

# ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

## Proposta di valutazione microtomografica di alcuni sostituti ossei

Rossella Bedini (a), Raffaella Pecci (a), Pietro Ioppolo (a),  
Deborah Meleo (b), Alessandra Bianco (c), Paola Casti (c)

*(a) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*  
*(b) Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche, Facoltà di Medicina e Chirurgia,*  
*Sapienza Università di Roma*  
*(c) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università Tor Vergata di Roma*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**  
**09/10**

Istituto Superiore di Sanità

**Proposta di valutazione microtomografica di alcuni sostituti ossei.**

Rossella Bedini, Raffaella Pecci, Pietro Ioppolo, Deborah Meleo, Alessandra Bianco, Paola Casti  
2009, 30 p. Rapporti ISTISAN 09/10

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di analizzare alcuni biomateriali da innesto osseo di diversa origine (omologhi, eterologhi e alloplastici) al fine di definirne le principali caratteristiche morfometriche, in particolare la porosità, grazie all'utilizzo della tecnica microtomografica. Sono stati scelti per l'analisi: un campione di osso omologo, un campione di osso eterologo di origine equina e due campioni di biomateriali alloplastici (il fosfato di calcio e il fosfato tricalcico in granuli). Per ciascun campione sono state prodotte, tramite microtomografia 3D, centinaia di *slice*. Dalle immagini riportate si nota che tutti i campioni studiati presentano una struttura porosa, pur mostrando una morfologia differente l'uno dall'altro. I risultati ottenuti mostrano una maggiore porosità dei campioni omologo ed eterologo, per i quali le ricostruzioni 3D hanno evidenziato la presenza di numerose interconnessioni tra i pori. Tale tipo di ricerca condotta su un esteso numero di campioni di tipologie diverse di sostituti od innesti ossei, si propone di fornire un contributo ad una migliore caratterizzazione microstrutturale di tali oggetti e principalmente al loro più adeguato utilizzo.

*Parole chiave:* Analisi microtomografica 3D, Sostituti ossei

Istituto Superiore di Sanità

**A proposal of microtomographic evaluation on some bone substitutes.**

Rossella Bedini, Raffaella Pecci, Pietro Ioppolo, Deborah Meleo, Alessandra Bianco, Paola Casti  
2009, 30 p. Rapporti ISTISAN 09/10 (in Italian)

The aim of this work has been to analyse some different origin biomaterials for bone substitutes (homologous, heterologous and alloplastic bone) to study the morphometric characteristics, especially the porosity, by means of microtomographic technique. One homologous bone, one heterologous equine bone and two alloplastic biomaterials (calcium phosphate, tri-calcium phosphate) have been chosen for analysis. Several hundred of slice have been generated for each sample by means of 3D microtomography. All samples show a porous structure even if they have a quite different morphology among them. The obtained results show a greater porosity in homologous and heterologous bone samples and with 3D reconstruction images it's possible to observe a lot of interconnections among pores. By means of this kind of research on a large number of different bone substitute samples, it will be possible to obtain a best microstructural characterization and indications for just use of these objects.

*Key words:* 3D microtomographic analysis, Bone substitutes

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, Pecci R, Ioppolo P, Meleo D, Bianco A, Casti P. *Proposta di valutazione microtomografica di alcuni sostituti ossei*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009. (Rapporti ISTISAN 09/10).

---

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

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

© Istituto Superiore di Sanità 2009

# INDICE

<b>1. Generalità sulle ricostruzioni ossee</b> .....	1
1.1. Il tessuto osseo.....	1
1.2. Rimodellamento e riparazione tissutale .....	2
1.3. Il problema clinico.....	3
1.4. Possibilità ricostruttive .....	4
<b>2. Biomateriali da innesto osseo</b> .....	5
2.1. Potenzialità di un innesto nella neogenesi ossea .....	5
2.2. Osso autologo .....	7
2.3. Osso omologo.....	7
2.4. Osso eterologo .....	8
2.5. Biomateriali alloplastici.....	9
<b>3. La tecnica microtomografica</b> .....	11
3.1. Generalità .....	11
3.2. Principi di ricostruzione tomografica .....	12
3.3. Strumentazione Skyscan.....	15
3.4. Principi di funzionamento .....	17
3.5. Parametri istomorfometrici.....	18
<b>4. Analisi sperimentale</b> .....	19
4.1. Materiali e metodi.....	19
4.1.1. Descrizione dei campioni.....	19
4.1.2. Preparazione e configurazione della strumentazione .....	20
4.1.3. Acquisizione dati .....	20
4.1.4. Ricostruzione delle sezioni trasversali .....	21
4.1.5. Segmentazione dell'immagine.....	21
4.1.6. Elaborazione e analisi dati tramite software di supporto .....	22
4.2. Risultati.....	23
4.2.1. Immagini acquisite.....	23
4.2.2. Ricostruzioni tridimensionali.....	24
4.2.3. Caratterizzazione morfometrica .....	26
<b>5. Discussione</b> .....	28
<b>Conclusioni</b> .....	29
<b>Bibliografia</b> .....	30



# 1. GENERALITÀ SULLE RICOSTRUZIONI OSSEE

## 1.1. Il tessuto osseo

Il tessuto osseo è una forma specializzata di tessuto connettivo, caratterizzata dalla mineralizzazione della matrice extra cellulare. È una struttura dinamica con capacità di rimodellamento e ridotta elasticità, dotata di elevata durezza e resistenza alla pressione e alla trazione, che assolve il compito fondamentale di regolare la concentrazione di calcio nel plasma (omeostasi).

Tali caratteristiche sono dovute alla sua complessa e straordinaria composizione: il tessuto è costituito da una componente cellulare, rappresentata da osteoblasti, osteociti e osteoclasti, e da una matrice intercellulare, organica ed inorganica, oltre al 10% di acqua circa. La componente inorganica è composta essenzialmente da sali minerali, tra cui il fosfato tricalcico (presente nella forma di cristalli submicroscopici di una varietà di apatite simile all'idrossiapatite), il carbonato di calcio e il fosfato disodico; questa componente è responsabile dell'elevata durezza del tessuto osseo e rappresenta circa il 67 % del peso secco dell'osso. La componente organica costituisce la restante parte del peso secco ed è costituita, oltre che da cellule, da fibre collagene (collagene di tipo I) immerse in una matrice amorfa, contenente principalmente glicoproteine non collageniche e proteoglicani, che insieme alle fibre forma la matrice organica intercellulare del tessuto. Le fibre collagene sono responsabili dell'elevata resistenza alla trazione e alla compressione del tessuto.

All'esame a occhio nudo si possono distinguere due tipi diversi di osso. L'osso spugnoso mostra ampi spazi delimitati da sottili lamine che si anastomizzano fra loro. Gli ampi spazi sono denominati spazi midollari, mentre le lamine ossee sono dette trabecole e sono composte da numerosi strati o lamelle. L'osso compatto è molto più denso dell'osso spugnoso. I suoi spazi sono di dimensioni molto ridotte e l'organizzazione lamellare è molto più precisa e fitta.

L'osso è sempre rivestito da un delicato involucro di tessuto connettivo. Le cavità midollari sono tappezzate da un endostio, la cui componente cellulare è costituita da cellule progenitrici, osteoblasti e, occasionalmente, osteoclasti. Il periostio è il rivestimento connettivale esterno dell'osso ed è composto da uno strato fibroso esterno, caratterizzato principalmente da fibre collagene e fibroblasti e da uno strato interno osteogenico in cui sono presenti poche fibre collagene e molte cellule osteogeniche con la loro progenie, gli osteoblasti. Il periostio aderisce all'osso mediante le fibre di Sharpey, fasci di fibre collagene che vengono intrappolate nella matrice ossea calcificata durante il processo di ossificazione. La matrice ossea è prodotta dagli osteoblasti, cellule derivate dai loro precursori meno differenziati, le cellule osteoprogenitrici. Dopo aver prodotto la matrice ossea, gli osteoblasti intrappolati si trasformano in osteociti. Gli osteociti occupano spazi di forma lenticolare, detti lacune, e possiedono lunghi prolungamenti citoplasmatici che vengono alloggiati in sottili canali o tunnel scavati nella matrice, denominati canalicoli. Dal momento che l'osso, al contrario della cartilagine, è un tessuto duro ma altamente vascolarizzato, i canalicoli si aprono entro ampi canali, i canali di Havers, all'interno dei quali sono ospitati i vasi sanguigni. Ciascun canale haversiano insieme al sistema di lamelle ossee che lo circondano e ai canalicoli che si irradiano dalle singole lacune verso di esso, va a costituire un osteone o sistema di Havers. I canalicoli compresi in ciascun osteone, raggiungono il canale haversiano in modo che gli osteociti possano eliminare i materiali di rifiuto e assumere nutrienti e ossigeno. I canali di Havers sono disposti più o meno parallelamente rispetto all'asse longitudinale delle ossa lunghe, ma risultano interconnessi attraverso un sistema di canali trasversali, detti canali di Volkmann. Le lamelle dell'osso compatto sono organizzate secondo

quattro sistemi lamellari: le lamelle circonfenziali interne ed esterne, le lamelle interstiziali e gli osteoni, mentre le lamelle dell'osso spugnoso sono disposte disordinatamente e non formano strutture organizzate.

L'istogenesi dell'osso può avvenire sia attraverso il processo di ossificazione intramembranosa che di ossificazione endocondrale. La prima, che riguarda le ossa della volta del cranio ha origine in un tessuto mesenchimale riccamente vascolarizzato, in cui le cellule mesenchimali si differenziano in osteoblasti (probabilmente passando in uno stadio intermedio rappresentato da cellule osteoprogenitrici), che cominciano ad elaborare la matrice ossea, formando le trabecole. Più trabecole si formano nella stessa area, più queste strutture stabiliscono interconnessioni. Fondendosi una con l'altra le trabecole formano osso spugnoso, che potrà essere rimodellato per dare origine all'osso compatto. La superficie di queste trabecole ospita osteoblasti. Frequentemente può essere evidente un altro tipo di cellule, gli osteoclasti. Queste grosse cellule pluripotenti, derivanti dai monociti, sono accolte in depressioni poco profonde della superficie trabecolare e hanno la funzione di riassorbire l'osso. Le regioni mesenchimali che non partecipano al processo di ossificazione rimangono come componente di tessuto molle dell'osso (periostio ed endostio). L'osso neoformato viene definito primario o a fibre intrecciate, in quanto le fibre collagene non possiedono ancora l'orientamento preciso presente nell'osso maturo. L'azione integrata di osteoblasti e osteoclasti porterà alla sostituzione dell'osso a fibre intrecciate con l'osso secondario o maturo. L'ossificazione endocondrale, processo responsabile della formazione di ossa lunghe e corte, si realizza su un modello cartilagineo (cartilagine ialina) preesistente, che viene usato come stampo sul quale e all'interno del quale l'osso viene formato. Tuttavia la cartilagine non si trasforma in osso. Si forma inizialmente un collare osseo sub-periostale (mediante ossificazione intramembranosa) intorno alla zona centrale dell'abbozzo cartilagineo. Questo collare, quindi, si accresce in spessore e lunghezza. I condrociti nel centro di questo stampo cartilagineo diventano ipertrofici e cominciano a riassorbire una certa quantità di matrice, allargando così le loro lacune al punto che alcune di esse confluiscono tra loro. I condrociti ipertrofici, dopo aver partecipato alla calcificazione della cartilagine, degenerano e muoiono. Gli spazi neoformati vengono invasi dal bottone periostale, costituito da vasi sanguigni, cellule mesenchimali e cellule osteoprogenitrici. Le cellule osteoprogenitrici si differenziano in osteoblasti, e questi ultimi cominciano a depositare matrice ossea, al confine della cartilagine calcificata. Man mano che il collare osseo subperiostale cresce in spessore e lunghezza, gli osteoclasti riassorbono il complesso cartilagineo calcificato-osso, lasciando un ampio spazio, la futura cavità midollare, che sarà popolata dalle cellule del midollo. L'intero processo di ossificazione si estende allontanandosi dal primitivo centro di ossificazione, e gran parte dell'abbozzo cartilagineo sarà sostituito da osso, formando la diafisi delle ossa lunghe. La formazione dell'epifisi ossea (centro secondario di ossificazione) avviene in maniera diversa, in modo che possa essere mantenuto il rivestimento cartilagineo a livello delle superfici articolari. La crescita in lunghezza di un osso lungo è possibile grazie alla presenza di due piastre epifisarie di cartilagine (cartilagine di accrescimento) interposte tra le epifisi e la diafisi (1, 2, 3).

## **1.2. Rimodellamento e riparazione tessutale**

Il tessuto osseo è un tessuto attivo in cui, in condizioni fisiologiche, vi è un continuo bilanciamento tra l'attività di riassorbimento dell'osso esistente (mediata dagli osteoclasti) e la deposizione di nuovo osso (per opera degli osteoblasti); questi continui processi di riassorbimento e deposizione di tessuto sono finalizzati ad adeguarlo in continuazione al carico meccanico applicato su di esso nonché a consentire la continua, fine regolazione della calcemia.

Quando i sistemi haversiani vengono riassorbiti i loro osteociti muoiono; gli osteoclasti vengono richiamati nell'area per riassorbire la matrice ossea, formando delle lacune di riassorbimento. Quando la cavità raggiunge una certa ampiezza, si assiste ad un'invasione di capillari con cessazione dei fenomeni di riassorbimento, e deposizione di nuova matrice ossea lamellare intorno ai vasi che si organizza in strutture haversiane. Le lamelle interstiziali che si osservano nell'adulto rappresentano i residui di osteoni in via di riassorbimento e rimodellamento.

Si calcola che l'intera massa scheletrica di un organismo adulto sia completamente rinnovata ogni 10 anni. Questo è un dato importante in quanto ogni soluzione volta a risolvere un deficit osseo dovrà promuoverne il rimodellamento.

Una frattura provoca un'emorragia localizzata e la formazione di un coagulo sanguigno, oltre alla distruzione della matrice ossea e alla morte delle cellule ossee in prossimità della frattura stessa, a causa del mancato apporto di sangue. Durante i processi di riparazione vengono eliminati dai macrofagi il coagulo sanguigno, le cellule sopravvissute e la matrice lesionata. Il periostio e l'endostio che circondano la frattura rispondono con un'intensa proliferazione delle cellule osteoprogenitrici, che formano un tessuto connettivo che circonda la frattura e penetra fra i monconi dell'osso fratturato.

Si forma quindi osso primario grazie a processi di ossificazione endocondrale e intramembranosa precedentemente descritti: entrambi i processi contribuiscono simultaneamente alla guarigione della frattura. La riparazione progredisce in modo tale che le trabecole ossee irregolari di osso primario uniscano temporaneamente gli opposti monconi dell'osso fratturato, formando un callo osseo. Se gli stress meccanici che agiscono sull'osso durante la riparazione, sono identici a quelli che agiscono durante l'accrescimento dell'osso, l'osso primario del callo viene gradualmente rimodellato e riassorbito portando alla formazione di un osso secondario simile a quello esistente prima della frattura (1, 2, 3).

### 1.3. Il problema clinico

Difetti ossei ampi presentano, in particolare in alcune aree dello scheletro, notevoli difficoltà di guarigione, perché non si creano le condizioni necessarie alla formazione del callo osseo. Conseguenze sono la formazione di tessuto fibroso, anziché di tessuto osseo, e l'assenza di saldatura ossea.

Numerosissime sono le situazioni, quindi, nelle quali la riparazione non si verifica o si attua in tempi troppo lunghi, come nel caso di fratture estese con perdita di tessuto osseo, di malformazioni congenite, di asportazione di tessuto nella patologia oncologica, o di patologie infettive e degenerative, come nel caso di anziani affetti da osteoporosi, dove anche danni di entità non critica possono risultare inguaribili per una minor capacità rigenerativa del tessuto osseo stesso.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha definito la decade 2000-2010 come *Bone and Joint Decade* (4), in quanto le patologie a carico dell'apparato scheletrico rappresentano circa il 50% di tutte le patologie nei soggetti ultra-sessantacinquenni. Ad esempio, considerando solamente le fratture all'anca, si stima che nel 1990 esse abbiano raggiunto nel mondo la cifra considerevole di 1,7 milioni di casi, e l'OMS prevede che si arrivi a 6 milioni di casi entro il 2050. Pertanto gli interventi chirurgici relativi al trattamento delle patologie ossee di origine traumatica o degenerativa sono in progressivo aumento.

Di qui la necessità di capire più a fondo il processo di formazione dell'osso, con l'obiettivo di utilizzare nuove strategie terapeutiche che ne promuovano un'efficiente rigenerazione (5).

## 1.4. Possibilità ricostruttive

Gli enormi progressi fatti dalla ricerca scientifica nel campo dei biomateriali e la continua evoluzione delle tecniche chirurgiche hanno aumentato sempre più la possibilità di influenzare la ricrescita ossea, fornendo al clinico nuovi strumenti per fronteggiare situazioni e deficit sempre più complessi, grazie anche all'utilizzo di innesti ossei.

Si tratta di quello che viene considerato il più promettente ambito di ricerca del nuovo capitolo della chirurgia rigenerativa: l'ingegneria tessutale. Il termine fu coniato in occasione di un meeting sponsorizzato dalla *National Science Foundation* (NSF, USA) nel 1987 (6) e l'anno successivo venne proposta quella che è diventata la definizione più ampiamente accettata di *tissue engineering*: "L'ingegneria dei tessuti è l'applicazione dei principi e dei metodi delle scienze della vita e dell'ingegneria, per la comprensione fondamentale delle relazioni tra struttura/funzione nei tessuti normali e patologici di mammiferi, e per lo sviluppo di sostituti biologici che ripristinino, mantengano o migliorino le funzioni dei tessuti (7).

Per specifici impieghi di ricostruzione di strutture con particolari caratteristiche biomeccaniche, quali cartilagine e osso, l'approccio sicuramente più diffuso e promettente dell'ingegneria tessutale prevede l'utilizzo di biomateriali usati come *scaffold* (impalcature di supporto) sulle quali far attecchire i tipi cellulari propri del tessuto da ricostruire. Possono essere aggiunte inoltre molecole biologicamente attive, quali i fattori di crescita, per facilitare la crescita e/o il differenziamento della componente cellulare.

In questo modo vengono sfruttate sia le caratteristiche meccaniche e strutturali dei biomateriali, sia le capacità biologiche delle cellule e/o delle molecole bioattive, al fine di ottenere sostituti ossei capaci di interagire con l'organismo ospite vicariando funzioni carenti, o modulando fenomeni biologici quali, ad esempio, la crescita e la reattività del tessutale (8).

## 2. BIOMATERIALI DA INNESTO OSSEO

Un biomateriale è un materiale progettato per interagire con sistemi biologici per valutare, trattare, incrementare o sostituire tessuti, organi o funzioni corporee (9).

I biomateriali rispondono al bisogno dell'uomo di sostituire o integrare tessuti o organi non più attivi dal punto di vista funzionale o metabolico, danneggiati da eventi patologici o traumatici con risultati a volte sorprendenti. È opportuno specificare che i biomateriali, per essere considerati tali, devono interfacciarsi in qualche punto con un tessuto vivente o con i fluidi biologici. Pertanto materiali posti a semplice contatto con la pelle integra, ad esempio protesi articolari o arti artificiali, non devono essere considerati biomateriali, perché la pelle funge da barriera rispetto ai fluidi biologici.

Molti materiali sono attualmente in uso come biomateriali e, considerando la loro natura chimica, possono essere suddivisi in: metalli, polimeri, ceramici (cristallini, porosi, a base di fosfato di calcio), compositi, materiali di origine biologica.

La rigenerazione ossea non può prescindere dallo sviluppo di biomateriali, in quanto lo *scaffold* è indispensabile per lo sviluppo delle cellule in ambiente tridimensionale, condizione necessaria per il raggiungimento di un'organizzazione spaziale simile a quella esistente nei tessuti nativi (10).

Vari studi hanno dimostrato che l'impiego di biomateriali inerti, ovvero materiali che coesistono con il tessuto biologico circostante non innescando alcuna reazione apprezzabile nell'organismo, né di rifiuto né di riconoscimento, non ha portato a risultati molto soddisfacenti. Nessun dispositivo che sia tollerato passivamente dall'organismo e non stimoli un'incorporazione ed un riconoscimento, può assicurare la stabilità delle sue prestazioni nel lungo periodo.

I biomateriali utilizzati negli innesti ossei sono quindi materiali bioattivi, che promuovono cioè la formazione di legami con il tessuto biologico, al quale è consentita la crescita sulla superficie o all'interno del biomateriale stesso.

L'inserimento di un biomateriale in un organismo vivente provoca una reazione di natura e intensità variabile che condiziona la riuscita dell'impianto (11).

### 2.1. Potenzialità di un innesto nella neogenesi ossea

Per capire come un innesto possa attecchire correttamente a livello di un sito ricevente, è necessario comprendere quali siano le principali potenzialità che questo può avere nella neogenesi ossea. In base alle diverse risposte tessutali indotte, si possono distinguere tre differenti tipi di proprietà biologiche dei biomateriali da innesto osseo:

1. Osteogenesi
2. Osteoinduzione
3. Osteoconduzione.

L'osteogenesi è la capacità di neogenesi ossea dell'innesto, indipendente dal sito donatore. Essa ha luogo quando viene promossa la formazione e la crescita di nuovo tessuto, da parte di osteoblasti e loro precursori presenti nel sito di rigenerazione. Cellule con attività osteogenica provengono dal periostio (30%), dalla zona intracorticale (20%), dall'endostio e dal midollo osseo (50%). Al contrario, le cellule della linea emopoietica non sembrano avere alcuna funzione osteogenica.

L'osteoinduzione è la capacità di un tessuto di indurre la differenziazione di cellule mesenchimali indifferenziate e pluripotenti, provenienti dal sito ricevente o dal circolo, in elementi osteogenici (osteoblasti), determinando così la neogenesi ossea a livello sia dell'innesto che del sito ricevente. L'osso trapiantato è in grado di indurre questa differenziazione grazie alla presenza di cellule dell'innesto sopravvissute al danno anossico, provocato dal suo prelievo dal sito donatore, in virtù del precoce trofismo dell'innesto per diffusione di sostanze nutritive del coagulo; inoltre la differenziazione è possibile grazie alla liberazione di biomolecole, quali ad esempio le proteine che partecipano al metabolismo osseo, le cosiddette Bone Morphogenetic Proteins, da parte dell'innesto stesso.

L'osteocostruzione è la capacità dell'innesto di creare un supporto strutturale alla neoformazione ossea. Essa ha luogo quando un materiale da innesto forma un reticolo tridimensionale, che serve come impalcatura per guidare la crescita degli osteoblasti e dei loro precursori dalle pareti del difetto (effetto *scaffold*). Si tratta di un processo di crescita vascolare e di invasione dell'innesto, da parte di cellule progenitrici provenienti dal tessuto ricevente, dapprima in periferia e poi con penetrazione all'interno dell'innesto (cosiddetta sostituzione strisciante o *creeping substitution*).

Per attivare i processi di osteogenesi, osteoinduzione e osteocostruzione, l'innesto necessita al livello del sito ricevente di un adeguato apporto vascolare, di immobilizzazione e di protezione dalla contaminazione esterna.

Gli eventi immediatamente successivi ad un innesto sono in ordine cronologico:

1. Adsorbimento di proteine
2. Adesione cellulare
3. Attivazione cellulare

L'adsorbimento di proteine comporta la formazione di uno strato proteico che aderisce alla superficie del biomateriale. La natura dello strato proteico dipende dalle proprietà superficiali dell'innesto, dall'affinità per la superficie delle proteine disperse nell'ambiente circostante e dalla organizzazione delle proteine adsorbite. Lo strato proteico che si forma non è una struttura statica, ma dinamica con variazione nel tempo dei tipi proteici, della conformazione e della composizione.

Le proteine adsorbite sul substrato solido subiscono comunque delle variazioni nella loro struttura tridimensionale. Inoltre si ritiene che le proteine presenti sulla superficie non sono libere di ruotare poiché l'adsorbimento coinvolge numerosi legami con la superficie solida. Sembra poi che l'orientazione sia la stessa per tutte le proteine dello stesso tipo. Le caratteristiche dello strato adsorbito rispecchiano le proprietà di superficie del biomateriale. In seguito all'interazione con proteine solubili, la superficie del materiale estraneo diventa biologicamente attiva poiché lo strato adsorbito induce una risposta cellulare specifica alla superficie dell'innesto che determinerà il grado di biocompatibilità di quest'ultimo.

*Conditio sine qua non* affinché un biomateriale possa essere innestato e/o trapiantato è che esso sia biocompatibile. Come migliore definizione di biocompatibilità viene tuttora accettata quella formulata da Henc (12), secondo la quale: "Un biomateriale è compatibile con il tessuto circostante se l'interfaccia tra tessuto vivente e materiale assomiglia il più possibile alle aree interfacciali naturali che vi si trovano".

Dopo la formazione dello strato proteico, nel sito dell'innesto arrivano cellule per diffusione, convezione e locomozione. Le cellule che arrivano vedono essenzialmente lo strato proteico interfacciale, anche se esse, in realtà, possono entrare in contatto diretto col materiale mediante pseudopodi che attraversano lo strato proteico preassorbito o consumando le proteine immobilizzate sulla superficie. Una volta raggiunto il sito dell'innesto, le cellule aderiscono allo strato proteico e tale processo è mediato da recettori specifici delle proteine adsorbite.

L'adesione cellulare avviene principalmente tramite contatti focali e close contact (mediati da specifiche proteine adesive come la fibronectina). Il legame ligando-recettore induce un cambio conformazionale delle proteine transmembrana della cellula innescando una specifica risposta biochimica.

In questo modo le cellule vengono attivate e l'effetto finale può essere: modificazione della forma della cellula e della morfologia della membrana plasmatica, rilascio di granuli citoplasmatici, espressione di selectine, moltiplicazione e organizzazione in tessuto.

Tali processi cellulari determinano la risposta dell'ospite all'innesto, ed essa può portare all'integrazione del dispositivo nel tessuto ospite (elevata biocompatibilità) o al suo rigetto (scarsa biocompatibilità).

Con opportune modificazioni superficiali è possibile migliorare la biocompatibilità di un impianto mantenendo inalterate le sue proprietà meccaniche e le sue funzionalità. Tali modificazioni prevedono il controllo del livello di contaminazione della superficie in modo da evitare la presenza di contaminanti indesiderati.

Il materiale da innesto ideale dovrebbe essere, oltre che biocompatibile, di facile manipolazione, atossico e non cancerogeno, utilizzabile in diverse formulazioni per le più svariate esigenze cliniche, radiopaco, sterile, economico e con buone caratteristiche meccaniche. Inoltre non deve sostenere lo sviluppo di microrganismi patogeni e deve essere bioattivo, cioè capace di stimolare la produzione di osso attraverso l'osteogenesi, l'osteoconduzione e l'osteoiduzione.

I biomateriali che costituiscono l'innesto possono essere classificati, in base alla loro origine e provenienza, in biologici (autologhi, omologhi, eterologhi) o alloplastici (idrossiapatite,  $\beta$ -fosfato tricalcico, solfato di calcio, biovetri e prodotti a base di polimeri). Si tratta di una classificazione universalmente accettata nel mondo scientifico (11).

Nessun materiale soddisfa attualmente tutte le caratteristiche richieste.

## 2.2. Osso autologo

L'osso autologo, prelevato cioè dallo stesso individuo ricevente, è considerato il miglior materiale da innesto sia per l'elevato potenziale osteogenico, grazie alla presenza nella porzione midollare di fattori di crescita e di cellule staminali totipotenti, sia per le eccellenti proprietà osteoinduttive e osteoconduttive. Non sono presenti problemi di compatibilità immunologica perché viene riconosciuto dall'organismo come "self", può essere ottenuto a basso costo giacché il suo prelievo richiede solo materiale chirurgico e terapeutico ed è un buon mantenitore di spazio.

Attualmente l'autografting rappresenta oltre il 50% degli innesti ossei garantendo l'80% di successi ed è quindi considerato quale gold standard. L'innesto di osso autologo è però gravato da tre limiti principali: non è indicato per lesioni ossee di grandi dimensioni perché la quantità di materiale disponibile è limitata, comporta la necessità di intervenire su due siti chirurgici con un conseguente aumento delle complicazioni post-chirurgiche (infezioni e dolore) inoltre è richiesto un costo supplementare relativo al prelievo osseo e all'allungamento della degenza ospedaliera.

## 2.3. Osso omologo

L'osso omologo, proveniente cioè da individui della stessa specie del ricevente, viene prelevato da cadaveri entro 24 ore dal decesso oppure da teste di femore asportate durante gli interventi di protesi d'anca, e conservato, dopo adeguato trattamento, nelle banche dell'osso. Sono

disponibili in commercio, a seconda del particolare procedimento di preparazione seguito, tre tipi di forme: osso congelato (*Freeze Bone Allograft*, FBA), congelato liofilizzato (*Freeze-Dried Bone Allograft* FDBA), e demineralizzato congelato liofilizzato (*Demineralized-Freeze-Dried Bone Allograft* DFDBA).

L'FBA, sottoposto a congelamento subito dopo il suo prelievo, possiede proprietà osteogeniche, osteoconduttive e osteoinduttive ma il suo utilizzo è particolarmente raro perché, non subendo alcun processo di sterilizzazione, può provocare reazioni immunitarie fino al rigetto o essere veicolo di agenti patogeni, quali virus epatitici e l'HIV. Il tessuto osseo prelevato dopo essere stato lavorato con perossido di idrogeno, tagliato e imbustato, viene congelato, riducendo gradualmente la temperatura di 1-2 °C al minuto, a -80/100°C, eventualmente utilizzando degli agenti crioprotettivi come il glicerolo o il solfossido di dimetile per non compromettere la vitalità delle cellule presenti nell'innesto.

L'FDBA si ottiene sottoponendo il materiale ad un trattamento che prevede in successione il lavaggio con perossido di idrogeno al 3% per 5-15 minuti in bagno ad ultrasuoni, la delipidizzazione con etanolo al 70% per 1 ora, il trattamento termico a temperature oltre i 300°C per 15-18 ore, la liofilizzazione e il congelamento in azoto liquido fino a temperature di -90°C che determinano la perdita del contenuto di acqua e infine la sterilizzazione con ossido di etilene o raggi gamma. Il tessuto osseo così trattato mantiene sia la porzione organica sia quella inorganica che gli conferiscono le proprietà osteoinduttive e osteoconduttive.

Il DFDBA si ottiene con un procedimento analogo che si conclude però con l'eliminazione della componente minerale dell'osso mediante un trattamento con acido cloridrico per 36-48 ore. Questo processo di demineralizzazione non altera la concentrazione delle proteine morfogenetiche presenti nel tessuto e amplifica le proprietà osteoconduttive dell'innesto, che variano comunque da preparato a preparato in relazione ai diversi protocolli seguiti nella realizzazione del prodotto. Zhang e coll hanno evidenziato inoltre che tali proprietà vengono influenzate da alcuni fattori come le dimensioni delle particelle e l'età del donatore. I campioni prelevati da donatori di sesso maschile, con età compresa tra i 41 e i 50 anni e da donatori di sesso femminile con età compresa tra i 31 e i 40 anni, sembrano essere dotati di maggiore potenziale osteoinduttivo.

Le proprietà osteoinduttive del DFDBA sono state messe in discussione da Schwartz ed al. che hanno evidenziato la mancata formazione di tessuto osseo in sedi extrascheletriche dopo aver impiantato 14 lotti di matrice ossea demineralizzata, provenienti da 6 diverse banche dell'osso, nel tessuto sottocutaneo di topi.

Un aspetto che ha sempre limitato l'impiego clinico degli innesti omologhi è il rischio di trasmissione, seppur remoto, di agenti patogeni del donatore all'organismo ospite. In particolare sono stati riportati 4 casi di trasmissione del virus HIV in seguito all'utilizzo di innesti FBA antecedenti al 1985, data in cui è stato messo a punto un test specifico per gli antigeni dell'HIV E dell'HbsAg da parte dell'*American Association of Tissue Banks* che permette di ovviare al problema dei falsi negativi registrati nel cosiddetto "periodo finestra", cioè durante i 6 mesi che intercorrono tra l'infezione e la sieroconversione. Il *Center for Disease Control* statunitense sostiene che in assenza di screening il rischio di contagio per l'HbsAg è pari al 4% e quello per l'HIV al 6%, che si sposta a 6/1.000.000 in presenza di doppio screening. Tutto ciò ha permesso di non registrare nessun nuovo caso di contagio a fronte di circa 7 milioni di innesti di tessuti molli e duri.

## 2.4. Osso eterologo

L'osso eterologo, proveniente cioè da specie diverse da quella dell'individuo ricevente (bovini, suini o equini), è un materiale osteoconduttivo e riassorbibile.

La provenienza da una specie diversa, amplificando i problemi immunitari, fa sì che la tecnica di preparazione includa anche la sistematica distruzione delle proteine. Ciò si può ottenere o attraverso un procedimento chimico basato sull'utilizzo di solventi organici, come i fenoli e l'etilenglicole, e sul trattamento termico alla temperatura di 300 °C per più di 16 ore, oppure non chimico ad alta temperatura basato sulla calcinazione del materiale per più di 6 ore a temperature prossime ai 600 °C con picchi anche di 1000 °C. L'analisi dei due processi menzionati, ha evidenziato una minore quantità di residuo organico dopo il trattamento del materiale ad alta temperatura piuttosto che dopo l'utilizzo dei solventi organici.

Gli innesti eterologhi, così come quelli omologhi, presentano indubbiamente dei vantaggi rispetto all'osso autologo, quali l'ampia disponibilità che li rende indicati anche per la terapia di difetti di grosse dimensioni, un costo non eccessivo ed un uso relativamente semplice non richiedendo, tra le altre cose, due interventi per il prelievo, con tempi di guarigione più brevi e senza invalidità residue.

Gli svantaggi sono rappresentati dal rischio di infezioni locali, dalla necessità da parte dell'organismo di eliminarli con un processo di lisi prima di sostituirli con osso neoformato ed infine la già citata possibilità di trasmissione di agenti patogeni e di sensibilizzazione dell'ospite alle proteine del donatore.

## 2.5. Biomateriali alloplastici

I biomateriali alloplastici sono sostituti sintetici dell'osso con proprietà di tipo osteoconduttivo e vengono classificati come riassorbibili, non riassorbibili o parzialmente riassorbibili. Sono indicati per ogni tipo di innesto, sono praticamente privi di qualsiasi rischio di reazioni immunitarie o da corpo estraneo, presentano tempi di guarigione brevi, sono privi di tossicità sistemica o locale, sono facilmente sterilizzabili e reperibili in commercio.

Sono rappresentati essenzialmente dal fosfato tricalcico, dall'idrossiapatite, dal solfato di calcio, dall'idrossido di calcio, dai biovetri e dai prodotti a base di polimeri.

Il fosfato tricalcico, costituito da calcio e fosforo in rapporto 3:2, ha assunto negli ultimi anni una sempre maggiore considerazione grazie alla sua biocompatibilità e riassorbibilità. Se ne conoscono due fasi,  $\alpha$  e  $\beta$ , che pur essendo identiche dal punto di vista chimico si comportano in maniera diversa dal punto di vista biologico. La fase  $\alpha$  viene riassorbita lentamente e il materiale innestato è riconoscibile dall'osso ricevente anche a distanza di anni, mentre la fase  $\beta$  viene completamente riassorbita e sostituita da osso neoformato nell'arco di 8-12 mesi. Il  $\beta$ -tricalcicofosfato, inoltre, è risultato essere altamente osteoconduttivo in quanto favorisce la crescita di osso sulla sua superficie in virtù della sua porosità e capillarità.

È stato dimostrato che le proprietà osteoconduttive del fosfato tricalcico si basano sulla micromorfologia porosa, sulla struttura interconnessa dei pori e sulla sua totale riassorbibilità, dovuta soprattutto alla solubilità chimica del materiale, che comunque non sembra causare alcuna variazione di PH nella zona in cui si verifica.

L'idrossiapatite è un fosfato di calcio idratato, caratterizzato da un rapporto Ca/P pari a 1,67. Rappresenta uno dei costituenti principali del tessuto osseo e dei tessuti duri dei denti dei vertebrati e può essere ricavato da sostanze naturali come lo scheletro del corallo, estratta da osso bovino, oppure ottenuta attraverso un processo di sintesi a partire da sali di fosfato di calcio.

Le varie forme dell'idrossiapatite presenti in commercio differiscono tra loro per la forma, solida o granulare, per la grandezza dei granuli e per il volume delle porosità presenti. La forma granulare compatta presenta una densità maggiore al 65%, una bassa porosità, un'alta cristallinità e una bassissima percentuale di riassorbimento, mentre la forma porosa presenta una

microstruttura haversiana simile a quella dell'osso con pori di diametro superiore ai 100  $\mu\text{m}$  che favoriscono lo stabilirsi di una neovascolarizzazione e un alto grado di riassorbimento. Esiste infine in commercio un'idrossiapatite bifasica a riassorbibilità controllata, costituita da idrossiapatite e fosfato tricalcico in diverse proporzioni. Man mano che il fosfato tricalcico viene riassorbito, l'idrossiapatite diventa più porosa ed una quota sempre maggiore entra a contatto con i tessuti ospiti favorendo un lento processo di sostituzione che si completa nell'arco di 4-5 anni.

Il solfato di calcio, chiamato anche gesso di Parigi, è un materiale a base di  $\beta$ -emidrato di solfato di calcio, prodotto calcinando gesso naturale a temperature di 110-130 °C. Presenta un'ottima biocompatibilità, è facilmente modellabile e viene utilizzato sia come barriera per la rigenerazione ossea guidata, sia come vettore per proteine morfogenetiche.

I biovetri sono materiali costituiti per il 45% da silice ( $\text{SiO}_2$ ), per il 24,5% da ossido di calcio ( $\text{CaO}$ ), per il 24,5% da ossido di sodio ( $\text{Na}_2\text{O}$ ) e per il 6% da ossido di fosforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ). Altamente biocompatibili ed osteoconduttivi, i biovetri stabiliscono con l'osso un legame chimico-fisico attraverso un film di Ca-P, scambiando con esso ioni o gruppi molecolari. Sono assolutamente non riassorbibili, non riuscendo gli osteoclasti ad eliminare i materiali a base di silicati, e permangono sotto forma di materia vetrosa estremamente solida, trovando quindi indicazione in tutti quei casi in cui la richiesta sia quella di una buona stabilità strutturale e integrazione con il sito ricevente.

Tra i vari prodotti a base di polimeri distinguiamo quelli costituiti da polimetilmetacrilato (PMMA) e poliidrossietilmetacrilato (PHEMA), come l'HTR, e quelli composti da copolimeri dell'acido polilattico e poliglicolico, come il SINTbone.

Il polimero HTR, altamente biocompatibile, è costituito da uno strato profondo di polimetilmetacrilato, che gli conferisce le caratteristiche meccaniche, da uno strato intermedio di poliidrossietilmetacrilato, a cui si possono attribuire le caratteristiche di emostasi e di adesione, ed infine uno strato esterno di idrossido di calcio, responsabile della capacità osteoconduttiva, che rappresenta l'unica componente riassorbibile del materiale. In seguito alla dissoluzione dello strato esterno i nuclei centrali in acrilico possono essere colonizzati da osso in nuova formazione. È stato osservato che il polimero nell'arco di 4-6 anni può andare incontro ad un certo grado di riassorbimento con una graduale sostituzione da parte del nuovo tessuto, anche se il prodotto viene unanimemente riconosciuto come non riassorbibile.

L'acido polilattico e l'acido poliglicolico, in varia composizione percentuale, sono i costituenti di molti prodotti attualmente in commercio utilizzati come dispositivi medici in campo chirurgico, odontoiatrico, maxillofaciale ed ortopedico. Numerosi studi sperimentali hanno dimostrato che questi polimeri sono biocompatibili e non citotossici e che il loro tempo di degradazione, variabile da un minimo di 4 ad un massimo di 8 mesi, è strettamente correlato alla massa impiantata, alla reattività individuale, all'età del paziente, alla circolazione sanguigna della zona dell'innesto, oltre ai fattori fisici propri del materiale, quali struttura chimica, composizione, peso molecolare, forma della superficie esposta, grado di densità.

## 3. LA TECNICA MICROTOMOGRAFICA

### 3.1. Generalità

La microtomografia computerizzata (micro-CT) è un nuovo genere di tecnica non distruttiva, che consente di ottenere informazioni sulla struttura interna dei campioni indagati, fornendo immagini ad alta risoluzione, senza danneggiare il campione stesso o prepararlo in alcun modo (non sono necessari tagli, coperture o trattamenti chimici del campione); essa è sostanzialmente una forma miniaturizzata dell'esame tomografico convenzionale ampiamente utilizzato in oncologia.

Le tecniche convenzionali, quali il microscopio ottico ed elettronico, possono fornire delle informazioni importanti sui campioni, che però devono essere trattati o sezionati correttamente; inoltre un grande interesse per la microscopia moderna è poter ottenere informazioni tridimensionali. Le informazioni circa la struttura tridimensionale potrebbero essere ottenute dall'immagine di una superficie o da una combinazione di parecchie fette sottili; ma in entrambi i casi le informazioni non possono essere certe poiché i metodi di taglio o di preparazione con tecniche distruttive possono cambiare drammaticamente la struttura del campione. Inoltre, molti campioni non possono essere studiati in questo modo, perché può risultare impraticabile sezionarli o possono essere addirittura danneggiati. Questo significa che la struttura interna dimensionale dell'oggetto 3D può essere studiata soltanto in maniera distruttiva; ma in molti casi sono richieste tecniche non-invasive di visualizzazione.

Per la microscopia un aspetto importante è rappresentato dall'interpretazione quantitativa delle immagini, in termini di parametri rappresentativi della microstruttura dell'oggetto. Anche se la maggior parte dei microscopi includono o possono essere collegati con i potenti sistemi di elaborazione di immagini, l'interpretazione del contrasto è ancora il problema principale. Per esempio, una micrografia bidimensionale della superficie di un oggetto non permette di dedurre le caratteristiche morfologiche precise poiché questo richiederebbe informazioni anche sulla terza dimensione. Inoltre, il contrasto dell'immagine è generato non soltanto dalla morfologia dell'oggetto ma da altri fattori quali, ad esempio, la composizione.

Un "microscopio ideale 3D" dal punto di vista dell'utente dovrebbe fare fronte alle seguenti richieste:

- L'oggetto dovrebbe essere esaminato in condizioni naturali.
- Qualsiasi zona all'interno dell'oggetto tridimensionale dovrebbe essere visualizzata in modo non distruttivo in 3D con ingrandimento sufficiente.
- Le caratteristiche numeriche della struttura interna (morfologia e composizione) dovrebbero essere dedotte attendibilmente in tutta la fetta bidimensionale.

La microtomografia a raggi X soddisfa queste richieste; in sostanza viene applicato lo stesso principio della TAC medica, in forma miniaturizzata e con in più la possibilità di realizzare ricostruzioni 3D delle strutture di interesse.

Il termine tomografia (dal greco *tòmos* = sezione) indica le tecniche che visualizzano gli oggetti in sezioni orizzontali. Le tecniche utilizzate per ottenere tomogrammi possono essere di vario tipo: nucleari, ottiche, NMR, acustiche, elettriche. Per ciascuna di esse l'informazione dell'oggetto è legata ad un opportuno parametro, ad esempio la capacità o la resistenza nelle tecniche elettriche.

La tomografia computerizzata (CT) utilizza le informazioni relative all'interazione dei raggi X con la materia, ottenendo immagini di tipo numerico ricostruite da un calcolatore mediante l'uso di algoritmi matematici.

L'oggetto viene investito da un fascio di raggi X i quali, dopo l'attraversamento del campione, giungono sul rivelatore fornendo una misura dell'attenuazione subita dalla radiazione lungo il percorso. Il risultato di tale processo è la formazione di un'immagine bidimensionale (proiezione).

Il campione viene ruotato per ottenere tante proiezioni quante sono gli angoli di rotazione. La composizione di tali proiezioni (mediante algoritmi sofisticati) fornisce l'immagine di una *slice* del campione. Poi alla rotazione del campione si aggiunge anche un moto di traslazione del sistema sorgente-rivelatore; questo permette di ottenere le singole *slice* a diverse altezze; sovrapponendo infine queste ultime è possibile ottenere una ricostruzione tridimensionale dell'intero campione e quindi la completa visualizzazione delle sue strutture esterne ed interne.

L'immagine del campione ricostruita al computer potrà essere quindi sezionata, esplorata al suo interno e misurata senza danneggiamento del campione stesso.

Due sono le geometrie per effettuare un'indagine tomografica e diversi sono gli algoritmi di ricostruzione, a seconda della forma e della larghezza dell'apertura del fascio incidente di raggi X:

- geometria fan-beam
- geometria cone-beam

Nella geometria fan-beam il fascio di raggi X è collimato in modo da ottenere un "fascio a ventaglio". Durante l'indagine tomografica, per ogni angolo di rotazione, vengono acquisite le proiezioni del campione *slice* per *slice*. I rivelatori impiegati sono di tipo lineare.

Nella geometria cone-beam il fascio di raggi X presenta la forma di un cono. In questo caso, per ogni angolo di rotazione, si acquisisce la radiografia dell'intero oggetto in esame grazie all'uso di rivelatori bidimensionali.

La micro-CT a raggi X sta diventando quindi un mezzo importante ed un approccio diagnostico per le indagini nella scienza dei materiali così come nella medicina, nella biologia, nell'elettronica, nella geologia, nell'industria petrolifera, nell'industria dei semiconduttori, dell'odontoiatria, nell'archeologia e nell'ingegneria biomedica. Questo perché la micro-CT permette di effettuare, riassumendo:

- analisi morfologiche;
- misura della porosità;
- valutazione delle proprietà strutturali di un materiale;
- caratterizzazione dei materiali multifasici, individuazione e quantificazione dei difetti del materiale quali cricche, crateri, fessurazioni;
- studio del comportamento dei materiali sotto sforzo (sviluppo e propagazione di cricche e scorrimento delle dislocazioni) (13).

## 3.2. Principi di ricostruzione tomografica

Anche se c'è stata un'evoluzione tecnica che ha portato ad un certo numero di generazioni di tomografi computerizzati, i principi fondamentali per ottenere le immagini sono rimasti invariati.

I dati base per il processo di ricostruzione dell'immagine sono un insieme di profili di attenuazione ottenuti per molte direzioni incidenti del fascio.

I raggi X hanno un'alta penetrazione negli oggetti a causa della lunghezza d'onda estremamente piccola in confronto alle dimensioni dell'oggetto esaminato. Dunque i raggi emessi dalla sorgente penetrano nel corpo senza essere deviati (in buona approssimazione), ma escono con una intensità  $I$  attenuata a causa dell'interazione dei raggi X con la materia, che avviene mediante i seguenti processi:

- Effetto fotoelettrico
- Effetto Compton

- Effetto Rayleigh
- Creazione di coppie

La creazione di coppie è un effetto quantitativamente rilevante oltre i 2 MeV e non deve essere preso in considerazione nella tomografia a raggi X.

Dunque quando una sorgente S emette un fascio collimato di fotoni di intensità  $I_0$ , il raggio X, passando attraverso la materia, viene attenuato e la riduzione dell'intensità del fascio nell'attraversare uno spessore  $dx$  di materia è rappresentata matematicamente dalla formula:

$$-\frac{dI}{I} = \mu dx$$

Dove  $\mu$  rappresenta la probabilità per unità di percorso che avvenga un'interazione ed è il parametro caratteristico relativo alla penetrazione e diffusione delle radiazioni X in un mezzo; prende il nome di coefficiente di attenuazione lineare e dipende dall'energia  $E_0$  dei fotoni incidenti, dal numero atomico  $Z$  e dalla densità  $\rho$

$$\mu(E_0, Z, \rho)$$

In particolare la dipendenza dalla densità è di tipo lineare.

Integrando la (1) su un materiale di spessore  $d$  si ottiene:

$$\int_{I_0}^{I(d)} \frac{dI}{I} = \int_0^d -\mu dx$$

quindi il valore della proiezione  $p$  è:

$$p = \ln(I_0 / I) = \int_0^d \mu dx$$

dove  $I_0$  e  $I$  sono rispettivamente l'intensità della sorgente luminosa e l'intensità misurata dai rivelatori. La relazione indica che il logaritmo del rapporto dell'intensità del fascio di radiazione incidente rispetto all'intensità trasmessa è numericamente uguale all'integrale lineare della distribuzione bidimensionale dei coefficienti lineari di attenuazione. L'insieme di più proiezioni costituisce un profilo di attenuazione.

Se il campione è disomogeneo, si può dividere la sezione analizzata in tanti elementini di superficie detti pixel. In ciascuno di essi si assume che il coefficiente di attenuazione sia costante e pari a  $\mu_j$ . In questo modo si discretizza l'integrale nella forma:

$$p = \ln(I_0 / I) = \Delta x \cdot \sum_j \mu_j$$

Fissata la dimensione del pixel, la (4) permette di determinare sperimentalmente la somma dei coefficienti di attenuazione lungo una linea di pixel attraversata dalla radiazione incidente. I rivelatori consentono di determinare tale valore numerico. In realtà il fascio di fotoni utilizzato nella TC non è monoenergetico e, inoltre, il rivelatore della radiazione ha un'efficienza che dipende dall'energia della radiazione incidente. La situazione reale sarà pertanto rappresentata da equazioni più complesse. Il problema da risolvere per la ricostruzione dell'immagine sarà quello di determinare, da un numero sufficiente di profili di attenuazione, il valore del coefficiente di attenuazione lineare di ogni singolo pixel.

La ricostruzione si effettua tramite una grande serie di misure eseguite nelle più diverse geometrie rispetto al fascio incidente. Alla fine della ricostruzione si ottiene una "mappa" di distribuzione della funzione coefficiente di attenuazione  $\mu(x,y)$  nella sezione dell'oggetto complessivamente attraversata dalla radiazione. Esistono diversi formalismi matematici che risolvono il problema della ricostruzione dell'immagine.

Una possibile soluzione è di ricorrere a un processo iterativo, che consiste nell'ottenere una serie di risultati approssimati per la matrice numerica che convergono alla soluzione finale a ogni iterazione. Questo metodo non è utilizzato negli attuali tomografi computerizzati commerciali e riveste solo interesse storico, essendo questa la tecnica di ricostruzione impiegata nel primo apparecchio di TC realizzato. Tuttavia una semplificata ed elementare descrizione di come opera il metodo può essere utile a evidenziare come si possa, dal numero finito di profili di attenuazione, ottenere la distribuzione che li ha determinati.

Supponiamo di avere ripreso alcuni profili per diverse angolazioni di incidenza ottenendo i valori delle proiezioni indicati in figura. Il procedimento viene inizializzato con la matrice 2x2 vuota, poi si effettuano le somme verticali e si sottrae il risultato dal raggio somma corrispondente, mettendo metà del valore ottenuto in ciascun valore di matrice. Si effettuano le somme orizzontali e si sottraggono dai raggi somma orizzontali. Metà di ciascun risultato è sommato algebricamente ai valori orizzontali di matrice. Dopo avere sommato le diagonali, si sottrae la somma delle diagonali dai raggi somma diagonali e si mette metà del risultato in ciascun elemento corrispondente. In questo caso semplice l'immagine originale è ricostruita esattamente mentre con tutti gli algoritmi utilizzabili vengono ovviamente ottenute sempre soluzioni approssimate. Tutti i dati devono essere acquisiti prima di iniziare il procedimento di calcolo e le operazioni da compiere, anche se semplici, sono numerosissime. L'uso di metodi iterativi porta quindi a tempi di ricostruzione non accettabili.

Nella pratica la ricostruzione dell'immagine viene effettuata con metodiche diverse fra le quali ricordiamo:

1. Metodo delle retroproiezioni (*back-projection*)
2. Metodo delle retroproiezioni filtrate (*filtered back-projection*)
3. Metodi basati su algoritmi sviluppati da Fourier (trasformata di Fourier), che in alcuni casi prevedono l'uso di programmi di calcolo detti filtri di convoluzione.

I filtri di convoluzione consistono in funzioni matematiche il cui uso, nei procedimenti di ricostruzione delle immagini, può portare ad aumentare la risoluzione in contrasto o quella spaziale a seconda del tipo di filtro di convoluzione usato. L'uso di appropriati filtri di convoluzione nelle procedure di ricostruzione consente quindi ottenere risultati migliori nello studio di particolari strutture (osso, polmone, ecc).

Il procedimento di ricostruzione ottiene non tanto i valori assoluti dei coefficienti di attenuazione lineare ma dei numeri che sono direttamente legati a tali coefficienti per una certa energia efficace del fascio di fotoni. Tali numeri si chiamano unità Hounsfield (UH) o numeri TC e sono dati da:

$$TC = \frac{k(\mu_c - \mu_w)}{\mu_w}$$

Dove  $\mu_c$  e  $\mu_w$  sono i coefficienti lineari di attenuazione rispettivamente del campione e dell'acqua mentre  $k$  è un fattore di scala in genere pari a 1000. Un numero TC non è altro che 10 volte la differenza percentuale tra i  $\mu_c$  del campione e quello dell'acqua diviso per  $\mu_w$ :

$$TC = \frac{10(\mu_c - \mu_w)}{\mu_w} \cdot 100$$

Ad esempio, un composto che un  $\mu$  il 4% più alto di quello dell'acqua avrà un numero  $\mu_c$  pari a

$$TC = \frac{10(1,04 \mu_w - \mu_w)}{\mu_w} \cdot 100 = 40$$

Per definizione l'acqua avrà un numero TC pari a 0 e, usando un fattore di scala uguale a 1000, l'aria lo avrà pari a - 1000 e l'osso denso pari a + 1000. La scelta di ottenere una matrice

di numeri TC è dovuta al fatto che gli algoritmi di ricostruzioni utilizzati dal calcolatore sono più veloci se ricavano il valore  $\mu_c - \mu_w$  invece del valore  $\mu_c$  del coefficiente di attenuazione lineare. I numeri TC di un particolare materiale e le differenze di numeri TC di due campioni diversi di materiale, non sono necessariamente identici per due apparecchiature differenti o per due immagini diverse dello stesso apparecchio o per due zone diverse della stessa immagine. Questo perché, i numeri TC, dipendono dall'energia effettiva del fascio di radiazioni X utilizzato per la misura, che a sua volta dipende dalla dimensione e composizione dell'oggetto e dalla posizione al suo interno dell'elemento cui il numero TC si riferisce.

La procedura matematica porta alla ricostruzione di un'immagine sottoforma di matrice numerica i cui elementi corrispondono ai pixel. Le dimensioni della matrice visualizzata non sono necessariamente uguali a quelle delle matrice calcolata. Spesso si ricorre ad un'interpolazione per aggiungere punti supplementari alla matrice visualizzata allo scopo di presentarla con maggiore finezza. In altri casi la matrice visualizzata può essere più piccola. Come si è detto, l'immagine viene rappresentata da una matrice bidimensionale le cui dimensioni sono definite dal numero di righe e colonne che la compongono (esempio 256x256). Per ogni dato valore di x e y la piccola regione di immagine rappresentata dalle coordinate (x,y) è chiamata elemento di immagine o pixel e  $f(x,y)$  è il suo corrispondente valore funzionale che è chiamato valore del livello di grigio ed è un numero intero non negativo, potenza di 2. I livelli di grigio dell'immagine radiologica corrispondono al valore del numero TC legato al valore del coefficiente lineare di attenuazione relativo al materiale contenuto in quel pixel. Per visualizzare l'immagine numerica TC i livelli di grigio sono convertiti in segnali analogici compatibili con i segnali video di un numero a raggi catodici (CRT). Nell'immagine TC visualizzata, la matrice ricostruita è rappresentata da un'insieme di piccoli quadrati (pixel) con una luminosità o tono di grigio determinato dal valore del numero TC del corrispondente elemento di matrice calcolata. Le matrici ricostruite e visualizzate ed i pixel sono strutture bidimensionali che si estendono pertanto lungo un asse x e un asse y. Nella realtà la matrice ricostruita o i valori dei pixel descrivono le proprietà, non tanto di una struttura bidimensionale quanto quelle di un volumetto di materiale contenuto con quello che si chiama voxel (*volume element*). Il voxel avrà un volume che dipende dalle dimensioni del pixel e dalla distanza tra *slices* adiacenti (16-19).

### 3.3. Strumentazione Skyscan

L'apparecchiatura Skyscan 1072, consente di realizzare scansioni di piccoli oggetti ad alta risoluzione e rappresentarli tridimensionalmente ed, inoltre, offre anche la possibilità di avere informazioni di carattere morfometrico sul campione osservato; informazioni utili e preziose per la caratterizzazione di biomateriali da innesto osseo.

Lo strumento è composto da un generatore di raggi X, un portacampione rotante ed una camera CCD (*Charge Coupled Device*). Il tutto è controllato da un PC con un doppio processore avente un software dedicato e sofisticato per la ricostruzione tridimensionale delle immagini e per i relativi calcoli dei parametri morfometrici.

Lo Skyscan 1072 utilizza la geometria parallela o cone-beam. La radiazione utilizzata (raggi X) è prodotta dal bombardamento di un materiale pesante con un fascio di elettroni (tubo radiogeno di 20 Watt). La sorgente utilizzata è puntiforme e non genera di per sé raggi paralleli, ma un fascio di raggi X a ventaglio. Utilizzando alcune parti di una serie di fasci a ventaglio con diverse prospettive, si realizza la formazione di fasci pseudo-paralleli. In questo modo il metodo di ricostruzione per fasci di raggi paralleli, può essere applicato anche con fasci di raggi X a ventaglio.

La geometria del cone-beam permette un ingrandimento ottico dell'oggetto in esame sul sistema rivelatore. L'ingrandimento  $M$  può essere modificato variando la distanza tra la sorgente di raggi X ed il rivelatore:

$$M = H_1 / H = L / L_1$$

dove  $L$  è la distanza sorgente-detector,  $L_1$  la distanza sorgente-campione,  $H$  l'altezza reale del campione,  $H_1$  l'immagine ingrandita sul detector.

In relazione alla scelta dell'ingrandimento, il campo di vista può cambiare da 20 mm a 2 mm con un range della risoluzione spaziale da circa 20  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  a 5  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , rispettivamente.

La radiazione è policromatica, ma viene opportunamente filtrata con filtro passa-banda per ottenere una radiazione monocromatica che attenua il problema di indurimento del fascio (l'artefatto più comune della CT collegato all'aumento di energia del fascio) e migliora notevolmente la sensibilità della microtomografia alle più piccole variazioni di assorbimento di raggi X all'interno del campione (risoluzione di contrasto).

L'energia del fascio può essere regolata in ampio range, permettendo che l'assorbimento ottimale dei raggi X sia scelto per ogni campione secondo il formato e/o la sua composizione.

Il sistema è fornito di una lastra di alluminio dallo spessore di 1 mm, che può essere usata come filtro hardware per minimizzare gli artefatti, posizionandola di fronte allo scintillatore.

Il rivelatore utilizzato è costruito con la tecnologia CCD ed è composto da tre parti:

1. lo schermo al fosforo, che trasforma i raggi X in luce visibile;
2. un supporto di conduzione in fibra ottica, che conduce la radiazione visibile al CCD;
3. il CCD, che rileva la radiazione luminosa e la trasforma in segnale elettrico.

Una volta che i raggi X colpiscono lo schermo al fosforo, essi vengono trasformati in radiazione luminosa. Quest'ultima va quindi a colpire i fotodiodi presenti nel CCD.

A questo punto i diodi diventano conduttori e la corrente che li attraversa va a scaricare dei condensatori direttamente collegati ad essi, caricati precedentemente, i quali avranno una tensione istantanea ai loro capi, minore di quella di partenza, inversamente proporzionale al flusso fotonico. In questo sistema ogni diodo rappresenta un pixel. Quando il periodo di integrazione del detector si è concluso, una serie di interruttori si chiudono e quindi la carica di ciascun condensatore viene trasferita a un sistema di registrazione di questi dati che è composto da altri condensatori.

In seguito, la carica presente sui condensatori di registro viene trasmessa ad un convertitore A/D che infine trasmette i dati al sistema di elaborazione. Dopo che questo trasferimento è avvenuto, gli interruttori vengono riaperti e i condensatori attaccati ai fotodiodi vengono ricaricati.

A questo punto un nuovo ciclo può ricominciare.

Caratteristiche di questo tipo di detector sono:

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

Tutte queste caratteristiche permettono di generare immagini 3D con un alto rapporto segnale/rumore (SNR) e con un'elevata risoluzione spaziale.

La risoluzione spaziale di una TAC convenzionale è tipicamente nella gamma di 1÷2,5 mm, che corrisponde al formato del voxel di 1÷10 mm<sup>3</sup>. La microtomografia computerizzata a raggi X, attualmente, permette di migliorare la risoluzione spaziale di 7-8 ordini di grandezza in termini di volume. Il sistema SkyScan 1072 permette di raggiungere una risoluzione spaziale di 5  $\mu\text{m}$ , corrispondente al formato voxel di circa 1x10<sup>-7</sup> mm<sup>3</sup>. Come nella "macro" tomografia, la struttura interna di un oggetto, sia di tipo biologico che di origine industriale, può essere ricostruita ed analizzata completamente in modo non distruttivo. I dati raccolti vengono poi

trasmessi ad un opportuno calcolatore e processati tramite software per essere in seguito elaborati secondo le necessità delle indagini e delle sperimentazioni.

### 3.4. Principi di funzionamento

L'immagine tomografica viene ricostruita secondo il procedimento qui di seguito sintetizzato:

1. si misura l'attenuazione di un fascio di raggi X in un numero elevato di traiettorie parallele attraverso lo strato corporeo in studio;
2. si determina la componente di attenuazione avvenuta nei singoli voxel attraverso un algoritmo specifico di ricostruzione di retroproiezione filtrata;
3. si realizza infine un "display" visivo su monitor dei valori numerici ricostruiti.

Si ricordi inoltre che l'immagine tomografica computerizzata è un'immagine digitale la cui unità costitutiva è il pixel (all'aumentare della densità elettronica il pixel corrispondente al voxel avrà una gradazione di grigio via via sempre più chiara).

Inoltre se alcune caratteristiche interne di un materiale devono essere determinate accuratamente, gli artefatti di un'immagine tomografica devono essere minimizzati.

Gli artefatti che si presentano sono essenzialmente dei seguenti due tipi:

- Artefatti ad anello; sono causati dalla disomogeneità del detector e sono ridotti tramite correzioni matematiche.
- Artefatti a stelle o strisce; che sono causati da radiazione secondaria e sono ridotti ponendo davanti al detector dei filtri di metalli leggeri (alluminio o rame).

La ricostruzione matematica delle diverse *slice* a partire dalle immagini delle diverse proiezioni, viene effettuata dallo Skyscan utilizzando l'algoritmo della retroproiezione filtrata. Per capire meglio tale algoritmo, mostriamo una possibilità di questa ricostruzione su un semplice esempio: un oggetto rappresentato da un singolo punto con assorbimento significativo, posto in un luogo non noto. Nell'attraversare il punto il fascio subirà un'attenuazione e la "linea d'ombra" monodimensionale subirà una diminuzione di intensità. Ora ruotiamo il nostro oggetto e ripetiamo la stessa operazione a piccoli incrementi angolari per 180°. In ogni nuova posizione di rotazione dell'oggetto, si aggiungono all'area di ricostruzione delle linee che vengono ottenute proiettando indietro i profili delle "linee d'ombra" delle proiezioni, tale operazione viene detta retroproiezione. Dopo una serie di rotazioni possiamo localizzare la posizione del punto di assorbimento all'interno dell'area di ricostruzione.

In generale occorre essere sicuri che tutte le parti dell'oggetto siano nel campo di vista (FOV, definito come l'area che è rappresentata nell'immagine ricostruita) perché, dato che i valori delle "linee d'ombra" sono dati dai punti di assorbimento dell'oggetto, solo in questo modo possono essere segnate come linee sull'area di ricostruzione nella memoria del computer, tutte le possibili posizioni dei punti di assorbimento dell'oggetto, senza perdita di informazioni.

All'aumentare del numero di proiezioni d'ombra da punti di osservazione diversi, il corpo dell'oggetto diventa sempre più definito. Nel caso di ricostruzione con un numero considerevole di proiezioni si può ottenere un'immagine con una buona definizione, che risulta influenzata dalla posizione e dall'area d'assorbimento dell'oggetto iniziale. Il risultato ottenuto è un'immagine a stella. La riproduzione a stella di un punto costituisce il più evidente artefatto della retroproiezione e ne rappresenta il limite più grosso, in quanto un metodo di ricostruzione esatto deve ricostruire un punto sotto forma di un punto e non altrimenti. Ma nota a priori l'immagine che deve essere ricostruita, possiamo pre-correggere le informazioni iniziali in assorbimento per far sì che l'immagine risultante sia il più possibile corrispondente all'oggetto reale. Ciascuna proiezione viene modificata matematicamente mediante un'equazione filtro, che controbilancia l'artefatto a stella proprio della retroproiezione. Si parla in questo caso di retroproiezione filtrata e l'integrale

che descrive questo metodo è del tipo conosciuto come integrale di convoluzione. La retroproiezione filtrata ha il vantaggio che ciascun profilo dell'immagine può essere elaborato completamente nel momento stesso in cui viene ottenuto, cosicché c'è meno tempo da aspettare per la ricostruzione dell'immagine una volta che sia completato il ciclo di scansione.

Lo stesso algoritmo può produrre immagini di sezioni trasversali non solo da un oggetto puntuale, ma da qualsiasi oggetto reale, che viene rappresentato da un gran numero di voxel di assorbimento discreti. L'assorbimento lineare in ciascun fascio di raggi X, come abbiamo visto, corrisponde alla somma degli assorbimenti di ciascun voxel presente in questo fascio.

Un programma del calcolatore analizza i dati registrati per produrre un'immagine 2D dei coefficienti di assorbimento. L'immagine 3D è poi ottenuta per sovrapposizione di immagini 2D di sezioni adiacenti (*slice*).

### 3.5. Parametri istomorfometrici

I parametri qui sotto riportati, chiamati anche “indici primari”, sono calcolati dal software di ricostruzione una volta selezionata la regione di interesse (ROI) formata dai singoli pixel che compongono l'immagine 2D. Nella rappresentazione 3D, il calcolo viene esteso a tutte le *slice* ottenute attraverso l'acquisizione del campione in modo da ottenere il volume di interesse composto dai singoli voxel (20).

- TV (*Tissue Volume*, mm<sup>3</sup>): volume totale di interesse, rappresentato dalla somma di tutti i voxel.
- BV (*Bone Volume*, mm<sup>3</sup>): la somma di tutti i voxel marcati come osso all'interno del volume di interesse.
- TS (*Tissue Surface*, mm<sup>2</sup>): superficie totale di interesse, rappresentata dalla somma di tutti i pixel.
- BS (*Bone Surface*, mm<sup>2</sup>): la somma di tutti i pixel marcati come osso all'interno della superficie di interesse.
- BV/TV (*Bone Volume Fraction*, %): rappresenta il volume percentuale.
- BS/BV (1/mm): rappresenta la superficie specifica.

Si riportano ora altri parametri, chiamati anche “indici secondari”, che vengono calcolati andando a considerare il modello a piani, il quale assume che l'osso trabecolare sia organizzato in infiniti piani con un certo spessore (Tb.Th.), una certa separazione (Tb.Sp.) e un determinato numero per unità di lunghezza (Tb.N.).

$$\text{Tb. Th.} = 2 \text{ BV} / \text{BS}$$

(*Trabecular Thickness*, mm): spessore delle trabecole ossee.

$$\text{Tb. Sp.} = (1 / \text{Tb. N.}) - \text{Tb. Th.}$$

(*Trabecular Separation*, mm): distanza tra i margini delle trabecole.

## 4. ANALISI SPERIMENTALE

### 4.1. Materiali e metodi

Il lavoro di ricerca è stato svolto nel dipartimento di Tecnologie e Salute dell'Istituto Superiore di Sanità, in collaborazione con la facoltà di Odontoiatria dell'Università di Roma La Sapienza. L'obiettivo è quello di analizzare alcuni biomateriali da innesto osseo di diversa origine (omologhi, eterologhi e alloplastici) al fine di definirne le principali caratteristiche morfometriche, in particolare la porosità, grazie all'utilizzo della tecnica microtomografica tramite strumentazione SkyScan 1072. Poiché esiste una stretta relazione tra le proprietà dei materiali e la loro microstruttura, è necessario caratterizzare gli stessi ai più alti livelli di risoluzione prima di poter migliorare quelli già esistenti o progettare razionalmente dei prodotti nuovi. L'analisi microCT 3D è composta dalle seguenti fasi:

1. Preparazione e settaggio della strumentazione
2. Acquisizione dati
3. Ricostruzione delle sezioni trasversali
4. Segmentazione delle immagini e calcolo dei parametri istomorfometrici
5. Analisi tramite software di supporto

#### 4.1.1. Descrizione dei campioni

Sono stati scelti per l'analisi un campione di osso omologo, un campione di osso eterologo di origine equina e due campioni di biomateriali alloplastici: il fosfato di calcio e il fosfato tricalcico in granuli.

Le caratteristiche dimensionali del campione di osso omologo esaminato, in Figura 1, sono 9mm x 7,5mm x 15mm. Le caratteristiche dimensionali del campione di osso eterologo esaminato, in Figura 2, sono 5mm x 5,5mm x 3mm.

Le caratteristiche dimensionali del campione di osso di fosfato di calcio, in Figura 3, sono 2mm x 1,5mm x 2,5mm mentre per il fosfato tricalcico sono di 1,5mm x 1,5mm x 2mm (Figura 1).



Figura 1. I quattro campioni sottoposti all'analisi microtomografica

#### 4.1.2. Preparazione e configurazione della strumentazione

I campioni vengono, per ogni acquisizione, collocati su un supporto cilindrico di cui è dotata la strumentazione per microtomografia. L'assicurazione di una posizione stabile del campione durante tutto il processo di acquisizione è una condizione importante per l'attendibilità dell'analisi, in quanto qualsiasi suo movimento introdurrebbe degli artefatti da ricostruzione.

Altro aspetto su cui porre attenzione è la posizione del campione rispetto all'asse di rotazione del corpo a cui è legato: se, infatti, il campione non fosse ben centrato si introdurrebbero errori nel processo di acquisizione legati alla sua variabile di posizione.

Una volta fissato il campione, il supporto viene inserito all'interno della macchina e si procede quindi con azionare il comando di chiusura automatica del coperchio.

Si seleziona il comando di avvio raggi e si utilizzano le prime immagini del campione, fermo sul supporto prima della partenza dell'acquisizione, per la regolazione dei parametri adeguati per una corretta scansione: la distanza fra sorgente e campione, al fine di ingrandire il campione in maniera desiderata nella fase di acquisizione, la risoluzione, il filtraggio, l'incremento dell'angolo di rotazione.

Per l'acquisizione dei campioni di osso è stato utilizzato un filtro di alluminio di 1 mm per minimizzare gli artefatti, ed è stato impostato un tempo di esposizione per ogni scansione di 5,9 s ed un incremento dell'angolo di rotazione di  $0,45^\circ$ . Il campo di visione è stato settato a 19,59 mm. In relazione alle diverse dimensioni dei campioni è stato possibile ottenere differenti valori per la risoluzione: una magnification di 18X per il campione omologo, che corrisponde ad una dimensione caratteristica dei pixel-size di  $16,3 \mu\text{m}$ , 40X per il campione eterologo corrispondente ad una dimensione dei pixel-size di  $7,3 \mu\text{m}$ , ed infine una magnification di 80X che corrisponde ad un diametro dei di  $3,7 \mu\text{m}$ , per i granuli alloplastici.

È stata scelta una rotazione di  $180^\circ$ , come da prassi, perché sottoporre il campione ad una rotazione completa di  $360^\circ$  significherebbe acquisire per due volte gli stessi elementi, e quindi favorire l'introduzione di artefatti da ricostruzione.

Per scegliere i valori dei parametri di acquisizione si è verificato di volta in volta che tipo di immagine si sarebbe ottenuta, scegliendo la più idonea per gli scopi prefissati.

#### 4.1.3. Acquisizione dati

Il tempo di acquisizione della strumentazione per microtomografia di un campione di osso è stato di circa 2 ore, durante il quale in una prima viene generata una proiezione frontale nel formato BMP (BitMaP) e successivamente nel formato TIFF (*Tagged Image File Format*) ogni  $0,45^\circ$ , incremento di angolo di rotazione. Queste immagini corrispondono alle proiezioni bidimensionali ottenute ai diversi angoli di rotazione le quali vengono memorizzate automaticamente dal software di acquisizione nel computer.

La Figura 2 mostra la prima proiezione frontale ottenuta dal campione omologo.

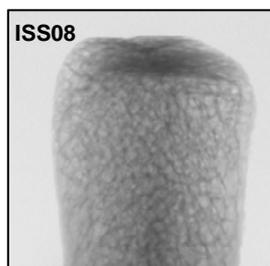


Figura 2. Proiezione frontale campione omologo

Successivamente, alla fine dell'acquisizione le immagini ottenute sono state elaborate con il software di ricostruzione del sistema microtomografico.

#### 4.1.4. Ricostruzione delle sezioni trasversali

Dalle immagini delle proiezioni bidimensionali è stato possibile ricostruire le immagini trasversali dell'oggetto, usando il software Cone\_rec (Skyscan, Belgio), che è basato sull'algoritmo del fascio di cono. La ricostruzione di circa 100 *slice* richiede circa 30 minuti.

Le immagini delle sezioni trasversali originali sono state elaborate utilizzando la metodica di calcolo a 16-bit in virgola mobile.

Il software utilizzato per il calcolo dei parametri istomorfometrici è ottimizzato tramite l'uso di *files bitmap* (256 livelli di grigio), cioè le immagini ottenute con la tecnica a virgola mobile vengono convertite in immagini bmp. La conversione viene effettuata assegnando al numero in virgola mobile che rappresenta l'aria (*floating point value*= 0.000) il valore bmp 255 (*white*), e al massimo numero in virgola mobile rappresentante l'osso (*floating point value*= 1.500) il valore bmp 0 (*black*). I numeri in virgola mobile compresi in questo intervallo vengono allora bilanciati linearmente. Un esempio di un'immagine di una sezione trasversale è mostrato in Figura 3.

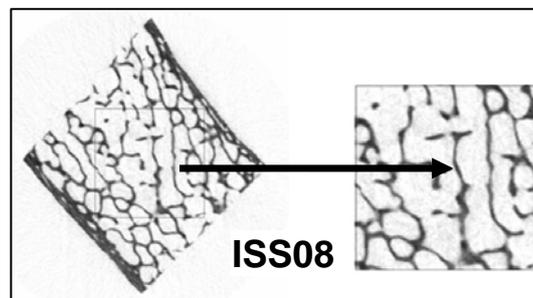


Figura 3. (Sx) Sezione trasversale dell'immagine del campione omologo con una regione d'interesse (ROI) quadrata selezionata nel centro. (Dx) Ingrandimento della regione quadrata d'interesse estratta dall'immagine della sezione trasversale

#### 4.1.5. Segmentazione dell'immagine

Per il calcolo dei parametri istomorfometrici e le ricostruzioni 3D, l'immagine con i livelli di grigio deve essere prima divisa nella fase osso e non osso. Questo processo, chiamato anche "segmentazione", *thresholding* o "binarizzazione", ha come risultato un'immagine composta soltanto da pixel bianchi o neri. Nell'esempio mostrato sotto (Figura 4), l'immagine a livello di grigio è stata segmentata, con l'immagine binarizzata composta di soli pixel neri (osso) e bianchi (non-osso).

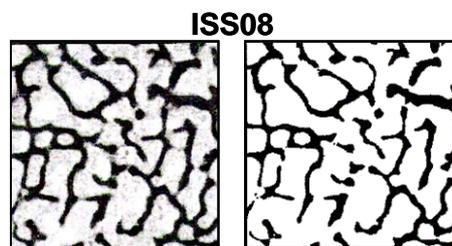


Figura 4. (Sx) Esempio di una ROI prima e (Dx) dopo la binarizzazione pixel neri = osso, pixel bianchi = non osso

I differenti metodi di segmentazione sono presentati in letteratura, come metodi “globali” o “locali”.

Esempi di metodi “globali” sono quelli rappresentati dai metodi dell’istogramma-guidato.

Guardando l’istogramma del livello di grigio, mostrato in figura, di un’immagine rappresentante principalmente due materiali come l’osso spugnoso e il midollo, questo può essere rappresentato da una curva bimodale. La soglia potrebbe allora essere scelta al centro dei due picchi, con tutti i livelli di grigio disposti al di sotto del valore di soglia appropriato per l’osso (nero) e quelli disposti al di sopra del valore di soglia appropriato per il non-osso (bianco). Tuttavia, nei casi in cui l’indurimento del fascio potrebbe influenzare severamente l’attenuazione del segnale verso il centro dell’immagine, questa procedura della soglia potrebbe diventare impraticabile.

I metodi di soglia locale sono stati proposti e sono quelli basati sui gradienti dei valori di grigio incontrati all’interfaccia osso-midollo. Esempi di questi metodi possono essere trovati in alcuni lavori in letteratura.

Questi metodi cercano principalmente di superare i problemi che possono sorgere nella segmentazione delle immagini che hanno una risoluzione limitata oppure un basso rapporto segnale-rumore, come ad esempio nel caso di immagini *in-vivo* (16-19).

#### 4.1.6. Elaborazione e analisi dati tramite software di supporto

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

Per comprendere i dati che vengono forniti da questo programma bisogna specificare che, dati tre assi ortogonali  $x$ ,  $y$ ,  $z$  con l’ultimo decentrato rispetto l’asse del campione, le immagini delle proiezioni, vengono acquisite orientativamente sul piano  $xz$  mentre le *slice*, fornite come immagini bitmap della grandezza di 1024 x 1024 pixel, sono poste sul piano  $xy$ .

Con CTan è possibile misurare distanze, angoli ed effettuare “tagli” sulle immagini acquisite per visualizzare dettagli appartenenti non solo a piani trasversali, ma a sezioni longitudinali. Grazie a quest’ultima opzione è stato possibile avere un quadro completo della struttura microscopica dei campioni. I parametri calcolati, che il programma è in grado di fornirci vengono qui di seguito elencati.

Caratteristiche 2D medie del VOI (Volume Of Interest) selezionato e caratteristiche 2D per ogni *slice*. Effettuando l’analisi bidimensionale dei campioni, CTan ci fornisce i valori medi dei parametri istomorfometrici dedotti dal valore che questi assumono per ogni sezione nella ROI (*Region Of Interest*) selezionata.

Oggetti rilevati in una *slice* scelta come esempio, con relative caratteristiche. Per ogni *slice*, è possibile rilevare gli oggetti che ne sono presenti e notevoli caratteristiche, individuali o come valori medi, che ci permettono di ricostruire la sezione in questione. È da specificare che per oggetto si intende una struttura ossea definita.

Caratteristiche 3D. Ci vengono forniti i valori medi di alcuni parametri, calcolati considerando tutto il VOI scelto.

Livelli di grigio del VOI selezionato. Il programma ci permette di selezionare il range dei livelli di grigio più opportuno e, per ognuno, ci fornisce la percentuale di annerimento alla quale corrisponde, l’area in mm<sup>2</sup> in cui questa tonalità è presente, la percentuale di questa area rispetto al totale, la presenza del relativo livello di grigio in percentuale. È possibile ottenere queste informazioni per una data *slice*, per un intervallo di *slice* o per l’intero campione, selezionando o meno la regione di interesse.

Il programma 3D\_creator fornisce una struttura tridimensionale a partire dai dati bidimensionali, ricostruendo un oggetto 3D realistico a partire dall'insieme delle sezioni trasversali acquisite sotto forma di immagini bitmap e che hanno tutte lo stesso orientamento all'interno dello spazio tridimensionale, ortogonale all'asse di rotazione. I programmi per la visualizzazione tridimensionale sono in realtà due: il primo è ANT.EXE, il principale, che comprende tutte le funzioni necessarie per la generazione e trasformazione del modello 3D (attraverso il movimento, la rotazione, le registrazioni di illuminazione, il re-taglio e molte altre funzioni opzionali); l'altro programma è TCONV.EXE per la riduzione del formato del gruppo di dati acquisiti.

È poi possibile visualizzare il campione acquisito attraverso il programma Tview, il quale fornisce una ricostruzione dell'oggetto tridimensionale attraverso una visualizzazione sequenziale delle sezioni memorizzate di cui esso è costituito; si seleziona una sola immagine bitmap appartenente ad una specifica cartella nella quale sono salvate le immagine relative ad un campione e la visualizzazione si avvia in automatico

Questi passaggi possono essere eseguiti in modo analogo per tutti i campioni.

## 4.2. Risultati

### 4.2.1. Immagini acquisite

Per ciascun campione (Figure 5-8) sono state prodotte, tramite microtomografia 3D, centinaia di *slice*. Se ne riportano solo quattro per ognuno (a-d), ciascuna corrispondente alla sezione indicata nell'immagine proiezione posta a sinistra, al livello indicato dalla linea.

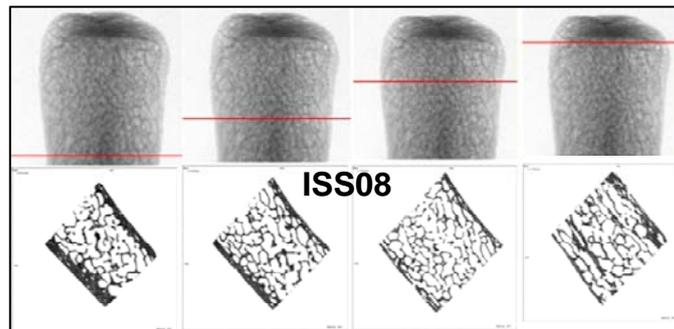


Figura 5. Sezioni particolari (*slice*) del campione omologo

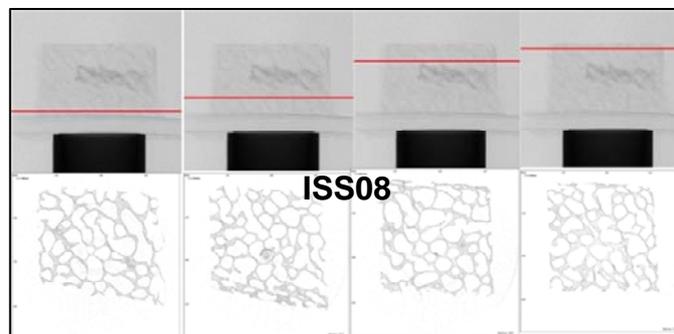


Figura 6. Sezioni particolari (*slice*) del campione eterologo

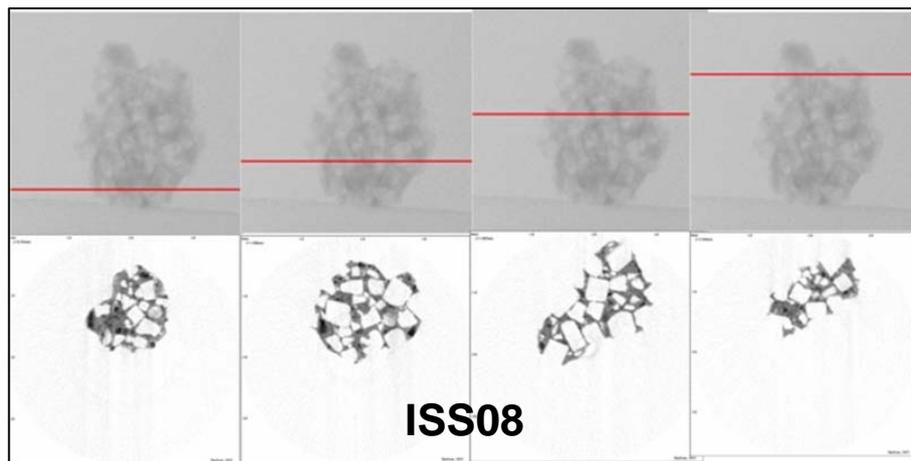


Figura 7. Sezioni particolari (*slice*) del campione calcio fosfato

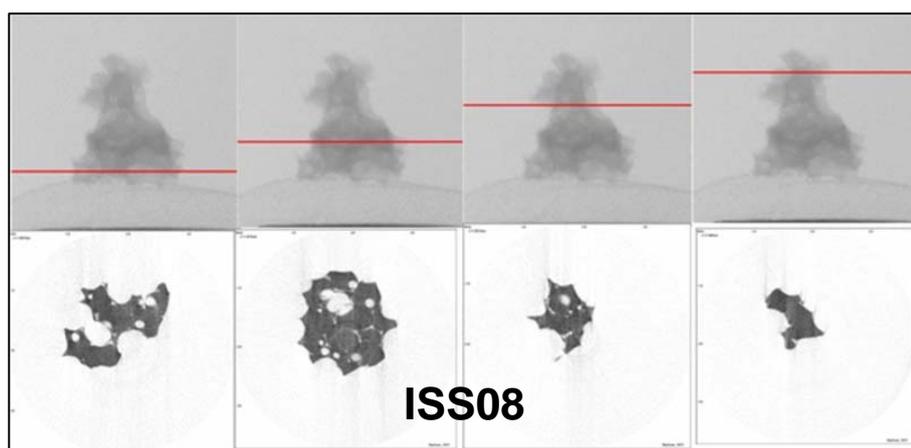
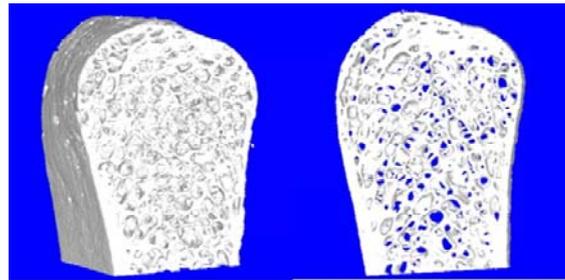


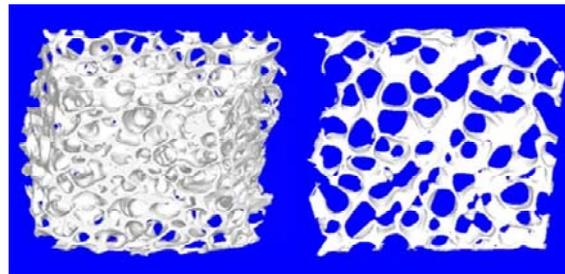
Figura 8. Sezioni particolari (*slice*) del campione trifosfato di calcio

#### 4.2.2. Ricostruzioni tridimensionali

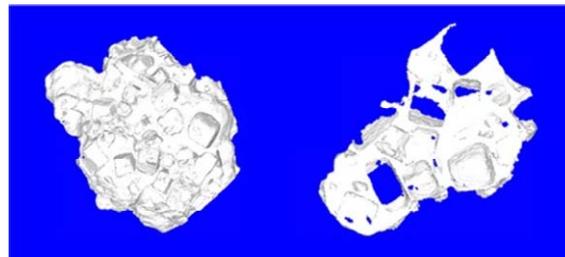
Riportiamo alcune ricostruzioni 3D ottenute tramite il software 3D\_creator. A sinistra è rappresentata la ricostruzione dell'intero campione, a destra è stata isolata una sezione (Figura 9).



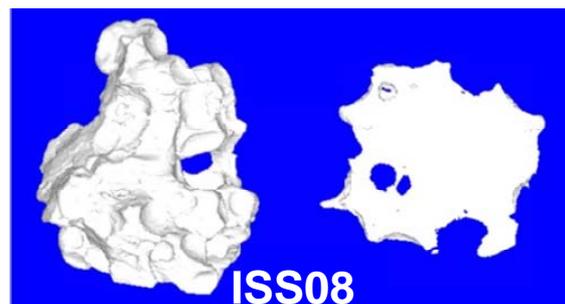
**osso omologo**



**osso eterologo**



**fosfato di calcio**

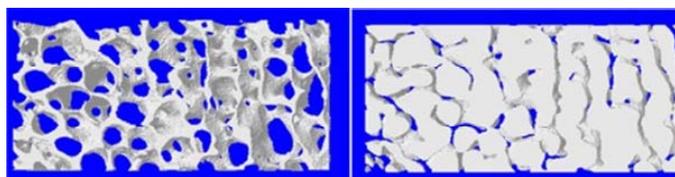


**fosfato tricalcico**

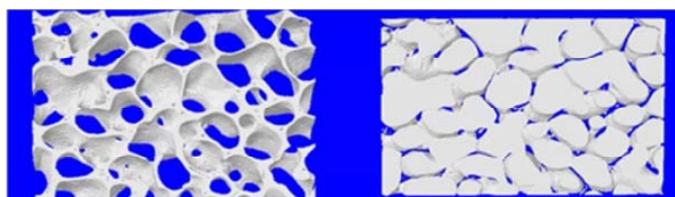
**Figura 9.** Ricostruzioni tridimensionali dei campioni di Figura 1 a sx e *slices* longitudinali per ogni campione a dx

Mostriamo la selezione di un'area di interesse per ciascun campione, prima sul piano frontale e poi su quello verticale, indicando con i numeri 1,2,3,4 rispettivamente il campione omologo, il campione eterologo, il fosfato di calcio e il fosfato tricalcico.

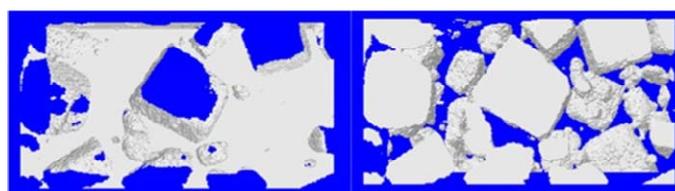
Per ciascuna area di interesse selezionata si riportano a sinistra le ricostruzioni della struttura 3D e a destra sono le ricostruzioni ottenute “riempiendo” le lacune e le interconnessioni (Figura 10).



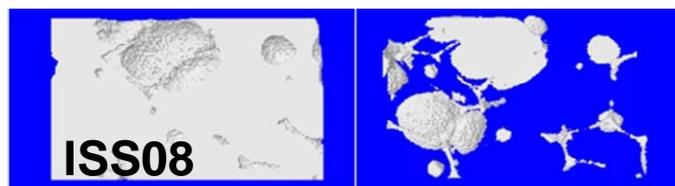
**osso omologo**



**osso eterologo**



**fosfato di calcio**



**fosfato tricalcico**

**Figura 10. Ricostruzioni tridimensionali di sezioni dei campioni di Figura 1 a sx e ricostruzione delle stesse in negativo a dx per la visualizzazione della interconnessione**

#### **4.2.3. Caratterizzazione morfometrica**

Il software CTAn Skyscan ha fornito i risultati mostrati in Tabella 1, per i parametri istomorfometrici che sono stati ritenuti importanti per la caratterizzazione dei campioni esaminati; ricordiamo che BV/TV rappresenta il volume percentuale, BS/BV la superficie specifica esaminata, Tb.Th lo spessore delle trabecole ossee e Tb.Sp la distanza tra le trabecole.

Questi valori non sono ottenuti per una comparazione tra i diversi campioni, ma solo per una loro migliore conoscenza strutturale in modo da poter dare indicazioni valide per un loro più adeguato utilizzo.

**Tabella 1. Parametri istomorfometrici ottenuti dai campioni esaminati con il sistema Skyscan**

Parametri	Campioni			
	Omologo	Eterologo	Calciofosfato	Tricalciofosfato
Porosità (%)	75,5	75,0	55,2	15,0
BV/TV (%)	24,5	25,0	44,8	85,0
BS/BV (mm)	22,5	38,4	55,0	17,6
Tb.Th. ( $\mu\text{m}$ )	88,9	52,1	36,4	113,3
Tb.Sp. ( $\text{mm}^{-1}$ )	27,4	15,6	4,5	1,9

## 5. DISCUSSIONE

La struttura di un biomateriale da innesto può essere descritta mediante parametri morfometrici (14): porosità, spessore delle trabecole, rapporto superficie di contatto-volume, distanza media tra i margini delle trabecole che corrisponde alla diametro medio dei pori. Queste e altre caratteristiche determinano il successo dell'innesto, L'architettura e la porosità dei diversi biomaterialii condizionano la rigenerazione del tessuto osseo dell'ospite. La necessità di un'elevata porosità risiede nel fatto che, la possibilità di invasione dell'innesto da parte di cellule progenitrici, è direttamente collegata alla presenza di pori all'interno del materiale innestato. Maggiore è il contenuto percentuale di pori, maggiore sarà la migrazione di cellule mesenchimali e osteoblasti nel sito ricevente. Inoltre un'elevata porosità e un elevato rapporto superficie di contatto-volume (ovvero tanti pori e piccoli), favoriscono l'adesione cellulare. Nello stesso tempo pori di grandi dimensioni e la presenza di interconnessioni tra gli stessi, favoriscono l'osteogenesi permettendo un'adeguata vascolarizzazione e un adeguato trofismo dell'innesto (11).

Esiste una dimensione minima dei pori raccomandata da Hulbert ed al di circa 100  $\mu\text{m}$  e studi successivi hanno dimostrato che, per migliorare l'osteogenesi, sono necessari pori aventi dimensioni maggiori di 300  $\mu\text{m}$ . Pori relativamente grandi però compromettono la resistenza meccanica. Fondamentale è infatti la funzione di sostegno dell'innesto, che nelle fasi iniziali del processo di integrazione, sostituisce il segmento osseo mancante e deve essere in grado di reggere carichi limitati. Determinanti dal punto di vista delle caratteristiche meccaniche dell'innesto sono anche le dimensioni e lo spessore delle trabecole.

È necessario stabilire un compromesso tra tutti questi aspetti, senza dubbio fondamentali, per un'ottimale prestazione dell'innesto nel sito ricevente. Importante da questo punto di vista risulta la caratterizzazione degli stessi, in maniera dettagliata dal punto di vista qualitativo e quantitativo (21, 3).

Dalle immagini riportate si nota che tutti i campioni studiati presentano una struttura porosa, pur mostrando una morfologia differente l'uno dall'altro.

I parametri ottenuti mostrano una maggiore porosità dei campioni omologo ed eterologo, per i quali le ricostruzioni 3D hanno evidenziato la presenza di numerose interconnessioni tra i pori, invece è evidente una bassa porosità del campione di fosfato tricalcico, del quale studi clinici hanno anche dimostrato le prestazioni carenti, nonostante esso rispetti le diverse condizioni di impiantabilità. Tutti i campioni inoltre rispettano la dimensione minima dei pori raccomandata, significativo è il basso valore del Tb.Sp relativo al fosfato tricalcico. Il campione di fosfato di calcio mostra un elevato valore del rapporto superficie di contatto-volume, mentre per quanto riguarda lo spessore trabecolare il valore rilevante è rappresentato dal campione omologo, mentre l'elevato valore del Tb.Sp del fosfato tricalcico è da correlarsi alla scarsa porosità del campione e quindi alla sua particolare struttura.

## CONCLUSIONI

Dalle immagini ottenute è stato possibile apprezzare la diversa struttura morfologica che mostra quattro diverse tipologie dimensionali di struttura e di porosità dei campioni analizzati.

Questo lavoro è un ulteriore contributo alla messa a punto della metodica microtomografica per la caratterizzazione microstrutturale di campioni di origine biologica e di origine sintetica che possono essere utilizzati come sostituti o innesti ossei. L'utilizzo della strumentazione SkyScan 1072 permette osservazioni strutturali dei biomateriali da innesto senza alcun trattamento, alterazione o danneggiamento dei campioni; per ciascuna *slice* è stato possibile fare degli ulteriori ingrandimenti senza perdere in qualità dell'immagine e da queste è stato possibile osservare una struttura interna priva di residui organici osservabili e rilevabili nel range della risoluzione del sistema microtomografico, e con una dimensione dei pori che risulta adeguata al rispetto delle condizioni di impiantabilità. Inoltre, tramite il software di ricostruzione dedicato, è stato possibile ottenere i campioni in formato tridimensionale e analizzare la microstruttura all'interno degli stessi tramite selezione di piani in tutte le direzioni e a tutti i livelli da caratterizzare.

Grazie alle immagini acquisite si può concludere che i campioni esaminati possono essere indagati in maniera più approfondita a livello microstrutturale per valutare se rispettino i criteri di progetto e le condizioni di impiantabilità, rispetto alle metodiche tradizionali.

Per il futuro si auspica l'utilizzo di questa metodica, non solo per il controllo a livello di produzione degli innesti ossei ma anche per l'acquisizione e le relative ricostruzioni dei campioni dopo un test o un impianto in un modello animale, poiché tale tecnica non altera in nessun modo l'oggetto indagato al contrario delle normali metodiche tradizionali utilizzate, che risultano tutte di tipo distruttivo nei confronti del campione da studiare.

Tale tipo di ricerca, condotta in modo sistematico e su un esteso numero di campioni di tipologie diverse di sostituti od innesti ossei, si propone di fornire un contributo ad una migliore caratterizzazione microstrutturale di tali oggetti e principalmente al loro più adeguato utilizzo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Gartner LP. *Atlante di Istologia*. Napoli: Edizione Edises; 2007
2. Armato U. *Compendio di Istologia*. Pordenone: Edizione Piccin; 2002
3. Cowin SC. *Bone Mechanics Handbook , 2nd Edition*. Boca Raton, FL: CRC Press LLC; 2001.
4. Canesi B, Ciocci A, Modena V, Cimmino MA, Marcolongo R. La reumatologia italiana per la Bone and Joint Decade 2000-2010: consuntivo dei primi due anni e prospettive future. Italian rheumatology for the Bone and Joint Decade 2000-2010; balance of the first two years and future prospects. *Reumatismo*, 2002;54(3):214-6.
5. Donati L, Vaienti L, Donati V, Donati T. *Ingegneria Tessutale: Dalle Prospettive Sperimentali alle Realtà Cliniche*. Bologna: Monduzzi Editore; 2003.
6. Mow VC, Huiskes R. *Basic Orthopaedic Biomechanics & Mechano-biology*. Philadelphia USA: Lippincott Williams & Wilkins; 1987.
7. Shalak R, Fox CF Preface. In: Shalak R, Fox CF. *Tissue Engineering*. New York. Alan R Liss Inc; 1988. pp. 26-29.
8. Van Cleynenbreugel T, Van Oosterwyck H, Vander Sloten Schrooten J. Trabecular bone scaffolding using a biomimetic approach. *J Mater Sci Mater Med*. 2002;13(12):1245-9.
9. Williams D. F. *Definitions in biomaterials*. Amsterdam: Elsevier Ed.; 1987.
10. Cima LG, Vacanti JP, Vacanti C, Ingber D, Mooney D, Langer R. Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *J Biomech Eng* 1991;113(2):143-51.
11. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26(27):5474-91. Review.
12. Hench LL, Wilson J. Surface-active biomaterials. *Science* 1984;226(4675):630-6.
13. Dal Pozzo G. *Compendio di tomografia computerizzata e TC spirale*. Torino: UTET; 1999.
14. Jones AC, Sakellariou A, Limaye A, Arns CH, Senden TJ, Sawkins T, Knackstedt MA, Rohner D, Hutmacher DW, Brandwood A, Milthorpe BK. Investigation of microstructural features in regenerating bone using microcomputed tomography. *J Mater Sci Mater Med*. 2004;15(4):529-32.
15. Jones JR, Poologasundarampillai G, Atwood RC, Bernard D, Lee PD. Non-destructive quantitative 3D analysis for the optimisation of tissue scaffolds. *Biomaterials*. 2007;28(7):1404-13.
16. Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. Practical cone-beam algorithm. *J Optic Soc Am A* 1984;1(6): 612-9.
17. Dufresne T. Segmentation techniques for analysis of bone by three-dimensional computed tomographic imaging. *Technol Health Care*. 1998;6(5-6):351-9.
18. Kuhn JL, Goldstein SA, Feldkamp LA, Goulet RW, Jesion G. Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. *J Orthop Res*. 1990;8(6):833-42
19. Waarsing JH, Day JS, Weinans H. An improved segmentation method for in vivo microCT imaging. *J Bone Miner Res*. 2004;19(10):1640-50.
20. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987;2(6):595-610.
21. Lin-Gibson S, Cooper JA, Landis FA, Cicerone MT. Systematic investigation of porogen size and content on scaffold morphometric parameters and properties. *Biomacromolecules*. 2007;8(5):1511-8.

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

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

*Roma, aprile-giugno 2009 (n. 2) 2° Suppl.*