

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Misura delle caratteristiche di tessuto osseo umano
in condizioni patologiche tramite analisi
microtomografica: primi risultati**

Rossella Bedini (a), Pietro Ioppolo (a), Raffaella Pecci (a),
Franco Marinozzi (b), Fabiano Bini (b), Elisa Pepe (b), Andrea Marinozzi (c)

(a) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

*(b) Dipartimento di Meccanica e Aeronautica, Facoltà di Ingegneria,
Sapienza Università di Roma*

(c) Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Campus Bio-Medico di Roma

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

09/7

Istituto Superiore di Sanità

Misura delle caratteristiche di tessuto osseo in condizioni patologiche tramite analisi microtomografica: primi risultati.

Rossella Bedini, Pietro Ioppolo, Raffaella Pecci, Franco Marinozzi, Fabiano Bini, Elisa Pepe, Andrea Marinozzi
2009, 37 p. Rapporti ISTISAN 09/7

Questo lavoro di acquisizione ed elaborazione di quattro campioni di tessuto osseo spugnoso, prelevati da teste femorali di pazienti viventi, in condizione fisiologica o patologica, è stato svolto *in primis* per verificare gli effetti di un'eventuale patologia sul tessuto osseo. Utilizzando la metodica microtomografica, si è voluto contribuire alla sua conoscenza e diffusione e si è voluto porre le basi per un impegnativo lavoro di ricerca che ha come scopo quello di valutare l'effetto della patologia sulle caratteristiche meccaniche di elementi primari del tessuto osseo spugnoso. Le trabecole formano un'architettura particolare orientata in modo da sopportare sollecitazioni meccaniche a cui è sottoposta durante l'intera vita dell'essere umano. A causa dell'insorgere di alcune malattie però, tale struttura subisce delle variazioni che contribuiscono a modificare le sue proprietà meccaniche. Dopo la scansione e acquisizione dei dati utilizzando la Skyscan 1072, si è passato ad elaborare i dati in modo da evidenziare le conseguenze delle patologie (riduzione massa ossea, differente mineralizzazione del tessuto presente, irregolarità della struttura trasecolare, ecc.).

Parole chiave: Struttura trabecolare, Microtomografia tridimensionale, Patologie del tessuto osseo

Istituto Superiore di Sanità

Measure of the bone mechanical characteristics in pathological conditions by means of microtomography analysis: first results.

Rossella Bedini, Pietro Ioppolo, Raffaella Pecci, Franco Marinozzi, Fabiano Bini, Elisa Pepe, Andrea Marinozzi
2009, 37 p. Rapporti ISTISAN 09/7 (in Italian)

This work of acquisition and elaboration of four samples of spongy bone, extracted from femoral bone of living patients, in physiological or pathological condition, has been carried out at first in order to verify the effects of an eventual pathology on the bony woven. Using the micro-tomography method, we have contributed to its acquaintance and spread and we have placed the bases for a difficult research work that has the aim of estimating pathology's effect on the mechanical characteristics of primary elements of the spongy bone. The trabeculae form a detailed architecture, as to support mechanical solicitations to which they are subordinate during the life of the human being. With the development of some pathologies, this structure endures of the variations that contribute to modify its mechanical properties. After the scanning and acquisition of data using Skyscan 1072, we have elaborated the data in order to evidence the consequences of pathologies (reduction of bony mass, different mineralization of the present woven one, irregularity of the trabecular structure, etc.).

Key words: Trabecular structure, 3D microtomography, Pathologies of bone tissue

Per informazioni su questo documento scrivere a: rossella.bedini@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Bedini R, Ioppolo P, Pecci R, Marinozzi F, Bini F, Pepe E, Marinozzi A. *Misura delle caratteristiche di tessuto osseo in condizioni patologiche tramite analisi microtomografica: primi risultati*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009. (Rapporti ISTISAN 09/7).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2009

INDICE

1. Il tessuto osseo	1
1.1. Generalità.....	1
1.2. Organizzazione morfologica delle ossa.....	1
1.3. Composizione del tessuto osseo.....	2
1.3.1. La componente minerale.....	2
1.3.2. Fibre connettivali.....	3
1.3.3. La sostanza fondamentale anista.....	3
1.3.4. Cellule ossee.....	3
1.4. Organizzazione architetture del tessuto osseo.....	5
1.5. Unità strutturale dell'osso.....	6
1.6. Vascolarizzazione del tessuto osseo.....	6
1.7. Istogenesi dell'osso.....	7
1.8. Accrescimento delle ossa.....	9
1.9. Proprietà meccaniche del tessuto osseo spugnoso.....	10
1.9.1. Test meccanici.....	11
1.9.2. Quantificazione dell'architettura del tessuto osseo spugnoso.....	13
2. Osteoporosi	16
2.1. Definizione e classificazione della patologia.....	16
2.2. Conseguenze.....	17
2.3. Fattori di rischio.....	17
2.4. Diagnosi.....	18
2.5. Prevenzione e trattamento.....	20
3. Analisi sperimentale	21
3.1. Introduzione.....	21
3.2. Strumentazione utilizzata.....	21
3.2.1. Principio di funzionamento di un microtomografo.....	21
3.2.2. La radiazione utilizzata.....	22
3.2.3. Il microtomografo Skyscan 1072.....	23
3.3. Software utilizzati.....	24
3.4. Materiali e metodi.....	25
3.4.1. Ricostruzione 3D.....	26
3.4.2. Analisi dei campioni.....	27
3.5. Risultati.....	29
3.5.1. Prima elaborazione.....	29
3.5.2. Seconda elaborazione.....	29
3.5.3. Terza elaborazione.....	30
3.6. Discussione.....	33
3.7. Conclusioni.....	36
Bibliografia	37

1. IL TESSUTO OSSEO

1.1. Generalità

Il tessuto osseo fa parte, insieme alla cartilagine, dei tessuti connettivi specializzati nella funzione di sostegno. L'appartenenza del tessuto osseo ai tessuti connettivi è giustificata sia per la sua origine dal mesenchima, il tessuto embrionale che funge da matrice per tutti i tessuti di questo genere, sia per la sua costituzione, essendo formato da cellule e da sostanza intercellulare composta da fibre collagene e sostanza fondamentale anista.

La peculiarità del tessuto osseo è quella di essere mineralizzato: infatti la sostanza intercellulare è per la maggior parte impregnata di cristalli minerali, in prevalenza fosfato di calcio. La presenza di minerali, come pure l'abbondanza e la particolare distribuzione delle componenti organiche della sostanza intercellulare, conferiscono a questo tessuto spiccate proprietà meccaniche di durezza e di resistenza alla pressione, alla trazione e alla torsione. In virtù di queste proprietà, il tessuto osseo rappresenta un materiale ideale per la formazione delle ossa dello scheletro, che costituiscono nel loro insieme l'impalcatura di sostegno dell'organismo.

Inoltre, dato il notevole contenuto di sali di calcio, il tessuto osseo rappresenta il principale deposito di ione calcio per le necessità metaboliche dell'intero organismo. La deposizione del Ca nell'osso e la sua mobilizzazione, finemente controllate da meccanismi endocrini, contribuiscono in modo sostanziale alla regolazione dei livelli plasmatici di questo ione (1).

1.2. Organizzazione morfologica delle ossa

Il tessuto osseo può formare tipi diversi di ossa, cioè si organizza in modo da costituire osso compatto o osso spugnoso.

Il tessuto osseo compatto appare come una massa solida, densa con la presenza esclusivamente di microscopici canali; è infatti privo di cavità macroscopicamente evidenti.

Il tessuto osseo spugnoso ha questo nome in quanto appare conformato come una spugna, con travate ossee, dette trabecole, variamente orientate e intersecate tra loro e delimitanti cavità, le cavità midollari, che in vivo sono ripiene di midollo osseo ematopoietico.

Nello scheletro di un uomo adulto circa l'80% della massa scheletrica è rappresentata da tessuto compatto, il quale forma intorno a tutte le ossa un rivestimento solido ed è quindi responsabile delle funzioni principali svolte dallo scheletro: protettiva e di sostegno. Il rimanente 20% della massa dell'osso è data da tessuto spugnoso.

Il tessuto osseo vero e proprio è rivestito da una sottile lamina fibrosa, il periostio, che provvede alla nutrizione dell'osso giacché, attraverso di esso, arrivano al tessuto i vasi sanguigni e i nervi ed ha la capacità sia di formare l'osso durante la crescita che di risanare fratture.

Dal punto di vista dello sviluppo, il periostio dà origine all'endostio e ne rimane in continuità.

L'endostio riveste le cavità che si trovano all'interno delle ossa (cavità midollari), le strutture trabecolari e l'intero osso compatto.

Dal punto di vista morfologico l'osso può appartenere ad una delle tre tipologie esistenti.

L'osso lungo (esempio il femore, omero, ecc.) è caratterizzato da due estremità, un'epifisi superiore prossimale e un'epifisi inferiore distale. Le epifisi sono costituite da tessuto osseo spugnoso, rivestito da una lamina di osso compatto. Interposto fra le due epifisi vi è un corpo, diafisi, per lo più di forma triangolare, formato da tessuto compatto recante nella parte intermedia il canale midollare. Posta precisamente tra ciascun estremo della parte midollare e la rispettiva epifisi vi è una zona in cui si trova la cartilagine di accrescimento, chiamata metafisi.

L'osso largo o piatto (esempio: volta cranica, osso iliaco, ecc.) è la tipologia di osso dove la larghezza e la lunghezza prevalgono sullo spessore, che è costituito essenzialmente da due lame di tessuto compatto fra le quali si interpone uno strato di tessuto spugnoso (diploe).

L'osso breve o corto (vertebre, strutture carpali e tarsali, ecc.) è la varietà di osso avente le tre dimensioni piuttosto equilibrate, formata alla periferia da tessuto compatto e al centro da tessuto spugnoso.

A carico della superficie esterna, nella maggior parte di questi tipi di ossa, si riscontrano delle sporgenze o eminenze di varia forma e grandezza dette apofisi, distinte in articolari (condili) e non articolari a seconda che fungano rispettivamente da capi articolari o da punti di inserzione per tendini e muscoli, o più semplicemente da punti di forza dell'osso stesso.

Il modello classico al quale fare riferimento per avere una descrizione accurata della struttura macroscopica dell'osso, è l'osso lungo.

1.3. Composizione del tessuto osseo

L'osso è costituito per il 70% da minerali e per il 30% da matrice organica. La matrice organica è formata per il 98% di proteine, delle quali il 95% collageni (fibre connettivali) e il 5% non collageni (sostanza fondamentale anista), mentre il restante 2% della matrice organica è composto da cellule ossee.

1.3.1. La componente minerale

La componente minerale è rappresentata da cristalli di sali di calcio, prevalentemente fosfato di calcio, a cui si aggiungono piccole quantità di carbonato di calcio, fluoruro di calcio, fosfato di magnesio. Il fosfato di calcio è presente sotto forma di cristalli di apatite, la cui formula chimica è $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6^{++}$; le due cariche positive sono di norma neutralizzate dal legame con due ioni ossidrilici (OH^-), formando così la idrossiapatite, ma si possono ritrovare anche altri anioni (ione carbonato nella carbonato-apatite, ione fluoruro nella fluoroapatite). Il cristallo si origina dall'impilamento delle singole celle elementari e ha la forma di un ago lungo e sottile, spesso circa 2 nm e lungo 20-40 nm. I cristalli di apatite tendono a disporsi parallelamente sia tra loro che alle microfibrille collagene, di cui ricoprono la superficie e permeano le porosità.

Durante il processo di formazione dei cristalli di idrossiapatite, il fosfato di calcio precipita inizialmente sotto forma di minutissimi aggregati amorfi. Questi nuclei vengono rapidamente sostituiti da sottilissimi cristalli aghiformi disposti parallelamente a molecole filamentose della sostanza fondamentale, detti filamenti assili (o *crystal ghosts*), in rapporto col periodo delle microfibrille collagene. Tali cristalli crescono assumendo l'aspetto tipico dei cristalli di apatite, occupando progressivamente gran parte dello spazio interposto tra le microfibrille collagene e permeando le microfibrille stesse. Una volta formati i cristalli di apatite, la deposizione di nuovo minerale può avvenire sia per formazione di nuovi cristalli che per apposizione sui

cristalli preesistenti. Tale fenomeno è finemente regolato dalle cellule ossee tramite la produzione di specifiche molecole della matrice ossea.

1.3.2. Fibre connettivali

Le fibre connettivali sono rappresentate per la quasi totalità da fibre collagene, composte da collagene di tipo I. Il collagene dell'osso possiede un elevato numero di legami crociati che tengono unite le singole molecole di tropocollagene. Le microfibrille collagene presentano la tipica striatura trasversale, con periodo di 70 nm, e si aggregano a formare fibre collagene di spessore rilevante (5-10 μm) soltanto nel cosiddetto tessuto osseo fibroso, mentre nell'altra varietà di tessuto osseo, chiamato lamellare, le microfibrille collagene (spesse circa 60 nm) non tendono a riunirsi in fibrille ma formano un feltro omogeneo. Dal periostio si dipartono spessi fasci di fibre collagene che penetrano all'interno del tessuto osseo corticale e si perdono nella sostanza intercellulare dell'osso: questi fasci costituiscono le fibre perforanti di Sharpey, che ancorano il periostio alla superficie dell'osso. L'abbondante contenuto in collagene è il principale responsabile della marcata acidofilia della sostanza intercellulare dell'osso.

Le fibre elastiche sono virtualmente assenti, ad eccezione di una piccola quota presente nelle fibre perforanti di Sharpey, mentre le fibre reticolari sono localizzate a livello della membrana basale che circonda i vasi sanguigni intraossei, ma non sono presenti nella sostanza intercellulare vera e propria dell'osso.

1.3.3. La sostanza fondamentale anista

La sostanza fondamentale anista è costituita da una varietà di macromolecole, tra cui i propeoglicani, le glicoproteine e le sialoproteine, grazie alle quali svolge funzioni diverse nei differenti processi a cui partecipa. La sostanza fondamentale anista, ad esempio, riveste un ruolo importante nei processi di mineralizzazione grazie all'azione delle glicoproteine e consente l'adesione delle cellule alla matrice ossea, per mezzo delle sialoproteine.

1.3.4. Cellule ossee

Le cellule proprie del tessuto osseo sono morfologicamente distinguibili in 4 varietà: le cellule osteoprogenitrici (dette anche preosteoblasti), gli osteoblasti, gli osteociti e gli osteoclasti. Di queste, cellule osteoprogenitrici, osteoblasti e osteociti sono in realtà fasi funzionali consecutive dello stesso tipo di cellule, derivate dalla differenziazione della cellula mesenchimale dei tessuti connettivi; sono pertanto considerabili come cellule autoctone dell'osso. Gli osteoclasti, per contro, derivano da precursori immigrati nel tessuto osseo dal sangue, i cosiddetti preosteoclasti, i quali a loro volta si differenziano da cellule staminali del midollo osseo ematopoietico (2).

I preosteoblasti hanno forma fusata o ovalare, con citoplasma scarso e basofilo e nucleo eucromatico con grande nucleolo. Si collocano sulle superfici libere delle ossa, nello strato più interno del periostio e nell'endostio, in vicinanza dei capillari sanguigni. Le cellule osteoprogenitrici sono dotate di capacità proliferativa, che si manifesta in modo particolare durante l'accrescimento corporeo, in quanto sono in grado di secernere proteine addette all'accrescimento osseo, azione che può comunque esplicarsi anche durante la vita adulta. Quando imboccano la via del differenziamento, le cellule osteoprogenitrici si trasformano in osteoblasti.

Gli osteoblasti hanno forma globosa o poliedrica e tendono a giustapporsi le une alle altre a formare delle lamine epitelioidi a ridosso delle superfici ossee in via di formazione. Hanno dimensioni rilevanti (circa 20 μm), un nucleo rotondeggiante con grande nucleolo e un citoplasma abbondante e basofilo. Gli osteoblasti sono uniti tra loro e con gli osteociti vicini tramite giunzioni serrate (o *gap junctions*), attraverso le quali le cellule si scambiano molecole, segnale per la coordinazione dell'attività metabolica, per la deposizione della matrice ossea e per la sua mineralizzazione. A quest'ultimo scopo contribuirebbero, inoltre, altre molecole prodotte dagli stessi osteoblasti, tra le quali vanno ricordate l'osteonectina, che favorisce la nucleazione dei cristalli minerali, e la osteocalcina, che agirebbe invece da inibitore della precipitazione di fosfato di calcio.

La produzione della matrice ossea e la sua mineralizzazione avvengono secondo un orientamento ben preciso: inizialmente l'osteoblasto depone osso dal lato rivolto verso la superficie ossea preesistente e solo successivamente ne depone da ogni lato tutto attorno a sé, di modo che ciascuna cellula si allontana progressivamente dalle circostanti a causa dell'interposizione di sostanza intercellulare. A questo punto l'osteoblasto rallenta sostanzialmente la sua attività metabolica e si trasforma in un osteocita, mentre nuovi osteoblasti si differenziano col tempo dalle cellule osteoprogenitrici. Quando il processo di formazione di nuovo tessuto osseo si è esaurito, gli osteoblasti che rimangono a ridosso della superficie ossea cessano la loro attività, riducono i loro organuli e si trasformano in una membrana di cellule appiattite, le cosiddette cellule di rivestimento dell'osso (*bone lining cells*), a cui si attribuisce un ruolo nel mediare gli scambi tra vasi sanguigni e osteociti.

Gli osteoblasti producono e secernono fattori solubili, il più studiato dei quali è il fattore di crescita trasformante (*Transforming Growth Factor- β*) (TGF- β) che è un potente stimolatore capace di modulare la proliferazione delle cellule osteoprogenitrici, di promuovere il loro differenziamento in osteoblasti e di incrementare il metabolismo e le sintesi macromolecolari degli osteoblasti maturi (3).

Gli osteoblasti sono anche coinvolti nei processi di rimaneggiamento dell'osso. Infatti, queste cellule sono in grado di innescare il riassorbimento della matrice ossea sia indirettamente, in quanto producono fattori solubili che attivano gli osteoclasti, le cellule preposte al riassorbimento osseo, sia direttamente, in quanto secernono enzimi proteolitici capaci di scindere i componenti della matrice organica dell'osso.

L'osteocita è una cellula stellata, con un corpo cellulare a forma di lente biconvessa e numerosi prolungamenti citoplasmatici. Presenta un piccolo nucleolo e un citoplasma tenuemente basofilo. Solo cellule terminali, con autonomia di vita finita. Il corpo dell'osteocita rimane racchiuso in una nicchia scavata nella sostanza intercellulare ossea, detta lacuna ossea, la cui forma ricalca quella della cellula, mentre i prolungamenti sono accolti all'interno di sottili canali scavati nel tessuto osseo e definiti canalicoli ossei. Alle loro estremità, i prolungamenti di un osteocita sono connessi mediante giunzioni serrate con quelli degli osteociti circostanti. Tra la membrana plasmatica del corpo cellulare e dei prolungamenti e la matrice mineralizzata rimane uno spazio sottile occupato da tessuto osteoide che non mineralizza. Attraverso il tessuto osteoide delle lacune e dei canalicoli ossei, l'acqua e le sostanze disciolte (gas respiratori e metaboliti) riescono a raggiungere tutti gli osteociti, anche quelli più distanti dai vasi sanguigni. Metaboliti e molecole segnale disciolti nel citoplasma possono inoltre essere scambiate tra gli osteociti per il tramite delle giunzioni serrate. Quando l'osteocita giunge al termine del suo ciclo vitale, esso ritrae i propri prolungamenti e degenera. Sono le cellule tipiche dell'osso maturo, responsabili del suo mantenimento e anche capaci di avviarne il rimaneggiamento.

Gli osteoclasti sono cellule giganti (100-200 μm), plurinucleate in quanto originate dalla fusione dei singoli precursori mononucleati: in un singolo osteoclasto possono infatti essere presenti fino a 50 nuclei, con nucleolo ben evidente. Il citoplasma è acidofilo. L'osteoclasto è

aderente alla matrice mineralizzata in via di riassorbimento ed è solitamente accolto in una cavità, detta lacuna di Howship, che si forma a seguito dell'azione erosiva della cellula sull'osso. Sul versante della cellula che si appone all'osso è visibile il cosiddetto orletto increspato, che appare come un ispessimento della superficie cellulare con una sottile striatura disposta perpendicolarmente alla superficie stessa.

Gli osteoclasti sono cellule preposte al riassorbimento della matrice ossea. Questo processo inizia con la dissoluzione della componente minerale dovuta all'acidificazione del microambiente della zona sigillata. A questo livello la anidraasi carbonica, sita sul versante dell'orletto increspato, genera acido carbonico a partire da CO_2 e H_2O . L'abbassamento del pH che ne consegue nell'ambiente extracellulare porta alla dissoluzione dei cristalli di apatite. L'azione erosiva dell'osteoclasto si manifesta con la formazione della lacuna di Howship. Una volta formata una prima lacuna, l'osteoclasto si distacca dalla matrice ossea, si muove per moto ameboide su una porzione di osso adiacente a quella appena riassorbita, aderisce nuovamente e forma una nuova lacuna. Procedendo un po' come una ruspa che compie uno sterro, l'osteoclasto procede lungo l'osso scavandovi solchi profondi. Nel loro insieme, più osteoclasti attivati riescono in un tempo relativamente breve a riassorbire porzioni anche cospicue di osso. La funzione osteoclastica è finemente regolata da fattori ormonali e locali (4).

1.4. Organizzazione architettonica del tessuto osseo

In base alle dimensioni e alla disposizione delle fibre collagene, si distinguono due varietà di tessuto osseo, il fibroso e il lamellare.

Il tessuto osseo fibroso è caratterizzato dalla presenza di fibre collagene di dimensioni rilevanti (5-10 μm di diametro) ma che non seguono un orientamento definito, per cui esse appaiono intrecciarsi in tutte le direzioni dello spazio. Gli osteociti, occupano lacune scavate negli interstizi tra le fibre collagene senza un ordine preciso. Le fibre si dispongono intorno ad un canale centrale occupato da un vaso sanguigno, detto canale di Haver. Le strutture che si formano sono denominate osteoni primitivi, e non vanno confusi con gli osteoni propriamente detti che caratterizzano la varietà omonima di tessuto osseo lamellare. Il tessuto osseo fibroso è il primo ad essere deposto, sia durante lo sviluppo fisiologico che nella riparazione di fratture, dopo di che esso viene rapidamente riassorbito e rimpiazzato con tessuto osseo di tipo lamellare. Ne rimane soltanto a livello delle inserzioni dei tendini e dei legamenti.

Il tessuto osseo lamellare è la varietà più diffusa, costituendo la quasi totalità dell'osso compatto e buona parte dell'osso spugnoso. Esso è caratterizzato dall'ordinata disposizione delle fibre collagene e degli osteociti, che si dispongono in strati sovrapposti, detti lamelle ossee. A seconda della disposizione delle lamelle, si distinguono in lamellare semplice e lamellare osteonico.

Il tessuto osseo lamellare semplice è caratterizzato da un numero limitato di lamelle con andamento parallelo. Questo forma le trabecole, le lamine ossee più sottili, i sistemi limitanti, o circolari, interno ed esterno della diafisi delle ossa lunghe, in cui le lamelle sono parallele alle superfici diafisarie interna ed esterna.

Il tessuto osseo lamellare osteonico è caratterizzato da un numero variabile di lamelle (8-20) disposte concentricamente attorno al canale di Havers, che costituiscono l'osteon.

Secondo alcuni studi, in ogni lamella le microfibrille collagene formano un feltro più o meno fitto intrecciandosi in ogni direzione dello spazio. A lamelle più sottili (circa 3 μm), ricche in microfibrille e relativamente povere in cristalli di apatite, si alternano lamelle più spesse (circa 7 μm), scarse in microfibrille e più mineralizzate. In queste ultime lamelle sono scavate le lacune ossee che accolgono i corpi degli osteociti. Questo modello consente anche di spiegare le

notevoli proprietà di resistenza meccanica del tessuto osseo lamellare: le lamelle più ricche in microfibrille sarebbero infatti più plastiche e più adeguate ad assorbire urti e sollecitazioni meccaniche di tensione e di torsione, mentre quelle più ricche in minerale sarebbero più rigide e più adatte a sopportare senza deformarsi le forze di pressione applicate sul segmento osseo. Sovrapponendosi a strati, i due tipi di lamelle unirebbero le loro proprietà meccaniche realizzando un edificio leggero e straordinariamente resistente.

1.5. Unità strutturale dell'osso

L'unità fondamentale del tessuto osseo compatto è l'osteone. Immaginati nelle 3 dimensioni, gli osteoni appaiono come delle lunghe strutture cilindriche di 200-250 μm di diametro, il cui asse longitudinale tende a disporsi parallelamente alle linee di forza applicate su un dato segmento osseo. Così il femore, che sostiene il peso del corpo ed è quindi soggetto a forze applicate in senso longitudinale, è formato in prevalenza da osteoni disposti parallelamente al suo asse maggiore. Analogamente, gli osteoni tendono a disporsi paralleli gli uni agli altri nei distretti scheletrici dove prevalgono forze di tensione.

Le lamelle di questi osteoni appaiono costituite da microfibrille collagene che tendono ad orientarsi preferenzialmente in senso longitudinale. Per questi osteoni, particolarmente resistenti alla trazione, è stato proposto il termine di osso lamellare osteonico a fibre parallele.

Gli osteoni costituiscono unità funzionali pressoché autonome, traendo il nutrimento per le loro cellule dal vaso sanguigno che percorre il canale di Havers. Di conseguenza, fenomeni di riassorbimento osseo che coinvolgano un osteone influenzano solo marginalmente gli osteoni vicini. Sono tuttavia presenti dei collegamenti tra vasi sanguigni di osteoni contigui, sotto forma di rami che decorrono quasi ad angolo retto tra un vaso haversiano e un altro, percorrendo canali scavati nella matrice ossea orientati perpendicolarmente ai canali di Havers, detti canali di Volkmann.

L'osso va incontro a continui processi di riassorbimento e deposizione di tessuto, finalizzati ad adeguarlo in continuazione al carico meccanico applicato su di esso. Di conseguenza, gli osteoni preesistenti possono venire riassorbiti, in tutto o in parte, e nelle cavità che così si formano ne vengono depositi di nuovi. Gli interstizi tra osteoni contigui sono pertanto occupati da porzioni di precedenti osteoni residue da precedenti processi di riassorbimento, che nel loro insieme prendono il nome di sistema interstiziale o breccia ossea. I limiti degli osteoni e delle porzioni di breccia ossea sono evidenziati da sottili lamine, chiamate linee cementanti, al cui livello i canalicoli ossei si arrestano. La superficie esterna delle ossa mature, come pure la superficie del canale diafisario delle ossa lunghe, sono delimitate da un sottile strato di osso lamellare semplice, composto da alcune lamelle a decorso parallelo, che costituiscono, rispettivamente, il sistema limitante, o circonferenziale, esterno e interno.

Nella parte spugnosa dell'osso l'unità strutturale è la trabecola; la trabecola ideale ha la forma di una mezzaluna con un raggio di 600 μm , spessa circa 50 e lunga 1 mm.

Come per il tessuto osseo compatto, anche le trabecole sono sostenute da linee cementanti (5).

1.6. Vascolarizzazione del tessuto osseo

La circolazione del sangue è strettamente connessa alla crescita, al modellamento e al rimodellamento dell'osso.

La sostanza compatta delle ossa lunghe possiede una rete vascolare molto intensa. I vasi del tessuto osseo compatto provengono dal canale midollare e dal periostio. Nel primo caso, una o più arterie nutritizie penetrano da uno o più fori nutritizi nello spessore del tessuto osseo e raggiungono, attraverso un canale nutritizio, il canale midollare. Qui si dividono in rami a decorso longitudinale, che in parte irrorano il midollo osseo, in parte rientrano nella sostanza compatta. Altri vasi passano direttamente nella sostanza compatta dal periostio, attraverso sottili forellini. Le epifisi delle ossa lunghe sono vascolarizzate dai rami diafisari e da arterie di origine periostale, che si portano in profondità a livello delle epifisi. Un'irrorazione di questo tipo è anche presente nelle ossa piatte e brevi. Il drenaggio venoso avviene tramite un percorso venoso che affianca le arterie di alimentazione.

Per quanto riguarda la rete di innervazione, non si hanno ancora conoscenze approfondite. È noto però che i canali midollari, il periostio e il canale di Havers sono innervati e che in questo ultimo sono presenti fibre nervose scarsamente mielinizzate. L'osso sembra inoltre essere ricco di fibre nervose che scorrono lungo i vasi adiacenti alle trabecole ossee.

1.7. Istogenesi dell'osso

Il tessuto osseo non deve essere inteso come una struttura stabile, definitiva. Come qualsiasi altro tessuto non rimane mai lo stesso, ma si rinnova di continuo con un incessante lavoro di demolizione e riedificazione che ne modifica la forma, la struttura e lo adegua alle esigenze del momento.

Durante lo sviluppo scheletrico ovviamente prevarranno i processi costruttivi che porteranno ad un incremento della sua larghezza e lunghezza, mentre i processi demolitivi compariranno con l'avanzare dell'età. In realtà anche negli anni di più attiva costruzione non mancheranno processi di demolizione, soprattutto nelle zone soggette a carico minore, così come nell'età involutiva non cesseranno i processi appositionali.

Questo lavoro continuo di trasformazione e di modellamento nell'architettura del tessuto osseo scaturisce sia dall'azione proliferativa degli osteoblasti presenti nel periostio più profondo e nell'interno del tessuto osseo stesso, cui competono i processi di edificazione, sia dall'azione contraria degli osteoclasti a cui competono i processi di distruzione con il meccanismo del cosiddetto riassorbimento lacunare o liscio.

L'osso si sviluppa sempre per sostituzione di un preesistente tessuto, sia esso il mesenchima oppure un tessuto connettivo differenziato. I processi che portano alla genesi di tessuto osseo nel contesto di un altro tessuto prendono il nome, nel loro insieme, di ossificazione o osteogenesi. Questi processi sono massimi durante la vita prenatale e rimangono sostenuti per tutto il periodo dello sviluppo.

Si distinguono tre tipi fondamentali di ossificazione (6): la diretta, la mantellare, la indiretta, la pericondrale e la endocondrale.

L'ossificazione diretta, o membranosa è responsabile della formazione di ciò che successivamente costituirà il tessuto osseo compatto; è tipica delle ossa piatte della volta cranica e di ossa del massiccio facciale. Essa inizia da centri di ossificazione che si sviluppano nel mesenchima, in fasi precoci della vita fetale, oppure in membrane di tessuto connettivo fibroso denso evolute dal mesenchima, in fasi più tardive della vita intrauterina e nella vita postnatale.

L'ossificazione diretta procede per sei fasi:

1. differenziamento di una ricca trama vascolare;
2. differenziamento di cellule mesenchimali in cellule osteoprogenitrici, le quali a loro volta si trasformano in osteoblasti;

3. posizionamento degli osteoblasti in filiere simil-epiteliali e inizio della deposizione della matrice organica dell'osso, o tessuto osteoide;
4. mineralizzazione del tessuto osteoide, che si trasforma in osso fibroso;
5. trasformazione dei primi osteoblasti, intrappolati nelle lacune ossee, in osteociti, che avviene via via che prosegue la deposizione di osso; contemporaneamente nuovi osteoblasti si differenziano apponendosi alla superficie dell'osso neoformato, che si accresce progressivamente in spessore;
6. arrivo e differenziazione dei preosteoclasti in osteoclasti, i quali avviano la dissoluzione dell'osso fibroso che verrà successivamente rimpiazzato con osso lamellare da nuovi contingenti di osteoblasti; i residui delle membrane connettivali in cui si sono sviluppati i centri di ossificazione permangono tra le ossa piatte della volta cranica durante la vita infantile, costituendo le fontanelle e le suture; esse hanno la funzione di consentire l'incremento del volume della scatola cranica per tutto il periodo dell'accrescimento.

L'ossificazione mantellare avviene a livello del corpo della mandibola. Essa può essere considerata una variante di ossificazione diretta, in quanto avviene nel contesto di un mesenchima e poi di un tessuto connettivo, seguendo le stesse tappe già descritte per l'ossificazione diretta. La peculiarità di questa modalità di ossificazione è che l'osso in formazione si modella attorno ad un abbozzo cartilagineo conformato a ferro di cavallo, detto cartilagine del Meckel, che deriva dal mesenchima. Si ritiene che la cartilagine del Meckel svolga un'azione di induzione sulla differenziazione in senso osseo del mesenchima circostante. Tuttavia, a differenza di quanto avviene per gli abbozzi scheletrici cartilaginei nell'ossificazione indiretta, essa non ossifica, ma viene invece circondata completamente dal tessuto osseo e infine involge; il vuoto che rimane viene colmato da tessuto osseo. Solo nella regione del mento un piccolo tratto della cartilagine del Meckel viene inglobato nella mandibola e ossifica con meccanismo condrale.

L'ossificazione indiretta, o condrale è responsabile della formazione di ciò che successivamente costituirà il tessuto osseo spugnoso. È la variante più diffusa, interessando tutte le restanti ossa dello scheletro assile e degli arti, nonché la base del cranio. Tipicamente, l'osso è preceduto da un abbozzo cartilagineo che richiama la forma del futuro segmento osseo e che viene successivamente riassorbito e rimpiazzato da tessuto vero e proprio. Le ossa che si formano con tale modalità sono anche dette ossa di sostituzione. L'osso si forma sia alla superficie dell'abbozzo cartilagineo, apponendosi all'esterno tra cartilagine e pericondrio (ossificazione pericondrale) sia all'interno di questo (ossificazione endocondrale).

L'ossificazione pericondrale prende l'avvio da cellule osteoprogenitrici che si differenziano nel pericondrio, che si trasforma così in periostio. Si assiste all'incremento dei vasi del pericondrio, alla deposizione di tessuto osteoide che mineralizzando si trasforma in osso fibroso e al rimaneggiamento di quest'ultimo da parte degli osteoclasti, con successiva deposizione di osso lamellare. Le fasi della ossificazione pericondrale avvengono secondo modalità che ricordano l'ossificazione mantellare attorno alla cartilagine di Meckel. La differenza principale è che in questa l'osso si forma attorno al pericondrio della cartilagine del Meckel, mentre nella ossificazione pericondrale l'osso si appone direttamente alla superficie della cartilagine, al di sotto del pericondrio che si trasforma in periostio.

Negli abbozzi delle ossa lunghe, l'ossificazione pericondrale inizia già durante la vita intrauterina, ancor prima della comparsa del centro di ossificazione endocondrale diafisario, attorno alla porzione mediana della diafisi. Ciò porta alla formazione di un manicotto periostale di tessuto osseo, che si accresce sia in senso radiale che in senso longitudinale avvicinandosi alle epifisi. Dopo la nascita, osso pericondrale viene deposto anche a ridosso delle epifisi delle ossa lunghe, nonché delle restanti ossa brevi e piatte.

L'ossificazione endocondrale prende avvio già durante la vita intrauterina dai centri di ossificazione e procede per fasi, schematizzabili come segue:

- i condrociti, unità del tessuto cartilagineo, proliferano, riunendosi in gruppi voluminosi con scarsa sostanza intercellulare interposta;
- i condrociti vanno incontro a ipertrofia: nel loro citoplasma compaiono gocce di grasso, accumuli di glicogeno;
- i condrociti liberano in seguito vescicole della matrice e inducono la calcificazione della matrice cartilaginea;
- la matrice cartilaginea calcificata viene in parte erosa grazie all'intervento di cellule di natura osteoclastica, definite anche *condroclasti*, provenienti dal circostante osso periostale già formatosi, per cui le lacune cartilaginee si ampliano e confluiscono tra di loro;
- i vasi sanguigni penetrano in queste cavità e si fanno strada a partire dal pericondrio, accompagnati da cellule mesenchimali;
- le cellule mesenchimali sopraggiunte coi vasi sanguigni si differenziano in cellule osteoprogenitrici e poi in osteoblasti, i quali depongono osso fibroso a ridosso dei residui della matrice cartilaginea calcificata;
- gli osteoclasti intervengono a riassorbire sia l'osso fibroso che la matrice cartilaginea mineralizzata, mentre nuovi osteoblasti depongono osso lamellare. Parte delle cellule mesenchimali penetrate assieme ai vasi sanguigni danno origine a nuovi vasi e al midollo osseo ematopoietico (7).

Ancor prima della nascita, nel centro della diafisi degli abbozzi cartilaginei delle ossa lunghe compaiono i centri di ossificazione endocondrale primari, o diafisari. Dopo la nascita, all'interno delle epifisi compaiono i centri di ossificazione secondari, o epifisari. Contemporaneamente a questi, si formano centri di ossificazione endocondrale anche al centro degli abbozzi delle restanti ossa brevi e piatte. Fatta eccezione per i segmenti scheletrici cartilaginei che non subiscono il processo di ossificazione (come ad es. la porzione sternale delle coste), la cartilagine viene progressivamente sostituita con osso. Nell'osso adulto, la cartilagine rimane solamente a livello delle superfici articolari (cartilagine articolare, o di incrostazione).

1.8. Accrescimento delle ossa

Grazie ai processi di crescita e di rimodellamento che persistono per tutto il periodo dell'accrescimento, i vari segmenti ossei assumeranno progressivamente la forma e le dimensioni definitive.

L'accrescimento in lunghezza delle ossa lunghe avviene grazie alla persistenza di tessuto cartilagineo proliferante a livello delle zone di transizione tra la diafisi e le epifisi. Questa cartilagine, detta cartilagine di coniugazione, presenta in successione topografica tutte le varie fasi che caratterizzano l'ossificazione endocondrale e si possono riconoscere infatti più strati adiacenti che, partendo dal versante epifisario, sono:

1. la zona della cartilagine a riposo, con piccoli gruppi isogeni di cellule globose;
2. la zona della cartilagine proliferante, detta anche seriata, in cui i condrociti proliferano dividendosi secondo un piano perpendicolare all'asse maggiore dell'osso; pertanto i gruppi isogeni sono formati da cellule disposte le une sulle altre in pile ordinate parallele all'asse maggiore dell'osso; l'accrescimento in lunghezza del segmento osseo è dovuto appunto all'attività proliferativa della cartilagine di questo strato;

3. la zona della cartilagine ipertrofica, con condrociti voluminosi infarciti di glicogeno e di lipidi;
4. la zona della cartilagine calcificata, i cui condrociti lasciano lacune vuote che vengono occupate da gettoni vascolari con condroclasti e cellule mesenchimali che poi divengono cellule osteoprogenitrici;
5. la zona di invasione ossea, o zona dell'osso neoformato, in cui sono presenti osteoblasti che depongono osso fibroso a ridosso dei residui della matrice cartilaginea calcificata e osteoclasti impegnati nei processi di riassorbimento.

Al termine dell'accrescimento corporeo, la cartilagine di coniugazione rallenta e poi cessa la proliferazione, viene raggiunta dal fronte di ossificazione e viene completamente sostituita da osso (chiusura delle epifisi).

L'accrescimento in larghezza delle ossa avviene per apposizione di osso dal periostio. Nelle scabrosità della superficie esterna delle ossa si dispongono nuovi vasi sanguigni accompagnati da cellule mesenchimali. Queste si differenziano in osteoblasti, che formano osteoni primitivi di osso fibroso attorno ai vasi neoformati, che saranno successivamente sostituiti con osso lamellare. Al termine dell'accrescimento, sulla superficie dell'osso vengono depositi alcuni strati di lamelle a decorso parallelo che costituiscono il sistema circonferenziale esterno. Nelle ossa lunghe, l'attività erosiva degli osteoclasti determina la formazione del canale diafisario, che si amplia progressivamente via via che il diametro della diafisi incrementa per apposizione di osso dal versante periostale. Quando l'osso ha raggiunto la taglia definitiva, da osteoblasti differenziatisi dall'endostio che riveste la superficie interna del canale diafisario vengono deposte le lamelle del sistema circonferenziale interno e uno strato sottilissimo di osso trabecolare.

Nelle ossa lunghe la combinazione di riassorbimento osseo sul versante interno e di deposizione ossea sul versante esterno è anche responsabile del cambiamento di forma delle estremità diafisarie. Un meccanismo analogo può spiegare l'incremento del raggio di curvatura delle ossa piatte della volta cranica, che si ottiene dalla combinazione di fenomeni di erosione sul versante intracranico e di apposizione sul versante esterno.

Questi fenomeni, che persistono per tutto il periodo dell'accrescimento corporeo e che sono il risultato di fenomeni di riassorbimento e deposizione di osso, con cambiamenti macroscopici della forma del segmento osseo interessato, vengono indicati nel loro insieme come rimodellamento osseo. Il rimodellamento può aver luogo anche in ossa completamente formate in risposta a intense e protratte sollecitazioni meccaniche, in corso di riparazione di fratture e in alcune malattie.

1.9. Proprietà meccaniche del tessuto osseo spugnoso

Il tessuto osseo spugnoso è un materiale altamente poroso ed ha una struttura interna molto complessa gerarchicamente divisibile (fibre di collagene, lamelle, ecc.). Tale suddivisione è importante per capire il comportamento meccanico del tessuto in quanto ogni livello contribuisce con proprietà meccaniche diverse, tanto che il tessuto osseo spugnoso può essere considerato un materiale composito dove si può identificare come matrice la struttura trabecolare e come materiale di riempimento il midollo.

Le trabecole sono considerate i costituenti reali nella sopportazione di carichi: costituite di cristalli di idrossiapatite incorporate in una matrice di fibre di collagene, creano un materiale rigido ma anche duttile. La struttura trabecolare può assumere forme diverse, ma in tutti i casi, lo spessore medio è più o meno lo stesso, 150-200 μm . In alcune strutture le trabecole

possono avere un orientamento pronunciato preferito, in altre questa caratteristica è difficile da riconoscere.

Al contrario, in base a misurazioni svolte su campioni ossei si è dedotto che il midollo osseo presente non contribuisce in modo significativo alla rigidità del tessuto osseo spugnoso, sottoposto ad un normale tasso di sollecitazione.

Il comportamento meccanico del tessuto osseo spugnoso è meglio descritto come viscoelastico.

La parte elastica di questo comportamento è dimostrata dall'abilità delle trabecole di ripristinare la completa geometria iniziale al rilascio di un carico applicato che non abbia superato il limite elastico; la parte viscosa invece è la responsabile del grado di dipendenza tra rigidità e grado di sollecitazione e di fenomeni correlati al comportamento assunto dal tessuto osseo in seguito a sollecitazione meccanica, come rilascio da stress o deformazione permanente.

Bisogna tuttavia specificare che, anche se le proprietà meccaniche sono dipendenti dal tasso di sollecitazione, il grado di dipendenza è molto debole: in conseguenza a ciò, per i tassi di stress presenti nelle normali attività, il tessuto osseo spugnoso può essere descritto come un materiale elastico.

Non esistono tecniche sperimentali per misurare in vivo le costanti elastiche del tessuto osseo spugnoso. I procedimenti che possono essere seguiti sono due:

1. test meccanici su campioni di osso prelevati in diversi siti anatomici e appartenenti a donatori con caratteristiche fisiche diverse;
2. quantificazione della architettura trabecolare da immagini acquisite con vari metodi (DEXA, TAC, RM...). È poi possibile infatti trovare relazioni generalmente valide tra costanti elastiche e parametri strutturali misurati sulle immagini acquisite, determinando le costanti di interesse in modo indiretto dalle misure morfologiche del campione analizzato.

Sono stati condotti molti studi per determinare il modulo di elasticità del tessuto in esame con entrambe le modalità e i dati ad oggi disponibili sembrano poter confermare che il range di appartenenza di questo valore è compreso fra 0,76 e 20 GPa, dipendente dalla direzione in cui il campione viene stressato, a dimostrazione della sua anisotropia.

Le proprietà sono definite al livello continuo, nel senso che considerando un volume rappresentativo contenente un grande numero di trabecole le qualità medie possono essere ritenute valide per il volume considerato; affinché valga quanto detto precedentemente, però, il volume deve essere limitato da un lato compreso fra i 3 e i 5 mm.

1.9.1. Test meccanici

La maggior parte delle trabecole sono caricate in compressione e curvatura. Per queste tipologie di carico è importante, al fine dell'analisi del comportamento meccanico, solo il modulo di Young. Esistono numerose tecniche per poterlo determinare, tra cui:

– *Test di tensione (compressione) uniassiale*

Viene effettuato collegando opportunamente il campione ad un impianto di tensione e applicandovi una forza senza che questa induca un momento. I campioni vengono sistemati in modo che la forza maggiore venga esercitata sulla porzione centrale e la tensione alla quale è sottoposto il campione viene misurata con un estensimetro inserito nella sua sezione media. Se si misurano la lunghezza del campione L prima della sollecitazione nella stessa direzione in cui verrà stressato, la forza applicata F , l'area

sottoposta a stress A e l'allungamento derivato δ si ottiene il modulo di Young applicando la seguente equazione:

$$E = F L / A \delta$$

– *Inarcamenti elastici e anelastici*

Tra le tecniche meno diffuse per il calcolo del modulo di Young c'è quella di estrapolare questa grandezza in seguito a inarcamenti provocati su trabecole isolate. Questa tecnica utilizza l'equazione classica di Eulero per l'inarcamento elastico di una trave:

$$\sigma = (\pi^2 / K^2) E (L / r)^2$$

dove σ è lo sforzo d'inarcamento critico determinato a partire dagli esperimenti, K è una costante di stato di contorno e L/r è il rapporto fra le dimensioni dell'esemplare. Questa equazione può essere però solamente usata quando il rapporto fra le dimensioni del campione, o della trabecola, è maggiore di 100.

– *Test di curvatura*

Il test di piegatura o curvatura consiste nell'applicazione di un momento flettente ed è molto utile per studiare le caratteristiche meccaniche delle ossa lunghe. Attraverso la prova di piegatura, la sezione d'osso in esame è sottoposta da un lato ad una tensione e dall'altro ad una compressione. Riuscendo a ricavare la rigidità del campione e la sollecitazione a cui è sottoposto da apposite formule e ipotizzando un'applicazione del carico attraverso tre punti è possibile calcolare E come segue:

$$E = S (L^3 / 48 I)$$

dove L è la lunghezza del campione e I è il momento di inerzia della sezione rispetto ad un asse neutrale.

– *Tecnica ultrasonica*

Le modalità con la quale il suono attraversa la materia dipendono da le proprietà elastiche di questa ultima e dalla densità:

$$v = \sqrt{(E / \rho)}$$

dove v è la velocità, E il modulo di Young e ρ la densità. Tale equazione può essere usata per calcolare il modulo di elasticità qualora si conosca la densità e la velocità di propagazione del suono nella materia. La velocità del suono può essere calcolata trasmettendo un'onda attraverso il campione e misurando con un oscilloscopio il tempo necessario all'onda per attraversarlo; la sua lunghezza diviso il tempo dà la velocità incognita.

– *Micro e nano test*

Si definiscono micro o nanotest quelle prove condotte su soggetti di dimensioni ridotti come trabecole, osteoni o lamelle interne agli osteoni. Queste prove richiedono grande responsabilità nella preparazione dei microcampioni e l'utilizzo di un estensimetro molto sensibile per misurarne gli spostamenti in seguito a sollecitazioni in tensione, compressione, torsione, etc. I campioni sono dell'ordine di 200 μm in larghezza e 2000 μm in lunghezza. Test di questo genere sono stati condotti su trabecole attraverso

compressione del campione in direzione della sua lunghezza ed estrapolando il modulo di Young dall'andamento della deformazione provocata ε :

$$\varepsilon = \Delta l / l_0 \quad \sigma = F/A \quad \sigma = E\varepsilon \quad E = \sigma / \varepsilon$$

dove Δl è la variazione in lunghezza registrata, l_0 la lunghezza iniziale, σ lo stress, F la forza applicata e A l'area della sezione sottoposta a sollecitazione.

– *Micro e nanoindentazione*

I test di dentellatura vengono usate principalmente per conoscere le proprietà meccaniche del tessuto osseo subcondrale e dello strato trabecolare in prossimità di giunzioni e articolazioni. Questi siti sono particolarmente interessati dal punto di vista clinico perché facilmente associabili a specifiche patologie, quale l'osteoartrite. Attraverso il test di dentellatura è possibile calcolare il modulo di Young e la forza correlata al tessuto osseo trabecolare del campione. Questi test sono di solito condotti utilizzando un penetratore smussato che, addentrandosi nel campione, determina una serie di stati attraverso i quali è possibile costruire la curva carico-spostamento. La forza dell'osso è stimata come massimo carico diviso l'area della sezione del penetratore. Il modulo di Young è calcolato come

$$E = S ((1 - \nu^2)/d)$$

dove S è anche l'inclinazione della curva carico-spostamento, ν il rapporto di Poisson caratteristico dell'osso (assunto pari a 0.3), d il diametro del penetratore.

1.9.2. Quantificazione dell'architettura del tessuto osseo spugnoso

Quantificare l'architettura del tessuto osseo spugnoso significa derivare proprietà spaziali e geometriche delle trabecole. L'interesse di effettuare questa analisi è da ricercare nel fatto che la struttura architettonica del tessuto sembra influenzare molto le sue proprietà meccaniche. Ad esempio pare che la porosità sia relazionata, in modo inversamente ed esponenzialmente proporzionale, alla forza dell'osso così come si è concluso che osteoni dove prevalevano fibre di collagene orientate principalmente in direzione longitudinale sono più forti e più rigidi in tensione rispetto a quelli dove le fibre sono per lo più orientati in direzione trasversale.

La disposizione trabecolare in un tessuto osseo spugnoso non è uniforme: alcune regioni sono molto dense, altre hanno solo trabecole sparse, in altri siti le trabecole sono più diffuse, in altri ancora meno. L'orientamento e il grado di anisotropia sono variabili che cambiano tra i diversi siti anatomici e fra i vari individui. Una spiegazione a questo fenomeno si è avuta negli ultimi anni quando si arrivò ad affermare che la disposizione delle trabecole non è affatto causale ma in modo ammirevole connessa con gli sforzi a cui esse debbano resistere. Le trabecole tendono infatti ad orientarsi nella stessa direzione in cui l'osso è sollecitato, creando una intensa rete di "montanti e ponti", nel quale è possibile identificare linee isostatiche formatesi naturalmente.

La quantificazione delle proprietà di un tessuto osseo spugnoso può avvenire utilizzando varie metodologie dotate di risoluzione compresa nel range 10-50 μm (8).

1.9.2.1. Parametri istomorfometrici

La definizione dei parametri istomorfometrici ha subito negli anni numerosi aggiornamenti anche in ragione delle nuove acquisizioni e dei progressi metodologici in tale ambito. Si è

reso quindi necessario, per consentire un utilizzo di questa metodica su ampia scala, definire una standardizzazione delle principali misurazioni istomorfometriche e della relativa nomenclatura cui fare riferimento. Sono quindi state precisate le definizioni dei principali parametri, qui di seguito descritti:

- *TOTAL VOLUME, TV* (mm³): volume totale preso in considerazione.
- *BONE VOLUME, BV* (mm³): volume occupato dalla sola componente ossea.
- *BONE VOLUME/TOTAL VOLUME, BV/TV(%)*: percentuale di tessuto osseo trabecolare costituito da osso mineralizzato e matrice osteoide rispetto al tessuto totale esaminato.
- *TRABECULAR BONE VOLUME FRACTION, Vv*: volume trabecolare in riferimento al volume totale considerato (volume trabecolare + volume midollare).
- *BONE SURFACE, BS* (mm²): superficie occupata dalla sola rete trabecolare.
- *BONE SPECIFIC SURFACE, BS/BV* (mm⁻¹): rapporto fra la superficie occupata dalla componente solida e il suo volume.
- *BONE SURFACE DENSITY, BS/TV* (mm⁻¹): rapporto tra la superficie ossa e il volume totale analizzato.
- *TRABECULAR THICKNESS, Tb.Th* (mm): parametro che rappresenta lo spessore delle trabecole. Per calcolarlo è necessario fare riferimento ad un modello strutturale delle trabecole esaminate.
- *TRABECULAR SEPARATION, Tb.Sp* (mm). Rappresenta la distanza presente fra le trabecole.
- *TRABECULAR NUMBER, Tb.N* (mm⁻¹). Indica il numero delle trabecole per unità di lunghezza.
- *TRABECULAR BONE PATTERN FACTOR, Tb.Pf* (mm⁻¹): indice che riduce la rete trabecolare ad un rapporto tra strutture concave e convesse, considerando una struttura concava come sinonimo di buona connettività mentre per convessa una struttura isolata.
- *EULER NUMBER, Eu.N* (mm⁻¹). Valutazione delle cavità ossee nel rapporto con le componenti trabecolare ad esse connesse. È un indice diretto della connettività trabecolare e può essere definito come il numero massimo di porzioni che possono essere rimosse dalla struttura senza che questa perda la sua integrità. Nelle strutture bidimensionali il numero di Eulero è dato dal numero di particelle ossee in queste identificabili (β_0) meno il numero di cavità presenti (β_1).

$$\chi = \beta_0 - \beta_1$$

Dato una struttura dell'osso 3D con β_0 particelle ossee separate, β_1 la connettività, e β_2 le cavità chiuse:

$$\chi = \beta_0 - \beta_1 + \beta_2$$

I numeri sopra elencati sono conosciuti come i tre numeri di Betti.

- *DEGREE OF ANISOTROPY, DA*: parametro indicante la dipendenza delle proprietà meccaniche in funzione alla direzione nelle quali queste sono state ricavate.
- *STRUCTURE MODEL INDEX, SMI*: stima della forma caratteristica in termini di plate and rods nelle rappresentazioni tridimensionali.
- SMI = 0 Ideal plates; SMI = 3 Ideal rods; SMI= 4 Ideal spheres.

- *FRACTAL DIMENSION, FD*: indicatore del rapporto esistente fra un punto e la sua posizione nello spazio con particolare riguardo alla complessità della struttura di cui fa parte.
- *POROSITY, Po (%)*: rapporto fra l'area occupata da cavità delimitate da struttura trabecolare e l'area totale (9-12).

1.9.2.2. Relazioni fra parametri istomorfometrici e proprietà meccaniche

Il metodo di studio per determinare queste relazioni consiste nel misurare parametri meccanici e strutturali su un gran numero di campioni e nel correlare i risultati utilizzando metodi statistici. Con tale procedimento è stata trovata una relazione valida fra costanti elastiche e parametri strutturali, ma la sua forma rimane ancora controversa a causa di una insufficiente conoscenza degli errori casuali che si possono verificare in sede di misurazione. Di solito i parametri strutturali vengono estratti da sezioni dei campioni analizzati, mentre le proprietà meccaniche vengono dedotte da test. Bisogna specificare però che i risultati ottenuti sono affetti da inaccuratezza nella valutazione dei parametri, nelle misure fornite dai test e in altri fattori che giustificerebbero il fatto che relazioni trovate in uno studio non sono valide per un altro. Tali inaccuratze sono ridotte almeno in parte nella valutazione dei parametri attraverso algoritmi informatici e software di simulazione; per questo motivo si prevede che le relazioni fornite con l'ausilio del computer siano più accurate di quelle fornite attraverso test sperimentali. In principio era stata trovata una relazione cubica tra la componente assiale del modulo di Young e la densità strutturale, analizzando un gruppo di campioni umani e bovini di tessuto osseo spugnoso e compatto. Successivamente si è trovata una relazione quadratica, che forniva risultati più accurati soltanto per i campioni umani. Studi condotti in seguito hanno infine fornito una relazione tra le due grandezze valida per il 94% dei casi analizzati:

$$E = 0.003715 \rho^{1.96}$$

In tutti questi studi, il modulo veniva determinato con test sperimentali. Proseguendo le osservazioni si scoprì che soltanto la frazione di volume osseo V_v avrebbe potuto giustificare al 94% la variazione del valore medio del modulo di Young. Dopo la conversione della frazione di volume V_v a densità strutturale, usando $\rho = 1800V_v$ la relazione ottenuta sperimentalmente può essere scritta

$$E = E_{\text{tissue}} 813 V_v^{1.93} = E_{\text{tissue}} 0.000424 \rho^{1.93}$$

dove con E_{tissue} è indicato il modulo di Young del materiale isotropico, dedotto con una analisi ad elementi finiti.

Al fine di migliorare i risultati ottenuti, è stato studiato se l'introduzione di altri parametri potesse contribuire a ridurre la varianza rimanente nella valutazione delle costanti elastiche: si trovò che introducendo alcune grandezze ($T_b.T_s$, $T_b.N$, ecc.) l'accuratezza dei risultati migliorava notevolmente.

2. OSTEOPOROSI

2.1. Definizione e classificazione della patologia

L'osteoporosi è una malattia a carattere progressivo che diminuisce la densità delle ossa agendo sulla loro componente minerale.

Questa patologia deriva da uno squilibrio nel sistema di regolazione ormonale che causa un'insufficiente formazione di tessuto osseo connettivale; tale situazione ha come conseguenza una mancata deposizione dei sali di calcio con il risultato di un difetto di sostanza ossea a livello delle strutture scheletriche che, in casi estremi, può essere causa di fratture spontanee.

Per comprendere meglio il meccanismo che conduce all'osteoporosi bisogna dire che l'osso, come già illustrato precedentemente, non è una struttura compatta e immutabile, ma un tessuto vivo che si rinnova continuamente attraverso un processo costituito da una prima fase di distruzione e una seconda di ricostruzione.

Dalla nascita e durante gli anni dello sviluppo corporeo, anche lo scheletro si accresce e aumenta la sua massa fino a raggiungere, verso i 20-30 anni, un valore massimo (picco di massa ossea). Fino al 40° anno di età circa, la quantità di osso eliminato viene rimpiazzata con altrettanto osso di nuova formazione senza perdita di massa ossea. Dopo i 40-45 anni la produzione di nuovo osso non riesce più a ricostruire completamente il tessuto distrutto dagli osteoclasti e con il passare degli anni in ambedue i sessi si va incontro ad una lenta e inesorabile perdita di sostanza ossea (osteoporosi senile).

Nelle donne nei primi anni dopo la menopausa, questa perdita (osteoporosi postmenopausale) avviene in maniera molto più rapida ed espone lo scheletro femminile al rischio di fratture già in età ancora relativamente giovane (55-60 anni). La causa nelle donne è la perdita della funzione ovarica che determina la scomparsa della produzione degli estrogeni, ormoni che, fra le altre funzioni, hanno quella di ostacolare la perdita di massa ossea.

L'osteoporosi rappresenta una delle complicanze più importanti della menopausa: la malattia si sviluppa in silenzio e quando cominciano a manifestarsi i primi sintomi è già in uno stadio avanzato.

L'osteoporosi viene divisa in primaria e secondaria. L'osteoporosi primaria può essere classificata come di tipo I o di tipo II. L'osteoporosi di tipo I (menopausale) insorge prevalentemente nelle persone di età compresa tra i 51 e i 75 anni, è sei volte più frequente nelle donne e si associa alla comparsa di fratture vertebrali e di Colles (frattura delle metafisi radiali).

L'osteoporosi di tipo II (senile) insorge negli individui di età superiore ai 60 anni, è due volte più frequente nelle donne e si associa alla comparsa di fratture vertebrali e dell'anca.

Tra il tipo I e il tipo II vi è una sovrapposizione notevole, pertanto questa classificazione ha un impiego clinico piuttosto limitato.

L'osteoporosi primaria che insorge nelle donne prima della menopausa e negli uomini in età più giovanile, eventualità peraltro rara, viene classificata come *idiopatica*.

Si ritiene che l'osteoporosi primaria sia una conseguenza dei cambiamenti ormonali che si verificano con l'invecchiamento, particolarmente della diminuzione dei livelli degli ormoni sessuali (estrogeni nelle donne, testosterone negli uomini). È probabile, comunque, che vi contribuiscano diversi altri fattori.

L'osteoporosi si definisce secondaria quando sussiste un'altra patologia di base che ne crea i presupposti. Si distingue dall'osteoporosi primaria in quanto quest'ultima non è direttamente

dipendente da nessun'altra patologia. È riconoscibile solo in una piccola parte dei casi di osteoporosi osservati tra gli anziani, nei quali la malattia primaria e quella secondaria spesso sono presenti entrambe. È invece alla base di una percentuale di casi molto maggiore tra le donne in premenopausa e gli uomini di età più giovane.

2.2. Conseguenze

L'osteoporosi causa una riduzione della massa e un'alterazione della struttura ossea, consistente in una diminuzione delle componenti minerali. Poiché dalla presenza di quest'ultimi dipende la resistenza meccanica dell'osso, questo diventa fragile e più esposto al rischio di fratture. Le fratture colpiscono più frequentemente il polso, il collo del femore e le vertebre.

Le fratture del polso e della colonna vertebrale sono tipiche dell'osteoporosi post-menopausale, mentre quelle del femore dell'osteoporosi senile.

Il rischio di frattura di polso dopo i 50 anni è del 15% nella donna e poco più del 2% nell'uomo; le percentuali riferibili alle fratture del collo del femore sono rispettivamente del 15% e del 5%. Fratture vertebrali sono molto frequenti in ambedue i sessi oltre i 70 anni.

Queste fratture non sono sempre collegate a cadute, ma possono essere causate da carichi di compressione dovuti a movimenti banali, quali una flessione, un sollevamento di un peso o un semplice cambiamento di posizione.

2.3. Fattori di rischio

La riduzione della massa ossea può essere la conseguenza del mancato raggiungimento di un picco ottimale di massa ossea nelle prime fasi dell'età adulta, di un aumento del riassorbimento osseo, del rallentamento dell'attività degli osteoblasti dopo che è stato raggiunto il picco di massa ossea. Nella maggioranza degli anziani è probabile che abbiano un ruolo tutti e tre questi fattori. La massa ossea ridotta, la perdita ossea rapida e l'aumento del rischio di fratture sono correlati con l'alta velocità del rimodellamento osseo. I principali fattori di influenza per la comparsa della patologia possono essere riassunti come segue:

- *Età*

L'effetto dell'età sullo scheletro è complesso. Il tasso di riassorbimento osseo sembra mantenersi costante, o addirittura aumentare, con gli anni; il tasso di formazione, invece, tende a diminuire. Tuttavia, l'osteoporosi non è una conseguenza inevitabile dell'invecchiamento; molte persone continuano a mantenere buoni livelli di massa ossea e di integrità strutturale anche dopo gli 80 e i 90 anni.

- *Sesso*

La frequenza più elevata delle fratture osteoporotiche nelle donne ha un'origine multifattoriale. Esse hanno un picco di massa ossea e una massa muscolare inferiori, rispetto agli uomini. Al momento della menopausa, la loro perdita ossea subisce un'accelerazione e può verificarsi una perdita anche durante l'età riproduttiva, particolarmente nel corso di un allattamento di lunga durata. Anche il minor diametro periostale delle ossa femminili contribuisce ad aumentare la fragilità dello scheletro. Un'altra ragione per la prevalenza dell'osteoporosi nel sesso femminile è il fatto che le donne vivono più a lungo degli uomini.

– *Razza*

Sebbene sia indubbio che la prevalenza dell'osteoporosi sia maggiore tra gli individui di razza bianca e asiatica che tra quelli di razza nera, i motivi di questo fenomeno non sono ben compresi; la prevalenza varia anche tra i diversi gruppi etnici. I bianchi hanno un picco di massa ossea inferiore rispetto ai neri, ma le differenze osservate nel rischio di fratture sembrano essere indipendenti dalle differenze di densità ossea. È possibile che abbiano un ruolo importante al riguardo le differenze di composizione corporea, di struttura scheletrica e di ricambio osseo.

– *Eredità*

Circa il 50-80% del picco di massa ossea è predeterminato geneticamente e la presenza di una familiarità per osteoporosi aumenta il rischio di fratture, indipendentemente dalla densità ossea.

– *Corporatura*

L'aumento del rischio di fratture associato con la corporatura esile è probabilmente di natura multifattoriale. Le donne magre producono meno estrogeni, specialmente dopo la menopausa. L'obesità può essere associata a un aumento della massa muscolare, a un maggiore impatto del carico sullo scheletro e ad una maggiore protezione di quest'ultimo, particolarmente dell'anca, da parte del tessuto adiposo sottocutaneo.

Altri fattori di rischio che possono influenzare l'apparizione dell'osteoporosi debbono essere ricercati nelle abitudini alimentari e nello stile di vita. Lo scarso consumo di alimenti ricchi di calcio, un eccessivo consumo di alcoolici, la vita sedentaria, la scarsa esposizione ai raggi del sole e il vizio del fumo sono tutti fattori aggravanti il rischio di osteoporosi. Inoltre l'uso di alcune medicine quali anticoagulanti, antiepilettici, cortisonici, lassativi, etc., possono favorire l'insorgere della malattia.

2.4. Diagnosi

L'iter diagnostico dell'osteoporosi deve basarsi su tre fasi integrate fra loro: l'esame clinico, le indagini strumentali e le indagini di laboratorio.

L'esame clinico consente di mettere in evidenza i possibili fattori di rischio. In certi casi sarà possibile rilevare i segni tipici di un'osteoporosi già in atto: sede e modalità di comparsa delle eventuali fratture, perdita di statura, tipo di dolore scheletrico. Tutte queste informazioni sono essenziali non solo per una corretta diagnosi, ma anche per orientare ulteriori accertamenti diagnostici differenziali e per ottimizzare gli indirizzi terapeutici.

Le indagini strumentali più moderne sono basate su tecniche di assorbimento di speciali radiazioni da parte del tessuto osseo al fine di determinare la densità minerale che è un indice quantitativo della massa ossea (*Bone Mineral Density*). Questi esami non sono né pericolosi né invasivi.

Attualmente le metodiche densitometriche sono le più sicure e utili ai fini della valutazione del contenuto minerale e della massa ossea, permettendo quindi anche una diagnosi precoce di osteoporosi. L'indagine densitometrica è in grado di misurare in modo abbastanza accurato e preciso la massa ossea e la sua densità minerale e, quindi, di verificare la resistenza meccanica dell'osso stesso. Si rileva un valore (massa ossea per unità di volume) che viene confrontato con quello medio registrato in soggetti sani dello stesso sesso durante il picco di massa ossea. L'unità di misura è rappresentata dalla deviazione standard da tale picco medio; se aumenta detta unità cresce anche il rischio di frattura. La misurazione della densità ossea può essere effettuata mediante diverse metodiche, tra cui:

- *Mineralometria ossea computerizzata (MOC)*
Viene effettuata con la tecnica della densitometria ossea a raggi X (DXA). Si tratta di un esame non invasivo che utilizza radiazioni a bassa energia e che permette di misurare soprattutto i segmenti ossei con scarsi tessuti molli. Il parametro che misura la densità minerale ossea è calcolato come rapporto tra il contenuto minerale dell'osso in relazione alla zona su cui si esegue la radiografia, cosa che elimina in larga parte l'effetto della dimensione del corpo, rendendo possibile comparare i risultati anche tra persone di differente conformazione. Tale esame può essere applicato a precise zone interessate da fratture, come vertebre lombari e zona femorale, o all'intero scheletro.
- *Mineralometria a singolo raggio fotonico*
Offre un'immagine della densità dell'osso in esame, ottenuta per attraversamento di raggi fotonici (radiazioni gamma), emessi da una sorgente radioattiva; i raggi subiscono un'attenuazione proporzionale al grado di mineralizzazione dell'osso attraversato.
- *Mineralometria a doppio raggio fotonico*
Il limite principale delle indagini a singolo fotone è quello di non poter indagare segmenti ossei circondati da abbondanti quantità di tessuto molle; per questo motivo sono nati quelli a doppio fotone con livelli energetici diversi in grado di eliminare quasi completamente le interferenze originate dai tessuti molli, permettendo quindi studi su parti importanti come vertebre e collo del femore.
- *Mineralometria ad ultrasuoni (US)*
È una tecnica densitometrica che sfrutta un fascio di ultrasuoni a bassa frequenza al posto dei raggi X. Consente una discreta precisione d'indagine, ma ha il limite di non consentire una misurazione della densità in tutto lo scheletro, ma solo del calcagno, rotula o falangi della mano. Si basa sulla modificazione che un fascio di ultrasuoni, a frequenza relativamente bassa, subisce attraversando l'osso. Vengono calcolati due parametri, la SOS (*Speed Of Sound*), che rappresenta la velocità di trasmissione del fascio ultrasonoro e il BUA (*Broadband Ultrasound Attenuation*), che è la riduzione d'ampiezza del segnale.
- *Tomografia assiale computerizzata*
Questa tecnica si basa sull'impiego di un'apparecchiatura che comprende una fonte radiante e uno strumento (tomografo) in grado di confrontare la densità dell'osso in esame con la densità di un campione standard di fosfonato di potassio (contenuto nella struttura a semiluna posta al disotto del paziente). Permette misurazioni selettive del corpo vertebrale sottoponendo il paziente a dosi di circa 100-1000 milliRem.
- *Radiologia Tradizionale*
La radiologia convenzionale è poco utile ai fini diagnostici e serve solamente per confermare o meno il sospetto di una frattura. È un'indagine strumentale che è in grado di evidenziare l'osteoporosi solo quando è in fase avanzata; non è quindi utilizzabile se si vuole riconoscere e trattare precocemente la malattia.

Nell'osteoporosi postmenopausale e senile gli indici di laboratorio sono nella norma. Tuttavia, alcuni parametri biochimici del metabolismo fosfocalcico sono indispensabili per riconoscere la presenza di importanti alterazioni della sua omeostasi e per una valutazione generale del turnover osseo. Nei casi in cui l'anamnesi o l'obiettività indichino la possibilità di patologie associate che interferiscano con il metabolismo osseo, le valutazioni di laboratorio più specifiche saranno di grande aiuto per inquadrare il singolo caso clinico.

2.5. Prevenzione e trattamento

La prevenzione delle fratture osteoporotiche è di importanza cruciale per evitare un fenomeno epidemico molto dispendioso. È necessario sviluppare programmi di prevenzione, destinati ai pazienti a rischio e a quelli con osteoporosi già diagnosticata, che comprendono l'apporto adeguato di calcio e di vitamina D tramite una dieta equilibrata, l'esecuzione regolare di esercizi fisici, l'astensione dal fumo e l'uso limitato di alcool e caffè. Esaminiamo brevemente questi fattori necessari per una adeguata prevenzione.

LA DIETA: l'alimentazione deve essere equilibrata con una somministrazione giornaliera di calcio di circa 800 mg nell'adulto, ma che deve aumentare fino 1300-1600 mg con l'avanzare dell'età, in gravidanza (1000-1300 mg), in allattamento (2000 mg) e in pre-menopausa (800-1000 mg). Sono da evitare eccessivi apporti di proteine e di sale da cucina in quanto favoriscono la perdita del calcio da parte del rene. Una dieta equilibrata deve contenere un quantitativo adeguato di vitamina K perché il deficit di questa vitamina è associato a un aumento del rischio di fratture.

L'ESERCIZIO FISICO: gli effetti degli esercizi di carico e di rafforzamento muscolare sulla densità ossea sono relativamente modesti. Tuttavia, il miglioramento dell'equilibrio e della forza muscolare riduce la probabilità di cadute e migliora le condizioni cardiovascolari.

IL FUMO: è ormai provato che il fumo favorisce lo sviluppo dell'osteoporosi. Le donne fumatrici presentano infatti livelli di estrogeni più bassi, una ridotta massa ossea, menopausa precoce e una costituzione corporea inferiore alla media.

L'ALCOOL: da evitare l'eccesso nel consumo di alcolici poiché influisce direttamente sulla funzionalità epatica e sull'assorbimento del calcio.

IL CAFFÈ: è bene limitarne l'uso, soprattutto nella post-menopausa, poiché contribuisce a peggiorare il bilancio del calcio attraverso l'eliminazione dello stesso con l'urina e le feci.

Per quanto riguarda la cura, una terapia farmacologica contro l'osteoporosi deve essere in grado di proteggere la qualità dell'osso, cercando di preservarne le proprietà strutturali e materiali.

I principali farmaci utilizzati a tale scopo sono supplementi di calcio e di vitamina D, in quanto questi agiscono aumentando l'assorbimento intestinale di calcio e di fosforo per favorire la neoformazione di osso, e inibitori del riassorbimento come estrogeni (in grado di prevenire la perdita ossea menopausale), bifosfonati, (che bloccano direttamente l'attività osteoclastica), calcitonina (una sostanza di natura ormonale che inibisce la decostruzione ossea tramite un'azione diretta sull'attività delle cellule deputate a tale scopo). Gli approcci terapeutici comprendono anche l'esecuzione regolare di esercizi fisici sotto carico e di altri provvedimenti volti a ridurre al minimo il rischio di cadute (13).

3. ANALISI SPERIMENTALE

3.1. Introduzione

Questa analisi sperimentale è stata svolta presso l'Istituto Superiore della Sanità e presso il dipartimento di Meccanica e Aeronautica dell'Università Sapienza di Roma.

Sono stati presi in considerazione quattro campioni di tessuto osseo spugnoso e ne sono state osservate e comparate le proprietà in seguito all'acquisizione con microtomografia.

Scopo di questa indagine è quello di determinare alcuni parametri che servano a quantificare l'architettura del tessuto osseo spugnoso, in condizioni fisiologiche e patologiche, al fine di verificare gli effetti causati dalla patologia, ormai ampiamente documentati in tante fonti letterarie, e di dedurre alcune caratteristiche meccaniche dei campioni analizzati.

3.2. Strumentazione utilizzata

3.2.1. Principio di funzionamento di un microtomografo

Una microtomografia computerizzata a raggi X (*micro Computerized Tomography* abbreviata in *microCT*) è una forma miniaturizzata della tradizionale Tomografia Assiale Computerizzata (TAC). Come quest'ultima quindi, permette di ricostruire la struttura interna di corpi opachi senza che questi vengano distrutti. Tale aspetto costituisce un grande vantaggio rispetto alle tecniche di microscopia convenzionali; qualunque microscopio ottico o elettronico, infatti, fornisce informazioni sulla struttura interna dei campioni considerati solo se questi vengono trattati e sezionati correttamente (14).

La microtomografia computerizzata fonda il suo funzionamento sull'utilizzo di un tubo radiogeno, generatore di raggi X, e un rivelatore di radiazione.

La sorgente di raggi X emette un fascio di radiazioni sottile e collimato, in modo da colpire solamente una sezione stretta del campione in esame; il fascio investe il campione e interagisce con la materia venendo così attenuato da quest'ultima, in maniera strettamente dipendente alla sua composizione interna. La radiazione che emerge dal campione colpisce un rivelatore di radiazione di tipo CCD (*Charge Coupled Device*) che una volta raccolti i dati li trasferisce ad un opportuno calcolatore.

Il sensore CCD, sensore superficiale ad accoppiamento di carica, è stato il primo rivelatore ad essere commercializzato con l'inizio dell'era digitale. È composto da tre parti:

- lo schermo al fosforo, che trasforma i raggi X in luce visibile;
- un supporto di conduzione in fibra ottica, che conduce la radiazione visibile al CCD chip, unità dello schermo contenente diodi e condensatori;
- il CCD chip, che rileva la radiazione luminosa e la trasforma in un segnale elettrico.

Una volta che i raggi X colpiscono lo schermo al fosforo, vengono trasformati in radiazione luminosa. Quest'ultima va quindi a colpire i fotodiodi presenti nel CCD chip. A questo punto i diodi diventano conduttori e la corrente che li attraversa va a scaricare dei condensatori direttamente collegati ad essi, caricati precedentemente, i quali avranno una tensione istantanea ai loro capi inversamente proporzionale al flusso fotonico. In questo sistema ogni diodo rappresenta un pixel. Quando il periodo di integrazione del detector si è concluso, una serie di interruttori si chiudono e quindi la scarica di ciascun condensatore viene trasferita ad un sistema

di registrazione di questi dati che è composto da altri condensatori. In seguito, la carica presente sui condensatori di registro viene trasmessa ad un convertitore analogico-digitale che trasmette i dati al sistema di elaborazione. Dopo che questo trasferimento è avvenuto, gli interruttori vengono riaperti e i condensatori collegati ai fotodiodi vengono ricaricati. A questo punto può avvenire un nuovo periodo di integrazione.

Le caratteristiche di questo rilevatore sono:

- capacità di rilevare radiazioni incidenti anche per esposizioni prolungate senza problemi di non linearità e di saturazione termica;
- basso rumore.

Ciò permette di generare immagini 3D con un alto rapporto segnale/rumore (SNR) e con un'elevata risoluzione spaziale.

Tale caratteristica per i CT-scanners convenzionali è di $1\div 2.5$ mm che corrispondono in termini di voxel (volume corporeo elementare) a $1\div 10$ mm³. Con la microtomografia computerizzata a raggi X è possibile aumentare la risoluzione di $7\div 8$ ordini di grandezza in termini di voxel.

3.2.2. La radiazione utilizzata

La radiazione utilizzata, raggi X, è una radiazione elettromagnetica le cui lunghezze d'onda sono comprese fra 0,001-10 nm; tali raggi possono essere divisi convenzionalmente in raggi duri, quelli a lunghezze d'onda minore di 10^{-1} nm, e raggi molli, quelli in cui λ è maggiore di quest'ultimo valore.

I raggi X si generano quando gli elettroni emessi da un filamento incandescente vengono accelerati da una differenza di potenziale e colpendo un metallo pesante, provocano in quest'ultimo o transizioni atomiche fra gli elettroni più interni o decelerazione dell'elettrone proiettile; in entrambi i casi, si producono radiazioni elettromagnetiche.

Lo spettro dei raggi X ha una componente continua e una formata da picchi particolari, detta caratteristica. La prima è generata da un meccanismo secondo il quale l'elettrone proiettile viene frenato da forze di natura elettromagnetica durante la transizione negli atomi bersagli; in tal caso, l'energia della radiazione emessa è in quantità uguale a quella dissipata dall'elettrone nel suo frenamento. Infinite possono essere quindi i valori del patrimonio energetico della radiazione in funzione a quella dell'elettrone, perché dipendenti a sua volta dalle infinite modalità con il quale può avvenire il passaggio nell'atomo bersaglio; ne deriva quindi uno spettro continuo. La componente caratteristica dei raggi x, al contrario, può generare onde la cui energia può assumere soltanto particolari valori. Più raramente può accadere infatti che l'elettrone, dotato di una certa energia cinetica, colpendo l'atomo bersaglio causi la fuoriuscita di un elettrone residente nelle orbitali più interne dell'atomo conferendogli l'energia necessaria per il suo allontanamento e provocando così una lacuna. Questa viene colmata da un elettrone che si trova negli strati più esterni e durante questo processo viene emesso un fotone X caratteristico, avente energia pari al salto energetico compiuto dall'elettrone che, per ripristinare una condizione di equilibrio, transita ad un livello energetico inferiore. Ovviamente lo spostamento di quest'ultimo elettrone lascia una nuova lacuna che verrà colmata da un elettrone ancora più esterno provocando l'emissione di un'altra riga caratteristica dello spettro.

Quando la radiazione incidente investe la materia viene più o meno assorbita da questa attraverso dei processi di assorbimento dei raggi X (effetto fotoelettrico e effetto Compton), in dipendenza alle caratteristiche del tessuto incidente e modificando le proprietà della radiazione residua. È infatti studiando quest'ultima che possiamo capire e analizzare le proprietà dei tessuti interni (15).

I raggi X non sono dolorosi per il paziente ma, pur essendo somministrate in basse dosi, sono nocive per l'organismo. Essendo radiazioni ionizzanti, possono danneggiare i tessuti biologici colpiti; tuttavia le dosi somministrate per esami radiologici sono assolutamente al di sotto di quelle in grado di provocare modificazioni. Inoltre particolari dispositivi sugli apparecchi consentono di ridurre tali dosi a valori minimi, tranquillamente accettabili da tutte le persone, fatta eccezione per le donne in gravidanza. Gli esami radiologici si possono ripetere anche nel tempo, senza che ciò aumenti eccessivamente i pericoli di danno. Solo l'abuso di esami, specie se ingiustificati, è da evitare.

3.2.3. Il microtomografo Skyscan 1072

Il microtomografo Skyscan 1072 utilizzato è un esempio di microtomografia computerizzata a raggi X (microTC). La sorgente è costituita da un tubo radiogeno raffreddato ad aria, avente doppia macchia focale, rispettivamente di 5 e 7 μm , e dotato di una filtrazione aggiuntiva costituita da una lamina di alluminio dello spessore di 1 mm. La differenza di potenziale per la sua alimentazione può variare fra i 20 e i 100 kV, mentre il suo amperaggio è compreso fra 0 e 250 μA . Il sensore digitale è di tipo CCD, modello C4742-55-12NRF, costituito da 1280 X 1024 pixels, raffreddato ad aria e collegato ad un convertitore A/D (Analogico/Digitale) con risoluzione a 12 bit.

Per la ricostruzione delle immagini sul rilevatore lo Skyscan utilizza la geometria a raggi paralleli, pur avendo una sorgente che emette radiazioni a ventaglio (*cone beam*), secondo la quale l'oggetto, investito dai fasci di raggi X, determina sul rilevatore la formazione di un'immagine, composta dalla radiazione residua, corrispondente alla proiezione bidimensionale dell'oggetto tridimensionale; ogni punto dell'immagine contiene informazioni relative all'assorbimento nell'oggetto in corrispondenza del parziale fascio di raggi X.

È infatti noto che la radiazione X, attraversando un qualsiasi oggetto, subisce un'attenuazione che può essere espressa tramite la funzione esponenziale:

$$N=N_0 e^{-\mu x}$$

dove con N_0 indichiamo il numero di fotoni emessi dalla sorgente di raggi X, ovvero il numero di fotoni che investono la materia, con N il numero di fotoni che interagiscono con la materia, con μ il coefficiente di attenuazione lineare e con x lo spessore della materia investita dalla radiazione.

È possibile ottenere l'informazione relativa all'assorbimento lineare dell'immagine tramite l'operazione logaritmo. Quest'operazione però è non lineare e quindi anche il minimo rumore in un'area piccola dell'oggetto in esame può produrre nella ricostruzione un errore molto significativo. Per eliminare questi errori viene fatta una media tra i dati iniziali e i risultati ottenuti con il calcolo logaritmico. D'altra parte in questo modo è anche possibile migliorare il rapporto segnale-rumore nell'immagine ombra al fine di ottenere le informazioni più significative.

Anche la presenza di rumore influisce negativamente sul processo di ricostruzione quindi è bene che questo venga ridotto il più possibile. Al riguardo, al fine di migliorare la sensibilità della microCT alle più piccole variazioni di assorbimento dei raggi X, la radiazione utilizzata in origine policromatica viene opportunamente trattata con un filtro passa-banda. In fase di acquisizione inoltre, l'energia del fascio deve essere scelta in funzione della composizione strutturale del campione, in modo che l'assorbimento per quella particolare tipologia sia ottimale. Il fascio prodotto dalla sorgente, prima di colpire l'oggetto, deve essere poi opportunamente collimato per limitare la zona colpita e aumentare di conseguenza il numero di fotoni incidenti per unità di superficie.

Le immagini ottenute dalla radiazione residua, in conseguenza al processo di assorbimento sopra descritto, vengono comunemente chiamate *slice* e possono, tramite processo di sovrapposizione, ricostruire la struttura tridimensionale del campione sottoposto ad esame.

È possibile comprendere meglio il processo di ricostruzione prendendo in esame il caso in cui un oggetto è costituito da un solo punto, in cui vi è un significativo coefficiente d'assorbimento e la cui posizione non è nota.

Per ogni linea monodimensionale si ha la diminuzione dell'intensità della radiazione nell'area dell'oggetto considerata. Le posizioni dei punti di assorbimento dell'oggetto vengono memorizzate sull'area di ricostruzione all'interno del computer come delle linee, e quindi è opportuno verificare che tutte le parti dell'oggetto cadano nel campo d'interesse. L'operazione viene poi ripetuta ruotando il campione per 180° (o, relativamente al tipo di campione, per 360°) a piccoli incrementi angolari, quindi nell'area di ricostruzione si aggiungono tante linee quante sono le diverse posizioni assunte dall'oggetto.

Ovviamente, minore è l'incremento angolare con cui viene ruotato il campione, maggiore è il numero di linee che definisce la posizione del punto di assorbimento. Con questa operazione, definita retro-proiezione, è possibile localizzare la posizione del punto di significativo assorbimento che sarà tanto più definita quanto più è elevato il numero delle proiezioni.

La stessa operazione può essere effettuata per un qualsiasi tipo di oggetto reale, le cui sezioni trasversali saranno rappresentate da un certo numero di *voxel* di assorbimento e l'assorbimento lineare di ogni fascio di raggi X è dato dalla somma degli assorbimenti di tutti i *voxel* contenuti nel fascio relativo. Grazie a particolari programmi questi dati potranno essere utilizzati per ottenere l'immagine bidimensionale dei coefficienti d'assorbimento.

Occorre considerare che il sistema presenta dei problemi che comporterebbero degli errori nell'immagine tridimensionale ricostruita. Questi errori vengono eliminati grazie all'applicazione di particolari correzioni.

Un primo problema è associato alla sorgente di raggi X in quanto non tutte le sorgenti possono generare fasci paralleli. Nel caso reale verrà utilizzata una sorgente puntiforme e l'area dell'oggetto in esame sarà investita da un fascio di raggi X a ventaglio. Per quello che riguarda la ricostruzione tomografica sarà possibile risolvere questo problema attraverso la formazione di fasci pseudo-paralleli utilizzando alcune parti di una serie di fasci a ventaglio con diverse prospettive. In questo modo il metodo di ricostruzione usato con fasci di raggi paralleli può essere applicato anche con fasci di raggi X a ventaglio (16).

3.3. Software utilizzati

Per la fase di acquisizione ed elaborazione dei dati si sono utilizzati i software forniti dalla casa costruttrice della Skyscan denominati: *Cone Beam Reconstruction*, *3D Creator*, *T-view* e *CT-Analyzer*.

Cone Beam Reconstruction è il programma che permette la ricostruzioni delle immagini.

Durante l'acquisizione gli oggetti vengono fatti ruotare per 180°. Per ogni posizione verrà acquisito il fascio X trasmesso, rappresentante la futura immagine. Tutte le acquisizioni vengono salvate come file .TIFF a 16 bit e il numero dei file salvati dipende dal passo di rotazione selezionato; per un tipico passo da 0,9 gradi, si avranno più di 200 immagini.

Dopo l'acquisizione si deve iniziare la ricostruzione, partendo dai file .TIFF si genererà, utilizzando un particolare algoritmo, una sezione ricostruita del campione analizzato, in forma ancora grezza. Questa non è ancora un'immagine ma una matrice di punti i cui elementi sono valori numerici indicanti il relativo grado di assorbimento di quella particolare zona durante l'esposizione. Questi valori serviranno per trasformare la matrice, le cui dimensioni dipendono dal

senso usato, in un'immagine con 256 livelli di grigio. Si selezionano il valore minimo e quello massimo. Tutti i valori compresi tra questi saranno mostrati come toni di mezzo. Qualunque valore, rappresentante una completa attenuazione, al di sotto del minimo sarà visualizzato con il bianco, mentre qualunque valore sopra il massimo sarà visualizzato con il nero.

Nei sistemi Skyscan l'immagine finale può essere trasformata in vari formati: .BMP, .RAW a 16 bit o file .TXT (17).

3D Creator è il programma che fornisce a generare una struttura tridimensionale a partire dai dati bidimensionali. I sistemi di microtomografia forniscono i risultati di ricostruzione come insieme delle sezioni trasversali attraverso l'oggetto. Tutte le sezioni hanno lo stesso orientamento all'interno dello spazio tridimensionale, ortogonale all'asse di rotazione e questo gruppo di dati vengono conservati come immagine .BMP sul disco rigido. Questo insieme di fette può essere visualizzato sullo schermo di un calcolatore come un oggetto 3D realistico, utilizzando appunto il software di ricostruzione in questione.

I programmi per la visualizzazione tridimensionale sono in realtà due:

- il primo è ANT.EXE, il principale, che comprende tutte le funzioni necessarie per la generazione e trasformazione del modello 3D (attraverso il movimento, la rotazione, le registrazioni di illuminazione, il re-taglio e molte altre funzioni opzionali);
- l'altro programma è TCONV.EXE per la riduzione del formato del gruppo di dati acquisiti (18).

È poi possibile visualizzare il campione acquisito attraverso il programma chiamato *T-view*, il quale fornisce una ricostruzione dell'oggetto tridimensionale attraverso una sequenziale visualizzazione delle sezioni memorizzate di cui esso è costituito; si seleziona una sola immagine bitmap appartenente ad una specifica cartella nella quale sono salvate le immagine relative ad un campione e la visualizzazione si avvia in automatico. Il programma permette inoltre di avere immagini a colori, di regolare contrasto e brillantezza, di evidenziare una sezione, ecc.

CT-Analyser è un software per derivare parametri quantitativi del campione acquisito e ricostruire modelli a partire dai dati ottenuti dallo Skyscan 1072.

3.4. Materiali e metodi

L'analisi sperimentale si è basata sull'acquisizione dei campioni ed elaborazione dei dati ottenuti.

A tale scopo le principali azioni svolte sono state:

- *Accensione dello Skyscan e predisposizione del software di acquisizione*

Abitualmente tale azione viene svolta prima di ogni altra cosa al fine di poter consentire il riscaldamento della macchina adeguato per un suo corretto funzionamento in relazione allo scopo per la quale viene utilizzata: ciò equivale a dire il raggiungimento di 100 kV come valore medio per l'alimentazione della sorgente e 98 μ A come valore medio per la corrente fra catodo e anodo.

- *Preparazione dei campioni*

I campioni scelti per questa analisi sono sezioni cubiche di limitate dimensioni prelevate da teste femorali di pazienti in condizioni fisiologiche e patologiche, in relazione al tessuto osseo da noi analizzato. Dopo aver nominato i campioni con sigle identificative (2A4, OA2, MNT, SDV) li abbiamo pesati, con notevole accuratezza, e calcolato la loro densità. Come esempio vengono di seguito riportati in Tabella 1 i risultati ottenuti per i primi due campioni.

Tabella 1. Risultati ricavati e calcolati in base all'analisi microtomografica per i campioni 2A4 e OA2

Parametri	Campioni	
	2A4	OA2
Bone volume (mm ³)	153,659	143,699
Massa (g)	0,372	0,305
Densità (g/cm ³)	2,422	2,121

I campioni sono stati collocati su un supporto cilindrico di cui è dotata la macchina. La preservazione di una posizione stabile del campione durante tutto il processo di acquisizione è una condizione importante per l'attendibilità dell'analisi, in quanto qualsiasi suo movimento introdurrebbe degli artefatti da ricostruzione (rumore). Altro aspetto su cui porre attenzione è la posizione del campione rispetto all'asse di rotazione del corpo a cui è legato: se, infatti, il campione non fosse ben centrato si introdurrebbero errori nel processo di acquisizione legata alla sua variabile posizione.

Una volta adagiato il campione, il supporto viene nuovamente inserito all'interno della macchina e si procede quindi con la chiusura del coperchio, l'avviamento della strumentazione e la regolazione dei parametri di lavoro.

Viene selezionato il comando di avvio raggi e si utilizzano le prime immagini fornite per la regolazione di alcuni parametri: la distanza fra sorgente e campione, al fine di ingrandirlo o meno nella fase di acquisizione, la risoluzione, il filtraggio, lo step di rotazione. L'acquisizione per i primi tre campioni è avvenuta utilizzando una *magnification* di 11,27 μm per pixel, mentre per l'ultimo si è dovuto acquisire con una risoluzione di 14,65 μm per pixel; si è impostata una *rotation step* di 0,45°, si è utilizzato un filtro di alluminio di 1 mm e scelta una rotazione completa di 180°. Per scegliere tali parametri si è verificato di volta in volta che tipo di immagine si sarebbe ottenuta, scegliendo la più idonea per gli scopi prefissati. Bisogna comunque porre attenzione ad alcuni aspetti: sarebbe stata gradita un'acquisizione a 8 μm per pixel, ma ciò non è stato possibile perché il campione fuoriusciva dal campo di vista, fattore questo che non deve mai verificarsi. È stata scelta una rotazione di 180°, come da prassi, perché sottoporre il campione ad una rotazione completa di 360° significherebbe acquisire per due volte gli stessi elementi, e quindi favorire l'introduzione di artefatti da ricostruzione.

Avviata l'acquisizione, la macchina ha lavorato per circa 1 ora e 45 minuti, durante il quale ha realizzato prima due immagini BMP a 180°, poi immagini TIFF ogni 0,45° di rotazione, salvate in automatico dal pc in un percorso precedentemente indicato. Successivamente, si è provveduti a trasferire i dati acquisiti su un secondo computer contenente i software per l'elaborazione. La procedura così descritta è stata eseguita in modo analogo su tutti i campioni.

3.4.1. Ricostruzione 3D

Per la ricostruzione 3D con i programmi sopra descritti, è stata scelta una sezione grazie anche all'ausilio del software, attraverso la quale è stata effettuata la regolazione del range dei livelli di grigio. Si è poi passati alla decisione dell'intervallo delle sezioni da considerare nella ricostruzione, imponendo la scelta di una *slice* ogni 2, conveniente in termini di rapporto tempo necessario-qualità ricostruzione. Attraverso l'ulteriore regolazione di altri parametri (come brillantezza, trasparenza, etc.) e grazie alla possibilità di modificare il campione (attraverso tagli di sezioni, rotazioni, ingrandimenti, ecc.) è stato possibile ottenere diversi modelli tridimensionali (Figura 1).

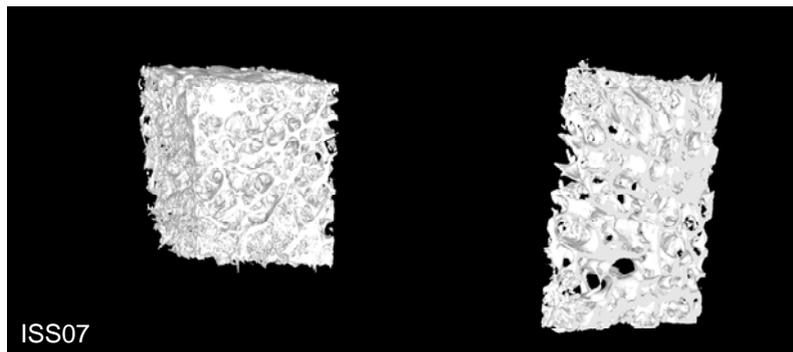


Figura 1. Ricostruzioni tridimensionali del campione 2A4

3.4.2. Analisi dei campioni

L'analisi microscopica dei campioni viene effettuata attraverso l'utilizzo del programma *CT analyser*. Questo software ci permette di visualizzare sullo schermo sia l'immagine ombra del campione, cioè la proiezione bidimensionale ottenuta dalla microTC, sia la successione di *slice* in cui questo è stato sezionato.

Per comprendere i dati che ci sono stati forniti da questo programma bisogna specificare che il sistema di riferimento usato non è uguale a quello dell'acquisizione: è determinato da tre assi ortogonali x , y , z con l'ultimo decentrato rispetto l'asse del campione. Le immagini ombra, quindi, vengono acquisite orientativamente sul piano x , z (Figura 2) mentre le *slice*, fornite come immagini bitmap della grandezza di 1024×1024 pixels, sono poste sul piano x , y (Figura 3). Al fine di esplicitare quanto detto vengono riportati alcuni dati che abbiamo tratto dalla *slice* 740 per il campione 2A4 e dalla 500 per il campione OA2. Si specifica che in base al sistema di riferimento tali sezioni corrispondono ad una altezza rispettivamente di $z = 8,339$ mm e $z = 5,634$ mm.

Per il campione 2A4 le coordinate dei vertici A, B, C e D sono rispettivamente (3,61-10,68) mm, (9,85-9,68) mm, (9,22-2,46) mm e (2,95-3,16) mm.

Per il campione OA2 le coordinate dei vertici A, B, C e D sono rispettivamente (4,08-9,13) mm, (8,84-7,72) mm, (7,39-2,76) e (2,61-4,06)mm.

Si precisa che tale misure sono state rilevate nonostante la mancata netta definizione del contorno del campione spugnoso, causata dalla sua natura (Figura 2).

Questi dati possono essere usati per determinare sommariamente le dimensioni del campione e ricostruire il suo orientamento durante l'acquisizione. Tale fatto è di estrema importanza perché permette di associare biunivocamente ogni punto del campione reale ad un solo punto nelle *slice* acquisite, evitando di compiere errori nella valutazione strutturale microscopica del campione.

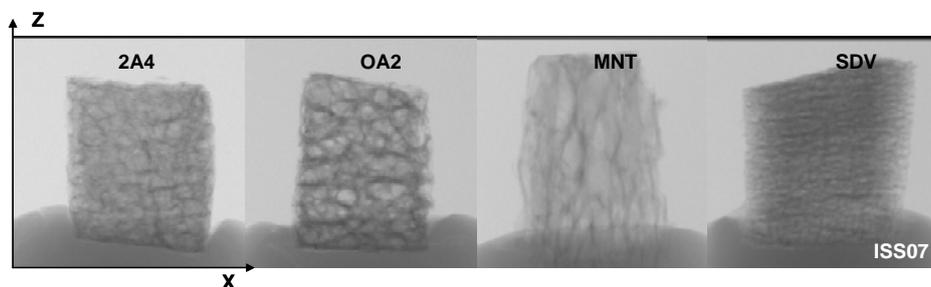


Figura 2. Visualizzazioni bidimensionali di campioni esaminati sull'asse x , z

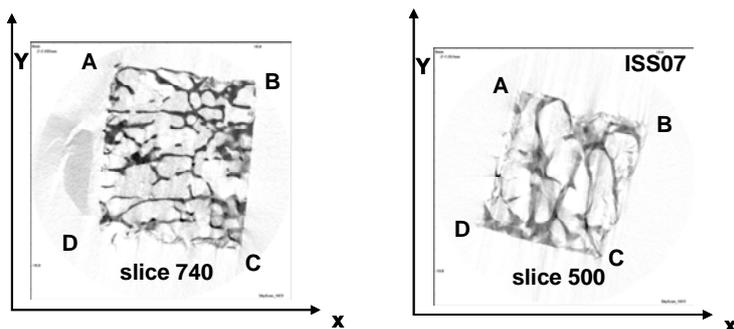


Figura 3. *Slice 740 e 500 e visualizzazione delle coordinate dei vertici (A, B, C, D) sull'asse x, y*

Con *CTan* è possibile misurare distanze, angoli ed effettuare “tagli” sulle immagini acquisite per visualizzare dettagli appartenenti non a piani trasversali, ma a sezioni longitudinali. Grazie a quest’ultima opzione è stato possibile avere un quadro completo della struttura microscopica dei due campioni.

A tal fine, in seguito ad un’unica scansione, si sono analizzati i cubetti di tessuto osseo secondo tre piani ortogonali ottenendo, per ogni analisi, utili informazioni riguardanti la loro struttura al livello bidimensionale e tridimensionale.

Nelle tre elaborazioni il procedimento seguito è stato sommariamente sempre lo stesso. Si è limitata l’analisi ad una regione di interesse, definita ROI (*Region Of Interest*), e di conseguenza ad un volume di interesse definito VOI (*Volume Of Interest*), ad un’area poligonale più ristretta e ad un numero di *slice* minori, allo scopo di eliminare le zone più esterne del campione, diminuire la mole di dati da elaborare e di conseguenza il tempo necessario al software per poterli calcolare.

I dati che il programma è in grado di fornirci vengono qui di seguito elencati:

1. caratteristiche 2D medie del VOI selezionato e caratteristiche 2D per ogni *slice*. Effettuando l’analisi bidimensionale dei campioni, *CTan* ci fornisce i valori medi di alcuni parametri istomorfometrici dedotti dal valore che questi assumono per ogni sezione nella ROI selezionata;
2. oggetti rilevati in una *slice* scelta come esempio, con relative caratteristiche. Per ogni *slice*, è possibile rilevare gli oggetti che ne sono presenti e notevoli caratteristiche, individuali o come valori medi, che ci permettono di ricostruire la sezione in questione. È da specificare che per oggetto si intende una struttura ossea definita;
3. Caratteristiche 3D. Ci vengono forniti i valori medi di alcuni parametri, calcolati considerando tutto il VOI scelto;
4. Livelli di grigio del VOI selezionato. Il programma ci permette di selezionare il *range* dei livelli di grigio più opportuno e, per ognuno di esso, ci fornisce la percentuale di annerimento alla quale corrisponde, l’area in mm² in cui questa tonalità è presente, la percentuale di questa area rispetto al totale, la presenza del relativo livello di grigio in percentuale. È possibile ottenere queste informazioni per una data *slice*, per un intervallo di *slice* o per l’intero campione, selezionando o meno la regione di interesse.

Si è proceduto con lo studio dei dati, anche attraverso l’ausilio di grafici e si è passati alla discussione e comparazione dei valori ottenuti.

Bisogna specificare che di seguito vengono riportati i valori numerici direttamente prodotti dalla macchina, dove l’approssimazione alla quinta cifra decimale dimostra l’alta risoluzione di cui è dotata.

3.5. Risultati

3.5.1. Prima elaborazione

Durante la prima elaborazione si sono effettuate misure direttamente sulle sezioni trasversali in cui i campioni sono stati scomposti in seguito al processo di acquisizione.

Il VOI è stato limitato superiormente, inferiormente (Figura 4) e ad una regione ROI di area poligonale interna al campione al fine di non considerare superfici esterne perché maggiormente esposte a fattori che ne avrebbero potuto modificare le caratteristiche.

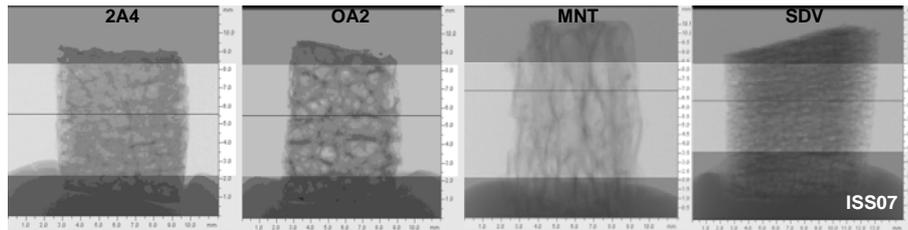


Figura 4. Visualizzazione delle parti escluse dalla nostra analisi (zone più scure)

3.5.2. Seconda elaborazione

Durante la seconda elaborazione si sono effettuate misure su sezioni longitudinali. Tali immagini sono state prodotte direttamente dal software che ha effettuato una serie di tagli sui campioni secondo un piano ortogonale al primo, nella regione da noi indicata. In seguito si è limitata una ROI al fine di eliminare componenti indesiderate e si sono elaborati i dati ottenuti (Figure 5-8).

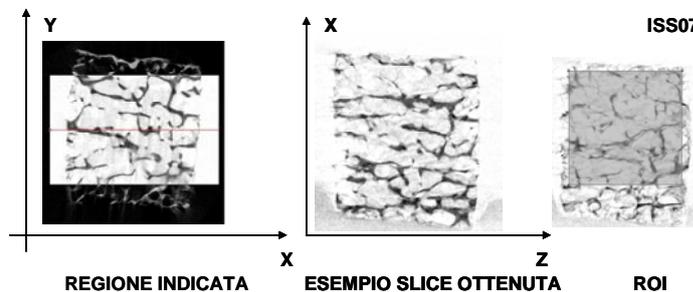


Figura 5. Visualizzazione della regione ROI del campione 2A4

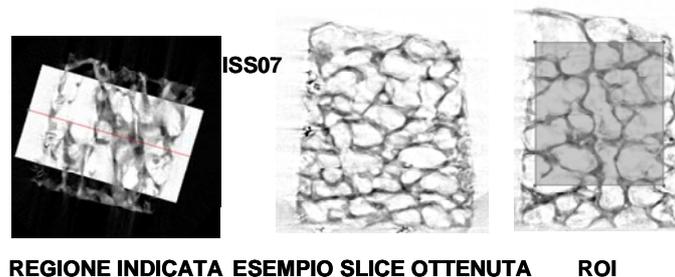


Figura 6. Visualizzazione della regione ROI del campione OA2

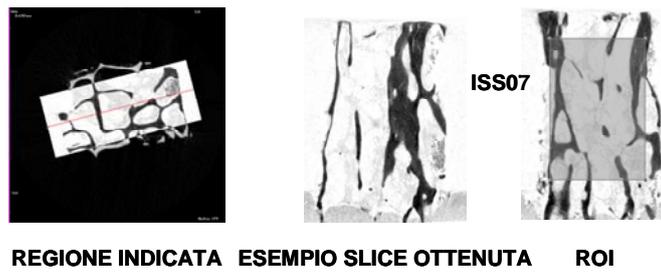


Figura 7. Visualizzazione della regione ROI del campione MNT

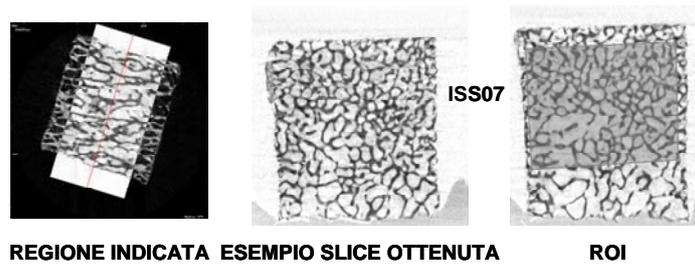


Figura 8. Visualizzazione della regione ROI del campione SDV

3.5.3. Terza elaborazione

Nella terza elaborazione si è proceduto come nella seconda, cercando questa di volta in volta di elaborare dati appartenenti a piani perpendicolari rispetto ai precedenti (Figure 9-12).

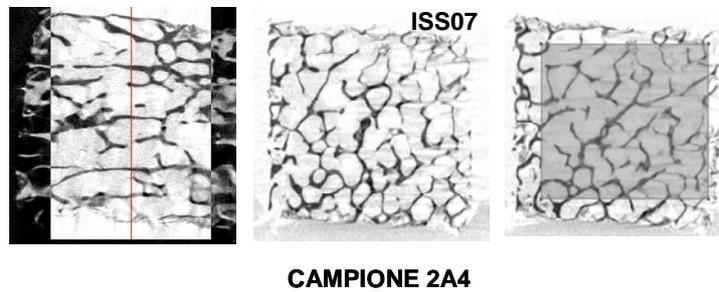


Figura 9. Visualizzazione di un piano perpendicolare del campione 2A4

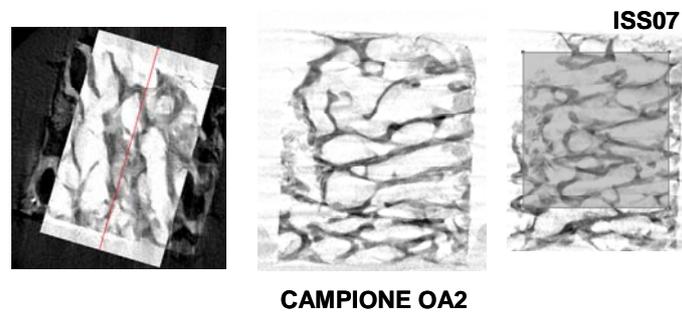
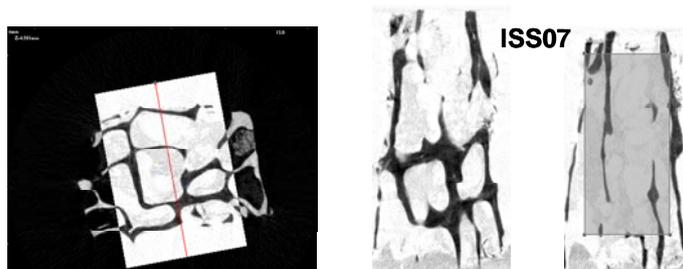
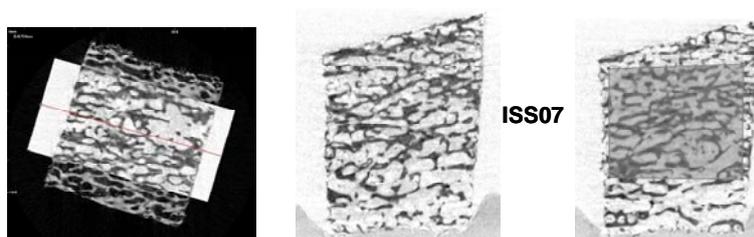


Figura 10. Visualizzazione di un piano perpendicolare del campione OA2



CAMPIONE MNT

Figura 11. Visualizzazione di un piano perpendicolare del campione MNT



CAMPIONE SDV

Figura 12. Visualizzazione di un piano perpendicolare del campione SDV

Come precedentemente detto, il software ci fornisce un numero elevato di parametri morfologici che sono mostrati nelle Tabella 2 -per ogni singolo campione.

Dopo un'attenta analisi, si riportano di seguito esclusivamente i dati ritenuti più significativi ai fini dello studio condotto durante questo lavoro sperimentale di analisi microtomografica tridimensionale.

Tabella 2. Risultati dell'analisi microtomografica 3D condotta sul VOI dei campioni 2A4, OA2, MNT, SDV

	BV/TV(%)	Tb.Th(mm)	Tb.N(1/mm)	Tb.Sp(mm)	DA	FD
Campione 2A4						
Prima elaborazione	30,97611	0,18614	1,66411	0,31019	1,21617 (0.17775)	2,21485
Seconda elaborazione	30,56721	0,19088	1,60142	0,33330	1,18228 (0.15418)	2,20924
Terza elaborazione	30,66858	0,19248	1,59331	0,36947	1,59134 (0.37160)	2,18198
Campione OA2						
Prima elaborazione	39,19507	0,23924	1,63830	0,42195	1,27257 (0.21419)	2,22309
Seconda elaborazione	38,92296	0,24849	1,60142	0,33330	1,18228 (0.15418)	2,20873
Terza elaborazione	38,85585	0,25131	1,54611	0,46091	1,47749 (0.32318)	2,20831
Campione MNT						
Prima elaborazione	23,70305	5,65168 mm	0,82069 1/mm	0,43837 mm	2,04975 (0.51214)	1,90503
Seconda elaborazione	22,65364	0,31559 mm	1,60142 1/mm	0,33330 mm	1,18228 (0.15418)	1,96796
Terza elaborazione	23,45461	0,30668 mm	0,76478 1/mm	0,54759 mm	3,45305 (0.71040)	1,96799
Campione SDV						
Prima elaborazione	60,03255	8,34368	2,21909	0,19849	1,41185 (0.29171)	2,38023
Seconda elaborazione	61,34196	0,28036	2,18797	0,21139	1,77698 (0.43725)	2,33804
Terza elaborazione	59,89318	0,28084	2,13263	0,22559	1,23357 (0.18935)	2,35853

Al fine di evidenziare al meglio l'andamento dell'annerimento nel volume considerato si propone una tabella (Tabella 3), nella quale si evidenzia, in funzione dei livelli di grigio, l'area totale da essi occupata. Per evitare un sovraccarico, si sono considerati i valori delle aree, espressi in mm², per ogni livello di grigio ogni 25 livelli e per l'ultimo selezionato.

Tabella 3. Valori delle aree in mm² per i livelli di grigio del VOI selezionato

	Numero della <i>slice</i>				
	1	25	50	75	100
Campione 2A4					
Prima elaborazione	0,262	1,566	8,296	20,809	23,388
Seconda elaborazione	0,178	1,000	6,000	17,000	18,000
Terza elaborazione	0,725	0,843	5,000	13,000	15,000
	125	150	175	200	210
Prima elaborazione	20,571	20,692	25,717	50,706	81,052
Seconda elaborazione	15,000	15,000	17,000	30,000	49,000
Terza elaborazione	13,000	13,000	15,000	26,000	41,000
Campione OA2					
Prima elaborazione	0,104	0,458	2,078	6,680	15,438
Seconda elaborazione	0,085	0,366	2,000	5,000	12,000
Terza elaborazione	0,119	0,276	1,000	5,000	11,000
	125	150	175	200	210
Prima elaborazione	24,698	29,977	33,230	41,476	50,032
Seconda elaborazione	18,000	22,000	24,000	28,000	33,000
Terza elaborazione	17,000	21,000	22,000	27,000	32,000
Campione MNT					
Prima elaborazione	0,178	3,359	13,927	10,788	4,561
Seconda elaborazione	0,178	3,359	13,927	10,787	4,561
Terza elaborazione	0,232	3,893	16,853	11,762	5,262
	125	150	175	200	210
Prima elaborazione	2,951	2,678	2,979	5,351	11,875
Seconda elaborazione	2,951	2,678	2,979	5,300	11,875
Terza elaborazione	3,552	3,246	3,555	5,941	11,156
Campione SDV					
Prima elaborazione	0,014	0,653	9,052	41,035	60,064
Seconda elaborazione	0,014	0,652	9,052	41,034	60,064
Terza elaborazione	0,009	0,311	5,926	29,844	45,780
	125	150	175	200	210
Prima elaborazione	47,319	38,389	41,181	74,520	103,045
Seconda elaborazione	47,319	38,388	41,181	74,520	103,040
Terza elaborazione	36,004	29,302	30,953	54,286	75,652

3.6. Discussione

Come si è precedentemente detto il microtomografo computerizzato, implementato con un opportuno algoritmo di ricostruzione, fornisce in output sezioni trasversali dei campioni analizzati (*slice*). Queste sole immagini contengono già importanti informazioni che ci permettono di effettuare prime considerazioni sui cubetti di tessuto osseo studiati.

Ponendo a confronto le *slice* fornite dalla prima elaborazione è infatti visibilmente evidente una diversa organizzazione nella distribuzione della rete trabecolare. È altresì riconoscibile come però le sezioni trasversali fornite dal programma non permettano di evidenziare linee isostatiche naturali, a dimostrazione del fatto che probabilmente si stanno osservando i campioni

da un punto di vista che non consente di cogliere le lunghezze delle trabecole. Ciò è evidente invece nelle *slice* ricavate dalla terza elaborazione per il campione 2A4 e dalla seconda per il campione OA2 e MNT, attraverso le quali si sono sezionati i campioni secondo piani che permettono di scorgere proiezioni delle lunghezze trabecolari. In queste immagini è possibile identificare la distribuzione della matrice ossea in funzione della direzione lungo la quale risulta sollecitata, a conferma di quanto ampiamente documentato (Figura 13). Questo riconoscimento risulta invece difficile nell'ultimo campione, data la superiore intensità della rete trabecolare: sembrerebbero riconoscibili linee isostatiche orizzontali nell'ultima elaborazione, ipotesi che troverebbe conferma soltanto conoscendo la posizione che il campione assumeva nella fetta di testa femorale dalla quale è stato prelevato.

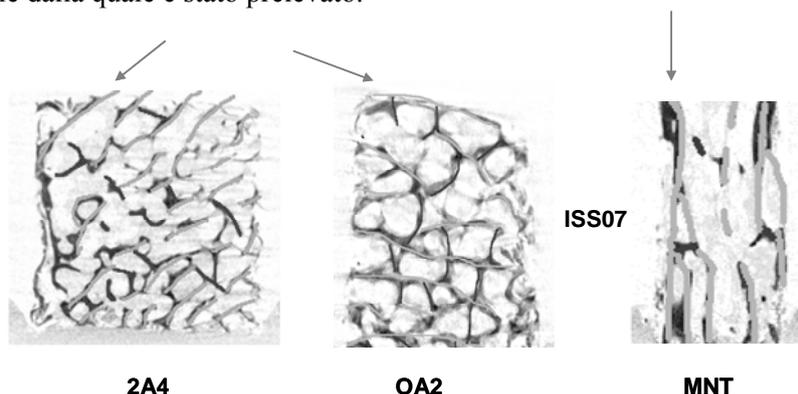


Figura 13. Rilevamento delle linee isostatiche naturali nei campioni

Studiando i dati ottenuti da un'analisi bidimensionale, a parità di punto di osservazione, è possibile notare come il volume osseo normalizzato rispetto al totale sia notevolmente maggiore nel campione SDV rispetto ai primi tre, in particolare rispetto a MNT. Continuando ad analizzare i dati relativi agli ultimi due esemplari è possibile notare come il numero di trabecole presenti sia notevolmente superiore nel campione SDV, mentre la separazione trabecolare è notevolmente inferiore. Se si considera inoltre la superiorità del parametro FD, indice dell'organizzazione della rete trabecolare, è possibile ipotizzare la presenza di una patologia progressiva nel campione MNT, che si manifesta con una diminuzione della massa ossea. Osserviamo infine che i valori registrati per la porosità evidenziano una maggiore presenza di cavità midollari nel campione SDV; questo dato, complementato con il maggiore spessore trabecolare presente nel terzo campione, sembra evidenziare il fatto che in seguito ad un deficit della componente ossea causato dalla patologia, il tessuto abbia risposto con un rimodellamento della struttura interna: per sopportare medesimi carichi in presenza di una struttura meno intensa, si fortifica quella presente. Una conferma di quanto precedentemente detto è implicita nei valori relativi al numero, lunghezza e area degli oggetti riconosciuti nelle *slice*: il campione MNT presenta un minor numero di oggetti ma dalle caratteristiche geometriche dominanti. Per gli altri due campioni non è possibile effettuare ipotesi, data la mancata presenza di differenze palesi nei parametri calcolati. Sembrerebbe forse lecito ipotizzare un deficit del tessuto osseo anche nel campione 2A4 in seguito al valore leggermente inferiore assunto da BV/TV, però questa informazione non può essere ritenuta molto significativa, in quanto non si conosce la vita medica dei pazienti donatori: piccole variazioni nei valori assunti dai parametri istomorfometrici possono infatti essere riscontrati in seguito a cambiamenti architettonici nella struttura

trabecolare causati dalla diversa età, dal sesso o da trattamenti terapeutici a cui sono stati sottoposti.

I valori indicati nell'analisi bidimensionale sono la media dei valori che i suddetti parametri assumono nelle varie sezioni. È possibile comunque visualizzare le caratteristiche di una singola *slice* e in questa studiare le proprietà degli oggetti che la compongono, secondo valori individuali o medi. Grazie a questi dati è possibile ricostruire la struttura trabecolare di ogni sezione e, più in generale, di tutto il VOI (Figura 14).

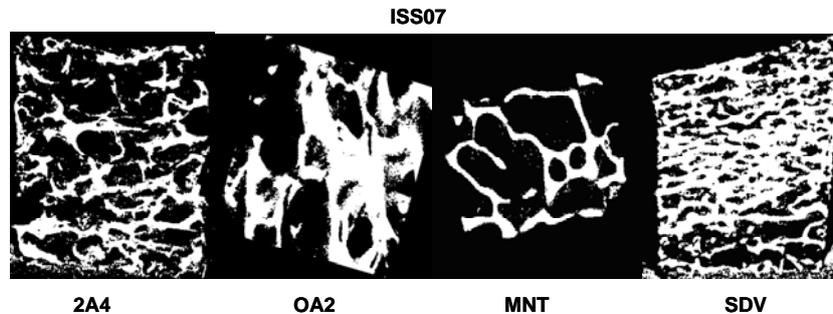


Figura 14. Esempi di ricostruzioni della rete trabecolare

I dati di maggiore interesse per il nostro scopo sono i dati 3D, in quanto forniscono un quadro completo della struttura ossea che stiamo esaminando. I parametri ci testimoniano una maggiore connettività nel campione che potremo considerare sano; si riscontra anche qui una maggiore disorganizzazione e una maggiore anisotropia nel campione MNT, il quale presenta anche sommariamente un minor numero di trabecole di spessore e separazione maggiore. Osservando la distribuzione dei livelli di grigio si evidenzia come i 210 livelli selezionati ricoprono una percentuale maggiore dell'area esaminata nell'ultimo campione. Non conoscendo il valore dei coefficienti di attenuazione per ogni livello ed essendo presente comunque rumore, causato maggiormente da un indurimento del fascio durante l'attraversamento della materia e non corretto tramite procedura di calibrazione con fantocci di prova, è possibile solo ipotizzare una presenza più intensa della rete trabecolare nel campione SDV e una minore nel MNT, poiché i livelli di grigio selezionati corrispondono a tonalità che partono da 0 (nero = osso) a 256 (bianco = cavità midollari).

Bisogna specificare che in base al voltaggio con il quale viene alimentata la sorgente, è possibile affermare che l'assorbimento della radiazione ionizzante avvenga quasi esclusivamente per effetto Compton. Poiché questo fenomeno deriva dall'interazione dei fotoni liberi o vincolati all'atomo da debole energia, la probabilità che si verifichi l'assorbimento è proporzionale alla densità elettronica della materia attraversata e quindi anche il diverso annerimento registrato dipende da questo fattore. Per ciascun campione sono state prodotte centinaia di *slice* dalle quali si nota un maggiore annerimento corrispondente al tessuto in MNT; la verifica della presenza di tonalità più scure è evidente nelle tabelle relative alla distribuzione dei livelli di grigi da cui è possibile concludere per quanto detto che le trabecole del terzo campione sono le più mineralizzate. Il fatto invece che le distribuzioni siano caratterizzate da dispersione, conduce anche alla deduzione della presenza di residui organici. Per quanto sopra indicato e ricordando che la componente minerale conferisce durezza, rigidità e resistenza al

tessuto mentre le fibre collagene sono responsabili della sua elasticità è possibile concludere che il rimodellamento osservato nel campione MNT assicurerà la capacità di sopportare sollecitazioni implicite nell'attività quotidiana fino a quando la maggiore mineralizzazione del tessuto presente riuscirà a compensare la perdita di capacità meccanica dovuta alla presenza di una minore massa ossea.

3.7. Conclusioni

Questo lavoro di osservazione e comparazione fra le caratteristiche di quattro campioni prelevati da pazienti in diverse condizioni è stato svolto al fine di verificare gli effetti di una eventuale patologia sul tessuto osseo (riduzione di massa ossea e maggiore mineralizzazione del tessuto presente), argomento che è ormai ampiamente trattato in molti manuali. Scopo secondario è quello di contribuire alla diffusione della conoscenza della nuova metodica microtomografica. Ricordiamo infatti che la strumentazione SkyScan permette l'osservazione della struttura interna di un campione secondo più punti di vista e senza danneggiarlo, un vantaggio quest'ultimo molto importante che determinerà sicuramente una sua grande diffusione.

BIBLIOGRAFIA

1. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest* 1988;81(2):277-81.
2. Marks SC Jr, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 1988;183(1):1-44.
3. Raisz LG, Kream BE. Hormonal control of skeletal growth. *Annu Rev Physiol* 1981;43:225-38.
4. Little K. *Bone behaviour*. New York (USA): Academic Press; 1973.
5. Marotti G. The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Ital J Anat Embryol* 1996;101(4):25-79.
6. Dickson GR. *Methods of calcified tissue preparation*. Amsterdam (NL): Elsevier Ed.; 1984.
7. Owen M. Histogenesis of bone cells. *Calcif Tissue Res* 1978;25(3):205-7.
8. S.C.Cowin. *Bone Mechanics Handbook*. Boca Raton, FL (USA): CRC Press; 1989.
9. Odgaard A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone* 1997;20(4):315-28.
10. Odgaard A, Gundersen HJ. Quantification of connectivity in cancellous bone, with special emphasis on 3-D reconstructions. *Bone* 1993;14(2):173-82.
11. Lorensen, W. E. and H. E. Cline, Marching Cubes: A High Resolution 3D Surface Construction Algorithm. *Computer Graphics* 1987;21(3):163-9.
12. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987;2(6):595-610.
13. Henry HL, Norman AW. Vitamin D: metabolism and biological actions. *Annu Rev Nutr* 1984;4:493-520.
14. Bedini R, Ioppolo P, Pecci R, Filippini P, Caiazza S, Bianco A, Columbro G. *Osservazioni di osso equino al microscopio elettronico a scansione e alla microtomografia 3D*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005 (Rapporti ISTISAN 05/37).
15. Branca FP. *Fondamenti di ingegneria clinica*. Milano: Springer-Verlag Italia; 2000
16. SkyScan. *1072 X-ray Microscope Instruction Manual*. Aartselaar (Belgium): SkyScan Ed.; 2005
17. SkyScan. *X-Ray Microscope – Microtomograph. Cone Beam Reconstruction Manual*. Aartselaar (Belgium): SkyScan Ed.; 2005. Disponibile all'indirizzo: https://www.itg.uiuc.edu/help/microct/ConeBeamRec_manual.pdf; ultima consultazione 4/3/2009.
18. SkyScan. *1072 – Software package: 3D-Creator Format Converter – Instruction Manual*. Aartselaar (Belgium): SkyScan Ed.; 1999-2000. Disponibile all'indirizzo: http://www.itg.uiuc.edu/help/microct/3dcreator_manual.pdf; ultima consultazione 4/3/2009.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, gennaio-marzo 2009 (n. 1) 8° Suppl.