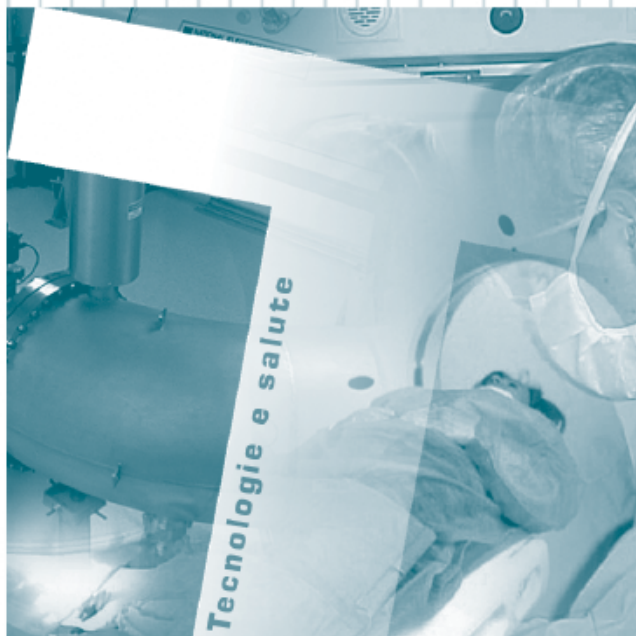


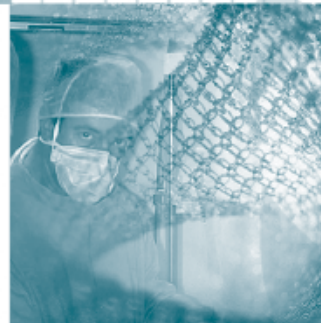
# Rapporti

## ISTISAN

12/48



Applicazioni della morfologia matematica  
nell'analisi della microstruttura  
trabecolare dell'osso



ISSN 1123-3117

R. Bedini, M. Matrecano,  
R. Pecci, M. Cesarelli, G. Mele,  
A. Marinozzi, F. Marinozzi



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Applicazioni della morfologia matematica  
nell'analisi della microstruttura trabecolare dell'osso**

Rossella Bedini (a), Marcella Matrecano (b), Raffaella Pecci (a),  
Mario Cesarelli (b), Giacomo Mele (c), Andrea Marinozzi (d), Franco Marinozzi (e)

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

*(a) Dipartimento di Ingegneria Biomedica, Elettronica  
e delle Telecomunicazioni, Università Ferdinando II, Napoli*

*(b) Istituto per i Sistemi agricoli e forestali del mediterraneo ISAFOM, CNR, Ercolano, Napoli*

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

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

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**12/48**

Istituto Superiore di Sanità

**Applicazioni della morfologia matematica per l'analisi della microstruttura trabecolare dell'osso.**

Rossella Bedini, Marcella Matrecano, Raffaella Pecci, Mario Cesarelli, Giacomo Mele, Andrea Marinozzi, Franco Marinozzi

2012, 38 p. Rapporti ISTISAN 12/48

Nel presente studio sono stati studiati due campioni di tessuto osseo spugnoso partendo da immagini microtomografiche e affrontando poi l'analisi attraverso l'uso della teoria della morfologia matematica. Questo approccio è interessante per trovare una maggiore correlazione tra i parametri morfometrici e strutturali proposti, e le proprietà meccaniche dell'osso che dipendono fortemente dall'organizzazione spaziale delle trabecole. Sono stati introdotti degli indicatori, quali la curva di distribuzione dimensionale delle trabecole e le curve di connettività che, permettendo di caratterizzare la struttura interna del tessuto osseo, hanno dato evidenza della natura, fisiologica e patologica, dei campioni analizzati.

*Parole chiave:* Microtomografia; Morfologia matematica; Struttura trabecolare ossea (o tessuto osseo spugnoso)

Istituto Superiore di Sanità

**Applications of mathematical morphology for analysis of bone trabecular microstructure.**

Rossella Bedini, Marcella Matrecano, Raffaella Pecci, Mario Cesarelli, Giacomo Mele, Andrea Marinozzi, Franco Marinozzi

2012, 38 p. Rapporti ISTISAN 12/48 (in Italian)

The aim of this study has been to examine first two spongy bone tissue samples starting from microtomographic images and then carrying out the analysis through the use of mathematical morphology's theory. This approach has been considered really interesting as it correlates the morphometric and structural parameters proposed with mechanical properties of bone, which depend from the spatial organization of trabeculae. Some indicators have been introduced such as the curve of trabeculae size distribution and the curves of connectivity. These indicators, which allowed to characterize the internal structure of bone tissue, had given evidence of the physiological and pathological nature of the samples analyzed.

*Key words:* Microtomography; Mathematical morphology; Trabecular bone structure (spongy bone tissue)

Per informazioni su questo documento scrivere a: [rossella.bedini@iss.it](mailto:rossella.bedini@iss.it).

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Bedini R, Matrecano M, Pecci R, Cesarelli M, Mele G, Marinozzi A, Marinozzi F. *Applicazioni della morfologia matematica per l'analisi della microstruttura trabecolare dell'osso*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2012. (Rapporti ISTISAN 12/48).

---

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.



# INDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>Introduzione</b> .....   | 1  |
| <b>1. L'osso</b> .....  | 2  |
| 1.1. Proprietà meccaniche del tessuto osseo spugnoso .....                          | 3  |
| 1.2. Patologie: fratture e osteoporosi .....  | 4  |
| 1.3. Resistenza meccanica dell'osso .....   | 5  |
| 1.4. Parametri di valutazione del rischio frattura .....                            | 5  |
| 1.4.1. La densità minerale ossea .....  | 5  |
| 1.4.2. Rimodellamento osseo .....   | 6  |
| 1.4.3. Mineralizzazione dell'osso .....   | 6  |
| 1.4.4. Dimensione e geometria dell'osso .....                                       | 6  |
| 1.4.5. Microarchitettura dell'osso .....  | 7  |
| <b>2. Analisi della microarchitettura trabecolare dell'osso</b> .....               | 8  |
| 2.1. Tecniche d'indagine .....  | 8  |
| 2.1.1. La microtomografia computerizzata .....                                      | 9  |
| 2.1.1.1. Principi di funzionamento .....  | 9  |
| 2.2. Parametri utilizzati per valutare la microarchitettura trabecolare ossea ..... | 10 |
| 2.2.1. Descrittori classici .....   | 11 |
| 2.2.2. <i>Trabecular Bone Pattern Factor</i> (Tb.Pf) .....                          | 11 |
| 2.2.3. Caratterizzazione della rete trabecolare .....                               | 11 |
| 2.2.4. Indice di interconnettività .....  | 12 |
| 2.2.5. Numero di Eulero .....   | 12 |
| 2.2.6. Massimo percorso nella rete .....  | 13 |
| 2.2.7. La dimensione frattale .....   | 13 |
| 2.2.8. Descrittori tridimensionali .....  | 13 |
| <b>3. La morfologia matematica: un nuovo approccio d'analisi</b> .....              | 15 |
| 3.1. Concetti preliminari .....   | 15 |
| 3.1.1. Metriche discrete .....  | 15 |
| 3.1.2. Identificazione delle componenti connesse .....                              | 16 |
| 3.2. Gli operatori della morfologia matematica .....                                | 16 |
| 3.2.1. Notazioni comuni .....   | 16 |
| 3.2.2. Operatori morfologici .....  | 17 |
| <b>4. Proposta di algoritmi d'analisi</b> .....                                     | 21 |
| 4.1. Procedure preliminari: segmentazione .....                                     | 21 |
| 4.2. <i>Successive opening</i> .....  | 22 |
| 4.2.1. La distribuzione dimensionale delle trabecole .....                          | 22 |
| 4.3. Connettività .....   | 24 |
| <b>5. Uno studio di esempio</b> .....   | 27 |
| 5.1. Distribuzione della misura delle trabecole .....                               | 28 |
| 5.1.1. Campione A .....   | 28 |
| 5.1.2. Campione B .....   | 31 |
| 5.2. Connettività .....   | 33 |
| 5.2.1. Campione A .....   | 33 |
| 5.2.2. Campione B .....   | 34 |
| <b>Conclusioni</b> .....  | 36 |
| <b>Bibliografia</b> .....   | 37 |



## INTRODUZIONE

Il tessuto osseo è una forma specializzata di tessuto connettivo, caratterizzata dalla mineralizzazione della matrice extracellulare che conferisce al tessuto una notevole durezza e resistenza. Nonostante la sua durezza e resistenza alla pressione ed alla trazione, l'osso è molto leggero; questa associazione della massima resistenza con il minimo peso è uno degli attributi più importanti dell'osso ed è dovuta alla sua straordinaria organizzazione interna.

Il tessuto osseo è costituito da cellule e da una matrice intercellulare organica ed inorganica. La matrice organica è composta da fibre collagene e da una sostanza amorfa nella cui costituzione entrano proteine non collageniche, complessi proteoglicanici e glicoproteine. Le fibre collagene costituiscono la parte maggiore della componente organica dell'osso, la matrice inorganica invece è costituita principalmente da fosfato e carbonato di calcio e rappresenta circa il 65 % del peso secco dell'osso.

L'osso non è un tessuto statico, ma è continuamente rinnovato e rimodellato per tutta la durata della vita.

Questo continuo processo di rimodellamento, oltre ad avere il compito di regolare la concentrazione di calcio nel plasma, assolve anche la fondamentale funzione meccanica.

La funzione meccanica delle strutture biologiche, e quindi anche di un osso, dipende da molteplici fattori: microarchitettura delle trabecole e/o degli osteoni, presenza di microlesioni all'interno della struttura, forma e geometria, ampiezza e dimensione dell'osso, proprietà materiali come ad esempio la composizione molecolare, la distribuzione delle componenti nello spazio, il grado e la qualità della mineralizzazione.

Sono talmente tante e complesse le caratteristiche alla base della resistenza dell'osso ai carichi che risulta difficile trovare una misura oggettiva di questa proprietà, fondamentale per valutare il rischio di un deterioramento della microarchitettura del tessuto osseo che porterebbe ad un aumento della fragilità e ad una suscettibilità alla frattura.

Le fratture ossee collegate all'invecchiamento, come la frattura del femore, della colonna vertebrale e del polso, costituiscono un problema sociale ed economico significativo con l'avanzamento dell'età media della popolazione.

Per cui è stata dedicata molta attenzione ad una migliore comprensione del meccanismo sottostante alla frattura, con lo scopo di sviluppare strategie per la prevenzione ed il trattamento.

La tecnica considerata fino ad oggi il *gold standard* per la quantificazione della componente minerale dell'osso è stata la densitometria a raggi X; ma, negli ultimi anni, sono state sviluppate nuove tecniche di *imaging* 3D, come la microtomografia computerizzata e la microrisonanza magnetica, che permettono di determinare nell'ambito della ricerca con buona approssimazione alcune delle componenti biomeccaniche dell'osso.

Tra queste tecniche, non entrate nella routine clinica della gestione del paziente osteoporotico, si prenderà in considerazione la microtomografia computerizzata ( $\mu$ -CT).

A partire da immagini microtomografiche, si vogliono proporre dei nuovi parametri capaci di caratterizzare in maniera possibilmente completa la microstruttura trabecolare di campioni ossei in 3D.

A tale scopo verranno implementati algoritmi di elaborazione per volumi tridimensionali d'immagini, basati sulla teoria della morfologia matematica; questa studia la forma degli oggetti e analizza la struttura geometrica di un'immagine (2D o 3D), al fine di rendere evidenti le sue connessioni topologiche con un elemento di confronto.

## 1. L'OSSO

Il tessuto osseo fa parte, insieme alla cartilagine, dei tessuti connettivi specializzati nella funzione di sostegno. Esso è costituito da cellule viventi (osteociti) e da sostanza intercellulare che risulta impregnata di sali minerali, tra i quali prevale il fosfato di calcio (Ca); è proprio la presenza dei sali minerali a conferire all'osso quella particolare caratteristica di durezza che lo contraddistingue come l'unico tessuto connettivo rigido e da cui derivano spiccate proprietà meccaniche di resistenza alla pressione, alla trazione e alla torsione. Dato il notevole contenuto di sali di calcio, il tessuto osseo rappresenta inoltre il principale deposito di ione calcio disponibile per le necessità metaboliche dell'intero organismo. La deposizione del Ca nell'osso e la sua mobilitazione, finemente controllate da meccanismi endocrini, contribuiscono infatti in modo sostanziale alla regolazione dei livelli plasmatici di questo ione. Inclusive nella matrice calcificata vi sono numerose fibrille che sono invece costituite da collagene.

L'unità fondamentale dell'osso è l'osteone, un cilindretto di tessuto osseo attraversato da un canale centrale detto di Havers, in cui entrano un vaso sanguigno e un nervo. Intorno al canale di Havers, la sostanza fondamentale del tessuto osseo è disposta a formare molteplici lamelle concentriche: l'insieme canali-lamelle è detto Sistema di Havers. Le cellule ossee occupano piccoli spazi chiamati lacune che si trovano tra le lamelle. Canali microscopici, i canalicoli, si irradiano in tutte le direzioni, partendo dalle lacune, per connetterle ai canali di Havers, dando la possibilità ai liquidi interstiziali di raggiungere le cellule ossee.

Del tessuto osseo esistono due varianti riconoscibili dal diverso arrangiamento lamellare: il tessuto osseo compatto o corticale e il tessuto osseo spongioso o spugnoso. Nell'osso compatto i sistemi Haversiani sono fittamente addensati l'uno all'altro e i piccoli spazi interposti sono riempiti da lamelle interstiziali. Nell'osso spongioso, invece, vi sono parecchi spazi vuoti compresi tra esili processi ossei (trabecole), connessi gli uni agli altri come le travi di un'impalcatura.

Nell'osso è presente una continua attività di trasformazione e rimodellamento dell'architettura interna, tendente a rendere le ossa stesse più adeguate alle esigenze funzionali dell'età. Vi sono infatti processi di edificazione di nuove lamelle nelle zone dell'osso che vanno irrobustite e processi di demolizione nelle zone che possono essere alleggerite. I processi di edificazione sono dovuti alla proliferazione degli osteoblasti, quelli di demolizione agli osteoclasti che esplicano la loro azione attraverso il meccanismo del riassorbimento lacunare. Gli osteoclasti hanno la capacità di consumare lentamente il tessuto osseo grazie alla secrezione di acido lattico, che scioglie i sali minerali di calcio e magnesio depositati sull'osso, e di uno speciale enzima proteolitico che scompone e digerisce la sostanza organica del tessuto osseo in cui i sali sono contenuti. I processi di calcificazione e demolizione si svolgono parallelamente sullo stesso osso, ma in zone diverse determinando negli anni le seguenti trasformazioni:

- **Fase Fetale:** le ossa hanno una struttura intermedia fra quella delle fibre intrecciate (tipiche del periodo embrionale) e quella lamellare.
- **Fase Finale dell'attività infantile:** i processi di erosione e costruzione lamellare sono attivi e già si distinguono i sistemi interni di apposizione lamellare. Inoltre si ingrandisce sempre di più l'interno del canale midollare.
- **Fase Adulta:** l'attività costruttiva periferica rende più spessa e compatta la parte esterna dell'osso, mentre l'interno del canale midollare si amplia maggiormente.
- **Fase Senile:** inoltrandosi nell'età senile, le lacune dell'erosione osteoclastica si allargano e minano la compattezza e la solidità dell'osso; questo è il quadro dell'osteoporosi senile che, diradando e allargando l'intera trama del tessuto osseo, rende lo ossa porose e fragili.

## 1.1. Proprietà meccaniche del tessuto osseo spugnoso

Il tessuto osseo spugnoso è un materiale altamente poroso ed ha una struttura interna molto complessa e gerarchicamente divisibile (fibre di collagene, lamelle, ecc.), come descritto. 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, esse danno origine ad un materiale rigido ma allo stesso tempo duttile. La struttura trabecolare può assumere forme diverse, ma, in tutti i casi, lo spessore medio è più o meno lo stesso, 150-200  $\mu\text{m}$ . In alcune strutture le trabecole possono avere un orientamento pronunciato preferito, in altre questa caratteristica è difficile da riconoscere.

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 può allora essere 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 responsabile del legame 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 siti anatomici diversi e appartenenti a donatori con caratteristiche fisiche diverse;
2. quantificazione della architettura trabecolare da immagini acquisite con vari metodi (Tomografia assiale computerizzata, Assorbimetria a raggi x a doppia energia, Risonanza magnetica, ecc.).

È 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 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).

## 1.2. Patologie: fratture e osteoporosi

Per frattura si intende l'interruzione della continuità ossea di un segmento scheletrico. Le fratture possono essere spontanee o patologiche, se si verificano in assenza di traumi a causa di una diminuita resistenza del tessuto osseo (tumori, osteoporosi), e traumatiche, se determinate da una sollecitazione meccanica che supera i limiti di resistenza del tessuto. In relazione all'integrità della cute che riveste la sede della frattura, si distinguono fratture chiuse (in assenza di lesioni cutanee) o esposte, in cui è presente una breccia cutanea che mette in comunicazione il segmento scheletrico con l'ambiente esterno. Le fratture esposte nel 10-15% dei casi degenerano in infezioni batteriche di difficile trattamento perché soggette ad elevato inquinamento microbico.

Le fratture femorali e vertebrali sono tra le maggiori cause di mortalità e malattia tra la popolazione anziana. L'incidenza di questa patologia è del 15% rispetto ad esempio al 9% del carcinoma al seno. Il progressivo invecchiamento della popolazione nel mondo occidentale renderà questo fenomeno sempre di maggior rilievo. La causa primaria delle fratture in soggetti anziani è data dal peggioramento delle caratteristiche meccaniche dell'osso, cioè, in prima approssimazione, dall'osteoporosi, una malattia delle ossa caratterizzata dal marcato impoverimento della densità minerale ossea e dal deterioramento microarchitetturale del tessuto (assottigliamento e riduzione del numero di trabecole che costituiscono l'osso spongioso).

Nell'anziano infatti l'equilibrio dinamico tra i processi di deposizione e riassorbimento osseo si sposta in favore di quest'ultimo; sono assai scarsi gli osteoni nuovi mentre abbondano le cavità di riassorbimento, molte delle quali non saranno più riempite da nuovi osteoni. Pertanto, col progredire dell'età si assiste a una progressiva perdita di tessuto osseo, con riduzione della massa ossea totale, condizione conosciuta appunto con il nome di osteoporosi, che comporta una minor resistenza delle ossa, le quali diventano suscettibili alle fratture. La malattia può instaurarsi lentamente, decorrendo asintomatica e rendendosi manifesta con il realizzarsi della frattura, anche spontanea. Essa determina la riduzione d'altezza del soggetto e l'aggravamento delle normali curve del rachide. Sforzi per mantenere o accrescere la massa ossea in pazienti osteoporotici sono basati su terapie farmacologiche (calcitonina, calcio, fluoruri, terapie ormonali, estrogeni, bifosfonati, vitamina D), tuttavia nella popolazione anziana si riscontra una scarsa efficacia del trattamento.

In Italia, come in tutti i paesi occidentali, l'invecchiamento della popolazione è un fenomeno che influenza la prevalenza e l'incidenza dell'osteoporosi. Per prevenire il costo sociale della malattia, un notevole contributo è dato dalla messa a punto di attività di promozione alla salute e dalla gestione del livello di accessibilità di terapie specifiche. L'impoverimento microarchitetturale della matrice ossea è causa di fratture che si verificano soprattutto nelle zone del polso, delle vertebre e del femore prossimale. Le conseguenze legate alle fratture del femore sono molto rilevanti: la mortalità è del 15-25%, la disabilità motoria colpisce più della metà dei pazienti nell'anno successivo alla frattura e solo il 30-40% di queste persone riprende autonomamente le attività quotidiane. Nei prossimi anni si stima che queste fratture aumenteranno di oltre il 50%. L'Italia è la nazione europea con la massima percentuale di ultrasessantacinquenni: 18,3%, contro il 15,7% della Gran Bretagna e il 16,6% della Germania; dati e stime della situazione europea mostrano che il numero di fratture del femore previste è in costante aumento e si calcola che nelle donne si passerà dalle oltre 300.000 fratture del 2000, a quasi 800.000 nel 2050<sup>1</sup>. L'osteoporosi può colpire ogni età, anche se il picco di incidenza è nell'età matura e anziana e può essere primaria o secondaria a varie cause anche iatrogene.

---

<sup>1</sup> Dati disponibili al sito: <http://www.vertebroplastica.it/>

## 1.3. Resistenza meccanica dell'osso

La rilevanza clinica dell'osteoporosi risiede nelle fratture che ne derivano e per questa ragione qualsiasi miglioramento all'impatto dell'osteoporosi sulla salute pubblica dipende da una riduzione delle fratture che ne conseguono.

Una preventiva valutazione del rischio fratture, infatti, è auspicabile per una riduzione delle future fratture e dei futuri interventi diagnostici o terapeutici, con conseguente riduzione dei costi per le cure mediche e/o riabilitative.

Dal punto di vista fisico, gli effetti delle patologie metaboliche dell'osso sul sistema osteoarticolare sono quelli di influenzare le caratteristiche morfologiche dell'osso, e inoltre di determinare differenti risposte meccaniche da parte della struttura ossea.

Per molto tempo vi è stato generale accordo nell'identificare nella densità dell'osso (quantità di tessuto per unità di volume) il principale fattore determinante la resistenza meccanica. La densitometria a raggi X ha pertanto rappresentato il *gold standard* per la quantificazione della componente minerale dell'osso e quindi della valutazione del rischio di frattura legato alla sua composizione materiale.

L'applicazione clinica di questa tecnologia si è basata essenzialmente sui seguenti criteri:

- 1) La massa ossea può essere misurata in maniera abbastanza accurata e in modo sicuro.
- 2) Le fratture dipendono almeno in parte dalla riduzione della massa ossea.
- 3) Non è possibile ottenere queste informazioni da altre valutazioni cliniche.
- 4) La condotta clinica può essere basata sulle informazioni ottenute dalla misurazione della massa ossea.

I fattori importanti, però, che conferiscono la robustezza all'osso sono rappresentati non solo dalla densità minerale ossea, ma anche dalla qualità ossea, intesa come tasso di rimodellamento, grado di mineralizzazione, microarchitettura, dimensioni e geometria dell'osso.

Quindi la sola densità minerale non è sufficiente a determinare con esattezza le reali modifiche della resistenza che si hanno nel corso del processo osteoporotico e dei miglioramenti attribuibili alla terapia farmacologica. Si è quindi giunti ad una migliore definizione di resistenza legandola sia alla densità, come "quantità" d'osso, sia alla sua "qualità", cioè a quelle caratteristiche e proprietà che influenzano la capacità di un osso di resistere alla frattura.

Su queste basi, si sta sviluppando grande interesse nella letteratura scientifica per la comprensione e l'approfondimento del concetto di qualità ossea.

La compromissione della microarchitettura ossea, infatti, costituisce un elemento importante nella genesi delle fratture da fragilità, indipendentemente dalla massa ossea. Dal momento che le alterazioni della geometria e della microarchitettura influenzano in maniera significativa le proprietà meccaniche dell'osso, è necessario che tali parametri possano essere misurati per definire il rischio di frattura (2, 3).

## 1.4. Parametri di valutazione del rischio frattura

### 1.4.1. La densità minerale ossea

La misurazione della densità minerale ossea (*Bone Mineral Density*, BMD) è ampiamente accettata come metodo quantitativo per la diagnosi di osteoporosi e predizione del rischio di frattura. L'organizzazione mondiale della sanità ha stabilito per la diagnosi di osteoporosi delle soglie di BMD basate sul numero di deviazioni standard dal valore medio di BMD di un giovane individuo adulto: questo parametro è definito *T-score*. Il rischio di frattura al collo del

femore e alle vertebre approssimativamente raddoppia ad ogni deviazione standard al di sotto del valore medio di BMD di un giovane individuo adulto. Questa metodica di diagnosi ha tuttavia delle limitazioni che vanno dal tipo di strumento usato per calcolare la densitometria, al sito dove effettuare la misurazione. Il *gold standard* per la misurazione della BMD è rappresentato dalla Assorbimetria a raggi x a doppia energia (*Dual-Energy X-ray Absorptiometr*, DEXA) con misurazione a livello del collo del femore o a livello delle vertebre.

Sebbene la BMD possa predire il rischio di frattura vi è tuttavia una forchetta di variazione in cui la BMD diminuisce e il rischio di frattura aumenta, e non esiste una soglia oltre la quale il rischio di frattura è zero (4).

Il cambiamento nel valore della BMD dovrebbe quindi essere valutato con molta cautela; inoltre, molti altri fattori influenzano la robustezza dell'osso, tra cui il tasso di rimodellamento osseo (*bone turnover*), la geometria, la mineralizzazione e la microarchitettura.

#### **1.4.2. Rimodellamento osseo**

Il processo di rimodellamento osseo è portato avanti dall'Unità Multicellulare di Base (BMU) composta da osteoclasti e osteoblasti (5); meccanismi locali nel microambiente dell'osso controllano il processo di rimodellamento. La sequenza degli eventi è la seguente: si attivano le cellule precursori degli osteoclasti che successivamente si fondono a formare osteoclasti attivati che producono un riassorbimento dell'osso.

Questo processo è seguito da neoformazione di osso da parte degli osteoblasti, che rimpiazza quello demolito dagli osteoclasti. L'osteoporosi si verifica quando il bilancio costruzione / riassorbimento è a vantaggio del riassorbimento. L'aumento del riassorbimento, durante un lungo periodo di tempo, produce cavità nelle ossa e aumenta il rischio di frattura. Come la BMD, anche il rimodellamento osseo è un indice parziale, che spiega solo parte della riduzione del rischio di frattura.

#### **1.4.3. Mineralizzazione dell'osso**

Oltre al volume del tessuto osseo, si può considerare la robustezza dell'osso che è determinata dal grado di mineralizzazione della matrice ossea. Durante il processo di rimodellamento l'osso, appena depono, è relativamente demineralizzato; affinché sia completamente mineralizzato è richiesto del tempo. Durante il rimodellamento rapido il processo di completa mineralizzazione ritarda, se confrontato con condizioni di turnover più lente. Le terapie anti-riassorbimento diminuiscono il processo di riassorbimento osseo, rendendo possibile la mineralizzazione. L'aumentata mineralizzazione della matrice potrebbe essere il fattore che spiega l'efficacia delle terapie anti-riassorbimento.

Al contrario, la over-soppressione del turnover osseo potrebbe potenzialmente portare ad un lieve aumento della fragilità ossea, poiché si accumulerebbero i microdanni.

Tuttavia a oggi non ci sono prove nell'umano che questo spostamento del processo di mineralizzazione rispetto alla situazione fisiologica, sia sufficientemente severo da intaccare la qualità dell'osso (6).

#### **1.4.4. Dimensione e geometria dell'osso**

Misure ossee come il diametro esterno e lo spessore della corticale giocano i ruoli maggiori nella determinazione della robustezza dell'osso (7). Sotto una specifica condizione di carico la distribuzione degli stress è determinata interamente dalla geometria dell'osso. Da un punto di

vista meccanico, aumentando il diametro esterno dell'osso si aumenta la resistenza alla flessione. Nell'osso corticale, le diminuzioni della massa ossea associate all'invecchiamento sono accompagnate da un meccanismo compensatorio che porta ad un generale aumento del diametro dell'osso che aiuta a resistere alle rotture (8). La maggiore resistenza delle ossa lunghe maschili in confronto a quelle femminili è dovuta alle dimensioni dell'osso, alla geometria e non semplicemente alla BMD.

#### 1.4.5. Microarchitettura dell'osso

Con il termine microarchitettura dell'osso si intende la modalità in cui le trabecole sono interconnesse in una rete tridimensionale.

La competenza biomeccanica dell'osso spugnoso dipende non solo dalla quantità assoluta di osso presente ma anche dalla microstruttura trabecolare dell'osso (9). Misurazioni istomorfometriche effettuate su biopsie di donne con e senza osteoporosi postmenopausale hanno mostrato che le trabecole sono più sottili, meno numerose e distanziate maggiormente nelle donne che presentano osteoporosi postmenopausale, rispetto a donne che non la presentano. La ridotta connettività tra le trabecole può spiegare perché l'osso osteoporotico appare più fragile di quanto sia suggerito dalla semplice BMD.

L'attività osteoclastica associata all'alto *bone turnover* nelle donne in postmenopausa provoca la perforazione e il riassorbimento delle lamine trabecolari, portando alla perdita delle trabecole e alla diminuzione della connettività trabecolare. Se un significativo numero di trabecole viene perso, la connettività all'interno della struttura *lattice-like* è compromessa, così come sono compromesse le proprietà meccaniche dell'osso trabecolare. La distruzione della struttura di rete tridimensionale di trabecole, che avviene con l'età, è caratterizzata per lo più dalla perforazione delle trabecole che decorrono orizzontalmente. La perdita di robustezza dell'osso in questa situazione è spiegata al meglio usando il principio di *Eulero*, che dimostra come la robustezza di una colonna sia inversamente correlata al quadrato della lunghezza della parte non sostenuta della colonna stessa (10). Dal principio di *Eulero* si evince che una importante resistenza alla compressione si perde quando si perde una singola trabecola orizzontale o che colleghi a croce due trabecole verticali. L'osso è un materiale anisotropo, cioè le sue proprietà meccaniche variano a seconda della direzione in cui viene applicata la forza. La perdita di trabecole orizzontali diminuisce la forza compressiva sufficiente a provocare una frattura e quindi aumenta l'anisotropia dell'osso.

La stereologia applicata alle sezioni istologiche ha rappresentato il *gold standard* per la valutazione della microarchitettura del tessuto osseo e, in particolare, dell'organizzazione strutturale delle trabecole.

Solo recentemente la microtomografia a raggi X ( $\mu CT$ ) è stata presa in considerazione come tecnica d'analisi per i numerosi vantaggi che essa offre (11). Rispetto alla più tradizionale istologia, infatti, è un metodo d'indagine non distruttivo, che mantiene la struttura del campione intatta, permettendo prove e analisi ulteriori (come ad esempio le prove meccaniche); benché quindi sia un metodo non invasivo e applicabile solo a piccoli campioni in vitro, tramite la  $\mu CT$  è stato possibile combinare le informazioni strutturali del campione osseo esaminato (es. densità e spessore trabecolare) con le proprietà meccaniche determinate sperimentalmente (es. modulo elastico, tensione di rottura) (12). La  $\mu CT$  inoltre viene impiegata in attività di ricerca pre-clinica, per lo sviluppo di metodiche per la valutazione biomeccanica e funzionale di nuovi dispositivi, della chirurgia ortopedica assistita dal calcolatore, di tecnologie che consentono la generazione di modelli per l'analisi biomeccanica delle strutture muscolari e scheletriche, a partire dall'analisi d'immagini.

## 2. ANALISI DELLA MICROARCHITETTURA TRABECOLARE DELL'OSSO

### 2.1. Tecniche d'indagine

La stereologia applicata alle sezioni istologiche per anni ha rappresentato il *gold standard* per la valutazione della microarchitettura del tessuto osseo e, in particolare, dell'organizzazione strutturale delle trabecole. Essa consiste nell'estrarre dei campioni ossei e analizzare le sezioni istologiche (bidimensionali) tramite istomorfometria convenzionale.

Grazie ai progressi raggiunti dai sistemi d'*imaging* ad alta risoluzione, da alcuni anni è invece possibile una valutazione tridimensionale della microarchitettura ossea di campioni in vitro.

Ovviamente perché i risultati siano attendibili, le tecniche d'analisi tridimensionali adottate devono essere adatte alle caratteristiche della microstruttura ossea.

In media, le trabecole dell'osso spugnoso hanno spessore di ~100-150  $\mu\text{m}$  e sono separate da spazi di ~500-1000  $\mu\text{m}$ . La risoluzione quindi deve essere almeno simile alla dimensione delle trabecole e idealmente isotropa (identica nelle tre dimensioni). Quando si verificano queste condizioni allora è possibile ottenere delle informazioni morfologiche e topologiche attendibili. Sezioni più spesse di 500  $\mu\text{m}$  non consentono un accesso diretto alla rete trabecolare: in questa situazione i parametri ricavati si dicono "apparenti" o si dice che si è analizzata la *texture* (13).

Ad oggi, le tecniche d'*imaging* ad alta risoluzione disponibili sono:

- *Micro-tomografia a sincrotrone* (SR $\mu$ CT), che è caratterizzata dall'estrema coerenza e monocromaticità della radiazione utilizzata. La luce di sincrotrone è una radiazione che viene prodotta da particelle cariche che viaggiano a una velocità prossima a quella della luce all'interno di un percorso curvo come quello costituito da un acceleratore di particelle. Nell'analisi della microarchitettura trabecolare tale tecnica può raggiungere risoluzioni di 1  $\mu\text{m}$  e scendere anche oltre la scala micrometrica (nanoCT). Le apparecchiature di questo tipo sono però molto costose, e per questo scarsamente utilizzate, e applicabili solo per studi in vitro.
- *Micro-tomografia* ( $\mu$ CT) a radiazione policromatica (con fotoni a differente energia), tipicamente a fascio conico. La risoluzione varia dai 7 ai 20  $\mu\text{m}$  o più bassa e possono essere analizzati cilindri ossei che misurano da pochi millimetri fino ad 80 mm.
- *micro-Quantitative Computed Tomography* ( $\mu$ QCT) e la *peripheral Quantitative Computed Tomography* (pQCT) che hanno risoluzioni dell'ordine dei 250  $\mu\text{m}$ . Per quanto detto prima tali risoluzioni risultano troppo alte per un'analisi corretta dello spessore delle trabecole. Per raggiungere risoluzione maggiori in questo caso è necessario aumentare la dose di radiazione somministrata al paziente con ovvie ripercussioni negative.
- *Scanning Acoustic Microscope* (SAM). In questo caso il campione viene analizzato utilizzando le onde sonore. La risoluzione raggiungibile dipende dalla lunghezza d'onda utilizzata (25  $\mu\text{m}$  per 50 MHz e 2  $\mu\text{m}$  per 900 MHz), ma per quanto accurata, l'analisi è possibile solo per il caso bidimensionale e richiede una specifica preparazione del campione. In compenso questa tecnica consente una valutazione quantitativa delle proprietà elastiche del materiale analizzato (14).
- *Micro-risonanza magnetica* ( $\mu$ MRI). Risoluzioni spaziali dell'ordine di 50  $\mu\text{m}$  richiedono la generazione di campi magnetici molto elevati e, a differenza della  $\mu$ CT, restituisce

immagini poco contrastate per le quali diventa particolarmente difficile la fase di segmentazione.

## 2.1.1. La microtomografia computerizzata

In questo rapporto si farà riferimento ad immagini ottenute da un microtomografo da tavolo, per tale motivo, nel seguito, verranno brevemente introdotti i principi che regolano il funzionamento di tale apparecchiatura e saranno esposte alcune considerazioni di carattere pratico.

### 2.1.1.1. Principi di funzionamento

La microtomografia ( $\mu$ -CT) è una particolare realizzazione della Tac che, lavorando su piccoli campioni di solito di pochi millimetri di grandezza, consente di raggiungere una risoluzione spaziale dell'ordine dei micron.

Come per la Tac, con la  $\mu$ -CT è possibile ricostruire la struttura interna di un oggetto opaco senza che questo sia distrutto, ottenendo non solo la tridimensionalità dell'informazione ma anche la visualizzazione della microstruttura interna dell'oggetto analizzato con la possibilità di effettuare opportune misurazioni e di fornire informazioni più complete sulle strutture, sia superficiali che interne. 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.

La microtomografia computerizzata fonda il suo funzionamento sull'utilizzo di un tubo radiogeno, generatore di raggi X, e un rivelatore di radiazione. Il principio alla base dei sistemi di microtomografia a raggi X è quindi simile a quello della Tac, con la differenza che durante la scansione la geometria del sistema sorgente-rivelatore è fissa, mentre il campione da analizzare ruota. In pratica, l'oggetto viene posto in un'apposita camera e posizionato su un supporto rotante posto tra una sorgente a raggi X e i detectors.

La sorgente di raggi X emette un fascio di radiazioni che investe il campione e interagisce con la materia venendo così attenuato da quest'ultima, in maniera strettamente dipendente dalla sua composizione interna. Il fascio incidente è di tipo conico, in modo da illuminare un'ampia sezione dell'oggetto analizzato.

L'intensità della radiazione che emerge dal campione viene rilevata tramite i detectors ad alta risoluzione e dà luogo a quella che viene chiamata immagine "proiezione". I dati raccolti vengono poi trasmessi ad un opportuno calcolatore.

L'oggetto viene quindi ruotato per piccoli incrementi angolari fino a  $180^\circ$  e per ogni rotazione viene registrata la proiezione. Il calcolatore analizza i dati registrati per produrre un'immagine 2D dei coefficienti di assorbimento (*slice*). La sequenza delle immagini tomografiche è ottenuta dall'applicazione di algoritmi di ricostruzione, tipicamente *Filter Back Projection* (FBP), a partire dalle immagini di *slice*.

La risoluzione spaziale dipende essenzialmente dal numero di scansioni eseguite. La capacità di usare le esposizioni prolungate ai raggi X, senza problemi di non linearità e di saturazione termica del rivelatore, permette un numero di scansioni del campione elevatissimo da cui una risoluzione spaziale elevatissima, tuttavia un numero di scansioni elevato comporta un tempo di ricostruzione di alcune ore.

### 2.1.1.2. Vantaggi e limiti

L'uso del microtomografo come sistema di acquisizione consente di ricostruire e analizzare la struttura interna del campione in maniera completamente non distruttiva. La ridotta macchia focale, unitamente alla possibilità di ingrandimento per via geometrica del campione sul piano di acquisizione, ovvero il tipo di rivelatore impiegato e la dimensione dei suoi pixel, offrono la possibilità di raggiungere, in linea di principio, risoluzioni spaziali dello stesso ordine di grandezza delle dimensioni della macchia focale; nella pratica, dettagli di pochi micrometri possono venire evidenziati su campioni di dimensioni millimetriche.

Se, come già accennato, la risoluzione spaziale oggi disponibile è tipicamente dell'ordine di pochi micrometri, è tuttavia vero che la qualità complessiva di una *slice* ricostruita non dipende soltanto dal potere risolutivo delle singole componenti di un apparato per  $\mu$ -CT, ma è condizionata anche da altri fattori (alcuni dei quali riportati nel seguito) e dai numerosi artefatti presenti nelle *slice*, causati dalle intrinseche limitazioni dovute al processo di acquisizione e dall'incertezza geometrica associata al sistema, che si ripercuote poi nel successivo processo di ricostruzione.

Innanzitutto è importante che l'oggetto analizzato sia contenuto all'interno del campo dei raggi X e che non si muova, cioè sia stabilmente fissato al supporto rotante durante la scansione. Per garantire che il campione rimanga all'interno del fascio dei raggi X, la forma ottimale del campione è quindi quella cilindrica; così quando è possibile, è meglio avere a disposizione campioni cilindrici, usando dei campionatori o impacchettando l'oggetto in un contenitore cilindrico di un materiale quasi trasparente ai raggi X.

È utile ricordare che la geometria conica del fascio introduce un certo grado di incertezza associato ai numerosi parametri liberi e richiede pertanto l'impiego di algoritmi di ricostruzione più complessi (15).

A causa della radiazione policromatica inoltre, il centro del campione risulta più esposto ai raggi X ad alta energia rispetto ai contorni più esterni e per tale ragione ha un'apparenza più scura (fenomeno del *beam hardening*). Di conseguenza, se nel processo di ricostruzione dell'immagine non è incluso un algoritmo di correzione, la distribuzione dei livelli di grigio è determinata non solo dalla natura fisica del campione, ma anche dalla sua dimensione e dal grado di mineralizzazione.

I cristalli di scintillazione che ricevono la radiazione, poi, peggiorano con l'uso producendo dei punti scuri che, per il sistema di rotazione del campione, si traducono in "artefatti ad anello" nella ricostruzione 3D. Anche questi artefatti vengono eliminati grazie all'applicazione di particolari algoritmi di correzione.

Se non risolti, la presenza di questi disturbi può rendere problematiche le successive fasi di segmentazione e analisi delle immagini microtomografiche.

## 2.2. Parametri utilizzati per valutare la microarchitettura trabecolare ossea

Per la valutazione della microarchitettura dell'osso, molti dei parametri impiegati in istomorfometria convenzionale possono essere utilizzati anche con le tecniche d'*imaging* ad alta risoluzione. Di seguito si introducono alcuni tra gli approcci di valutazione bidimensionali più utilizzati e i descrittori tridimensionali di più recente introduzione.

### 2.2.1. Descrittori classici

I primi parametri descrittivi della microarchitettura ossea tridimensionale furono sviluppati da Parfitt (16) e vengono di seguito riportati:

- *Trabecular Thickness*, Tb.Th (mm). Rappresenta lo spessore delle trabecole.
- *Trabecular Separation*, Tb.Sp (mm). Rappresenta la distanza presente fra le trabecole.
- *Trabecular Number*, Tb.N ( $\text{mm}^{-1}$ ). Indica il numero delle trabecole per unità di lunghezza.

Tali parametri vengono ricavati combinando le misurazioni della superficie trabecolare con quelle del perimetro, calcolate sulle sezioni istologiche, si tratta cioè di parametri di microarchitettura che sono derivati per via indiretta. Ciò limita la loro affidabilità nella valutazione della microarchitettura dell'osso, in quanto questa varia da sito a sito e dipende da fattori come l'età, lo stato di menopausa, ecc., come dimostrato da uno studio comparato tra istomorfometria e nuove metodiche tridimensionali utilizzate per esaminare 250 biopsie umane di 5 siti differenti (17).

### 2.2.2. *Trabecular Bone Pattern Factor (Tb.Pf)*

Il *Trabecular Bone Pattern Factor (Tb.Pf)* è un metodo proposto da Hahn *et al.* (1992) (18) ed è basato sul principio che in una struttura perfettamente connessa le superfici concave sono abbondanti mentre le superfici convesse sono relativamente poche. Al contrario, in una struttura disconnessa le superfici concave diventano meno numerose di quelle convesse. Nella pratica queste valutazioni vengono effettuate attraverso l'analisi d'immagine, in particolare viene applicato l'operatore di *dilation* (vedi paragrafo 3.2.2.2) della morfologia matematica.

Scelta quindi un'area d'interesse sull'immagine binaria, viene calcolata l'area,  $A_1$ , e il perimetro,  $P_1$ , del tessuto osseo presente

A questo punto viene applicato l'operatore di *dilation*, che ha come effetto quello di aumentare la dimensione delle trabecole, normalmente di 1 pixel, e quindi vengono calcolati gli stessi parametri sulla nuova immagine, denominati  $A_2$  e  $P_2$ . Il Tb.Pf viene definito come il rapporto:

$$\frac{(P_1 - P_2)}{(A_1 - A_2)}$$

In presenza di una rete trabecolare altamente disconnessa, poiché aumenta il numero delle strutture convesse, il processo di dilatazione accresce il perimetro maggiormente di quanto non accade per l'area, quindi se il Tb.Pf cresce la connettività decresce. Questo indice però, per come è definito, tende a sovrastimare le superfici convesse, anche se tale caratteristica risulta particolarmente utile negli studi sull'osteoporosi poiché questa patologia è caratterizzata da una ridotta interconnessione e, conseguentemente, da una predominanza delle strutture convesse.

### 2.2.3. Caratterizzazione della rete trabecolare

La valutazione diretta della connettività trabecolare (19) prevede la trasformazione manuale o computerizzata delle trabecole ossee in una rete di linee (*scheletrizzazione*), che rappresentano una raffigurazione semplificata della struttura trabecolare, e del successivo calcolo:

- del numero di Nodi (*Nd.N*), cioè dei punti in cui 3 o più trabecole si riuniscono
- dei rami terminali (*N.Tm*)

- dei rami di connessione (*Struts*) fra i nodi (*Nd.Nd*), tra i rami terminali (*Tm.Tm*) e fra nodi e rami terminali (*Nd.Tm*).

In genere, ad ogni oggetto o ramo di connessione è associato un colore differente in modo da caratterizzare anche visivamente l'intera rete trabecolare.

Al fine di ottenere un singolo parametro da maneggiare è tipicamente calcolato il rapporto tra le componenti Nodi e Terminali (*Nd/Tm*), che è un indice diretto della connettività trabecolare.

#### 2.2.4. Indice di interconnettività

L'indice di interconnettività (ICI) fu originariamente proposto da Le *et al.* (200) per descrivere la connettività di biomateriali porosi come il corallo marino. Il procedimento è simile a quello visto per la *struct analysis*, ma applicato alle cavità di midollo osseo. In questo caso, al processo di scheletrizzazione, fa seguito una fase di rifinitura per eliminare i rami dello scheletro erroneamente generati a causa dei contorni irregolari delle cavità. Sullo scheletro così ottenuto vengono determinati il numero totale di nodi, i rami di collegamento tra nodo e nodo e quelli tra nodo e terminali. Inoltre viene anche calcolato il numero di "alberi", intesi come struttura composta da nodi interconnessi ad altri nodi o a "rami terminali". A partire da questi dati viene calcolato l'ICI (211). Un aumento di connettività delle cavità contenenti il midollo osseo genera un grande numero di nodi e rami di connessione, associati invece ad un basso numero di "alberi" (ICI elevato), questo corrisponde però ad un'alta frammentazione della rete trabecolare.

Questo metodo è basato sull'analisi dello spazio occupato dal midollo osseo: partendo da un punto scelto a caso in una delle cavità del midollo, si diramano molteplici raggi in tutte le direzioni dello spazio. Ovviamente i raggi verranno interrotti nel loro cammino se incontrano una superficie trabecolare, corticale, il bordo dell'immagine e/o della cavità. Il diagramma così ottenuto costituisce una sorta di stella della quale vengono misurate le lunghezze di ogni raggio (222).

Se la rete trabecolare è molto disconnessa, queste lunghezze diventano più significative. Al fine di migliorare l'accuratezza dell'analisi, generalmente vengono scelti diversi punti da cui generare le stelle, questo aumenta la probabilità di intercettare anche piccole interruzioni della rete trabecolare. A causa dei lunghi tempi d'elaborazione, tipicamente a questa metodologia si preferisce il metodo della massima lunghezza intercettata (*Maximum Intercept Length, MIL*). Il metodo MIL prevede la realizzazione di una serie di griglie costituite da linee parallele orientate secondo angolazioni che variano da 0 a  $\pi$ . Ogni griglia viene poi sovrapposta all'immagine d'interesse, e vengono rintracciati quei segmenti lineari, detti corde, che cadono nelle cavità midollari.

Per ogni griglia viene poi calcolato il cubo della lunghezza di tutte le corde e tale valore viene utilizzato per determinare lo *star volume*. Un alto valore dell'indice di *star volume*, corrisponde ad una rete molto frammentata.

#### 2.2.5. Numero di Eulero

Questo metodo consiste nel valutare il rapporto tra le cavità ossee e le componenti trabecolari ad esse connesse. Può anche 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 ( $\beta_0$ ) meno il numero di cavità presenti ( $\beta_1$ ).

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

Data una struttura dell'osso 3D con  $\beta_0$  particelle ossee separate,  $\beta_1$  connettività, e  $\beta_2$  cavità chiuse, si ha:

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

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

Per reti trabecolari molto connesse, il valore di  $\chi$  è piccolo, al limite addirittura negativo.

### 2.2.6. Massimo percorso nella rete

La rete trabecolare può essere vista come un labirinto in cui teoricamente è possibile muoversi in tutte le direzioni. Maggiori sono le interruzioni nella rete trabecolare, più lungo diventa il percorso da compiere a causa delle numerose discontinuità (233).

### 2.2.7. La dimensione frattale

Gli oggetti biologici sono caratterizzati da un'irregolarità e una complessità che spesso sono difficili da quantificare tramite la geometria euclidea. L'analisi frattale consente di quantificare in qualche modo la complessità di strutture di questo tipo.

La dimensione frattale  $D$  può essere misurata con il metodo del *boxes counting* che consiste nel sovrapporre all'immagine dei contorni delle trabecole, una serie di griglie costituite da quadratini di lato  $g$ . Viene quindi calcolato il numero di quadratini  $N(g)$  che si sovrappongono ai contorni delle trabecole e il ciclo ricomincia con l'applicazione di una nuova griglia caratterizzata da una dimensione  $g$  leggermente più grande. Il parametro  $D$  è ottenuto come pendenza della retta di regressione tra il  $\log N(g)$  e  $\log(g)$  (*Richardson's plot*) (244).

Benché molto utilizzati, nessuno dei parametri descritti sopra è completamente descrittivo della microarchitettura trabecolare e in questo senso non può essere considerato singolarmente. Poiché ognuna delle tecniche risulta sensibile ad una particolare caratteristica o componente della microstruttura, solo il loro uso combinato consente una descrizione della microarchitettura della rete trabecolare.

### 2.2.8. Descrittori tridimensionali

Ai parametri introdotti fino a questo punto devono essere aggiunti quelli derivati dall'uso di recenti apparecchiature d'analisi ( $\mu$ CT,  $\mu$ MRI, ecc.) che consentono l'analisi direttamente nello spazio tridimensionale, eliminando quindi il passaggio dal 2D al 3D.

In particolare, poiché l'uso della  $\mu$ CT consente la valutazione del volume trabecolare e delle caratteristiche delle trabecole direttamente in 3D, sono stati recentemente definiti i seguenti nuovi parametri:

- *Structure Model Index*, SMI: si basa sulla rappresentazione della rete trabecolare in termini di *plate and rods*. Per cui un SMI=0 si ottiene idealmente per una rete composta principalmente da *plates*; SMI=3 indica invece la predominanza di *rods*.
- Grado di anisotropia (*Degree of Anisotropy*), DA. Un materiale isotropo è identico in tutte le direzioni in termini di proprietà meccaniche o fisiche. Il tessuto osseo è invece anisotropo perché è organizzato secondo le direzioni delle forze meccaniche applicate alle ossa (gravità, movimento, ecc.). Valutando l'orientamento nello spazio delle trabecole, questo parametro, indica come le proprietà meccaniche del tessuto osseo dipendono dalla direzione lungo cui le forze sono state applicate.

È bene ricordare che la  $\mu$ CT è utilizzata come metodica d'indagine solo da pochi anni e per tale motivo ancora non c'è stato un processo di standardizzazione nella definizione dei parametri da parte dei produttori delle apparecchiature, seppure necessaria in quanto la validità di alcuni algoritmi di calcolo non è del tutto verificata. In particolare gli algoritmi utilizzati per il calcolo dello spessore delle trabecole sono fortemente influenzati dalla forma stessa degli oggetti misurati: i nodi (le zone di connettività tra le trabecole) hanno una notevole influenza nel calcolo dei valori dello spessore e per tale motivo possono condurre anche a delle conclusioni errate.

### 3. LA MORFOLOGIA MATEMATICA: UN NUOVO APPROCCIO D'ANALISI

Per quanto detto sopra riguardo la poca esaustività dei parametri di microarchitettura utilizzati fino a questo momento e facendo riferimento alla scarsa standardizzazione nelle metodiche di calcolo di alcuni indici, in questa sede si vuole proporre un nuovo approccio all'analisi della microstruttura trabecolare che fa uso della teoria della morfologia matematica.

In particolare, a partire da immagini da  $\mu\text{CT}$ , si vogliono proporre dei nuovi parametri capaci di caratterizzare in maniera possibilmente completa la microstruttura trabecolare di campioni ossei in 3D. Grazie infatti alla tecnica della microtomografia che fornisce un volume tridimensionale d'immagini, è possibile svincolarsi dal processo di passaggio dell'analisi dal bidimensionale al tridimensionale e operare direttamente in tre dimensioni.

In questo modo, e attraverso l'implementazione di algoritmi 3D di analisi d'immagine applicati alle sezioni microtomografiche ricostruite, si vuole trovare una maggiore correlazione tra i parametri morfometrici/strutturali proposti, e le proprietà meccaniche dell'osso, in quanto già diversi studi (255) hanno dimostrato una dipendenza del comportamento meccanico dell'osso dall'organizzazione spaziale delle trabecole.

A tale scopo verranno implementati algoritmi di elaborazione per volumi tridimensionali d'immagini, basati sulla teoria della morfologia matematica che consente l'esame della struttura geometrica di un'immagine (2D o 3D) attraverso le sue connessioni topologiche con un elemento di confronto.

#### 3.1. Concetti preliminari

Per consentire una corretta comprensione delle tecniche d'elaborazione proposte, è utile introdurre alcuni concetti fondamentali come quello di metrica discreta e connessione.

##### 3.1.1. Metriche discrete

Considerando il caso delle immagini binarie (bi o tridimensionali), definiamo  $F=\{1\}$  ed  $F^*=\{0\}$  i due insiemi costituenti una immagine binaria digitalizzata su griglia quadrata.

Chiameremo rispettivamente tali insiemi supporto (*foreground*) e sfondo (*background*).

Dati due pixel  $p$  e  $q$  di coordinate  $(x_1, y_1)$  e  $(x_2, y_2)$ , si definiscono le funzioni distanza  $d_4$  (*city block*) e  $d_8$  (*chessboard*), nel caso bidimensionale:

- $d_4(p, q) = |x_1 - x_2| + |y_1 - y_2|$
- $d_8(p, q) = \max\{|x_1 - x_2| + |y_1 - y_2|\}$

I vicini di un pixel  $p$  sono i pixel aventi da  $p$  distanza unitaria. L'insieme dei vicini di  $p$  costituisce l'intorno di  $p$ . Si parla di intorno  $N_4(p)$  oppure di  $N_8(p)$  a seconda della metrica usata.

Nel caso tridimensionale, dati due voxel  $p$  e  $q$  di coordinate  $(x_1, y_1, z_1)$  e  $(x_2, y_2, z_2)$  si parlerà di funzioni distanza:

- $d_6$  (*city block*) definita come  $d_6(p, q) = |x_1 - x_2| + |y_1 - y_2| + |z_1 - z_2|$ ,
- $d_{18}$  (*chessboard*) definita come  $d_{18}(p, q) = \max\{|x_1 - x_2| + |y_1 - y_2| + |z_1 - z_2|\}$
- $d_{26}$  (*euclidean*) definita come  $d_{26}(p, q) = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2 + (z_1 - z_2)^2}$

Anche nel caso tridimensionale si parla di intorno  $N_6(p)$ ,  $N_{18}(p)$  oppure  $N_{26}(p)$  a seconda della metrica usata.

Un percorso di lunghezza  $n$  da  $p$  a  $q$  è una sequenza di pixel  $p=p_0, p_1, p_2, \dots, p_n=q$ , tale che, con la metrica scelta,  $p_i$  è un vicino di  $p_{i+1}$ , con  $1 \leq i \leq n$ .

Un sottoinsieme di  $F$  (o di  $F^*$ ) è connesso se presi due qualsiasi dei suoi pixel, esiste un percorso tra questi interamente costituito da pixel di  $F$  (o di  $F^*$ ). Ogni sottoinsieme connesso dell'immagine viene denominato componente connessa e identifica un singolo oggetto all'interno dell'immagine.

### 3.1.2. Identificazione delle componenti connesse

L'identificazione delle componenti connesse è un procedimento fondamentale per quei processi di elaborazione delle immagini, come quello proposto in questo contesto, che prevedono una caratterizzazione precisa ma allo stesso tempo differenziata di ogni oggetto presente all'interno del volume.

L'operazione d'identificazione si basa sul concetto di etichettatura. Si tratta cioè di assegnare un'etichetta (o label) ad ogni *voxel* contenuto nell'immagine in maniera tale che tutti i *voxel* appartenenti allo stesso oggetto dell'immagine siano caratterizzati dalla medesima etichetta.

## 3.2. Gli operatori della morfologia matematica

La parola morfologia denota comunemente una branca della biologia che ha a che fare con la forma e la struttura di animali e piante.

Nell'ambito dell'*image processing*, invece, la morfologia matematica fornisce un approccio all'elaborazione delle immagini basato sulla forma.

Essa nasce negli anni '60 in Francia (*Serra, Ecole des Mines*) (26) e si basa sul concetto d'insieme e su alcune operazioni elementari su di esso.

È uno strumento utile per la rappresentazione della forma di una regione e consente di ricavare i contorni, lo scheletro e molte altre informazioni sulla geometria dell'immagine. È inoltre possibile effettuare comuni operazioni di filtraggio come lo *smoothing* e l'*edge detection*.

Gli insiemi nella morfologia matematica sono rappresentati dagli oggetti contenuti nell'immagine.

La struttura dell'immagine viene "sondata" attraverso un insieme speciale chiamato Elemento Strutturante (ES), sulla base del quale viene elaborata l'immagine in input. Esso può avere forma qualsiasi, solitamente definita dall'utente, in quanto fortemente dipendente dal problema da trattare.

L'elemento strutturante viene solitamente rappresentato come una matrice i cui valori, nel caso di immagini binarie, vengono settati a 0, per il *background*, o ad 1 per il *foreground*.

### 3.2.1. Notazioni comuni

Siano  $A, B, C$  insiemi (oggetti) dell'immagine  $I$ , bi o tridimensionale; e siano  $a, c$  e  $w$  elementi di quest'insiemi.

L'elenco sottostante riporta le comuni notazioni insiemistiche che verranno utilizzate nel seguito:

- $a \in A$ ,  $a$  appartiene all'insieme  $A$
- $a \notin A$ ,  $a$  non appartiene all'insieme  $A$

- $A \subseteq B$ ,  $A$  è incluso nell'insieme  $B$
  - $C = A \cup B$ ,  $C$  è dato dall'unione degli insiemi  $A$  e  $B$
  - $C = A \cap B$ ,  $C$  è ottenuto dall'intersezione tra gli insiemi  $A$  e  $B$
  - $A \cap B = \emptyset$ , l'intersezione tra gli insiemi  $A$  e  $B$  è vuota
  - $A^c = \{w \mid w \notin A\}$ , indica l'insieme complementare di  $A$
  - $A - B = \{w \mid w \in A, w \notin B\} = A \cap B^c$ , indica l'insieme differenza
- Di grande importanza sono inoltre le seguenti definizioni:
- Riflessione di  $A$ :  $A^r = \{c \mid c = -a, a \in A\}$
  - Traslazione di  $A$  rispetto ad un vettore  $t$ :  $A_t = \{c \in I \mid c = a + t, a \in A\}$

### 3.2.2. Operatori morfologici

Nell'ambito della morfologia matematica, vengono definiti 5 operatori principali: *Erosion*, *Dilation*, *Opening*, *Closing*, *Hit-or-Miss transform*, che combinati con diversi elementi strutturanti,  $B$ , trasformano un oggetto  $A$  in vario modo. Benché le definizioni siano del tutto generali, per comodità d'esposizione, negli esempi si farà riferimento solo al caso di immagini bidimensionali in bianco e nero. I concetti introdotti, però, possono essere facilmente estesi alle immagini tridimensionali e a quelle a toni di grigio.

#### 3.2.2.1. Erosione

Assieme all'operatore di dilatazione, che verrà descritto successivamente, costituisce il principale operatore morfologico da cui vengono ricavati tutti gli altri.

L'operazione di erosione è definita nel seguente modo:

$$A \ominus B = \{x \mid B_x \subset A\}$$

dove  $A$  è l'immagine da elaborare e  $B$  è l'elemento strutturante.

$O$ , in maniera del tutto equivalente come:

$$A \ominus B = \bigcap_{b \in B} A_{-b}$$

In modo più dettagliato l'erosione opera nel seguente modo: il centro dell'elemento strutturante viene posto su ogni pixel di *foreground* dell'immagine in input; se per ogni pixel dell'elemento strutturante avente valore 1 il corrispondente pixel dell'immagine sottostante è di *foreground*, il pixel in input viene lasciato inalterato, altrimenti viene settato a 0.

In prossimità dei bordi l'elemento strutturante non sempre può essere contenuto interamente nell'immagine cosicché tali punti verranno erosi, ovvero settati come *background*, quindi l'effetto finale di un'erosione è la riduzione dello spessore degli oggetti presenti nell'immagine.

Il risultato dell'operazione di erosione dell'immagine  $A$  tramite l'elemento strutturante  $B$ , può anche essere visto come il luogo dei punti coperto dal centro di  $B$  quando  $B$  si muove interamente in  $A$ .

#### 3.2.2.2. Dilatazione

Si tratta dell'operatore duale dell'erosione e viene definito nel seguente modo:

$$A \oplus B = \{x \mid B_x^r \cap A \neq \emptyset\}$$

dove  $A$  è l'immagine da elaborare e  $B$  è l'elemento strutturante.  
O, in maniera del tutto equivalente come:

$$A \oplus B = \bigcup_{b \in B} A_b$$

In maniera più dettagliata, l'operatore di dilatazione opera nel seguente modo: il centro dell'elemento strutturante viene posto su ogni pixel di *foreground* dell'immagine in input; se almeno uno dei pixel di *foreground* della maschera coincide con uno dei pixel della porzione di immagine sottostante, ovvero se almeno uno dei pixel di tale porzione di immagine ha valore 1, il pixel in input viene settato ad 1; in caso contrario il pixel in input viene settato a 0, cioè *background*.

La dilatazione dell'immagine  $A$ , tramite l'elemento strutturante  $B$  può anche essere vista come il luogo dei punti coperto da  $B$  quando il centro di  $B$  si muove su  $A$ , o altrimenti, sfruttando la dualità degli operatori di erosione e dilatazione, il risultato equivale ad applicare l'operatore di erosione al complemento dell'immagine  $A$ , se l'ES è simmetrico rispetto all'origine.

Dagli esempi è possibile osservare che l'effetto dell'operatore è quello di espandere i bordi delle regioni di *foreground* dell'immagine e di ridurre le dimensioni dei fori eventualmente presenti all'interno degli oggetti.

### 3.2.2.3. Apertura

L'operazione di apertura consiste nell'applicazione di un'erosione seguita da una dilatazione ed è definita nel seguente modo:

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B$$

Un problema dell'operatore di erosione, infatti, è che esso tratta in maniera uguale tutte le regioni dell'immagine e quindi anche quelle sulle quali non si desidera apportare cambiamenti.

Tale problema viene attenuato applicando successivamente l'operatore di dilatazione. L'*opening* ha quindi effetto simile all'erosione ma preserva meglio la struttura degli oggetti.

Possiamo pensare all'applicazione di tale operatore nel seguente modo: l'elemento strutturante viene fatto scorrere all'interno di ogni oggetto dell'immagine; tutti i pixel di *foreground* che possono essere coperti dall'elemento strutturante, tale che esso sia interamente contenuto nella regione di *foreground*, vengono lasciati immutati mentre tutti i pixel di *foreground* che non possono essere sovrapposti alla maschera, senza che essa venga a coprire punti al di fuori della regione di *foreground*, vengono settati come *background*.

Attraverso l'operatore di apertura è possibile rimuovere le regioni che sono più piccole dell'elemento strutturante.

### 3.2.2.4. Chiusura

L'operatore di chiusura è il duale dell'operatore di *opening*, e consiste nell'applicare una dilatazione seguita da una erosione utilizzando lo stesso elemento strutturante.

$$A \bullet B = (A \oplus B) \ominus B$$

Sebbene la dilatazione abbia l'effetto di riempire piccoli buchi negli oggetti di *foreground* essa tratta in modo uguale tutte le regioni dell'immagine. Tale problema viene risolto applicando successivamente l'operatore di erosione.

Anche in questo caso l'effetto è simile a quello che si avrebbe applicando l'operatore di dilatazione, preservando meglio la struttura dell'immagine.

È possibile pensare all'applicazione di tale operatore nel seguente modo: l'elemento strutturante viene fatto scorrere attorno ad ogni oggetto dell'immagine; per ogni pixel di *background*, se l'elemento strutturante può toccare tale punto senza intersecare alcun punto della regione di *foreground* il pixel di *background* rimane tale, altrimenti viene settato come *foreground*.

Attraverso l'operatore di chiusura è possibile riempire le cavità degli oggetti dell'immagine che sono più piccole dell'elemento strutturante.

### 3.2.2.5. Hit-or-miss Transformation

L'operatore di *Hit or Miss Transformation* è utilizzato per individuare particolari *pattern* all'interno di una immagine ed è alla base di molti altri operatori da esso derivabili. Esso viene definito nel seguente modo:

$$A \otimes B = (A \ominus B_1) \cap (A^c \ominus B_2)$$

dove  $B_1$  è l'insieme dei pixel (voxel) che rappresentano il *foreground* dell'ES  $B$ , e  $B_2$  è l'insieme dei pixel (voxel) di *background* di  $B$ , quindi permane il vincolo che  $B_1 \cap B_2 = \emptyset$ . L'insieme  $A \otimes B$  contiene quindi l'insieme delle posizioni in cui  $B_1$  trova *match (hit)* in  $A$  e  $B_2$  trova *match* in  $A^c$ .

L'elemento strutturante  $B$ , con le sue componenti  $B_1$  e  $B_2$ , può essere rivisto come una unica maschera con tre tipi di valori:

- Punti necessariamente di immagine
- Punti di *background*
- Punti non rilevanti, cioè punti la cui presenza all'interno dell'immagine non è significativa.

#### 3.2.2.5.1. Thinning

Si introduce, a questo punto, l'operatore morfologico di *Thinning* che è ottenuto attraverso l'operatore *Hit-or-Miss Transformation* nel seguente modo:

$$A * B = A - (A \otimes B)$$

Si tratta di un'operazione morfologica che ha l'obiettivo di rimuovere determinati pixel di *foreground* dall'immagine binaria, riducendo lo spessore degli oggetti. Viene comunemente utilizzata per l'estrazione dello scheletro di un oggetto

L'operatore è calcolato facendo scorrere l'origine dell'elemento strutturante su ogni pixel dell'immagine in input e confrontandolo con i pixel dell'immagine sottostante. Se i pixel di *foreground* e *background* dell'elemento strutturante sono esattamente uguali a quell'immagine sottostante, il pixel su cui è posta l'origine dell'elemento strutturante viene settato a 0 cioè *background*, altrimenti viene lasciato inalterato.

Una definizione alternativa molto usata per tale operatore prevede come elemento strutturante  $B$  l'uso di una sequenza di elementi strutturanti,  $B_1, B_2, B_3, \dots, B_n$ , tali che  $B = \{B_1, B_2, B_3, \dots, B_n\}$  e  $B_1$  è ottenuto dalla rotazione di  $B_{i-1}$ .

Si tratta quindi di un processo iterativo in cui l'operazione di *thinning* viene applicata tra  $A$  e  $B_1$ , quindi al risultato viene nuovamente applicato l'operatore ma con elemento strutturante  $B_2$  e così via fino a  $B_n$ .

### 3.2.2.5.2. *Pruning*

La procedura di estrazione dello scheletro di un oggetto, skeletonizzazione, a partire dall'operatore di *thinning*, può essere ulteriormente migliorata implementando una variante di questo operatore, detta *pruning* (potatura). Gli algoritmi di skeletonizzazione basati sul *thinning*, infatti, possono fornire un risultato impreciso, ad esempio in alcuni casi si riscontra la presenza di piccole protuberanze, o di "bracci morti", che non danno un contributo attivo alla costruzione dello scheletro dell'immagine. L'algoritmo di *pruning*, attraverso la definizione di un opportuno elemento strutturante rotante, è in grado di individuare e quindi rimuovere tali protuberanze. Come accennato sopra, esso deriva direttamente da quello di *thinning*, ma a differenza del precedente è eseguito per un numero finito di cicli, a seconda delle esigenze del caso in esame.

Si tratta di definire un ES in grado di individuare i bracci morti dello scheletro dell'immagine, per tale motivo la strategia migliore è quella di definire un ES che abbia le stesse caratteristiche degli oggetti che si stanno cercando.

Per essere sicuri di intercettare tutti i segmenti indesiderati, quindi, vengono definiti tanti ES quanto vale la metrica discreta che si sta utilizzando.

Benché il processo di *pruning* sia estremamente potente e in molti casi efficace, anch'esso non è esente da errori; infatti può capitare che oltre ad eliminare i bracci morti, l'operazione di *pruning* possa togliere anche le estremità dello scheletro dell'immagine. A rigor di logica, infatti, le estremità rientrano proprio nella categoria degli oggetti che in genere si vogliono eliminare con questa operazione. Poiché l'algoritmo non è in grado di distinguere tra i bracci morti indesiderati e quelli invece utili, la procedura viene eseguita solo per un numero di cicli definito dall'utente, che di volta in volta a fine ciclo può verificare il risultato e decidere se proseguire. Ecco perché non è possibile definire a priori il numero di cicli da far eseguire all'operatore di *pruning*, ma si ritiene necessario procedere per via sperimentale valutando caso per caso a seconda dei risultati ottenuti.

## 4. PROPOSTA DI ALGORITMI D'ANALISI

Le procedure d'analisi che verranno proposte in questa sezione si considerano applicate a un volume d'immagini già segmentato e in cui è stata selezionata una regione (volume) d'interesse, che si ritiene cioè abbastanza rappresentativa dell'intero volume.

### 4.1. Procedure preliminari: segmentazione

Benché non discussa in questa sede, la segmentazione è una delle fasi più critiche di tutto il processo d'analisi, nonché uno dei problemi tipici dell'elaborazione d'immagini ed è quindi opportuno presentarne almeno gli aspetti salienti.

Obiettivo della segmentazione è la separazione di uno o più oggetti di interesse dallo sfondo (*background*) dell'immagine.

Nel caso in esame, in particolare, lo scopo è quello di separare la fase solida (trabecole) del campione osseo considerato, dalle cavità midollari che invece appaiono vuote.

A tale fine la tecnica più semplice consiste nello scegliere una singola soglia globale  $T$ , e nell'impostare a 0 i pixel la cui intensità è inferiore a  $T$  e a 1 i rimanenti.

Normalmente la soglia ideale viene calcolata a partire dall'istogramma dell'immagine, che è la rappresentazione grafica del numero di pixel che assumono un fissato livello di luminosità.

La presenza di due o più picchi, nella distribuzione dell'istogramma, causata da oggetti a luminosità medie diverse, consente di scegliere in modo relativamente facile la soglia ottimale, determinandola come minimo locale tra i due picchi individuati dallo sfondo (cavità midollari) e dagli oggetti presenti (trabecole).

Il risultato della segmentazione su immagini in scala di grigio, è dato da un insieme d'immagini binarie che rappresentano il punto di partenza delle successive elaborazioni.

Sebbene molto semplice, il metodo di segmentazione appena descritto presenta alcuni problemi.

In certi casi, infatti, a causa del processo stesso di generazione delle immagini, la distribuzione dell'istogramma è tale per cui non si evidenziano picchi, o questi appaiono parzialmente sovrapposti, e la scelta del valore della soglia globale è totalmente affidata all'esperienza dell'operatore. Per tale motivo spesso tale tecnica produce degli errori nella classificazione che sono proporzionali alla percentuale dei valori di grigio che risultano comuni ad entrambe le popolazioni che si intendono segmentare. Sono state allora suggerite delle tecniche di segmentazione più oggettive, che ad esempio tengono conto anche delle dipendenze spaziali dei voxel/pixel oltre al loro valore di luminosità.

La difficoltà di automatizzare il processo di valutazione della soglia ottimale e la consapevolezza che tale scelta si ripercuote inevitabilmente su tutte le successive fasi di analisi, rende il procedimento di segmentazione particolarmente delicato. Nel panorama delle metodiche di elaborazione delle immagini digitali (27) sono stati fatti molti sforzi per risolvere tale problematica e sicuramente molto può essere ancora fatto per rendere il procedimento di segmentazione più efficiente e meno sensibile alle considerazioni soggettive del singolo operatore.

## 4.2. Successive opening

L'algoritmo *successive opening* (26) è un operatore per l'analisi d'immagine molto potente che sfrutta gli operatori morfologici per ottenere una caratterizzazione piuttosto dettagliata della struttura descritta da un volume d'immagini. Esso consiste nell'applicare in maniera reiterata l'operatore morfologico di *opening* al volume tridimensionale d'immagini binarizzate, usando, di volta in volta, elementi strutturanti di forma sferica a diametro crescente.

L'applicazione di tale metodo a immagini di sezioni del tessuto osseo consente di ottenere diversi tipi d'analisi, ognuno dei quali descrive una delle caratteristiche dell'organizzazione strutturale dei campioni analizzati.

### 4.2.1. La distribuzione dimensionale delle trabecole

Grazie all'approccio del *successive opening* è possibile partizionare lo spazio delle trabecole in funzione dello spessore delle trabecole stesse. La distribuzione spaziale delle trabecole (*Trabecular Space Dimension*) è in pratica un istogramma di frequenza delle dimensioni che caratterizzano l'insieme delle trabecole.

La quantificazione della geometria di oggetti complessi come le trabecole dipende dal modo in cui viene partizionato lo spazio degli oggetti presenti nel volume d'interesse. La partizione infatti non è univoca, ma è legata al parametro dimensionale scelto per caratterizzare le parti elementari, ad esempio si possono considerare le componenti connesse, oppure le parti separate da strozzature o ancora quelle caratterizzate da un certo spessore delle pareti solide.

Più specificamente, per l'applicazione considerata in questa sede, la curva di distribuzione dimensionale che se ne ricava è una così detta distribuzione di quantità (non di frequenza), che fornisce informazioni sulla ripartizione del volume totale delle trabecole in funzione della distanza tra le pareti solide.

Nella Figura 1 è mostrato un esempio di TrSD ottenuto dall'analisi di un campione di osso umano.

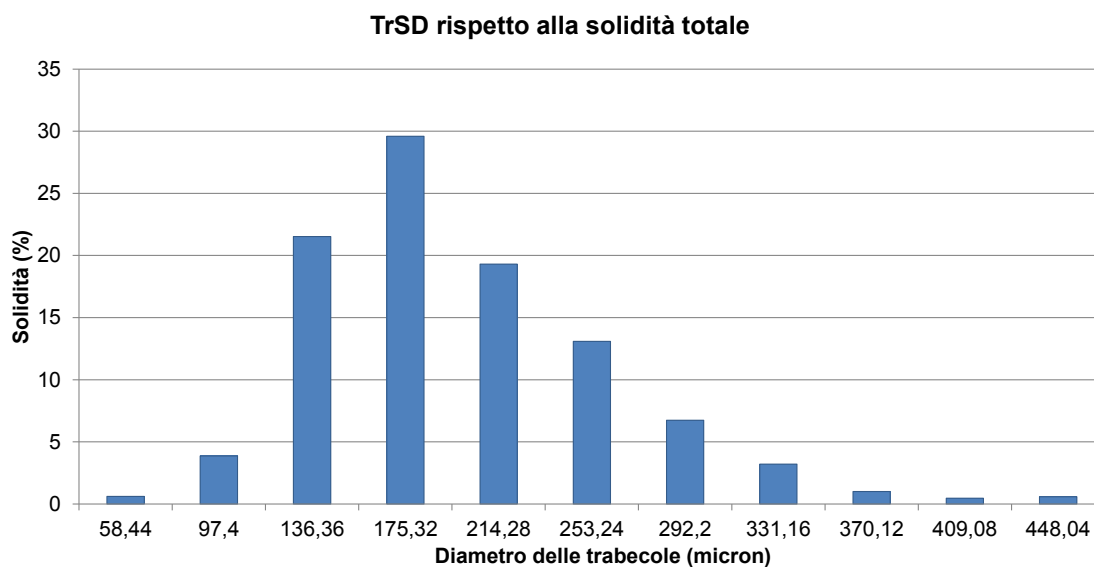


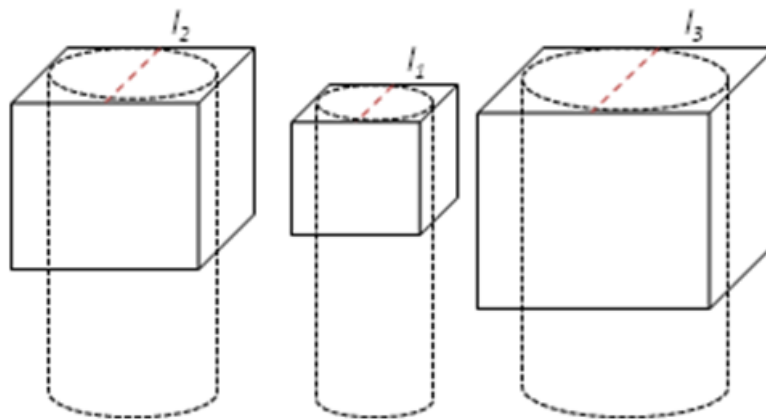
Figura 1. Esempio di un grafico di TrSD relativo ad un campione osseo umano (*femoral neck*)

Questo tipo di classificazione può essere molto significativa ai fini della correlazione delle caratteristiche strutturali del campione osseo considerato con le sue proprietà meccaniche. Una distribuzione siffatta dello spessore delle trabecole, calcolata nel volume tridimensionale delle immagini, rappresenta, infatti, una quantificazione della microarchitettura trabecolare che, come è noto <sup>1</sup>, è possibile collegare al calcolo delle costanti elastiche del tessuto osseo spugnoso. Legando poi il parametro così ottenuto con il valore di porosità, che è dato dal rapporto fra il volume occupato dalle cavità midollari delimitate dalla struttura trabecolare e il volume totale, è anche possibile monitorare il rimodellamento della struttura interna. Se ad esempio, ad un elevato valore di porosità corrispondono valori altrettanto elevati dello spessore trabecolare, ciò probabilmente è dovuto ad una risposta del tessuto osseo che, magari in seguito ad un deficit della componente ossea causato da una patologia, fortifica la struttura presente per sopportare medesimi carichi in presenza di una struttura meno intensa.

Dal punto di vista implementativo, la costruzione della curva di distribuzione dimensionale richiede l'applicazione dell'operatore morfologico di *opening* e quindi la definizione di un opportuno elemento strutturante. Lavorando con volumi tridimensionali d'immagini, si è scelto come ES la naturale estensione in 3D dell'ES circolare, cioè una sfera<sup>2</sup>.

Si ricorda infatti che l'obiettivo dell'analisi proposta è quello di costruire la curva della distribuzione dimensionale delle trabecole, si vuole cioè partizionare l'intero spazio delle trabecole, contenute nel volume esaminato, in funzione del loro diametro, della distanza cioè tra due pareti opposte che costituiscono ogni trabecola.

Se la microstruttura interna dell'osso spugnoso avesse un andamento regolare come quello, per fare un esempio, di una rete idraulica caratterizzata dalla presenza di tubi che differiscono solo nel diametro, la curva di TrSD verrebbe costruita come l'istogramma della misura dei diametri presenti. In altre parole, come un grafico in cui, alla misura di ogni diametro delle sezioni di tubo presenti, è associata la frequenza di occorrenza di quel diametro, cioè il numero di tubi caratterizzati da un diametro della sezione pari a quello considerato. In questo caso allora, l'ES, che opera come strumento di confronto per sondare le caratteristiche degli oggetti esaminati, potrebbe essere semplicemente definito come un cubo di lato  $l$  voxel (Figura 2). Il calcolo della lunghezza del diametro di ogni tubo presente può essere eseguito infatti facilmente verificando di volta in volta che la sezione dei tubi sia contenuta nell'ES.



**Figura 2. Rappresentazione di ES di forma cubica di lato  $l_1$ ,  $l_2$  e  $l_3$**

<sup>2</sup> In realtà per la natura intrinsecamente digitale di questi elementi, che sono infatti realizzati tramite voxel cubici, non è possibile riprodurre esattamente una sfera, ma solo una sua approssimazione.

Nel caso dell'osso spugnoso però, capita che, non solo due oggetti trabecola abbiano diametri diversi, ma che lo stesso oggetto abbia un diametro variabile. Si tratta, infatti, di oggetti caratterizzati da una struttura poco regolare, per cui risulta già difficile definire il diametro della sezione. Per ovviare a questa ambiguità, si è deciso di considerare come parametro dimensionale di riferimento, la distanza minima (spessore) tra le pareti ossee che costituiscono la trabecola. Si capisce allora per quale motivo è stato scelto come ES proprio la sfera: essa è, infatti, il luogo geometrico dei punti equidistanti dal suo centro e quindi è quello che meglio si presta all'identificazione della distanza minima tra le pareti solide, quando queste sono orientate secondo qualunque direzione. Non è detto infatti che le trabecole si sviluppino solo in verticale o in orizzontale, ma si verifica che esse siano orientate anche nelle altre direzioni, si rende quindi necessario un ES dalle caratteristiche indipendenti dal particolare orientamento considerato, come appunto quello di forma sferica.

Per costruire la curva di TrSD, dopo ogni applicazione dell'operatore di *opening*, il raggio dell'elemento strutturante viene incrementato di un *voxel* in maniera da intercettare spessori delle trabecole sempre più grandi. Per ogni ciclo viene allora calcolata la porzione di volume solido caratterizzata da una distanza tra le pareti pari proprio al diametro dell'ES. Viene cioè individuata una particolare classe dimensionale, e la procedura è reiterata fino a raggiungere un diametro pari al massimo spessore delle trabecole del campione in esame.

### 4.3. Connettività

Al fine di trovare delle relazioni significative tra le proprietà microstrutturali del tessuto osseo e quelle meccaniche, non si può prescindere dallo studio della connettività. Infatti, quando un significativo numero di trabecole viene perso, la connettività all'interno della struttura dell'osso trabecolare è compromessa e, di conseguenza, anche le sue proprietà meccaniche.

A tale proposito, nell'ambito di questo studio, la valutazione della connettività è basata sull'esistenza e la qualità di eventuali collegamenti continui costituiti da trabecole, che mettano in comunicazione due punti prestabiliti, all'interno del campione analizzato. Si vuole indagare, cioè, se sono o meno presenti delle fratture che interrompono tali collegamenti, lungo una prefissata direzione, e quali sono le loro caratteristiche morfologiche.

La sola distribuzione dimensionale, infatti, non tiene conto, in generale, del modo in cui sono collegate le diverse classi dimensionali identificate con il calcolo della TrSD.

Il metodo che si vuole proporre caratterizza la connettività tra coppie di facce opposte del cubo che rappresenta il volume d'interesse (Figura 3).

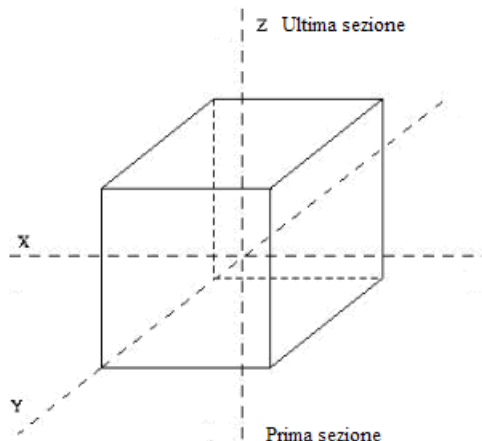


Figura 1. Rappresentazione del volume nello spazio tridimensionale

Il calcolo della connettività prevede due fasi distinte: nella prima vengono identificate le componenti connesse che collegano ognuna delle coppie di facce opposte; nella seconda, tramite l'operatore di opening, viene eliminata la classe dimensionale relativa al raggio dell'ES e calcolato il volume connesso residuo. Tale processo viene ripetuto per diametri dell'ES via via crescenti, fino ad esaurire tutte le classi dimensionali.

Per quanto riguarda l'individuazione delle componenti connesse, come precedentemente spiegato, si è pensato di cercare, all'interno del campione analizzato, gli oggetti trabecola che costituiscono un percorso ininterrotto tra due punti prestabiliti.

A tale proposito è stato proposto un metodo per caratterizzare sia quantitativamente che qualitativamente gli oggetti trabecola che mettono in comunicazione le coppie di facce opposte del cubo che rappresenta il volume d'interesse.

È bene sottolineare che il risultato di questa analisi dipende fortemente dalla metrica discreta scelta. In particolare, si ricorda che per il caso tridimensionale, a seconda della funzione distanza utilizzata, per ogni punto  $p$  (voxel del volume considerato) è possibile fare riferimento a tre diversi intorni:  $N_6(p)$ , se si stanno considerando solo le sei facce del cubo che costituisce ogni voxel,  $N_{18}(p)$ , se oltre alle sei facce si considerano anche i dodici spigoli, oppure  $N_{26}(p)$  se si considerano le 6 facce, i dodici spigoli e gli otto angoli. In pratica ognuno di questi intorni determina una diversa "configurazione di vicinanza", per cui se si sceglie l'intorno  $N_6(p)$ , allora due voxel appartengono allo stesso oggetto solo se hanno una faccia in comune, mentre se si sceglie l'intorno  $N_{26}(p)$ , basta che questi abbiano un angolo o uno spigolo in comune.

È chiaro che, se la struttura delle trabecole fosse molto regolare, basterebbe scegliere l'intorno  $N_6(p)$  per trovare dei percorsi continui dal un lato all'altro del volume d'interesse, poiché però nella pratica questo non avviene, si preferisce scegliere l'intorno  $N_{26}(p)$ . In questo modo infatti è possibile seguire con precisione anche i contorni più articolati che dovessero presentare gli oggetti trabecola nel volume considerato.

L'esito dell'analisi di connettività può essere sintetizzato attraverso una o più curve dette curve di connettività (*Bone-Connectivity*). Ogni curva viene costruita ponendo in ascissa il diametro delle trabecole e in ordinata la percentuale di tessuto trabecolare connesso. Nella Figura 4 è mostrato un esempio di curva di Bone Connectivity ottenuta dall'analisi di un campione di osso umano.

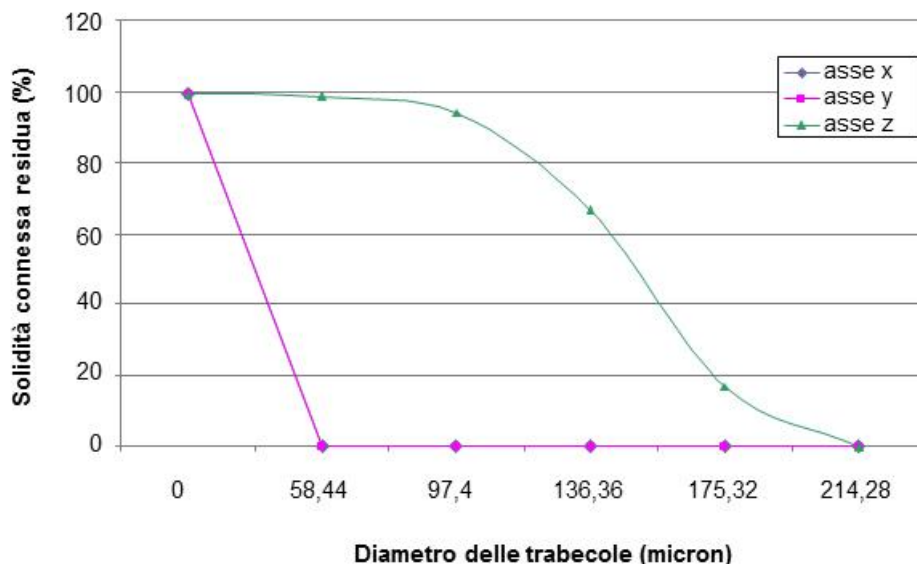
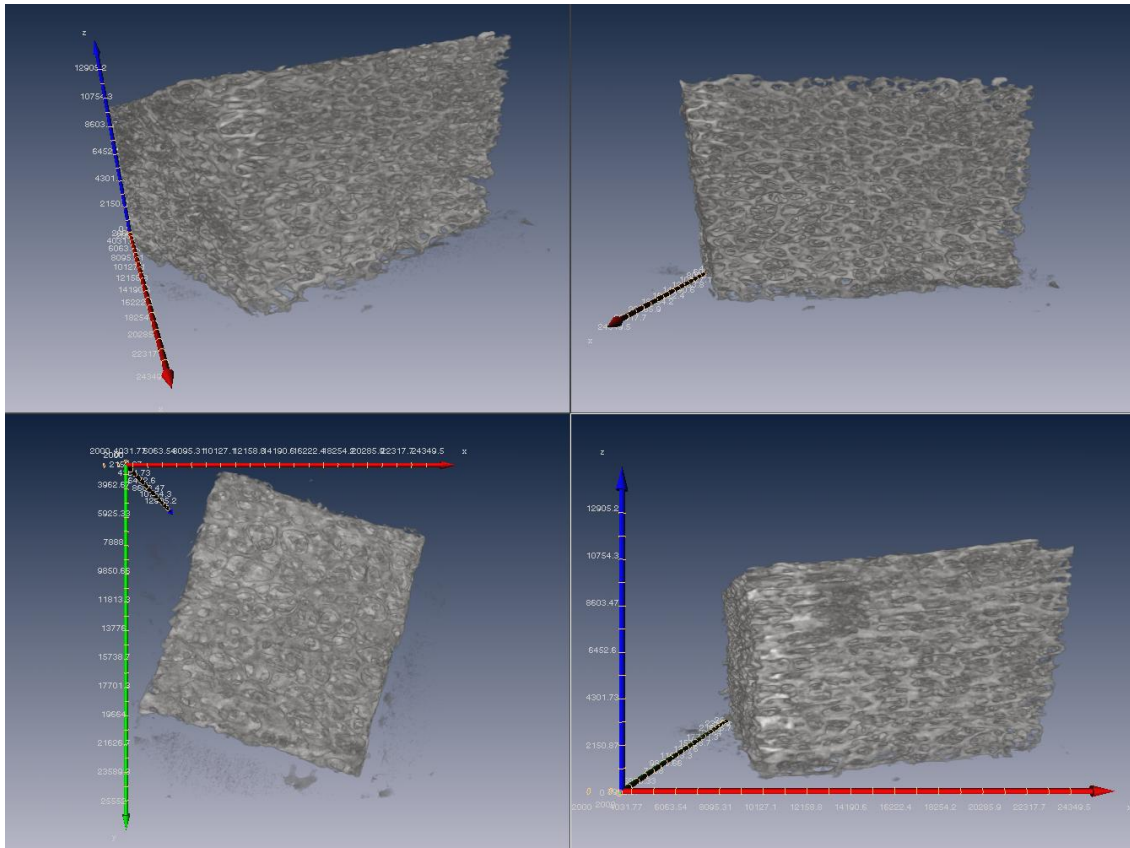


Figura 4. Esempio di un grafico di *Bone-connectivity*, relativo ad un campione osseo umano (*femoral neck*)

È bene sottolineare che il valore per cui la connettività si annulla rappresenta la classe dimensionale caratterizzata da un diametro delle trabecole critico ai fini della connettività. In altre parole questo parametro è in grado di esprimere lo spessore massimo di quelle trabecole a cui è affidata la connettività in una data direzione. Ovviamente minore risulta tale valore, più è alto il rischio di fratture, in quanto ne consegue che le trabecole responsabili della connettività sono molto sottili.

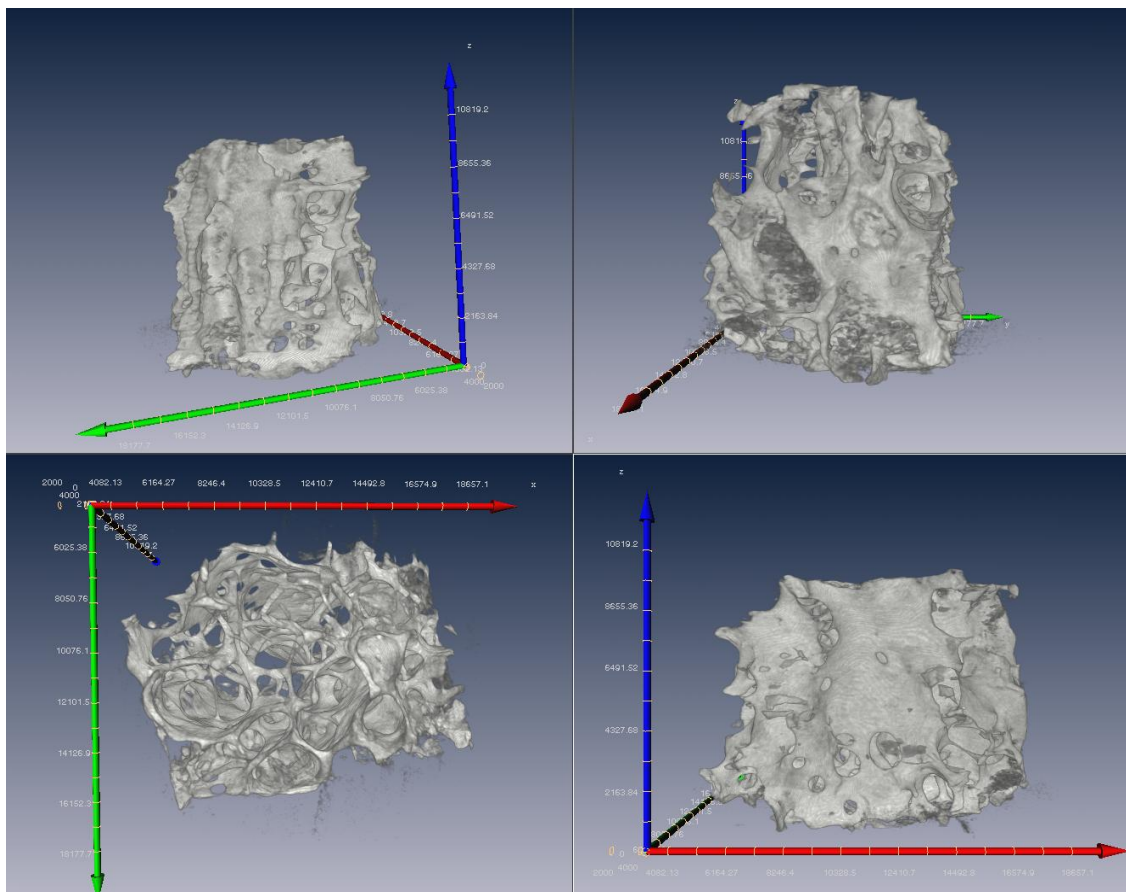
## 5. UNO STUDIO DI ESEMPIO

Nel seguito verrà presentato lo studio relativo all'analisi morfometrica di due campioni di ossa umane, uno prelevato da un donatore sano, denominato nel seguito, campione A e l'altro, campione B, proveniente da un donatore affetto da una patologia metabolica del tessuto osseo. Nelle Figure 5 e 6 vengono mostrati i due campioni come appaiono dopo una ricostruzione tridimensionale.



**Figura 5. Visualizzazione, secondo diverse prospettive, del campione A, dalle dimensioni di 15x20x10 mm<sup>3</sup> circa**

Ad una preliminare ispezione visiva, i due campioni presentano caratteristiche diverse: la struttura del primo campione, campione A, appare omogenea e compatta, con trabecole dall'aspetto simile e le cui dimensioni variano solo lievemente rispetto alle diverse direzioni spaziali. Per quanto riguarda il campione B, esso appare invece disomogeneo, con trabecole dallo spessore molto sottile o al contrario piuttosto esteso; la disposizione degli elementi è disordinata e non mostra alcuna proprietà di isotropia spaziale.



**Figura 6. Visualizzazione, secondo diverse prospettive, del campione B, dalle dimensioni di 15x12x9 mm<sup>3</sup> circa**

In realtà, il motivo di questa differenza strutturale potrebbe dipendere oltre che dalle condizioni fisiche del donatore, anche dal sito originario di prelievo dei due campioni, che però al momento dell'analisi non è noto. Per tale ragione i risultati ottenuti verranno illustrati supponendo che i campioni siano stati prelevati da siti confrontabili, in caso contrario le conclusioni raggiunte dovrebbero essere riviste aggiungendo come dato l'informazione mancante.

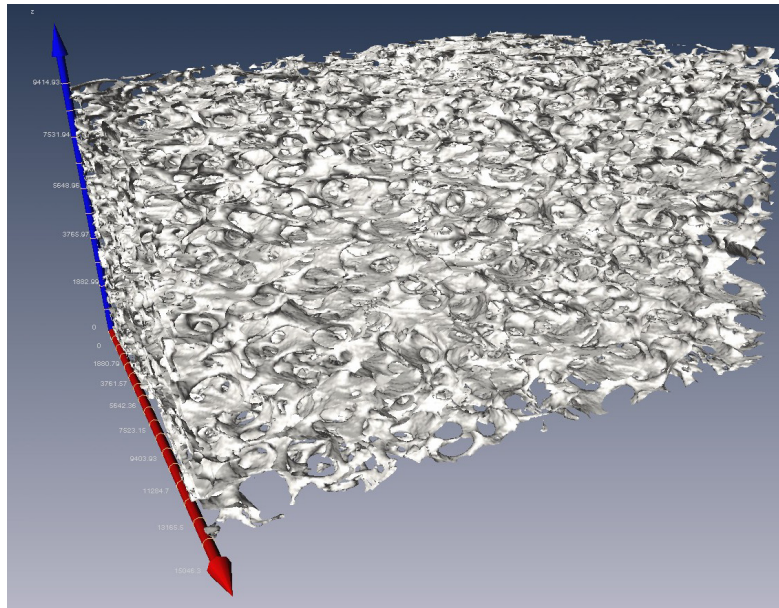
## 5.1. Distribuzione della misura delle trabecole

### 5.1.1. Campione A

Dal primo campione, proveniente da un donatore sano, e acquisito con una risoluzione d'immagine di 14,66  $\mu\text{m}$  e poi successivamente sottocampionato due volte<sup>3</sup>, è stato ritagliato un volume d'interesse (*Volume Of Interest*) delle dimensioni di 591x514x322 voxel, che viene mostrato in Figura 7. Tale ritaglio è stato eseguito in maniera tale che il VOI fosse strettamente contenuto nel volume originario. Il volume così ottenuto è stato quindi binarizzato attraverso la

<sup>3</sup> La risoluzione d'immagine nella fase d'analisi è in definitiva pari a 29.3  $\mu\text{m}$ .

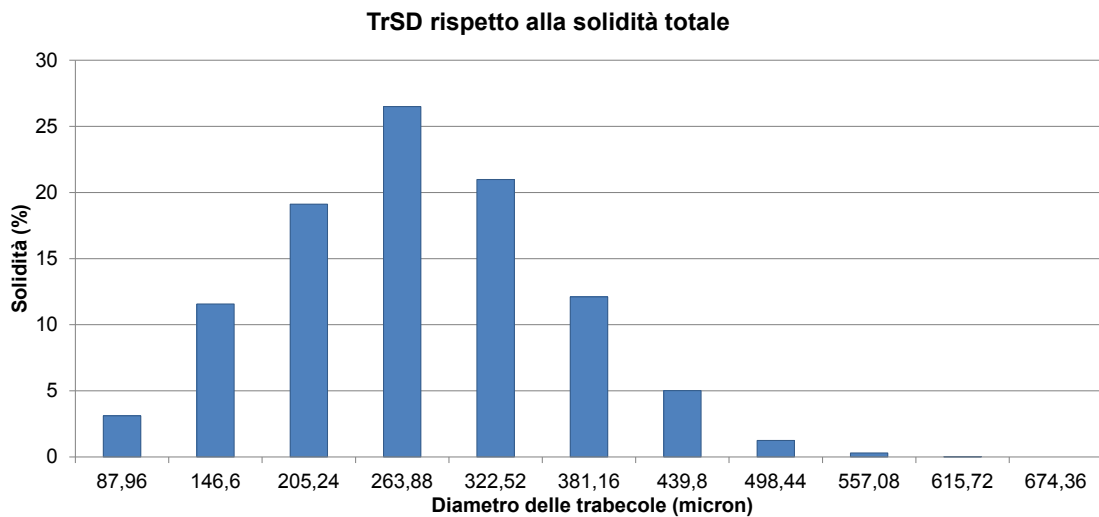
scelta di una soglia globale, posta pari a 140, come suggerito da esperti dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) di Roma.



**Figura 7. Rappresentazione 3D del VOI relativo al campione A**

La *Trabecular Size Distribution* relativa a questo campione è del tutto coerente con le osservazioni espresse dopo la semplice ispezione visiva del campione.

Dal grafico in Figura 8 si nota che le trabecole presentano un diametro con variabilità piuttosto limitata: la distanza tra le pareti solide, infatti, varia solo tra 88  $\mu\text{m}$  e 616  $\mu\text{m}$  circa.



**Figura 8. TrSD di campione A**

Questo è coerente con l'aspetto molto omogeneo con cui si presenta il campione. La maggior parte delle trabecole, quasi il 27%, inoltre, è caratterizzata da un diametro di circa 264  $\mu\text{m}$ , che può essere considerato un valore caratteristico del campione analizzato.

Per comprendere meglio come è stato partizionato l'intero spazio delle trabecole, grazie agli algoritmi di morfologia matematica utilizzati, si riportano di seguito alcune immagini esemplificative. In questo caso, le classi di trabecole corrispondenti a differenti valori del diametro sono state fuse in modo da ottenere solo quattro classi principali. Nella prima immagine (in alto a sinistra) sono state inserite le trabecole, o parti di esse, caratterizzate da una distanza dalle pareti compresa tra 0 e 147  $\mu\text{m}$ ; nell'immagine in alto a destra il diametro considerato è compreso tra 147  $\mu\text{m}$  e 264  $\mu\text{m}$ ; per quella in basso a sinistra da 264  $\mu\text{m}$  a 381  $\mu\text{m}$ ; e infine per la quarta immagine, in basso a destra, sono stati considerati valori del diametro maggiori di 381  $\mu\text{m}$ .

Come mostrato chiaramente dalla Figura 9, la maggior parte del volume delle trabecole è caratterizzato da un diametro compreso tra 147  $\mu\text{m}$  e 264  $\mu\text{m}$ , ed è a quelle di questa dimensione che sono in gran parte affidate, allora, le proprietà meccaniche e di resistenza del campione analizzato. Per completezza, in Figura 10, si riporta anche l'immagine ottenuta sommando i quattro contributi, che restituisce l'immagine del volume originario classificato secondo gli spessori trabecolari.

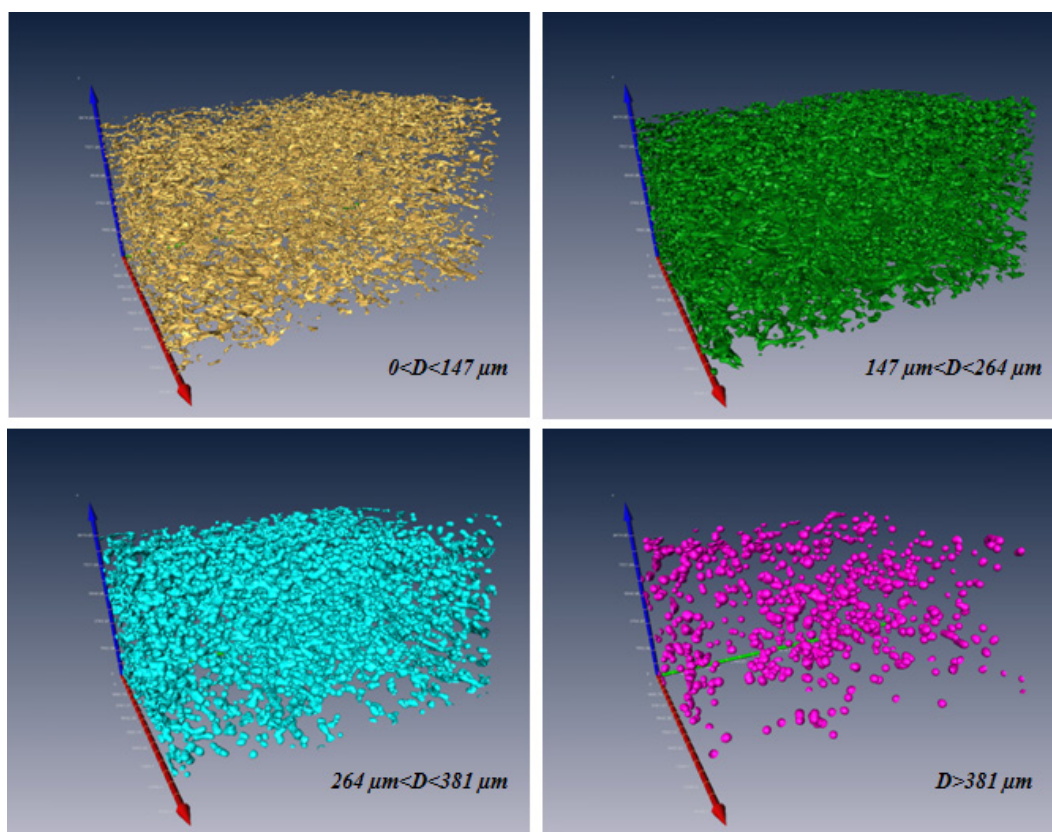
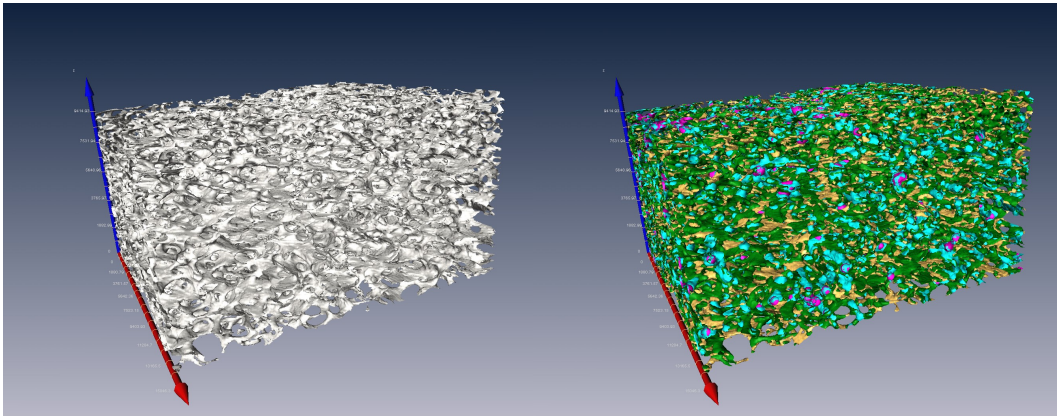


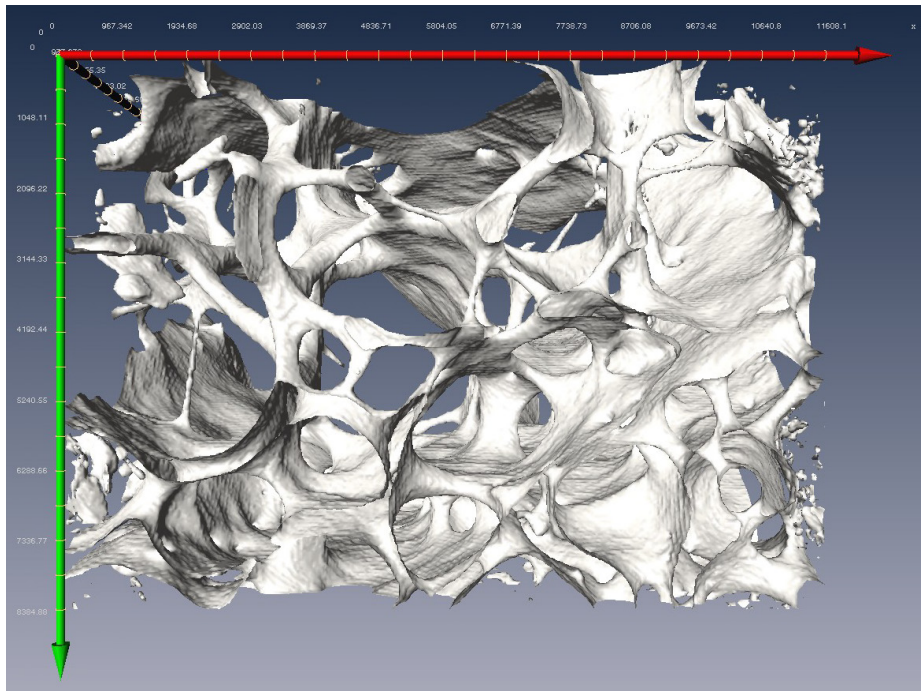
Figura 9. Partizione del volume originario in quattro classi dimensionali



**Figura 10. Confronto tra il volume originario e quello ottenuto come sovrapposizione dei 4 contributi dimensionali**

### 5.1.2. Campione B

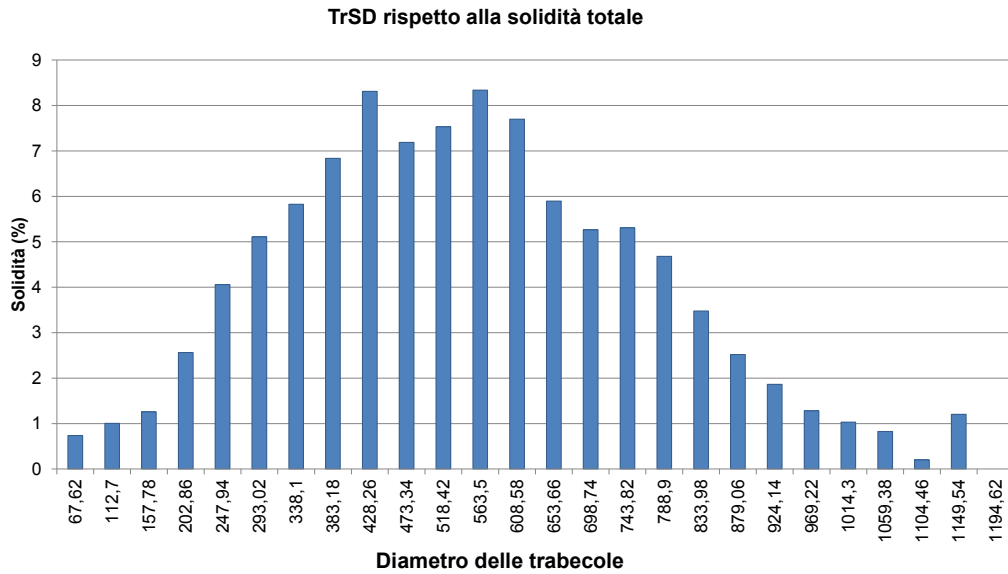
Per quanto riguarda il campione proveniente da un donatore affetto da osteoporosi, esso è stato acquisito ad una risoluzione di  $11,27 \mu\text{m}$  e poi successivamente sottocampionato due volte<sup>4</sup>. Dal volume originario è stato estratto un VOI di  $516 \times 373 \times 348$  voxel, completamente contenuto nel volume iniziale, e binarizzato con soglia pari a 150, anche questa suggerita dagli esperti dell'ISS. In Figura 11 è riportata una ricostruzione 3D del VOI analizzato.



**Figura 11. Ricostruzione 3D del campione B**

<sup>4</sup> La risoluzione d'immagine è in definitiva pari a  $22,5 \mu\text{m}$ .

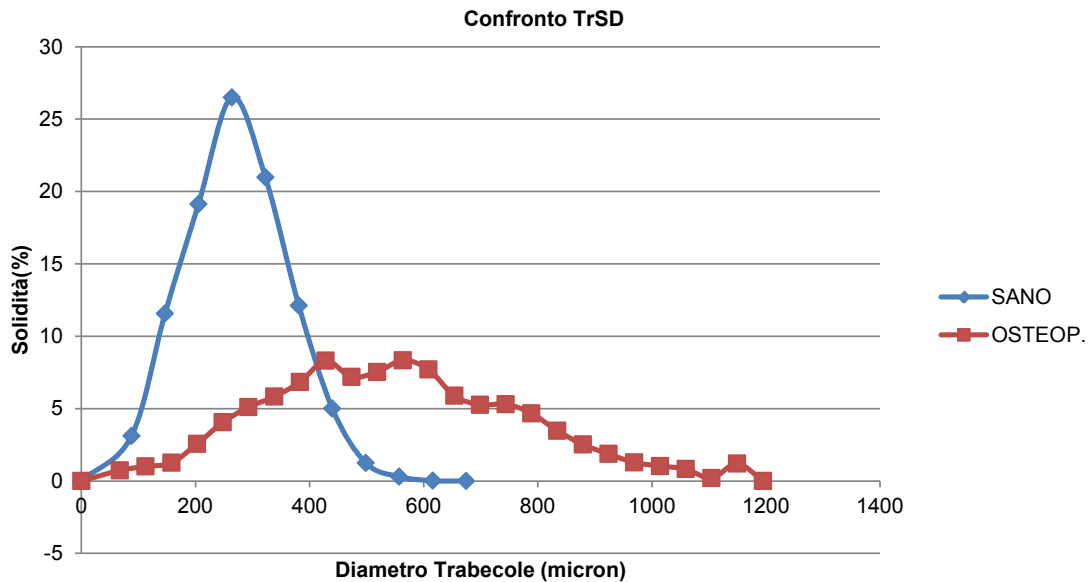
Come atteso, il grafico della *Trabecular Size Distribution* di questo campione (Figura 12) appare molto differente da quello relativo al campione A.



**Figura 12. TrSD di campione B**

In primo luogo è facile notare che le trabecole che compongono il VOI sono caratterizzate da valori del diametro estremamente differenti, il range di variabilità infatti va da appena 78 µm a circa 1150 µm. Inoltre, non è possibile considerare come caratteristico nessuno dei valori che appartengono a questo intervallo, in effetti il grafico, non solo non è strettamente unimodale, ma nei suoi valori massimi raggiunge appena poco più dell'8% del volume solido totale.

Se si confrontano le curve di TrSD (Figura 13), la differenza risulta ancora più evidente.



**Figura 13. Confronto tra le curve di TrSD relative ai campioni A e B**

Nel campione B le trabecole raggiungono diametri anche piuttosto elevati, che invece non sono affatto presenti nel campione A (donatore sano). È come se nel donatore patologico vi fosse una tendenza alla presenza di trabecole in generale più robuste, ma composte da pochi esemplari per ogni classe dimensionale. Si intuisce che in questo modo le proprietà meccaniche e di resistenza ai carichi sono concentrate in pochi punti e non omogeneamente distribuite all'interno del volume dell'osso.

## 5.2. Connettività

### 5.2.1. Campione A

La curva di connettività viene calcolata per valutare la presenza e quindi le caratteristiche di eventuali cammini di percorrenza presenti tra due facce qualsiasi del volume d'interesse. In questa sede sono state considerate solo le facce opposte del parallelogramma che compone il VOI, e tali direzioni sono state denominate come gli assi cartesiani ortogonali di un comune sistema di riferimento:  $x$ ,  $y$  e  $z$ .

Al momento dell'analisi, però, non erano noti gli angoli e le direzioni di orientamento del campione osseo durante la fase di scansione, per tale motivo non è stato possibile associare alle direttrici considerate una direzione di riferimento, come ad esempio l'asse di carico dell'osso. Probabilmente la conoscenza di questa caratteristica potrebbe fornire delle indicazioni più precise circa le proprietà strutturali del campione di quelle che sono state comunque dedotte, per tale motivo è auspicabile che per le future analisi siano note anche queste informazioni.

Le curve di connettività per il primo campione mostrano che in esso le trabecole sono fortemente connesse in tutte e tre le direzioni considerate (Figura 14). Questo implica che, soprattutto se si considera di eliminare dal volume delle trabecole quelle che hanno un diametro abbastanza piccolo, per ogni orientamento del VOI sono comunque presenti dei collegamenti tra le facce opposte del volume d'interesse. Al crescere del diametro delle trabecole eliminate, però, la connettività diminuisce sempre di più. In particolare, il diametro di circa 205  $\mu\text{m}$  può essere considerato una misura limite; infatti, tolta questa classe dimensionale di trabecole, si ha un abbassamento della connettività del 60% o poco meno. In effetti, quindi, il diametro critico è quello pari a 264  $\mu\text{m}$  per cui, eliminata questa classe, nel VOI non è presente, o solo in maniera minimale, alcuna forma di connettività. Questo risultato è del tutto coerente con quanto commentato in relazione alla TrSD: le trabecole caratterizzate da un diametro pari a 264  $\mu\text{m}$  non solo rappresentano più del 25% del totale, ma ad esse sono affidate le proprietà di connettività del campione considerato. Le trabecole con diametro maggiore, allora, non partecipano in maniera attiva a quei processi, come la resistenza ai carichi, che coinvolgono le trabecole in tutte le direzioni considerate.

In Figura 15 è mostrato il VOI originale e quello ottenuto considerando solo le trabecole connesse. Poiché il campione è estremamente connesso, i due volumi coincidono quasi perfettamente.

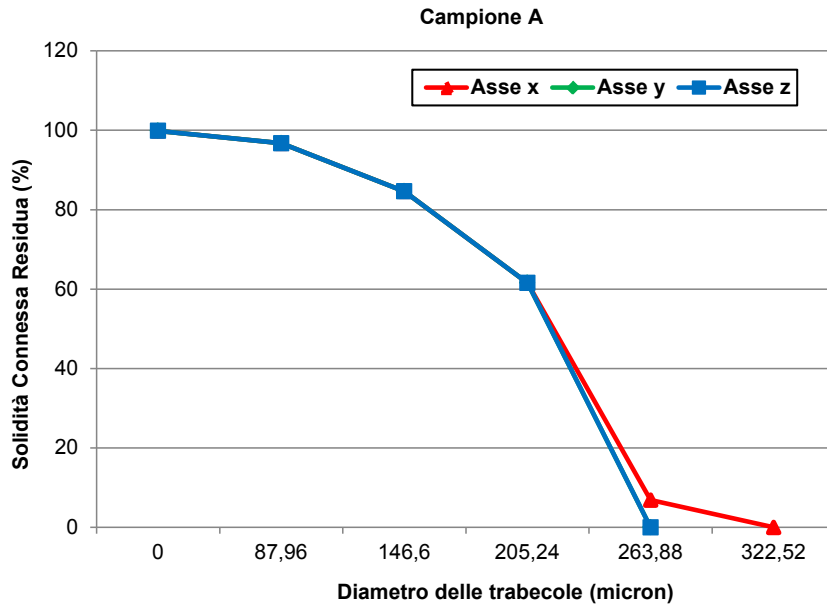


Figura 14. Curve di connettività del campione A

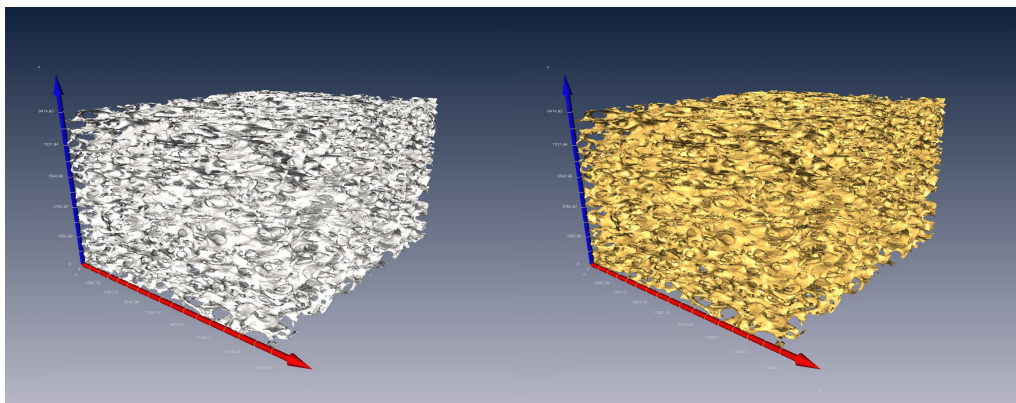


Figura 15. VOI originale a sinistra, VOI connesso a destra

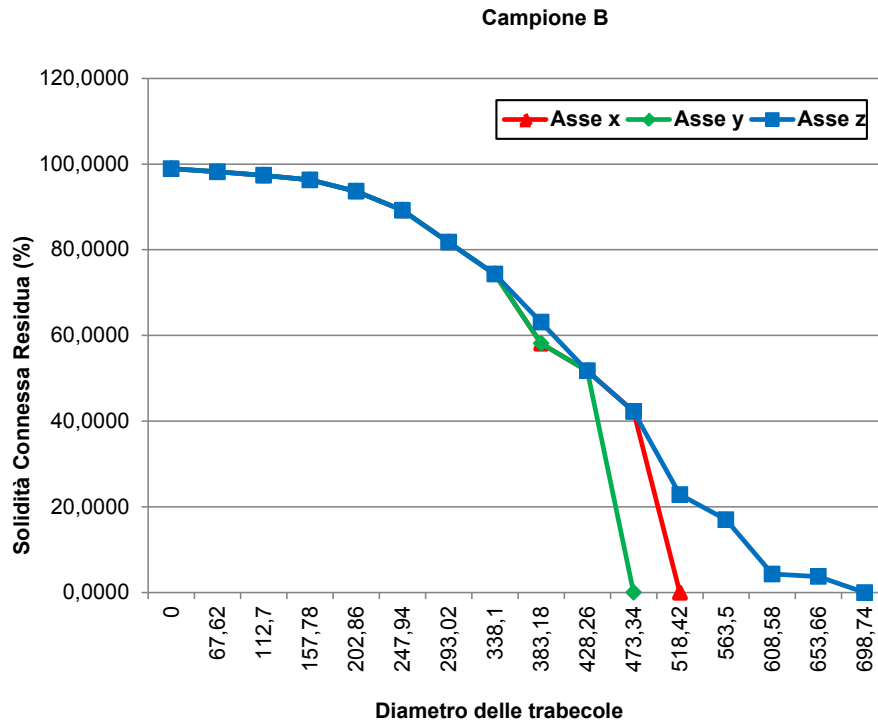
### 5.2.2. Campione B

Esaminando le curve di connettività relative al secondo campione (Figura 16), si possono trarre alcune interessanti considerazioni.

In primo luogo il comportamento strutturale del campione è leggermente anisotropo rispetto alle tre direttrici considerate, come d'altronde già evidenziato precedentemente. In particolare, lungo la direzione denominata *asse z* si conserva la connettività per valori maggiori del diametro delle trabecole.

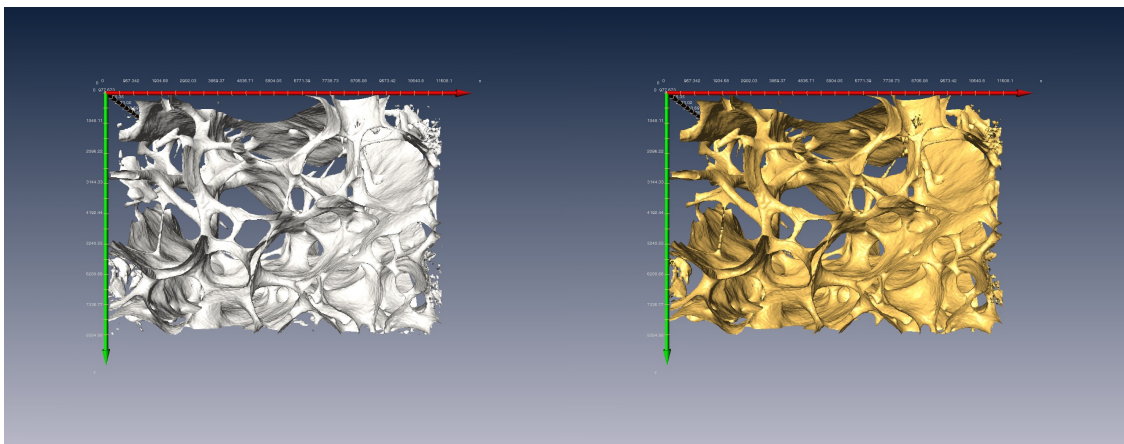
Benché anche in questo caso, poi, il volume appaia molto connesso, la sua connettività va rapidamente a diminuire. Se si considera infatti l'estrema varietà di classi dimensionali di cui è composto il campione, con il diametro delle trabecole che raggiunge anche i 1150  $\mu\text{m}$ , stupisce

che nelle direzioni denominate  $y$  e  $x$ , la connettività si annulli già per un diametro pari a circa 473 e 518  $\mu\text{m}$ , rispettivamente. Sebbene quindi vi siano trabecole dalla struttura piuttosto robusta, l'analisi della connettività ha evidenziato che in realtà gli elementi portanti sono caratterizzati da un diametro decisamente inferiore.



**Figura 16. Curva di Connettività del campione B**

Anche in questo caso viene mostrato in Figura 17 il confronto tra il VOI originale, a sinistra, e quello del connesso, a destra, che comunque appaiono molto simili, date le proprietà di connettività.



**Figura 17. VOI originale a sinistra, VOI connesso a destra**

## CONCLUSIONI

Con l'avvento delle nuove metodiche d'*imaging* ad alta risoluzione, lo studio della microarchitettura del tessuto trabecolare osseo ha subito un grosso impulso, in quanto è stato possibile superare il limite dell'analisi bidimensionale imposto dalle tecniche tradizionali. La natura intrinsecamente tridimensionale delle nuove strumentazioni ha permesso di visualizzare e analizzare i campioni ossei direttamente in 3D, anche se questo progresso non è stato accompagnato da un'adeguata standardizzazione dei parametri d'indagine. Troppo frequentemente ci si è limitati semplicemente a mutuare o adattare gli indicatori usati in istologia classica, e quelli invece introdotti e sperimentati per le nuove metodologie sono risultati insufficienti a descrivere in maniera esaustiva la struttura e le proprietà del tessuto trabecolare osseo.

In questa sede è stato proposto un nuovo approccio d'analisi che, sfruttando la flessibilità e le potenzialità degli algoritmi di morfologia matematica per l'analisi d'immagini, ha consentito di introdurre degli indicatori, quali la curva di TrSD e le curve di connettività, che permettono di caratterizzare in maniera sufficientemente completa la microstruttura interna dei campioni ossei.

Seppur soffrendo della mancanza di alcune informazioni utili, l'analisi mostrata in questa sede ha evidenziato come sia possibile fornire degli indicatori i cui andamenti riflettono la natura, fisiologica o patologica, dei campioni di tessuto ossei.

In particolare, la curva di distribuzione dimensionale delle trabecole restituisce la composizione differenziata delle classi dimensionali presenti nel campione. Un andamento unimodale di tale curva, quindi, è stato associato a una struttura omogenea (campione A), mentre la presenza di un elevato numero di classi dimensionali è risultata coerente con il campione di tessuto osseo affetto da osteoporosi (campione B).

Le curve di connettività, inoltre, hanno evidenziato come, nel campione sano, il diametro critico al di sopra del quale non vi è più la connessione tra gli elementi portanti sia anche il parametro caratteristico del VOI; al contrario, per il campione osteoporotico, la connettività è affidata alle classi dimensionali più piccole e meno frequenti rispetto alle varietà di cui è composto il volume.

Per il futuro è auspicabile la verifica dei risultati esposti in questa sede, attraverso l'applicazione dei metodi proposti ad un numero maggiore di campioni. In questo modo dovrebbe essere possibile non solo discriminare il caso fisiologico da quello patologico, ma anche la risposta degli indicatori presentati alle diverse patologie.

## BIBLIOGRAFIA

1. 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).
2. Bouxsein ML. Bone quality: where do we go from here? *Osteoporosis international* 2003;14:118-27.
3. Muller R, Lenthe GH van. Microarchitectural aspects of quality and competence of bone. *Advances in Osteoporotic Fracture Management* 2004;3:2-12.
4. Faulkner K, von Stetten E, Miller P. Discordance in patient classification using T-scores. *J Clin Densitom* 1999;2(3):343-50.
5. Holick M, Krane S. Introduction to bone and mineral metabolism. *Harrisons principles of internal medicine*. 2001;2:2192-2204.
6. Boivin G, Meunier PJ. Methodological considerations in measurement of bone mineral content. *Osteoporosis international* 2003;14:22-28.
7. Turner C. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporosis International* 2002;13(2):97-104.
8. Bono C, Einhorn T. Overview of osteoporosis: pathophysiology and determinants of bone strength *The Aging Spine* 2005;8-14.
9. Dalle Carbonare L, Giannini S. Bone microarchitecture as an important determinant of bone strength. *Journal of endocrinological investigation* 2004;27(1):99.
10. Barger-Lux MJ, Recker RR. Bone microstructure in osteoporosis: transilial biopsy and histomorphometry. *Topics in Magnetic Resonance Imaging* 2002;13(5):297.
11. Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, *et al.* Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 1998;23(1):59-66.
12. Perilli E, Baleani M, Ohman C, Fognani R, Baruffaldi F, Viceconti M. Dependence of mechanical compressive strength on local variations in microarchitecture in cancellous bone of proximal human femur. *Journal of biomechanics* 2008;41(2):438-46.
13. Lespessailles E, Chappard C, Bonnet N, Benhamou CL. *Imaging techniques for evaluating bone microarchitecture. Joint, bone, spine: revue du rhumatisme* 2006;73(3):254-61.
14. Raum K, Leguerney I, Chandelier F, Talmant M, Saied A, Peyrin F, *et al.* Site-matched assessment of structural and tissue properties of cortical bone using scanning acoustic microscopy and synchrotron radiation muCT. *Phys Med Biol* 2006;51(3):733-46.
15. Feldkamp LA, Davis L, Kress JW. Practical cone-beam algorithm. *J Opt Soc Am* 1984;1(6):612-9.
16. Parfitt AM. The stereologic basis of bone histomorphometry. Theory of quantitative microscopy and reconstruction of the third dimension. In: Recker RA (Ed.). *Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretations*. Boca Raton, FL: CRC; 1983. Pag. 53-87.
17. Hildebrand T, Laib A, Muller R, Dequeker J, Ruegsegger P. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J Bone Miner Res* 1999;14:1167-74.
18. Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, Delling G. Trabecular bone *pattern* factor. A new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone* 1992;13:327-30.

19. Mellish RW, Ferguson-Pell MW, Cochran GV, Lindsay R, Dempster DW. A new manual method for assessing two-dimensional cancellous bone structure: comparison between iliac crest and lumbar vertebra. *J Bone Miner Res* 1991;6:689-96.
20. Le H, Holmes R, Shors E, Rosenstein D. Computerized quantitative analysis of the interconnectivity of porous biomaterials. *Acta stereologica* 1992;11(Suppl.1):267-72.
21. Chappard D, Legrand E, Pascaretti C, Baslé MF, Audran M. Comparison of eight histomorphometric methods for measuring trabecular bone architecture by image analysis on histological sections. *Microscopy research and technique* 1999;45(4-5):303-312.
22. Vesterby A. Star volume in bone research. A histomorphometric analysis of trabecular bone structure using vertical sections. *Anat Rec* 1993;235(2):325-34.
23. Tabor Z. Analysis of the influence of image resolution on the discriminating power of trabecular bone architectural parameters. *Bone* 2004;34(1):170-9.
24. Fazzalari NL, Parkinson IH. Fractal dimension and architecture of trabecular bone. *The Journal of Pathology* 1999;178(1):100-5.
25. Perilli E, Baleani M, Raatjes W, Baruffaldi F, Cappello A, Toni A. Compressive properties of trabecular bone related to microCT evaluated morphometric parameters: preliminary results. *Journal of Mechanics in Medicine and Biology* 2005;5(2):349-55.
26. Serra J. *Image analysis and Mathematical morphology*. London: Academic Press; 1982.
27. Gonzales R, Wintz P. *Digital Image Processing* Boston: Addison & Wesley; 1977.

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

*Roma, ottobre-dicembre 2012 (n. 4) 22° Suppl.*