



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie

TESI DI LAUREA

Valutazione della densità minerale ossea a partire da immagini radiografiche convenzionali e digitali mediante l'uso del software open source ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA)

Relatore: Dr. Alessandro Zotti

Correlatore: Dr. Calogero Vaccaro

Laureando: Carlo Anselmi

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

A Davide e Leonardo

Indice Generale

Introduzione.....	I
1 Presentazione.....	1
1.1 Densitometria ossea (DXA)	1
1.2 Generalità su ImageJ.....	3
2 Obiettivi e possibili applicazioni.....	5
2.1 Richiami di istologia e fisiologia del tessuto osseo	5
2.2 Cause di demineralizzazione ed ipermineralizzazione del tessuto osseo.....	12
2.3 Impiego sperimentale della DXA nella medicina veterinaria	15
2.4 Obiettivo del lavoro.....	18
3 Apparecchiature e materiali utilizzati	20
3.1 Radiologia tradizionale	21
3.2 Radiologia digitale.....	23
3.3 Preparazione dei campioni	28
4 Descrizione della metodica	30
4.1 Esame al densitometro a raggi X.....	30
4.2 Digitalizzazione delle pellicole radiografiche	32
4.3 Acquisizione delle immagini radiografiche digitali.....	34
4.4 Elaborazione e calibrazione delle immagini	35
4.5 Selezione della ROI (Region of Interest) e misurazione del MGV (Mean Gray Value).....	37
4.6 Conversione del MGV (Mean Gray Value) in OD (Optical Density)	42
5 Statistiche e correlazione.....	46
5.1 Valutazione della precisione del metodo	46
5.2 Valutazione della accuratezza del metodo	53
6 Conclusioni.....	57
7 Bibliografia.....	59
8 Webgrafia	65

Introduzione

La presente tesi costituisce un approccio sperimentale ad una metodica di studio di immagini radiografiche convenzionali e digitali che prevede l'utilizzo di un software open source denominato ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

Nel campo della medicina umana per lo studio della densità minerale del tessuto osseo è stata messa a punto una metodologia precisa e così specifica per tale fine da mettere in secondo piano le altre tecniche di imaging radiologico. Il gold standard allo stato attuale, per questo tipo di indagine, risulta essere l'apparato densitometrico a raggi X. Altre metodiche di studio radiologico, come la radiologia tradizionale e digitale, offrono immagini precise, se eseguite con i dovuti parametri, ma non permettono un'analisi specifica della densità minerale ossea, in quanto non sono visibili, direttamente dal radiogramma, perdite di tessuto minerale inferiori al 30-40% (Jergas *et al.*, 1994; Pellegrini, 1998). Questo limite è dovuto all'incapacità dell'occhio umano di cogliere differenze esigue di tonalità di grigio. I cambiamenti che avvengono, ad esempio, in stati iniziali di patologie che interessano il distretto osseo non provocano delle modifiche nella tonalità tali da poter essere riconosciute dall'occhio umano, che può teoricamente riconoscere solamente da 40 a 100 tonalità di grigio a seconda delle condizioni ambientali (Prokop e Galanski, 2008). Inoltre il potere di risoluzione dello stesso è non inferiore ai due decimi di millimetro (Ambu, 2003).

La radiologia tradizionale e quella digitale inoltre non permettono, a differenza della densitometria ossea, una quantificazione della sostanza minerale ossea presente nella sezione in analisi.

Per questi motivi in medicina umana ha visto enorme diffusione l'utilizzo dell'apparato densitometrico, che offre un'accuratezza e una precisione molto elevate, come trattato in seguito. Infatti l'apparato densitometrico a raggi X fornisce valori numerici sulla densità minerale ossea e questi sono indicati come Bone Mineral Density (BMD), ovvero come il rapporto tra la sostanza minerale del tessuto analizzato in grammi e l'area in centimetri quadrati del tessuto stesso (Zotti *et al.*, 2001).

L'apparato densitometrico permette quindi una valutazione quantitativa della sostanza minerale ossea. È inoltre uno studio diretto che può essere condotto in vivo su distretti anatomici precisi, senza la necessità di trasformare o trattare i campioni in alcun modo. L'alternativa, ovviamente improponibile in vivo, è l'incenerimento dell'osso e la successiva analisi della sostanza minerale residua.

Per tali pregi la densitometria a raggi X è divenuta di così grande importanza in medicina umana con la sua conseguente enorme diffusione, ad esempio, nella diagnosi dell'osteoporosi post-menopausale della donna.

In medicina veterinaria, purtroppo, tale apparato non ha visto la medesima diffusione e il clinico è sempre stato obbligato, nello studio del tessuto osseo, a fare riferimento quasi esclusivamente alla pura radiologia, sia essa tradizionale o digitale.

Con la presente tesi si è cercato di trovare una soluzione per colmare il gap esistente fra radiologia, indipendentemente se trazionale o digitale, e densitometria ossea. Per tale fine si è voluto comprovare accuratezza e precisione di un software nello studio informatizzato di pellicole radiografiche convenzionali digitalizzate e di immagini radiografiche digitali.

Tale software è preposto allo studio di svariati formati di immagini digitali, per ottenere da queste molteplici informazioni. Nel nostro caso si è cercato di applicare il software per valutare la scala di grigi delle immagini, in modo da avere un dato da mettere in relazione alla densità minerale ossea misurata con un densitometro. Il parametro misurabile con il software ImageJ e che può essere utilizzato allo scopo è definito MGV, cioè Mean Gray Value.

Per valutare la precisione è stata ripetuta diverse volte la misurazione del MGV su una stessa porzione di immagine radiografica. Invece per valutare l'accuratezza del metodo sono stati messi a confronto i valori di BMD, misurati con un densitometro a raggi X su un certo numero di campioni omogenei, e i valori di MGV misurati in modo indiretto a partire dalle immagini radiografiche dei corrispondenti campioni con il software ImageJ. Il fine ultimo, in questo caso, è stato quello di stabilire una correlazione tra i valori di BMD e di MGV.

Un altro parametro che è stato utilizzato, sempre allo scopo di metterlo in relazione al BMD, è la OD (Optical Density). Tale parametro valuta la densità ottica dell'immagine

ed è misurabile solo dopo un'opportuna calibrazione di ImageJ.

Si è cercato, in definitiva, di offrire al clinico veterinario uno strumento di semplice utilizzo in grado di fornire dati comparabili a quelli che offrirebbe uno studio densitometrico, senza dover ricorrere all'uso di costosi e complessi apparati di cui, in campo veterinario, difficilmente si dispone.

1 Presentazione

1.1 Densitometria ossea (DXA)

La densitometria ossea con tecnica di assorbimento a raggi X è una metodica diagnostica detta anche mineralometria ossea computerizzata (MOC).

La MOC digitale a raggi X, o DXA dall'inglese Dual energy X-Ray Absorptiometry, è il procedimento attualmente più utilizzato per determinare la sostanza minerale del tessuto osseo, misurando attraverso un'elaborazione al computer la diversa intensità con cui vengono arrestati i fotoni (particelle costituenti la luce) emessi da un tubo radiogeno. È infatti possibile calcolare la densità della componente minerale dell'osso conoscendo il coefficiente di attenuazione dell'osso e dei tessuti molli e l'intensità del fascio di raggi X attenuato e non attenuato.

Più precisamente (Zotti *et al.*, 2001), la densitometria ossea propriamente detta si fonda su tecniche assorbimetriche, ovvero sulla misurazione dell'assorbimento da parte dell'osso di un quantitativo di radiazioni dipendente dalla densità minerale.

L'elaborazione matematica computerizzata della differenza tra l'energia iniziale delle radiazioni prodotte dal generatore e quella successiva all'attraversamento del segmento osseo in esame, consente la quantificazione sia del contenuto minerale osseo (BMC, Bone Mineral Content), espresso in grammi, sia della densità ossea (BMD, Bone Mineral Density) espressa in g/cm^2 .

Lo strumento per eseguire tale studio è il densitometro a raggi X, dotato di un apposito software per l'elaborazione dei dati acquisiti (figura 1).

La DXA si è dimostrata in grado di eseguire misurazioni della massa ossea della colonna vertebrale lombare, del femore e dell'intero scheletro con un'elevata precisione (capacità dello strumento di fornire lo stesso risultato in misurazioni ripetute) e accuratezza (corrispondenza tra la stima acquisita ed il valore vero del dato) in vivo.

L'errore di precisione in vivo è per le indagini sulla colonna vertebrale inferiore all'1% e l'errore di accuratezza è intorno al 2-4%. Inoltre la DXA permette una risoluzione di immagine fino a 0,76 mm x 1 mm che consente di ottenere immagini più dettagliate e di

qualità simile a quella prodotta da apparecchi radiografici, ma soprattutto offre una maggiore affidabilità rispetto alle tecniche precedenti. La velocità di esecuzione è molto elevata e l'esposizione è trascurabile (inferiore a 3 mRem). Questo rende l'esame particolarmente indicato ad un esteso impiego clinico, soprattutto per studi di follow-up (Zotti *et al.*, 2001).

È però indispensabile la completa immobilità del paziente, in quanto qualsiasi movimento renderebbe l'esame inutile. Di conseguenza, in campo veterinario, non si può prescindere dal sottoporre l'animale a sedazione o anestesia, anche per evitare agli operatori l'esposizione ai raggi X, cui sarebbero sottoposti nel tentativo di tenere nella posizione adeguata l'animale per tutta la durata dell'esame.

L'applicazione più comune della DXA in medicina umana è la diagnosi dell'osteoporosi post-menopausale, ma non è difficile ipotizzare una sua applicazione anche in medicina veterinaria per lo studio di qualsiasi forma degenerativa del tessuto osseo, così come nei processi infiammatori o nei processi riparativi a seguito di traumi o di interventi chirurgici. La possibilità di avere a disposizione dati obiettivi sulla densità minerale ossea è un supporto molto utile per ogni clinico veterinario in sede diagnostica e decisionale, tanto più se tali dati possono essere ottenuti, con ragionevole approssimazione, utilizzando mezzi alla portata di qualunque ambulatorio veterinario.



Figura 1 – Densitometro a raggi X Hologic QDR1000

1.2 Generalità su ImageJ

ImageJ è un software open source molto flessibile realizzato in Java (figura 2).

Java è un linguaggio di programmazione orientato agli oggetti, derivato dallo Smalltalk (anche se ha una sintassi simile al C++) e creato da James Gosling e altri ingegneri di Sun Microsystems (<<http://www.sun.com/java/>>).

L'autore di ImageJ, Wayne Rasband, è un ricercatore del "National Institute of Mental Health" che ha sede a Bethesda nel Maryland (USA) (<<http://rsbweb.nih.gov/ij/>>).

Il suo software è di pubblico dominio e i suoi utilizzatori godono delle quattro libertà definite da Richard Stallman nel 1986, vale a dire:

- eseguire il programma per qualsiasi scopo;
- studiare il funzionamento del programma e modificarlo, se ciò risulta utile allo scopo;
- distribuire copie del programma e aiutare i nuovi utilizzatori ad usarlo;
- rendere pubbliche le migliorie o le nuove funzionalità aggiunte in modo che tutta la comunità possa beneficiarne.

ImageJ è in grado di elaborare ed analizzare molteplici formati di immagine digitale, tra i quali il DICOM (Digital Imaging and Communication in Medicine), che è attualmente riconosciuto come il formato più diffuso per le immagini medicali.

Il fatto che ImageJ sia stato progettato con un'architettura aperta permette l'aggiunta di nuove funzionalità semplicemente tramite i plugins Java, che possono essere creati, modificati e visualizzati all'interno dell'editor integrato (<<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/intro.html>>).

Tuttavia, già nella sua configurazione base, ImageJ consente di fare una serie di misurazioni su immagini o parti di immagini selezionate dall'utilizzatore, le comunemente dette *region of interest* (ROI).

Il valore, tra i tanti misurabili, che è stato preso in considerazione per verificarne la correlazione con il Bone Mineral Density, è il Mean Gray Value (MGV) dell'immagine in una ROI preselezionata.

Il MGV è il valore medio di grigio in una scala 0-255, per immagini a 8 bit, misurato sulla totalità dei pixel contenuti all'interno della ROI (<<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/menus/analyze.html#set>>).

Le misurazioni con ImageJ possono essere calibrate su grandezze note o su scale di valori predefinite. Per questo motivo, nell'effettuare nuovamente le misurazioni sulle medesime immagini, si è calibrato opportunamente il sistema in modo da poter esprimere i valori ottenuti in termini di densità ottica, ovvero Optical Density, OD (<<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/index.html>>).

La OD è un'unità di misura riconosciuta a livello internazionale e di cui si tratterà nel paragrafo 4.6. Si è così verificata anche la correlazione fra i valori di BMD e di OD.

ImageJ viene costantemente aggiornato da uno staff di sviluppatori che lo utilizzano per scopi anche molto diversi tra loro, ma sempre riconducibili all'imaging digitale.

home | news | docs | download | plugins | macros/dev | list | links

ImageJ

Image Processing and Analysis in Java

- [Features](#)
- [News](#)
- [Documentation](#)
- [Download](#)
- [Plugins](#)
- [Developer Resources](#)
- [Applets/Web Start](#)
- [Mailing List](#)
- [Links](#)
- [ImageJ Conference \(Oct. 27-29\) **New**](#)

This page has been visited **6,640,986** times. Send comments to wsr@nih.gov. [Disclaimer](#)

Figura 2 – homepage del sito internet di ImageJ

2 Obiettivi e possibili applicazioni

2.1 Richiami di istologia e fisiologia del tessuto osseo

Il tessuto osseo è una particolare varietà di connettivo, costituito da cellule e da una sostanza intercellulare (la matrice) fortemente mineralizzata. Tale tessuto nell'organismo forma strutture ben definite, le ossa.

Esternamente l'osso è rivestito da un connettivo fibroso a fasci intrecciati, il periostio, ad eccezione delle superfici articolari che, invece, sono ricoperte da cartilagine.

Sul piano morfologico si distinguono, a seconda che la matrice intercellulare sia disposta o meno a costituire lamelle, il tessuto osseo non lamellare e quello lamellare, quest'ultimo più diffuso nella vita post-natale dei mammiferi. Le lamelle, che hanno uno spessore di 4.5-11 μm , si dispongono a formare sistemi particolari, ovvero il tessuto osseo compatto, oppure a costituire trabecole che si intrecciano e si anastomizzano, ossia il tessuto osseo spugnoso. Il tessuto osseo compatto si trova nella diafisi delle ossa e presenta una struttura caratteristica composta da canali che lo attraversano in senso parallelo all'asse maggiore, definiti canali di Havers, e in senso obliquo, canali di Volkmann.

Il tessuto osseo compatto presenta una tipica formazione definita osteone, al cui interno passa un canale di Havers. L'osteone è un sistema concentrico di lamelle e le fibre collagene che lo costituiscono possiedono un andamento ad elica. Le lamelle interstiziali occupano lo spazio tra gli osteoni. Nelle diafisi il tessuto osseo compatto forma una cavità, definita cavità midollare, in cui è presente il midollo osseo e tale cavità è ricoperta dall'endostio, che è un connettivo fibroso.

Il tessuto osseo spugnoso è formato da strati di lamelle associate in trabecole variamente anastomizzate che delimitano le cavità midollari, ovvero spazi intercomunicanti occupati da vasi, nervi e midollo osseo (Rosati e Colombo, 2003).

Lo scheletro dei vertebrati è formato da ossa di varie forme e dimensioni costituite dal tessuto osseo, principale tessuto connettivale di sostegno dell'organismo. Si è tentati di considerare il tessuto osseo, a causa della sua durata e della resistenza all'usura, come un "tessuto morto", relativamente inerte dopo la sua formazione. Al contrario il tessuto

osseo, modificando la propria struttura in risposta a sollecitazioni interne ed esterne, è un tessuto dinamico durante tutta la vita dell'animale. Il tessuto osseo differisce dagli altri tessuti connettivali per l'alto contenuto di minerali che gli conferiscono robustezza e rigidità.

Le tre principali funzioni svolte dalle ossa e dal tessuto osseo sono: 1) aiutare a mantenere un ambiente ionico costante nell'organismo, grazie ad una regolazione omeostatica; 2) sostenere e proteggere tessuti e organi delicati, compreso il midollo osseo e il cervello; 3) costituire, insieme a muscoli e tendini, un mezzo di locomozione per il corpo e permettere i movimenti delle varie parti del corpo stesso (Swenson e Reece, 2002).

Le modificazioni dello scheletro, ovvero l'accrescimento e il metabolismo, sono controllati da numerosi fattori che comprendono ormoni sistemici, fattori mitogenici, fattori di crescita sistemici e locali. Queste sostanze influenzano lo sviluppo e il controllo dell'accrescimento dello scheletro, il turnover e il rinnovamento dell'osso per opera dell'attività coordinata degli osteoblasti, osteociti ed osteoclasti.

Nello specifico, per quanto riguarda gli ormoni sistemici, il paratormone (PTH) è secreto dalle ghiandole paratiroidi in risposta a una riduzione della calcemia. L'effetto principale del PTH è la stimolazione al riassorbimento di tessuto osseo da parte degli osteoclasti; in questo modo si forniscono ioni calcio al sistema circolatorio, contribuendo al mantenimento di una normale calcemia. Un altro effetto del PTH è quello di provocare un aumento del numero degli osteoclasti.

L'attivazione degli osteoclasti porta al rapido sviluppo di microvillosità in corrispondenza con la superficie ossea e la comparsa di numerosi vacuoli nel citoplasma. Inoltre aumenta la produzione di sostanze acide e la sintesi e secrezione di enzimi idrolitici: segnali strettamente associati al riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti.

Gli osteoblasti, stimolati dal PTH, cambiano di forma e riducono le proprie dimensioni, esponendo matrice ossea. La sintesi di collagene e di altre matrici proteiche negli osteoblasti è inibita mentre contemporaneamente è stimolata la sintesi di collagenasi e di altri enzimi proteolitici. La collagenasi è secreta come pro-enzima ed è attivata per scissione proteolitica. Una proteasi coinvolta nel processo di conversione è il fattore di attivazione del plasminogeno (PAF) che converte il plasminogeno a plasmina, un'altra

proteasi in grado di convertire la collagenasi inattiva nella sua forma attiva. La produzione di PAF da parte delle cellule ossee è stimolata dal PTH, dall' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e da altri fattori (Swenson e Reece, 2002).

Sebbene fino ad ora sia stato messo in evidenza l'effetto catabolico del PTH, questo ormone ha anche un effetto anabolico sulla neo-formazione di tessuto osseo. L'effetto catabolico del PTH sul riassorbimento osseo si svolge con l'esposizione continua del tessuto osseo a concentrazioni relativamente elevate di PTH. Al contrario l'attività anabolica è associata all'esposizione intermittente delle cellule ossee a basse concentrazioni di questo ormone; in tali condizioni si riscontra un aumento sia del numero che dell'attività degli osteoblasti che formeranno il tessuto osseo. Nell'azione anabolica del PTH sono coinvolti alcuni fattori di crescita, derivati dalle stesse cellule ossee, come le somatomedine (IGF) ed il transforming growth factor-beta ($\text{TGF-}\beta$). Nel rene il PTH inibisce il riassorbimento dei fosfati, aumentando in tal modo l'escrezione urinaria di questo anione (risposta fosfaturica) ed inoltre aumenta il riassorbimento di calcio nei tubuli renali (Swenson e Reece, 2002).

Il PTH, indirettamente, aumenta l'assorbimento intestinale di calcio e fosforo mediante il suo effetto stimolante sulla sintesi dell'ormone vitamina D, come verrà a breve discusso.

La carenza di vitamina D provoca rachitismo negli animali in accrescimento e osteomalacia negli adulti. Entrambe le patologie sono caratterizzate da una ridotta mineralizzazione dello scheletro mentre continua la produzione di osseina, la matrice non calcificata. Sebbene la causa primaria del rachitismo e dell'osteomalacia sia la carenza di vitamina D, anche altri fattori, come la steatorrea nella quale si verifica un malassorbimento di vitamina D nell'intestino, le alterazioni dei tubuli renali o l'uremia cronica determinano condizioni patologiche simili.

Una fonte di vitamina D è rappresentata dalla dieta che può contenere la forma vegetale della vitamina, la vitamina D_2 (ergocalciferolo) o quella animale, la vitamina D_3 (colecalciferolo). Un'altra fonte è rappresentata dalla produzione endogena di vitamina D_3 in seguito all'esposizione della cute alla luce del sole o ad altre fonti di raggi ultravioletti. La vitamina D_2 viene trasformata in $25(\text{OH})\text{D}_2$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ e $24,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ e la vitamina D_3 in $25(\text{OH})\text{D}_3$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La forma vitaminica D_2 ha lo stesso effetto biologico qualitativo della forma

D₃, ma le risposte possono essere diverse quantitativamente. Per brevità, nella seguente trattazione si farà riferimento alla forma vitaminica D₃.

La vitamina D₃ assunta, viene convertita biochimicamente in vari metaboliti, tre dei quali rivestono uno speciale significato biologico. Questi sono il 25-idrossicolecalciferolo (25 (OH)D₃), 1,25-diidrossicolecalciferolo (1,25 (OH)₂D₃) e il 24,25-diidrossicolecalciferolo (24,25 (OH)₂D₃). Il metabolita 25 (OH)D₃, prodotto nel fegato, è la principale forma circolante di questa vitamina che nel sangue è prevalentemente veicolata dalla proteina legante la vitamina D. Il metabolita 25 (OH)D₃ viene anche idrossilato nel rene con formazione del metabolita biologicamente più attivo, l'1,25 (OH)₂D₃, che viene considerato come la forma ormonale della vitamina. La formazione dell'1,25 (OH)₂D₃ è stimolata da un effetto diretto del PTH sulle cellule renali. Pertanto una condizione di ipocalcemia che induca la liberazione di PTH determina anche una sintesi dell'ormone vitamina D₃, 1,25 (OH)₂D₃.

Anche l'altro metabolita diidrossilato, il 24,25 (OH)₂D₃, viene prodotto dalle cellule del rene; la sua produzione è massima in condizioni di normocalcemia e decresce durante i periodi di ipocalcemia quando aumenta la sintesi di 1,25 (OH)₂D₃.

Il principale punto di azione dell'1,25 (OH)₂D₃ è l'intestino, dove stimola l'assorbimento di calcio e fosforo che contribuiscono al mantenimento delle proprie concentrazioni plasmatiche. Si pensa che gli effetti antirachitico ed anti-osteomalacico della vitamina D dipendano principalmente da questo effetto fisiologico che fornisce calcio e fosforo all'organismo per la successiva incorporazione nell'osso durante i processi di mineralizzazione.

Anche il riassorbimento dell'osso è stimolato dall'1,25 (OH)₂D₃ che, in molti casi, agisce in maniera simile al PTH aumentando l'attività e il numero delle cellule che riassorbono il tessuto osseo. La funzione osteolitica dell'1,25 (OH)₂D₃, come quella del PTH, contribuisce ad apportare calcio al sistema circolatorio, fornendo il calcio essenziale per il metabolismo dei tessuti e per la mineralizzazione delle ossa in zone lontane da quelle in cui questo era stato prelevato.

Nelle cellule bersaglio, l'1,25 (OH)₂D₃, agisce, come gli steroidi, inducendo la sintesi proteica mediante trascrizione genica. Le prime proteine che si formano sono proteine intestinali leganti il calcio e dipendenti dalla vitamina D. Si pensa che le proteine leganti il calcio partecipino all'assorbimento di questo ione nell'intestino. In carenza di vitamina

D, l'assorbimento intestinale di calcio è depresso e le proteine leganti sono praticamente assenti, fornendo in parte la prova della loro implicazione nei processi di assorbimento (Swenson e Reece, 2002).

La calcitonina viene prodotta e secreta dalle cellule C (o cellule parafollicolari) della ghiandola tiroide nei mammiferi e dalle ghiandole ultimo branchiali negli uccelli e nei vertebrati inferiori. Lo stimolo primario per la sua secrezione è l'ipercalcemia. Questo ormone, di natura peptidica, ad azione ipocalcemizzante, inibisce il riassorbimento osseo agendo direttamente sugli osteoclasti che sono dotati di recettori per la calcitonina. In queste cellule si verifica una retrazione della membrana cellulare e le microvillusità diventano meno prominenti. Inoltre gli osteoclasti si separano dalla superficie ossea, diventano meno mobili e viene inibita la formazione di enzimi lisosomiali (Swenson e Reece, 2002).

Proseguendo con gli ormoni sistemici, l'ormone somatotropo (GH, Growth Hormone) è un ormone di natura peptidica, secreto dall'adenoipofisi. La carenza di ormone somatotropo provoca nanismo, mentre l'eccesso determina gigantismo negli animali in accrescimento o acromegalia negli adulti. Si pensa che l'aumento dello spessore della cartilagine di accrescimento sia dovuto a una stimolazione della produzione dei condrociti da parte dell'ormone somatotropo. Questo è considerato il principale ormone in grado di influenzare la crescita in lunghezza delle ossa.

È opinione corrente che questo ormone non agisca direttamente sul tessuto bersaglio, ma stimoli la sintesi e la secrezione di fattori di crescita, le somatomedine, da parte del fegato. Le somatomedine sono anche conosciute come fattori di crescita insulino-simili ed indicati (Swenson e Reece, 2002) con la sigla di IGFs: IGF-1 e IGF-2 (Insulin-like Growth Factors).

Un altro ormone sistemico è l'estradiolo. Studi clinici, effettuati su soggetti in post-menopausa affetti da osteoporosi hanno evidenziato gli effetti dell'estradiolo sullo scheletro. Durante il periodo di post-menopausa vi è un incremento del turnover del tessuto osseo; il grado di riassorbimento osseo è superiore a quello di neoformazione, causando una netta perdita di massa ossea. La terapia sostitutiva con estrogeni determina una diminuzione del riassorbimento osseo tanto che appare il metodo più efficace per preservare lo scheletro degli individui osteoporotici (Swenson e Reece, 2002).

Vengono ora indicati altri ormoni sistemici implicati nel metabolismo del tessuto osseo.

Glicocorticoidi. Eccessi di glicocorticoidi sono associati a nette perdite di tessuto osseo e allo sviluppo dell'osteoporosi. È stato ipotizzato che il principale effetto di un eccesso di glicocorticoidi sia una riduzione dell'assorbimento di calcio nell'intestino. Questo comporta come conseguenza un iperparatiroidismo caratterizzato da un aumento del riassorbimento osseo per opera degli osteoclasti e da una minore neoformazione di osso. Inoltre i glicocorticoidi diminuiscono il turnover del tessuto osseo negli stati patologici (Swenson e Reece, 2002).

Ormoni tiroidei. Gli ormoni tiroidei sono necessari per un normale accrescimento e sviluppo agendo primariamente tramite stimolazione e liberazione di somatomedine nel fegato. Le somatomedine stimolano la crescita della cartilagine e dell'osso ed inoltre esercitano un effetto diretto sugli osteoclasti, incrementando così il riassorbimento osseo.

In caso di ipertiroidismo gli effetti sul metabolismo e sulla massa ossea sono riconducibili sia a un disaccoppiamento tra attività osteoblastica ed osteoclastica, che determina una riduzione della durata del ciclo di rimodellamento per una contrazione dell'osteof ormazione, sia al bilancio calcico negativo, che ha come principale meccanismo patogenetico la ridotta secrezione di PTH (Swenson e Reece, 2002).

Insulina. L'insulina secreta dalle cellule beta del pancreas endocrino è un importante stimolatore della sintesi di matrice ossea. Negli animali con diabete indotto sperimentalmente si riscontra una diminuzione della crescita dell'osso e della cartilagine e una minore mineralizzazione dello scheletro. L'effetto dell'insulina è in parte mediato dalle somatomedine in quanto l'insulina influenza direttamente la loro liberazione nel fegato. L'insulina inoltre stimola la formazione di $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$ da parte dei tubuli renali, per cui l'effetto mineralizzante dell'insulina potrebbe essere mediato dalla via dell'ormone vitamina D (Swenson e Reece, 2002).

Sono stati identificati circa una ventina di fattori, in aggiunta ai più classici ormoni sistemici, e sono in via di studio i loro effetti sulla moltiplicazione e sul metabolismo di specifiche popolazioni di cellule ossee (Swenson e Reece, 2002). Alcuni di questi fattori sono:

1. Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF);
2. Fattori di crescita dei fibroblasti (FGF);
3. Transforming growth factor β ($TGF\beta$):
 - $TGF\beta_1$
 - $TGF\beta_2$
4. Fattori osteoinduttivi o proteine morfogenetiche dell'osso (BMP).

2.2 Cause di demineralizzazione ed ipermineralizzazione del tessuto osseo

Le ossa, principali elementi dello scheletro, sono formate da uno speciale tessuto connettivo di sostegno le cui spiccate caratteristiche di resistenza e solidità dipendono dall'orientamento delle fibre e dalla mineralizzazione della sostanza fondamentale amorfa. Per tutta la durata della vita, dopo essersi formato, l'osso si rimodella e si rinnova, sia per realizzare adattamenti morfo-funzionali, sia per assolvere l'importante compito di mantenere l'omeostasi del calcio nel plasma.

La somma di azioni patologiche e reazioni tissutali nell'osso dà luogo a modificazioni patologiche che assumono aspetti sensibilmente diversi a seconda che un agente causale colpisca l'osso in formazione, in accrescimento, in rimodellamento, in rimaneggiamento e quindi a seconda che si tratti di un feto, un animale in sviluppo post-natale, oppure giovane, adulto o vecchio. Tali modificazioni possono portare a un'ipermineralizzazione o a una ipomineralizzazione del tessuto osseo.

La morfopatologia dell'osso è inoltre influenzata dal suo stato di attività funzionale e metabolica in condizioni di mobilità, immobilità, carico ed altre sollecitazioni più o meno protratte (Guarda e Mandelli, 2002).

La tabella 1 mostra le cause di demineralizzazione ossea per le quali viene indicata in medicina umana l'analisi densitometrica.

Medicina umana. L'analisi dxa è indicata nelle demineralizzazioni conseguenti a:
Ipertiroidismo
Iperparatiroidismo
Ipotiroidismo
Ipogonadismo
Sindrome di Cushing
Osteoporosi
Anoressia nervosa
Obesità
Malattia celiaca
Sindromi da malassorbimento
Menopausa
Menopausa chirurgica o iatrogena
Menopausa precoce
Neoplasie maligne sottoposte a chemioterapia
Disturbi del ciclo mestruale
Immobilizzazione protratta
Età avanzata
Utilizzo di farmaci come: cortisonici, antiepilettici, eparina, anticoagulanti orali, diuretici dell'ansa

Tabella 1: cause di demineralizzazione ossea in medicina umana

Alcune delle cause sistemiche di demineralizzazione del tessuto osseo in medicina umana, viste nella Tabella 1, sono state studiate anche in medicina veterinaria. Si possono citare, come esempio di studi, l'iperparatiroidismo (Mader, 2007), l'immobilizzazione protratta (Van Vechten e Vasseur, 1993), l'osteodistrofia fibrosa (Hernandez-Divers, 2006), il trattamento con farmaci quali i glucocorticoidi (Ettinger e Feldman, 2007). Cause di demineralizzazione locale sono invece i tumori ossei, le osteiti e le infiammazioni periostali (Sodikoff, 2001).

Meno numerose sono le cause di ipermineralizzazione del tessuto osseo.

Alcune situazioni di ipermineralizzazione del tessuto osseo si possono riscontrare nei casi di osteopetrosi (Lees e Sautter, 1979; Vezzoni e Schramme, 2004; Mader, 2007) e qualora si formino calli ossei (Morgan, 1999; Sumner-Smith, 2002).

Molte delle patologie descritte in umana non sono state ancora studiate in campo veterinario. Tale assenza di studi trova spiegazione nel fatto che per eseguire tali indagini si necessita del densitometro, strumento come detto in precedenza poco diffuso nelle cliniche veterinarie.

2.3 Impiego sperimentale della DXA nella medicina veterinaria

Sebbene la densitometria ossea non abbia visto in campo veterinario quella enorme diffusione che ha visto in medicina umana, in medicina veterinaria gli studi sperimentali eseguiti con questa tecnica sono tutt'altro che esigui.

Vengono di seguito citati alcuni esempi, divisi per ambito clinico.

Impiego nella medicina degli animali da compagnia

Nel cane la densitometria ossea a raggi X è stata utilizzata per lo studio del metabolismo osseo e per il monitoraggio della risposta all'esercizio fisico e di particolari terapie o regimi alimentari in grado di influenzare il turnover osseo (Zotti *et al.*, 2001). La dxa ha trovato applicazioni nello studio (Mazzaferro *et al.*, 2001) effettuato sul tessuto minerale osseo di cani affetti da osteosarcoma, nella valutazione dell'effetto nel cane del cisplatino sull'osteogenesi (Ehrhart *et al.*, 2002) e, ancora come esempio, nello studio (Hewitt *et al.*, 2005) dell'effetto di compressioni pneumatiche intermittenti a livello venoso sulla guarigione di fratture ossee in cani beagle. Tra le più recenti indagini con dxa possiamo citare lo studio (Theyse *et al.*, 2006) che ha evidenziato l'efficacia di marcatori nella valutazione della neo-formazione ossea in cani, comparando i risultati di DXA e quelli di comuni kits immunobiochimici e inoltre lo studio (Gossellin *et al.*, 2007) effettuato per il monitoraggio della composizione corporea (adipe corporeo, tessuto molle, contenuto di tessuto minerale osseo) durante il trattamento di cani obesi con dirlotapide. Nel cane e nel gatto la dxa è stata utilizzata per studiare i tumori ossei correlati all'espressione in tali specie di un recettore specifico (Barger *et al.*, 2007). Nel gatto un recente studio ha analizzato gli effetti di demineralizzazione ossea dovuta a iperparatiroidismo secondario (Dimopoulou *et al.*, 2010).

Impiego nella medicina equina

L'utilizzo della dxa nello studio del cavallo è ancora limitato perchè non si dispone di densitometri a raggi X di dimensioni o orientamento tali da essere adeguati a tale specie. La densità minerale ossea è stata soprattutto valutata a livello di terzo metacarpale (Carstanjen *et al.*, 2003; Donabedian *et al.*, 2005).

Tale distretto anatomico infatti è facilmente accessibile, presenta scarsità di tessuti molli a ricoprirla, ha un ruolo biomeccanico essenziale ed è sede di importanti processi patologici di natura traumatica (Zotti *et al.*, 2001).

Altri studi nel cavallo sono stati rivolti alla valutazione degli effetti del fenilbutazone nell'attività e formazione delle ossa (Rohde *et al.*, 2000), all'analisi di come l'allenamento (Porr *et al.*, 2000) o la restrizione del moto (Nielsen *et al.*, 2000) siano in grado di modificare la densità minerale ossea.

Impiego nella medicina degli animali da laboratorio

La necessità della medicina umana di avvalersi di animali fisiologicamente paragonabili all'uomo per disporre di dati scientifici, ha fatto sì che le analisi con dxa negli animali da laboratorio si siano sviluppate molto velocemente. Non sorprenderà quindi che gli studi in questo settore siano più recenti e in più rapida evoluzione. Come esempio di applicazione della dxa possiamo citare un'analisi della densità minerale ossea effettuata in animali da laboratorio (Tsujiro *et al.*, 2009), uno studio in conigli sull'effetto del paratormone sul contenuto minerale dopo distruzione osteogenetica (Aleksyniene *et al.*, 2009), uno in ratti sull'osteoporosi indotta da iponatriemia (Verbalis *et al.*, 2010) e uno in minipig trattati con glucocorticoidi (Ikeda *et al.*, 2003).

In animali di laboratorio di maggiori dimensioni si è valutata l'accuratezza e la precisione della dxa nel misurare la densità minerale ossea della colonna vertebrale di ovino (Pouilles *et al.*, 2000) e si sono analizzati gli effetti precoci sulla densità minerale ossea dell'alesatura intramidollare di femore di suini (Ellingsen *et al.*, 2009).

Impiego nella medicina dei Cetacei

Aumentando l'interesse scientifico per tale ordine di mammiferi sono aumentati gli studi effettuati e di seguito ne indicheremo alcuni. La densità minerale ossea, valutata con dxa, è stata utilizzata come indicatore dell'età in due specie di delfini: *Stenella coeruleoalba* (Guglielmini *et al.*, 2002) e *Tursiops truncatus* (Butti *et al.*, 2007). La dxa è stata inoltre applicata nell'indagine che ha valutato la densità minerale ossea del rostro di un maschio di *Mesoplodon densirostris* (Zotti *et al.*, 2009).

Impiego nella medicina dei Rettili

I nuovi stimoli di ricerca in campo veterinario provengono dalle specie non convenzionali, "territori" che prevedono ancora ampie possibilità di indagine scientifica. Possiamo citare uno studio con dxa sulle malattie metaboliche dell'osso in *Iguana iguana* (Zotti *et al.*, 2004). Inoltre riportiamo come esempio due studi che hanno utilizzato la dxa in differenti specie di tartarughe: in *Geochelone pardalis* si è considerata l'influenza della dieta sulla densità minerale ossea (Fledelius *et al.*, 2005) e in *Chrysemys picta* l'influenza delle condizioni ambientali, sempre sulla densità minerale ossea (Sternadel *et al.*, 2006). Infine citiamo lo studio che ha visto applicare la dxa nella valutazione della composizione corporea di serpenti *Nerodia rhombifer* (Secor e Nagy, 2003).

2.4 Obiettivo del lavoro

L'obiettivo principale della presente tesi è valutare accuratezza e precisione del software ImageJ in un utilizzo specifico che non è stato ancora standardizzato, ovvero nello studio della densità minerale ossea a partire da immagini radiografiche tradizionali digitalizzate e/o digitali.

Il fine ultimo è quello di ottenere, senza l'utilizzo di un apparato densitometrico, un saggio attendibile della densità minerale ossea analizzando una radiografia. Per raggiungere questo obiettivo è stato necessario studiare la correlazione tra i dati ottenuti da studio densitometrico a raggi X di un campione osseo e quelli ricavati analizzando immagini radiografiche digitali o digitalizzate del medesimo campione, con il software ImageJ. I primi sono espressi in BMD e i secondi in MGV. Inoltre, è stata studiata la correlazione fra BMD e OD, Optical Density, un altro parametro misurabile con ImageJ dopo opportuna calibrazione del sistema, per la cui trattazione si rimanda al paragrafo 4.6.

Il MGV (Mean Gray Value) altro non è che un valore numerico compreso tra 0 e 255, se si opera su immagini a 8 bit, mentre se si opera su immagini a 16 bit sarà compreso tra 0 e 65535 (Neri *et al.*, 2008).

L'idea di mettere in relazione il MGV e il BMD è stata sviluppata in precedenza (Haristoy *et al.*, 2009), anche se le immagini iniziali erano ottenute da tomografi, i cui dati assorbimetrici sono direttamente riferibili alla scala Hounsfield. In altri studi (Mah e McDavid, 2008) si è tentato di convertire il MGV in Unità Hounsfield (HU).

La scala Hounsfield rappresenta lo standard per la calibrazione dei coefficienti di attenuazione ricostruiti in sistemi medicali di tomografia computerizzati.

Tuttora mancano in letteratura studi validi sulla correlazione diretta tra BMD e MGV e soprattutto manca un metodo standard in grado di fornire, a partire da immagini radiografiche, dati numerici obiettivi per esprimere la densità minerale ossea.

È un dato di fatto che una demineralizzazione non è apprezzabile direttamente dal radiogramma se non oltre il 30-40% (Jergas *et al.*, 1994; Pellegrini, 1998), quindi poter apprezzare una mineralizzazione anomala con un metodo rapido e sufficientemente affidabile prima di arrivare a un vero danno del tessuto osseo sarebbe un ottimo risultato.

Inoltre sarebbe di indubbia utilità in campo clinico veterinario la possibilità di controllare a scadenze regolari, al pari di un qualsiasi parametro laboratoristico, la densità minerale ossea. Permetterebbe infatti di seguire l'evoluzione di un eventuale processo patologico a carico del tessuto osseo, mettendo a confronto dei semplici dati numerici, assicurando allo studio radiografico una maggiore obiettività. Il medico veterinario in sede decisionale potrebbe avere l'ausilio di tali dati obiettivi, semplicemente affiancando ai routinari studi radiografici di follow-up uno studio tramite ImageJ.

L'esame è rapido e dal punto di vista economico non comporta alcuna spesa in quanto il download del programma, essendo open source, è gratuito.

È evidente che si tratta di un saggio di tipo indiretto, ovvero eseguito elaborando immagini radiografiche. La metodica proposta non può in alcun modo sostituire un esame di un apparato densitometrico e tantomeno può sostituire l'interpretazione del clinico veterinario, ma può costituire una valida alternativa di ordine pratico, utilizzabile in molti contesti tipici della professione veterinaria.

3 Apparecchiature e materiali utilizzati

Nella tabella 2 vengono elencate le caratteristiche dei materiali, apparecchiature e campioni utilizzati per la presente tesi. La parte iniziale della tabella è stata suddivisa in due, a seconda dello studio radiografico cui sono stati sottoposti i campioni.

Studio Radiografico Convenzionale	Studio Radiografico Digitale
<i>Campioni</i>	<i>Campioni</i>
N° 22 campioni ossei ricavati da 22 metatarsi di bovino	N° 17 campioni ossei ricavati da 2 femori di cavallo
<i>Materiali</i>	<i>Materiali</i>
Pellicole radiografiche Retina XO 35 x 43 cm	Cassetta radiografica CEA G fine 100 da ortopedia 35 x 43 cm
Liquido fissaggio Agfa G354	
Liquido sviluppo Agfa G153	
<i>Apparecchiature</i>	<i>Apparecchiature</i>
Sviluppatrice automatica Agfa	Scanner digitale CR: KODAK CR-360
Fotocamera digitale: NIKON COOLPIX 8700	Software scanner: Examion AQS versione 1.03
<i>Apparecchiature comuni</i>	
Densitometro a raggi X HOLOGIC QDR 1000, Hologic Inc., Waltham, MA, USA	
Software densitometro: Analysis Software Version 6.20 D, Hologic Inc., Waltham, MA, USA	
Apparecchio radiologico M.T. Medical Technology - mod. TS 9600 fornito di tubo radiogeno I.A.E mod. RTM 90 H pot. Max 600 mA/150 kVp e collimatore Ralco mod. R302/A	
Software ImageJ 1.4 Windows version	
Sega a nastro: TBS, SO 31360 INOX	

Tabella 2: materiali, apparecchiature e campioni utilizzati

3.1 Radiologia tradizionale

La radiologia sfrutta l'interazione degli atomi della materia con fasci di particolari onde elettromagnetiche, dette raggi X, la cui lunghezza d'onda appartiene alla banda compresa fra 0,001 e 1 nm. Di conseguenza, vista la proporzionalità inversa tra lunghezza d'onda e frequenza, possiamo anche definire i raggi X come onde elettromagnetiche ad alta frequenza.

L'energia rilasciata dai raggi X all'interno del corpo irradiato viene espressa dalla dose: questa si misura in Gray (1 Gy = 1 J/kg). Giova ricordare che le dosi radianti minime per le quali sia stato dimostrato un effetto lesivo sulle cellule sono superiori di molte decine di volte rispetto a quelle impiegate in radiodiagnostica

(Nessi, <<http://www.sirm.org/it/principi/61-i-principi-fisici-della-radiologia>>).

Nella presente tesi, con l'espressione "radiologia tradizionale" ci si riferisce alla "radiologia convenzionale", ovvero a quella metodica che prevede l'utilizzo di pellicole radiografiche e del loro sviluppo chimico, cioè di liquidi che estraggono l'immagine impressa sulla pellicola sfruttando una reazione chimica. La tecnica radiografica prevede diversi passaggi e i fattori che possono influire sul risultato finale sono diversi, pertanto è essenziale cercare di standardizzare il più possibile la metodica per ottenere immagini omogenee dal punto di vista dei contrasti e della luminosità.

Tra i fattori che incidono maggiormente possiamo citare:

- la temperatura del liquido di sviluppo, che influisce sulla velocità della reazione. Questo fattore diventa meno importante utilizzando, come nel nostro caso, una sviluppatrice automatica con un sistema regolabile di riscaldamento della vasca di sviluppo;
- la concentrazione del liquido di sviluppo, che può anch'essa influire notevolmente sulla qualità dell'immagine, perchè il liquido viene diluito in acqua all'interno di un serbatoio che funge da dispenser per la sviluppatrice. Una soluzione preparata da diversi giorni, troppo o troppo poco concentrata può dare immagini falsate;
- la tensione dell'impianto elettrico, che può non essere costante e influenzare così l'emissione del fascio radiogeno.

Il primo step per la realizzazione della radiografia è l'esposizione (figura 3).

Per l'esame radiografico dei campioni utilizzati per l'applicazione del primo metodo, cioè sezioni di arti posteriori di vitellone (vedi paragrafo 3.3.), l'apparecchio radiologico è stato impostato a una distanza costante di 100 cm dai campioni da radiografare. I parametri di esposizione sono stati mantenuti per tutti i campioni a 57 kVp (kilovolts picco), 400 mA (milliampere) e 0,025 secondi. È stata utilizzata una cassetta da ortopedia CEA G fine 100, non inserita nel potter .

Il secondo step è lo sviluppo (figura 4).

Le pellicole sono state sviluppate immediatamente dopo l'esposizione utilizzando una sviluppatrice automatica Agfa e liquido di sviluppo a due fasi Agfa G153.



Figura 3 – fase di esposizione del campione alla sorgente radiogena



Figura 4 – fase di sviluppo della pellicola radiografica. Inserimento della pellicola nella sviluppatrice automatica

3.2 Radiologia digitale

Nel 1995 cominciano a diffondersi i primi sistemi di radiologia digitale, ovvero i sistemi DR (digital radiography) basati su detettori al silicio e selenio amorfo. A seguito della produzione di immagini diagnostiche digitali e della necessità di gestire anche l'informazione digitale alfanumerica, negli stessi anni sono stati introdotti sistemi informatici di supporto quali il *radiology information system* (RIS), l'*hospital information system* (HIS) e il *picture archiving and communications system* (PACS) che hanno dato alla radiologia gli strumenti per l'archiviazione elettronica e la trasmissione di dati a distanza. È stato inoltre definito il protocollo *digital imaging and communication in medicine* (DICOM) che ha stabilito il formato digitale universale per la codifica e la comunicazione delle immagini medicali (nella completa sicurezza, in quanto il formato non è modificabile). Contrariamente alla radiologia tradizionale, dove la pellicola rappresenta il sistema sia di detenzione che di conservazione dell'immagine, nella radiologia digitale i detettori sono usati esclusivamente per creare l'immagine digitale, che viene poi successivamente registrata e conservata su un supporto digitale. L'intero iter di produzione di un'immagine digitale può essere suddiviso in quattro fasi: creazione, elaborazione, presentazione e archiviazione. Il detettore viene inizialmente esposto a una radiazione X, e l'energia conseguentemente assorbita deve essere trasformata in un segnale elettrico che viene poi registrato, digitalizzato e quantificato mediante una scala di grigi che rappresenta la quantità di radiazione X depositata in ogni pixel della matrice digitale. Dopo tale campionamento e quantificazione del segnale, opportuni software di elaborazione organizzano i dati grezzi (raw data) e li trasformano in un'immagine medicale. L'elaborazione delle immagini consente molteplici operazioni, come quella di zoom, inversione della scala dei grigi, modificazioni dell'ampiezza e del livello della finestra, misurazioni di angoli e distanze, esaltazione di contorni, definizione di regioni di interesse (region of interest, ROI) e segmentazione. Una volta generata, l'immagine viene registrata e conservata in un archivio digitale che, oltre all'immagine stessa, contiene anche i dati anagrafici relativi al paziente (cioè quella componente definita *header*). L'immagine digitale può ovviamente in qualsiasi momento essere stampata su pellicola, anche se uno dei

principali vantaggi che la radiologia digitale potrà consentire a breve è proprio la completa eliminazione dell'utilizzo di pellicole (filmless radiology) (Neri *et al.*, 2008).

Oltre ai sistemi DR esistono i sistemi di acquisizione indiretta, ovvero la radiografia computerizzata (computed radiography, CR), che utilizza una lastra (imaging plate) ricoperta di cristalli di fosforo fotostimolabili contenuta in una cassetta radiografica, simile a quelle usate in radiologia tradizionale.

La cassetta, una volta esposta alla sorgente radiogena, va inserita in un sofisticato scanner che estrae la lastra dalla cassetta e ne acquisisce l'immagine che verrà poi elaborata dall'apposito software e archiviata (figure 5 e 6).

Alla fine del processo di acquisizione la lastra viene resettata e ricollocata all'interno della cassetta, pronta per essere nuovamente impressionata.



Figura 5 – fase di esposizione di una sezione di femore equino

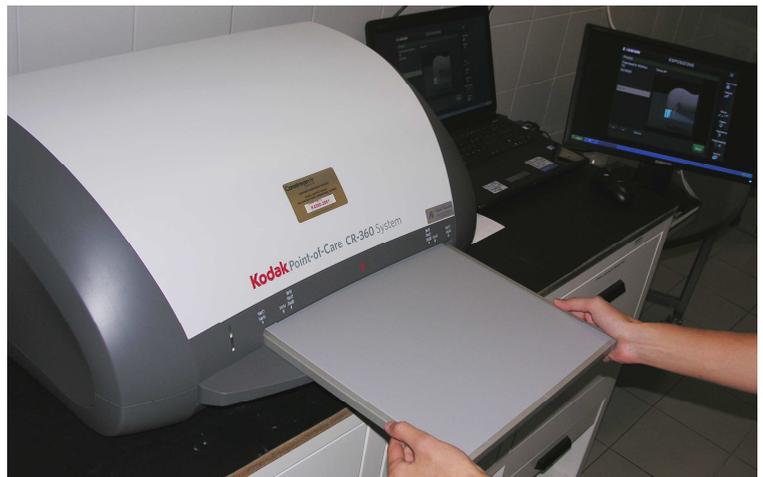


Figura 6 – fase di scansione dell'immagine previo inserimento della cassetta

Per meglio comprendere le differenze tra la radiologia tradizionale e la radiologia digitale è necessario introdurre alcuni concetti di base, come la risoluzione spaziale, la curva densitometrica e la risoluzione di contrasto.

La risoluzione spaziale definisce il limite entro il quale è possibile distinguere come separati due punti distinti di un'immagine e si misura in paia di linee per millimetro (pl/mm). Nei sistemi digitali, uno dei fattori che limita la risoluzione spaziale è la dimensione dei pixel della matrice di acquisizione. Le risoluzioni spaziali tipiche del sistema tradizionale schermo di rinforzo-pellicola vanno dai 5 ai 10 pl/mm, fino ad arrivare a 15-20 pl/mm per la mammografia. Questi livelli di risoluzione sono difficili da ottenere in un sistema digitale, proprio per i limiti imposti dalla spaziatura del pixel. Inoltre, si produrrebbero immagini di dimensioni enormi, fino a 8000 pixel per lato, con tutte le problematiche legate alla gestione di file così grandi. Poichè i parametri di risoluzione e dimensione dell'immagine non hanno una valenza assoluta, ma contano in relazione allo scopo a cui l'immagine è destinata, per molte indagini diagnostiche ci si può accontentare di valori di risoluzione spaziale dalle 2,5 pl/mm alle 5 pl/mm. Questi valori corrispondono a dimensioni del pixel di 0,2 mm e sono le tipiche risoluzioni dei sistemi di CR. In applicazioni mammografiche, invece, sono necessarie risoluzioni più elevate, fino a 10 pl/mm ovvero pixel di 0,1 mm (Neri *et al.*, 2008).

La curva densitometrica (figura 7) rappresenta la funzione che esprime le densità di annerimento rilevabili sull'immagine in funzione del logaritmo dell'esposizione.

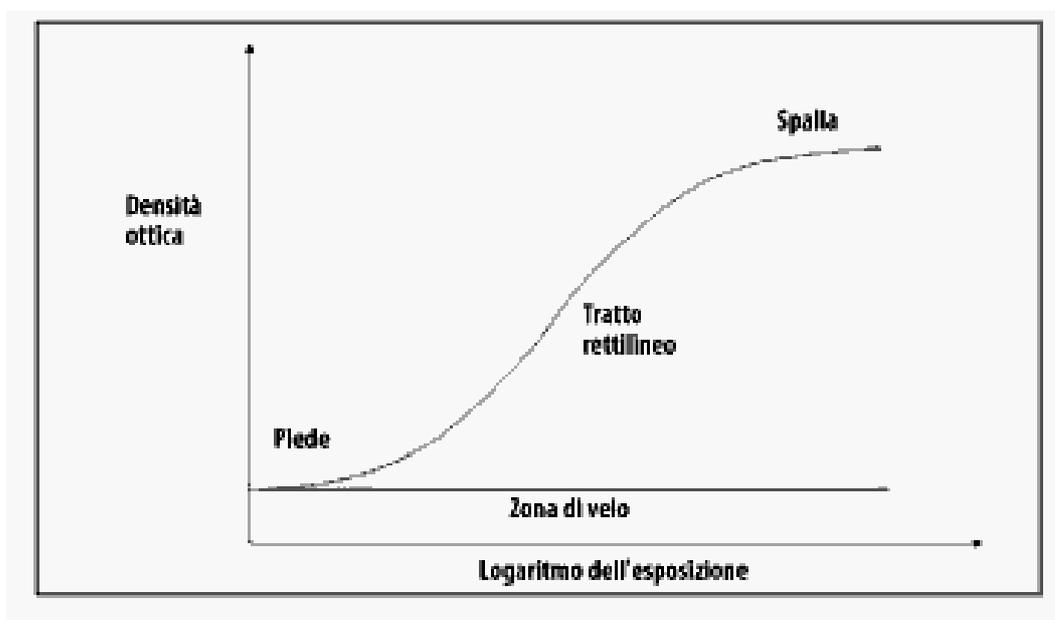


Figura 7 – Curva densitometrica

In un sistema tradizionale screen-film, solo la parte centrale della curva è utile ai fini diagnostici. Questo tratto è rettilineo e ci informa della corrispondenza lineare tra il livello di esposizione e la densità ottica rilevabile sull'immagine. Ad ogni incremento della dose di esposizione corrisponde sull'immagine un incremento di densità ottica (vedi paragrafo 4.6), con una relazione che dipende dalla pendenza della curva. Le zone del piede e della spalla della curva sono zone rispettivamente di sotto e sovraesposizione. In un sistema digitale, invece, la curva di risposta è lineare per un intervallo di esposizioni molto più grande. Disponiamo quindi di un range dinamico più ampio, cioè di una maggiore capacità nel rilevare variazioni di attenuazione del fascio X. Il range dinamico viene comunemente misurato in decibel (dB). Con gli strumenti di elaborazione digitale, la pendenza e la forma della curva possono essere facilmente modificate per migliorare la percezione del contrasto su un più ampio range di esposizioni (Neri *et al.*, 2008).

La risoluzione di contrasto è la più piccola variazione di intensità rilevabile fra zone contigue dell'immagine. Essa è limitata dal range dinamico e dal livello di quantizzazione (pixel depth). Nei sistemi convenzionali la risoluzione di contrasto è determinata dalle caratteristiche sensitometriche della pellicola e dal suo trattamento. Nei sistemi di imaging digitale, il contrasto può essere variato a piacere. Il contrasto può essere ottimizzato selettivamente con l'operazione di windowing che consiste nella scelta dell'ampiezza della finestra di variazione di gradazione dei grigi con cui rappresentare l'immagine e la scelta del livello centrale di questa finestra (Neri *et al.*, 2008).

I vantaggi più importanti delle immagini digitali sono:

- possibilità di modificare "a posteriori" le caratteristiche delle immagini, principalmente la densità e il contrasto, senza dover ripetere l'esame;
- archiviazione rapida in minimo spazio e recupero in tempi brevissimi;
- possibilità di teletrasmissione via cavo o Internet in maniera molto semplice, realizzando consultazioni e discussioni di casi da parte di esperti a distanza ("teleradiologia").

Inoltre, i sistemi CR, essendo basati sull'utilizzo di cassette radiografiche, possono essere integrati nei dispositivi radiologici tradizionali, sono facilmente trasportabili e risultano ben adattabili all'esecuzione di esami radiografici in campo.

Nel nostro caso sono stati utilizzati un sistema di scansione CR Kodak CR-360 dotato di apposite cassette Kodak e il software di elaborazione Examion 1.03.

Per l'esposizione dei campioni, sezioni di femore equino (vedi paragrafo 3.3), l'apparecchio radiologico è stato impostato a una distanza costante di 100 cm; i parametri di esposizione sono stati mantenuti per tutti i campioni a 60 kVp (kilovolts picco), 400 mA (milliampere) e 0,025 secondi.

3.3 Preparazione dei campioni

Per la presente tesi sono stati utilizzati due tipi di campioni ossei. Il primo è stato impiegato per la radiografia tradizionale, il secondo per la radiografia digitale.

Il primo tipo è stato ricavato dagli arti posteriori di 11 vitelloni maschi (*Bos taurus*), di età e taglia omogenea, macellati. Al mattatoio, tali arti sono stati sezionati, con ragionevole approssimazione, a livello del terzo prossimale del metatarso (figura 8). Si sono così ottenuti 22 campioni.



Figura 8 – Sezione di arto posteriore bovino

Il secondo tipo di campione è stato ricavato, presso la sala necroscopica della facoltà di Medicina Veterinaria di Padova, da 2 arti posteriori di 2 diversi cavalli (*Equus caballus*). Da ognuno è stato isolato il femore, separandolo dalle masse muscolari e tendinee. Quindi ogni femore è stato sezionato trasversalmente tramite sega a nastro, il primo in 7 porzioni e il secondo in 10, ottenendo così un totale di 17 sezioni (figure 9 e 10).

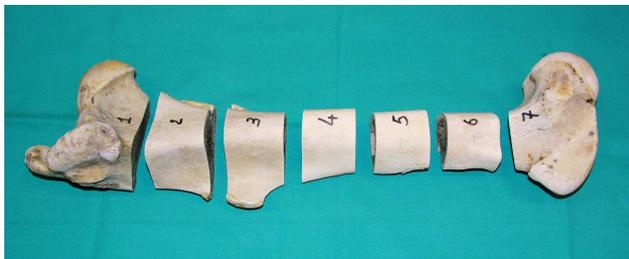


Figura 9 – Sezioni di femore equino n.1

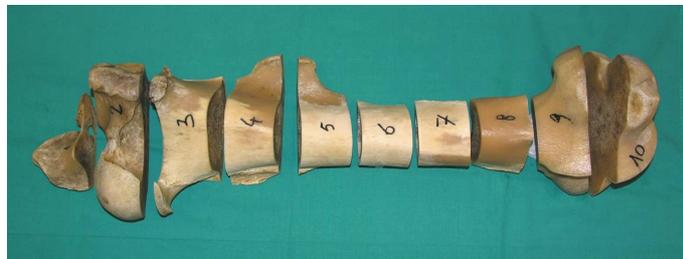


Figura 10 – Sezioni di femore equino n.2

Per eliminare il midollo osseo interno e la restante parte di tessuto molle adeso, ognuna delle 17 porzioni è stata sottoposta a un processo utilizzato in un precedente studio (Toque *et al.*, 2006). Tale metodo prevede l'ebollizione del campione osseo in acqua a 99.5°C per 30 minuti e il lavaggio dei preparati con acqua fredda; a ogni ebollizione si effettua il cambio dell'acqua. Tutto il processo deve essere eseguito 3 volte. Alla fine le porzioni sono state lavate con acqua fredda e fatte asciugare a temperatura ambiente. Sono state conservate protette da un telo di "tessuto-non-tessuto" per evitare il contatto con insetti striscianti e ditteri.

4 Descrizione della metodica

I due metodi utilizzati per la determinazione del MGV (Mean Gray Value) saranno descritti in dettaglio passo dopo passo. Il primo metodo inizia da una pellicola radiografica che deve essere digitalizzata, mentre il secondo a partire da un file già acquisito.

Nel paragrafo 4.6 viene trattata la metodica relativa alla determinazione dei valori di OD (Optical Density).

4.1 Esame al densitometro a raggi X

Qualsiasi considerazione su una possibile correlazione tra BMD e MGV sarebbe impossibile senza avere a disposizione un densitometro a raggi X. Nel nostro caso tutti i campioni sono stati analizzati con un densitometro a raggi X Hologic QDR1000 (Hologic Inc., Waltham, MA, USA).

Per ogni campione sono stati ricavati i dati del BMD in una specifica ROI selezionata manualmente e di forma trapezoidale. Ricordiamo che il BMD è una misura rapportata all'area della regione esaminata, precisamente corrispondente al rapporto tra BMC e l'area (figure 11 e 12).

I campioni derivati dagli arti bovini sono stati collocati in posizione dorso-plantare, le sezioni dei femori equini in posizione antero-posteriore.

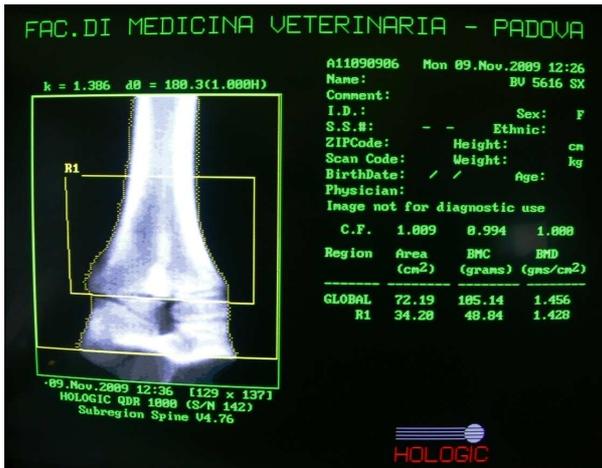


Figura 11 – Schermata contenente i risultati finali dell'esame densitometrico di sezione di un arto posteriore bovino. La subregion R1 è stata delimitata in modo da contenere la parte distale del metatarso



Figura 12 – Esecuzione di esame densitometrico di una sezione di arto posteriore bovino in proiezione dorso-plantare

4.2 Digitalizzazione delle pellicole radiografiche

Dopo avere radiografato i campioni con le modalità viste al paragrafo 3.1, è stato necessario digitalizzare le pellicole per ottenere i file da elaborare con ImageJ. Per digitalizzare le pellicole radiografiche è stata utilizzata una fotocamera digitale Nikon Coolpix 8700, montata su un supporto regolabile e orientata con l'obiettivo dall'alto verso il basso, in modo da risultare perfettamente perpendicolare al piano orizzontale e a una distanza di 45 cm. Le pellicole radiografiche sono state poste su un negatoscopio a luce fredda, bloccato in modo che il centro dell'inquadratura nel mirino della fotocamera coincidesse con il centro del piano illuminato. Eliminate le altre fonti luminose esterne naturali o artificiali, si è proceduto alle riprese con i seguenti parametri: diaframma 3.6 - tempo di esposizione 1/60 di secondo – risoluzione 2048x1536 pixel – saturazione BN – flash e zoom disattivati – funzione macro attiva per permettere la messa a fuoco (figura 13).

Da ogni pellicola si è così ricavato un file in formato .jpeg, pronto per l'elaborazione con ImageJ (figura 14).

Il formato identificato dall'estensione .jpeg o .jpg è attualmente uno dei formati di file di immagini più diffuso, noto anche come file di interscambio. Esso deriva da uno standard che permette di diminuire percentualmente la qualità originaria dell'immagine per ottenere file meno voluminosi in termini di memoria occupata, cioè di byte. Questa caratteristica è utilissima per l'archiviazione e la trasmissione telematica delle immagini stesse.



Figura 13 – Sistema utilizzato per la digitalizzazione delle pellicole radiografiche



Figura 14 – Esempio di immagine digitalizzata con il sistema a fianco

4.3 Acquisizione delle immagini radiografiche digitali

Dopo avere radiografato i campioni con le modalità viste al paragrafo 3.2, si è passati alla fase di acquisizione utilizzando l'apparecchiatura CR Kodak CR-360.

Con il software Examion le immagini sono state orientate, contrassegnate, archiviate ed infine esportate in formato DICOM 16 bit.

Come già accennato in precedenza, il formato Dicom è uno standard riconosciuto e utilizzato ormai su larga scala nelle applicazioni medicali. Esso permette di legare indissolubilmente all'immagine una serie di informazioni sul paziente, sull'apparecchiatura che ha generato le immagini e sulle caratteristiche più tecniche dell'immagine stessa. Tutto questo è contenuto nella cosiddetta componente *header* (vedi paragrafo 3.2).

Le immagini Dicom 16 bit sono state elaborate ed esportate dal software Examion (figura 15) rigorosamente allo stato nascente, senza applicare alcun filtro specifico o regolazioni di sorta, che avrebbero potuto falsare la lettura del MGV.

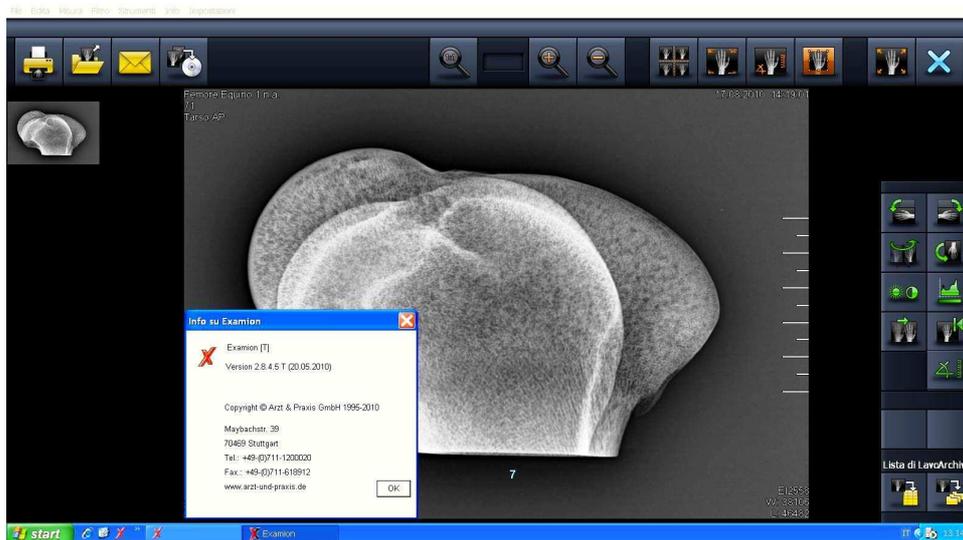


Figura 15 – Schermata del software di elaborazione radiografica digitale Examion 1.03

4.4 Elaborazione e calibrazione delle immagini

Sia le immagini .jpeg derivate dalla digitalizzazione delle radiografie delle sezioni di arti posteriori bovini che le immagini dicom 16 bit derivate dal software Examion hanno richiesto una ulteriore elaborazione preliminare con ImageJ e precisamente:

- Conversione a 8 bit per ridurre la scala di grigi a 0-255. Questo vale sia per i Dicom che per i .jpeg. I primi sono a 16 bit e quindi hanno una banda di grigio che va da 0 a 65535, eccessiva per i nostri scopi, e quindi riducibile. I file .jpeg, ottenuti con la metodica descritta al paragrafo 4.2, sono già a 8 bit e desaturati, cioè privi della componente RGB (i colori), ma questo è comunque da verificare.
- Applicazione funzione *invert*. I file Dicom 16 bit vengono aperti da ImageJ in negativo, cosa che allo stato attuale non siamo in grado di spiegare. È quindi necessario applicare la suddetta funzione per riportarla allo stato reale.
- Applicazione funzione *crop*. La funzione di *cropping* diventa di fondamentale importanza solo nel caso in cui si decida di applicare la selezione automatica della ROI (vedi oltre). Diversamente, utilizzando la selezione manuale, può essere considerata facoltativa, assolutamente ininfluente sulla lettura del MGV. Tale funzione è inoltre fondamentale nella misurazione di immagini digitalizzate, in quanto si deve diminuire l'area su cui applicare il bilanciamento automatico (vedi punto successivo) per concentrare l'ottimizzazione dell'immagine a livello della ROI (vedi oltre) e poter così ottenere dati significativi.
- Bilanciamento automatico. Questa funzione si applica solo sulle immagini in formato .jpeg dopo aver applicato la funzione di *crop*. Essa serve a ottimizzare e, in un certo qual modo, a standardizzare le immagini. Il comando analizza il profilo dell'immagine e modifica la saturazione di una piccola percentuale di pixel migliorando il range della scala di grigi. Sulle immagini Dicom 16 bit, questo non è necessario in quanto l'immagine è già stata ottimizzata dal software Examion.
- Calibrazione pixel-cm. Non è possibile misurare il MGV negli stessi identici punti in cui è stato misurato il BMD, ma essendo la misurazione del BMD

rapportata a una superficie in centimetri quadrati, è possibile misurare il MGV su superfici di grandezza almeno simile. A questo scopo bisogna misurare con ImageJ anche la superficie, ma per ottenere un valore in centimetri quadrati è necessario utilizzare la funzione *Analyze/SetScale*. Con questa procedura si stabilisce un rapporto pixel-cm, cosicché la misurazione dell'area delle ROI sarà resa in centimetri quadrati. Con le immagini digitali in formato Dicom il problema non si pone, in quanto sull'immagine viene automaticamente sovrainpresso un righello su cui si può effettuare la calibrazione, prima misurando il righello stesso con la funzione *Straight line* e poi applicando il valore in pixel ottenuto per la funzione *SetScale* (figura 16). Sulle pellicole radiografiche digitalizzate, invece, è necessario in fase di ripresa posizionare sul campo un oggetto di lunghezza conosciuta, meglio se un righello. Così facendo il righello diventerà parte dell'immagine stessa e sarà possibile calibrarla.

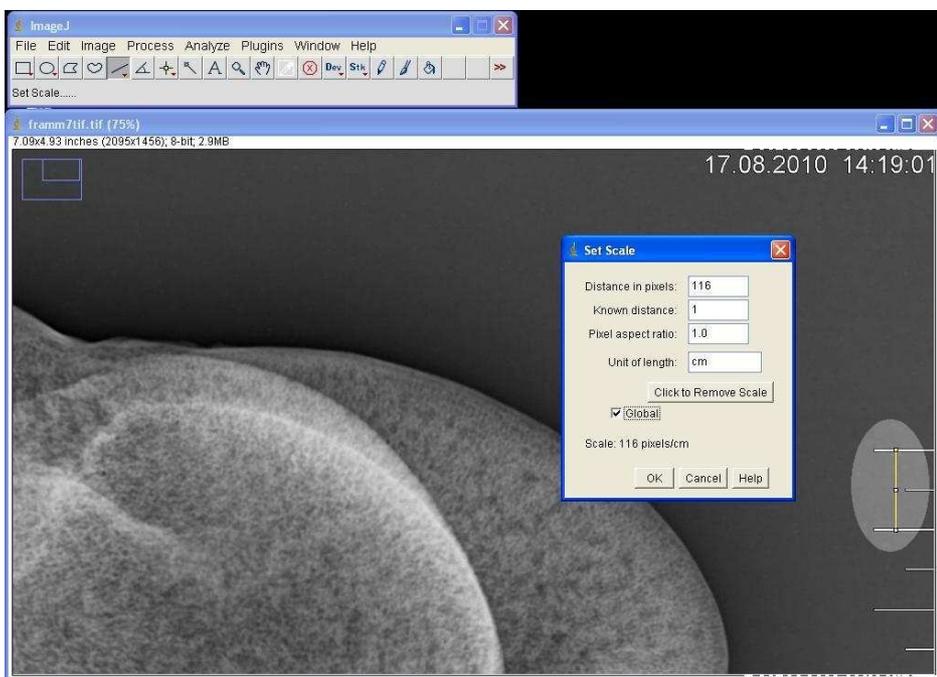


Figura 16 – Calibrazione pixel-cm

4.5 Selezione della ROI (Region of Interest) e misurazione del MGV (Mean Gray Value)

Per intendere a pieno il significato del MGV è necessario trattare alcuni principi di base. La considerazione iniziale è il concetto di valore di grigio assegnato ad un singolo pixel, ovvero il più piccolo elemento autonomo dell'immagine presa in considerazione.

L'intensità di grigio di ogni pixel analizzato, variando dal nero per la minore intensità al bianco per la maggiore, viene espressa come Gray Level (Johnson, 2006).

Il gray (Gy) è l'unità del sistema metrico internazionale (SI) per indicare la dose assorbita di radiazioni ionizzanti (per esempio, raggi X), ed è definita come l'assorbimento di un joule di radiazione ionizzante da parte di un chilogrammo di materia. La formula è la seguente:

$$1 \text{ Gy} = 1 \frac{\text{J}}{\text{kg}} = 1 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-2}$$

Quest'unità di misura, intesa come Gray Level, assume un valore numerico che varia in un intervallo che prende il nome di Grayscale. Il Grayscale in immagini 8 bit varia da 0 a 255 e in quelle a 16 bit da 0 a 65535.

La somma dei Gray Level misurati in una determinata selezione divisa per il numero di pixel della selezione stessa è il MGV

(<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/menus/analyze.html#set>). Tale dato è quindi l'espressione del valore medio dell'intensità di grigio dei pixel dell'area selezionata.

L'area selezionata, all'interno della quale si è calcolato il MGV, si definisce ROI (Region Of Interest). Essa può assumere diverse forme poligonali o curve, ma soprattutto può essere selezionata manualmente punto per punto o automaticamente, usando il filtro a soglia variabile dello strumento *wand tool*

(<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/tools.html>).

Nel nostro caso, la ROI, di forma trapezoidale, è stata selezionata manualmente nel tentativo di sovrapporla il più possibile alla ROI dell'esame densitometrico, sia per quanto riguarda la forma e i punti perimetrali (figura 17), sia per quanto riguarda la superficie (tabelle 3-6).

La selezione automatica è stata utilizzata solo nel paragrafo 5.1; pertanto, qualora non specificato, si deve intendere che la selezione della ROI sia stata eseguita manualmente.

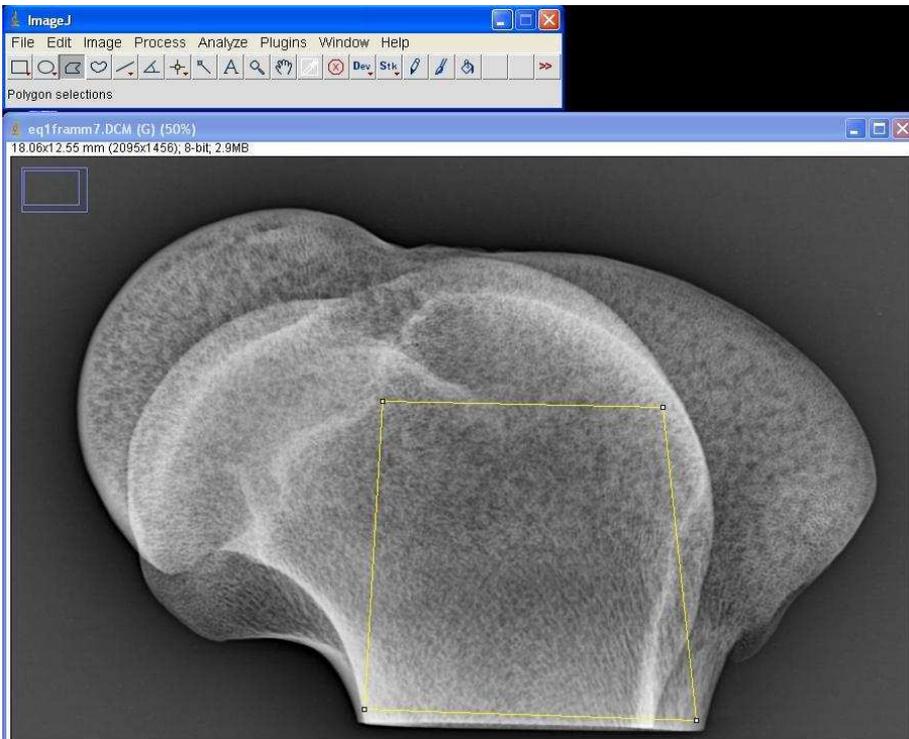


Figura 17 – Selezione manuale della ROI su Rx digitale di sezione di femore equino

Una volta selezionata la Region Of Interest, per ottenere le misurazioni con ImageJ è sufficiente attivare la funzione *Analyze/Measure* o la combinazione di tasti "CTRL+M". I vari parametri misurabili possono essere scelti e selezionati con la funzione *Analyze/Set Measurements*. Nel nostro caso i parametri essenziali da selezionare sono: *Area*, *Mean Gray Value*, *Min & Max Gray Value* e *Display Label* (figura 18).

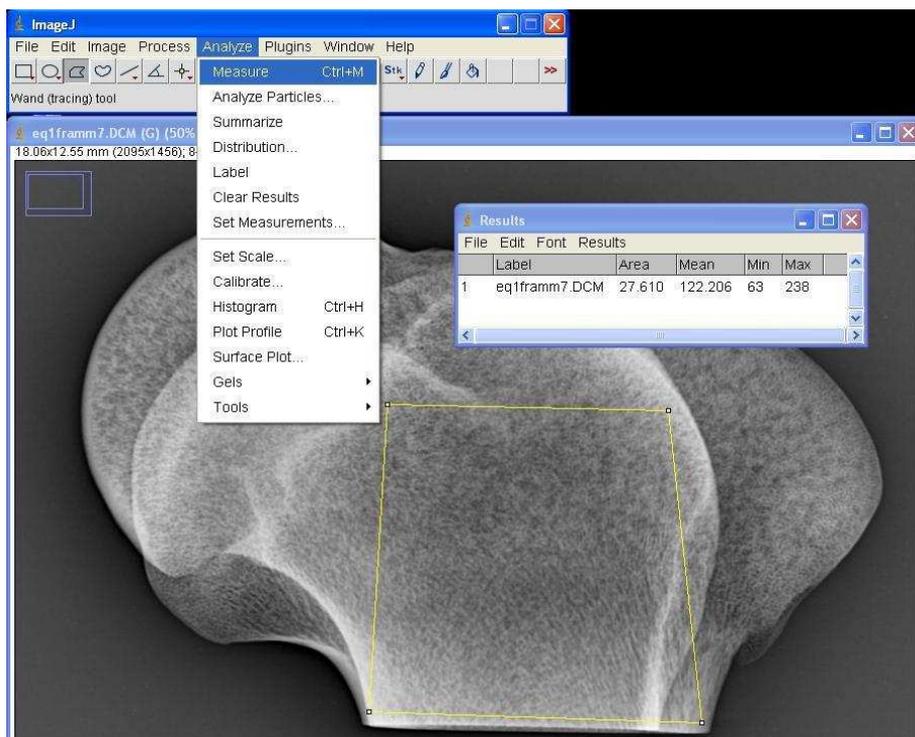


Figura 18 – Misurazione del MGV (Mean Gray Value)

Nelle tabelle 3 e 4 riportiamo i risultati ottenuti con il saggio densitometrico della sostanza minerale ossea dei campioni analizzati e i valori di MGV delle immagini radiografiche misurati con ImageJ. Inoltre si riportano le aree, espresse in centimetri quadrati, dei corrispettivi studi.

campione	area HOLOGIC	BMD	area ImageJ	MGV
1274dx	27,79	1,305	27,982	140,941
1274sn	29,76	1,355	29,68	148,819
1275dx	32,74	1,245	32,861	131,714
1275sn	30,74	1,195	30,655	127,714
1277dx	24,44	1,239	24,528	119,198
1277sn	24,74	1,301	24,655	137,506
1278dx	27,65	1,158	27,67	121,78
1278sn	26,53	1,182	26,486	128,639
1598dx	22,67	1,201	22,686	94,79
1598sn	22,69	1,045	22,72	87,289
1653dx	36,31	0,915	36,278	86,777
1653sn	29,9	1,018	29,89	90,054
1729dx	34,77	1,032	34,786	96,54
1729sn	34,1	1,071	34,112	102,387
1730dx	26,47	1,149	26,483	108,464
1730sn	31,63	1,511	31,65	178,075
1825dx	29,22	0,937	29,216	97,659
1825sn	30,26	0,947	30,249	97,337
1932dx	33,17	1,178	33,194	124,098
1932sn	29,88	1,18	29,874	130,513
1991dx	26,33	1,185	26,34	115,34
1991sn	24,87	1,142	24,881	113,926

Tabella 3: risultati della misurazione del BMD e MGV su 22 metatarsi bovini

sezione	area HOLOGIC	BMD	area ImageJ	MGV
1.1	48,12	1,132	48,225	114,775
1.2	34,87	1,218	35,061	111,560
1.3	27,7	1,5	27,767	128,882
1.4	18,92	1,872	18,913	139,278
1.5	18,42	1,949	18,374	142,316
1.6	16,99	1,82	16,898	125,871
1.7	26,33	1,44	26,238	119,886
2.1	14,45	1,2	14,543	119,539
2.2	18,73	1,264	18,837	120,687
2.3	36,01	1,237	36,155	113,304
2.4	37,84	1,418	37,702	125,554
2.5	31,51	1,803	31,445	130,425
2.6	26,05	2,104	26,027	140,889
2.7	24,45	2,256	24,372	151,943
2.8	25,63	1,973	25,767	144,738
2.9	31,04	1,832	31,192	136,88
2.10	27,15	2,213	27.017	161,845

Tabella 4: risultati della misurazione del BMD e MGV su 17 sezioni di femore equino

4.6 Conversione del MGV (Mean Gray Value) in OD (Optical Density)

Nel presente lavoro il valore di intensità di grigio delle immagini analizzate è stato finora misurato come MGV, ma questa non è la sola misura che si può ottenere con ImageJ. Calibrando opportunamente il sistema si ottengono valori di intensità di grigio espressi in OD, Optical Density o Densità Ottica, che abbiamo già avuto modo di trattare al paragrafo 3.2.

La OD è un'unità di misura riconosciuta a livello internazionale ed esistono diverse apparecchiature standard per misurarla, ad esempio gli scanner densitometrici e, come appena accennato, anche ImageJ (Vivino, <<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/more-docs/Engineering/ImgEngr.html>>).

La OD è l'unità di misura che in spettrofotometria prende il nome di assorbanza e viene calcolata con la seguente relazione:

$$OD = \text{Log}_{10}(I_0 / I)$$

Pertanto la densità di un punto è il logaritmo del rapporto fra l'intensità della luce incidente (I_0) su di esso e di quella che vi passa attraverso (Shapiro, 1995).

Normalmente un'intera immagine radiografica presenta valori di OD in un range compreso fra 0,2 (per le zone più opache) e 4 (per le zone più trasparenti). Da questo si deduce che la densità dipende dal grado di esposizione del detettore dell'immagine al fascio radiogeno (Ball e Price, 1995).

Nel nostro caso abbiamo calibrato (vedi oltre) e utilizzato ImageJ per analizzare nuovamente le stesse immagini radiografiche, ma questa volta esprimendo i valori in OD.

Infatti si è ritenuto importante esprimere i dati in quest'unità di misura standard e più usata nel campo della diagnostica per immagini, dove viene generalmente chiamata densità (Ball e Price, 1995).

Per ottenere i valori in OD sono necessari alcuni passaggi fondamentali.

Innanzitutto bisogna avere a disposizione una immagine di riferimento, o una cosiddetta step-tablet su cui poi effettuare la calibrazione. Un esempio di tablet utilizzabile è fornito dalla Kodak (figura 19). Tale tablet è composta da 21 step con una

densità ottica conosciuta, da 0.05 a 3.05. L'immagine è in formato .tif e può essere aperta con ImageJ per misurare il MGV in ogni singolo step con la funzione di selezione rettangolare. Misurati i 21 step si ottiene una scala di valori di MGV corrispondente ai valori di OD conosciuti della tablet. Si salva in un file di testo che sarà poi utilizzato per la calibrazione, con la funzione *calibrate*.

Si seleziona il comando dal menu *Analyze/Calibrate*, si carica il file di testo con le due tabelle e si seleziona *Rodbard* per verificare la correlazione tra i dati, poi si digita OD come unità di misura e infine si dà "ok"

(<<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/index.html>>).

In questo modo il valore di intensità di grigio di ogni pixel verrà espresso in Densità Ottica.

Optical Density Calibration

This is an example of how to use a calibrated optical density step tablet to calibrate an image. Normally the step tablet, and the image to be calibrated, are scanned or photographed at the same time. In this example, however, only the step tablet was scanned.



Figure 1. Optical density step tablet.

Figure 1 is a Kodak No. 3 Calibrated Step Tablet scanned with an Epson Expression 1680 Professional scanner. The tablet has 21 steps with a density range of 0.05 to 3.05 OD. This image is available as a [ZIP compressed TIFF file](#) that can be opened directly in ImageJ. Calibrated step tablets are available from [Tiffen \(Kodak\)](#) and [Stouffer](#).

The first step in calibrating the image is to measure the mean gray value of the background and the first 18 steps. We don't measure the last three steps because they are not distinguishable and also because the calibration function in ImageJ is currently limited to 20 measurements. Before starting, make sure the "Results" window is closed. Create a rectangular selection that fills most of one step without overlapping another step. Move the selection to the white background at the left end of the image and measure it. Then, starting at the left, move the selection and measure each of the first 18 steps.

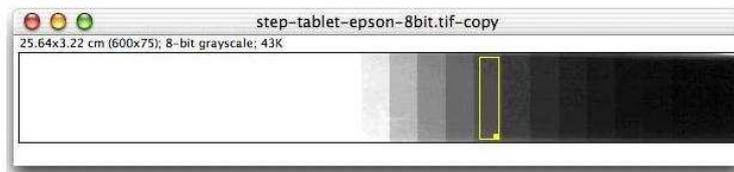


Figure 2. OD step tablet with adjusted LUT.

Figura 19 – Tutorial per la conversione del MGV in densità ottica

Come nel caso della misurazione del MG_V, anche nella determinazione della densità ottica, la ROI di forma trapezoidale è stata selezionata manualmente nel tentativo di sovrapporla il più possibile alla ROI dell'esame densitometrico, sia per quanto riguarda la forma e i punti perimetrali, sia per quanto riguarda la superficie.

Nelle tabelle 5 e 6 si riportano i risultati ottenuti con il saggio densitometrico della sostanza minerale ossea dei campioni analizzati e i valori di OD delle immagini radiografiche misurati con ImageJ. Inoltre vengono riportate le aree, espresse in centimetri quadrati, dei corrispettivi studi.

sezione	area HOLOGIC	BMD	area ImageJ	OD
1.1	48,12	1,132	48,275	0,556
1.2	34,87	1,218	34,959	0,565
1.3	27,7	1,5	27,824	0,458
1.4	18,92	1,872	18,788	0,425
1.5	18,42	1,949	18,875	0,421
1.6	16,99	1,82	16,837	0,493
1.7	26,33	1,44	26,305	0,507
2.1	14,45	1,2	14,327	0,527
2.2	18,73	1,264	18,974	0,511
2.3	36,01	1,237	35,86	0,567
2.4	37,84	1,418	37,413	0,486
2.5	31,51	1,803	31,589	0,451
2.6	26,05	2,104	26,356	0,415
2.7	24,45	2,256	24,554	0,368
2.8	25,63	1,973	25,783	0,392
2.9	31,04	1,832	30,668	0,429
2.10	27,15	2,213	26,691	0,305

Tabella 5: risultati della misurazione del BMD e di OD su 17 sezioni di femore equino

campione	area HOLOGIC	BMD	area ImageJ	OD
1274dx	27,79	1,305	27,779	0,446
1274sn	29,76	1,355	27,139	0,391
1275dx	32,74	1,245	31,287	0,516
1275sn	30,74	1,195	31,015	0,557
1277dx	24,44	1,239	24,527	0,507
1277sn	24,74	1,301	24,366	0,43
1278dx	27,65	1,158	27,384	0,512
1278sn	26,53	1,182	26,584	0,47
1598dx	22,67	1,201	22,078	0,685
1598sn	22,69	1,045	21,029	0,719
1653dx	36,31	0,915	35,061	0,756
1653sn	29,9	1,018	30,516	0,723
1729dx	34,77	1,032	34,732	0,721
1729sn	34,1	1,071	34,460	0,65
1730dx	26,47	1,149	26,479	0,603
1730sn	31,63	1,511	30,309	0,297
1825dx	29,22	0,937	29,056	0,658
1825sn	30,26	0,947	30,424	0,682
1932dx	33,17	1,178	33,382	0,528
1932sn	29,88	1,18	29,399	0,536
1991dx	26,33	1,185	26,187	0,58
1991sn	24,87	1,142	24,792	0,56

Tabella 6: risultati della misurazione del BMD e di OD su 22 metatarsi bovini

5 Statistiche e correlazione

Per poter attribuire un significato valido dal punto di vista statistico alle misurazioni di MG_V bisogna valutare due aspetti del lavoro svolto finora: la precisione e l'accuratezza del metodo.

Nei seguenti paragrafi vengono ricordate le definizioni di accuratezza e precisione di un esperimento, termini apparentemente sinonimi, ma che assumono significati molto diversi in statistica. Vengono inoltre citate le cause della variabilità di un esperimento, ovvero i motivi che determinano una differenza tra i dati ottenuti ripetendo medesimi esperimenti.

5.1 Valutazione della precisione del metodo

Una prima causa di variabilità di un esperimento risiede nelle caratteristiche stesse del materiale sperimentale e può essere ascritta a quelle differenze individuali (nel senso di unità sperimentali) che non possono essere controllate nell'esperimento. Dall'entità di questa variabilità dipende la precisione dell'esperimento, cioè la possibilità di ottenere risultati ripetibili, ovvero che non si discostino troppo da un esperimento all'altro, qualora l'esperimento venga ripetuto. Precisione può essere pertanto definita come concordanza di risultati tra le ripetizioni di un esperimento (Camussi *et al.*, 1995).

In una determinazione analitica gli errori casuali di manualità possono essere il motivo per cui i risultati di analisi ripetute si disperdono attorno ad un valore medio. La dispersione o variazione è l'attitudine che presenta un insieme di dati a disporsi intorno alla media. Tanto minore è questa variazione, tanto maggiore è la precisione. Come grandezze di riconoscimento della precisione si possono usare due misure statistiche della variazione, ovvero la deviazione standard e il coefficiente di variazione (Pagani e Duranti, 1998). Vengono ora descritte tali misure e la motivazione della scelta di utilizzare per il nostro studio il coefficiente di variazione come indice di precisione del metodo.

La deviazione standard (σ) è la radice quadrata dello scarto quadratico medio, che è la media (μ) delle differenze elevate al quadrato tra ciascuna delle osservazioni in un gruppo di dati e la media aritmetica dei dati stessi. Lo scarto quadratico medio è definito dalla relazione:

$$\sigma^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2$$

Tale formula quindi rappresenta l'errore al quadrato che commettiamo, in media, sostituendo a una generica osservazione x_i , la media μ .

Il coefficiente di variazione (CV) indica il rapporto tra la deviazione standard e la media di un insieme di dati. È generalmente espresso in percentuale, secondo la seguente relazione:

$$CV = \left(\frac{\sigma}{|\mu|} \right) \times 100\% \quad \mu \neq 0$$

La deviazione standard, a differenza del CV che è un numero puro, è espressa nella stessa unità di misura della variabile originale. È quindi il CV che permette di dare un giudizio sulla "grandezza" della deviazione standard di un insieme di dati indipendentemente dalla scala di misura utilizzata. Pertanto, il CV risulta utile per confrontare la variabilità di due caratteri e in modo particolare per misurare la precisione dei dati ricavati da uno studio (Camussi *et al.*, 1995).

Viene ora trattata la misurazione del MGV e in seguito quella in termini di OD.

La misurazione del MGV, su immagini radiografiche digitali e digitalizzate, mediante ImageJ, può essere effettuata in due modi:

- selezionando manualmente la ROI (figure 20 e 22) e ripetendo le misurazioni ad ogni selezione. In questo modo si andrà a misurare il MGV su punti diversi, su aree differenti, ottenendo risultati ovviamente differenti.

Nel nostro caso su 10 misurazioni di MGV effettuate su immagine digitale, utilizzando i medesimi punti di reperi, si è ottenuto un coefficiente di variazione di 0,09% (tabella 7) e su immagini digitalizzate un coefficiente di variazione di 0,1% (tabella 9).

- selezionando automaticamente la ROI (figure 21 e 23) applicando un filtro a soglia variabile. Così facendo non ci sarà più alcuna variazione e i risultati di misurazioni

ripetute saranno identici (tabelle 8 e 10). In questo contesto va precisato che la selezione automatica normalmente determina un aumento dell'area analizzata in quanto il software, secondo l'operazione di riconoscimento dei contorni (*edge detection*), segue in maniera più precisa il perimetro della ROI, aumentando così il numero di pixel presi in considerazione (<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/tools.html>). Nel nostro lavoro questo non è sempre risultato un concetto valido. Infatti le aree di elevata trasparenza, all'interno delle ROI di alcune immagini radiografiche, in casi estremi, non vengono considerate dal software. Si possono così determinare risultati differenti da quelli ottenuti con la metodica manuale. Esula da questa tesi lo studio di tale evenienza e per questo motivo, pur rimanendo di indubbia utilità la selezione automatica, nel presente lavoro ci si è soffermati maggiormente sull'utilizzo della selezione manuale della ROI.

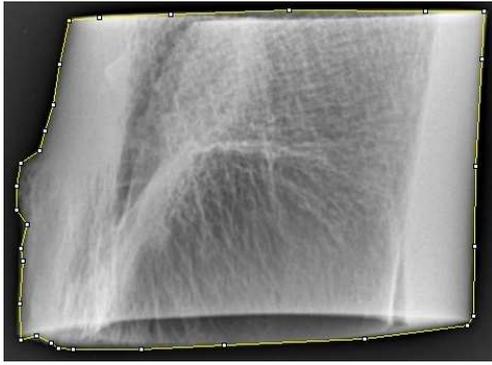


Figura 20- Selezione manuale su immagine digitale

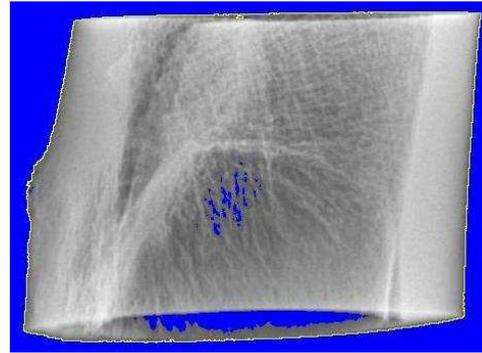


Figura 21- Selezione automatica su immagine digitale

Tabella 7: Misurazioni di MGV con selezione manuale su immagine digitale

n. misura	Area cm ²	MGV
1	39,318	153,021
2	39,406	152,939
3	39,386	153,031
4	39,438	152,974
5	39,559	152,740
6	39,345	153,107
7	39,475	152,700
8	39,385	152,997
9	39,532	152,762
10	39,374	152,798

Media Aritmetica	152,907
Deviazione Standard	0,143615575
Coefficiente di Variazione (%)	0,093923541

Tabella 8: Misurazione di MGV con selezione automatica su immagine digitale

Area cm ²	MGV
38,99	154,002

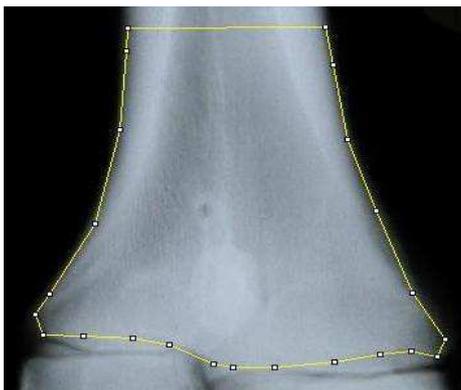


Figura 22 - Selezione manuale su immagine digitalizzata



Figura 23 - Selezione automatica su immagine digitalizzata

Tabella 9:

Misurazioni di MGV con selezione manuale su immagine digitalizzata

n. misura	Area cm ²	MGV
1	27,576	128,829
2	27,673	128,765
3	27,712	128,945
4	27,62	128,762
5	27,739	128,781
6	27,581	128,902
7	27,756	128,643
8	27,764	128,957
9	27,567	128,896
10	27,563	129,106

Media Aritmetica	128,8586
Deviazione Standard	0,130431
Coefficiente di Variazione (%)	0,10122

Tabella 10:

Misurazione di MGV con selezione automatica su immagine digitalizzata

Area cm ²	MGV
25,593	133,556

Allo stesso modo di quanto esposto per selezionare una ROI per misurare il MG_V, si può procedere per effettuare le misurazioni di densità ottica (ovviamente dopo la calibrazione vista al paragrafo 4.6). Nelle tabelle 11 e 13 si riportano i risultati di OD ottenuti con selezione manuale della ROI, mentre nelle tabelle 12 e 14 quelli relativi alla selezione automatica. Le aree analizzate sono espresse in centimetri quadrati. In questo caso il coefficiente di variazione su 10 misurazioni di OD su immagine digitale è di 0,40%, quello ottenuto su immagine digitalizzata è di 0,45%.

Tabella 11: Misurazioni di OD con selezione manuale su immagine digitale

n. misura	Area cm ²	OD
1	39,564	0,371
2	39,511	0,368
3	39,639	0,370
4	39,569	0,369
5	39,579	0,372
6	39,619	0,369
7	39,536	0,367
8	39,582	0,370
9	39,646	0,371
10	39,560	0,370

Tabella 12: Misurazione di OD con selezione automatica su immagine digitale

Area cm ²	OD
36,651	0,339

Media Aritmetica	0,370
Deviazione Standard	0,001
Coefficiente di Variazione (%)	0,404229

Tabella 13: Misurazioni di OD con selezione manuale su immagine digitalizzata

n. misura	Area cm ²	OD
1	27,775	0,475
2	27,551	0,47
3	27,673	0,472
4	27,652	0,471
5	27,593	0,47
6	27,846	0,474
7	27,521	0,469
8	27,539	0,47
9	27,699	0,474
10	27,545	0,47

Media Aritmetica	0,4715
Deviazione Standard	0,002121
Coefficiente di Variazione (%)	0,449909

Tabella 14: Misurazione di OD con selezione automatica su immagine digitalizzata

Area cm ²	OD
26,512	0,448

Riassumendo, i valori del coefficiente di variazione ottenuti calcolando il MGV sono nell'ordine dello 0,1%, quelli ottenuti calcolando la OD sono nell'ordine dello 0,4%.

Tale differenza non sorprende, in quanto il coefficiente di variazione dipende fortemente dal range di valori delle misure ottenute, ovvero dalla loro media (Albanese e Passariello, 2009).

Si può affermare che il metodo è preciso poichè il coefficiente di variazione è inferiore allo 0,5% in entrambi i casi.

5.2 Valutazione della accuratezza del metodo

Un'altra causa di variabilità di un esperimento è la mancanza di uniformità nel modo in cui questo viene materialmente eseguito. Un esperimento condotto in modo uniforme, ovvero effettuato applicando sempre allo stesso modo le tecniche necessarie per ottenere i risultati, viene definito accurato.

L'accuratezza può essere definita come la concordanza delle osservazioni sperimentali con il dato reale (Camussi *et al.*, 1995).

Il fine che ci si propone è di ottenere dai valori campionari indicazioni quanto più precise possibili circa il vero valore delle quantità ignote, stime quanto più possibile vicine ai parametri cercati, senza peraltro pretendere di poterne conoscere esattamente il reale valore numerico (Camussi *et al.*, 1995).

La forza di associazione tra due variabili X e Y, indipendentemente dalle loro unità di misura, è indicata come coefficiente di correlazione.

Il coefficiente di correlazione tra due variabili viene determinato a partire dalla covarianza e dalle varianze delle due variabili, secondo la formula seguente:

$$\text{Corr}(X, Y) = \frac{S_{XY}}{S_X S_Y} = r_{XY}$$

È stato calcolato il coefficiente di correlazione tra i valori di BMD ed MGV ottenuti dalla misurazione effettuata sulle pellicole radiografiche digitalizzate di 22 metatarsi bovini, così come tra i valori ottenuti dalle radiografie digitali di 17 sezioni di femore equino. I risultati sono i seguenti:

- coeff. di correlazione riferito ai dati della tabella 3 (radiologia tradizionale): 0,91

- coeff. di correlazione riferito ai dati della tabella 4 (radiologia digitale): 0,93

È evidente che la radiologia digitale determina un grado di correlazione maggiore.

Nei grafici 1 e 2 vengono rappresentati i dati riferiti rispettivamente alle tabelle 3 e 4.

I valori di MGV sono indicati divisi per 100 per motivi grafici.

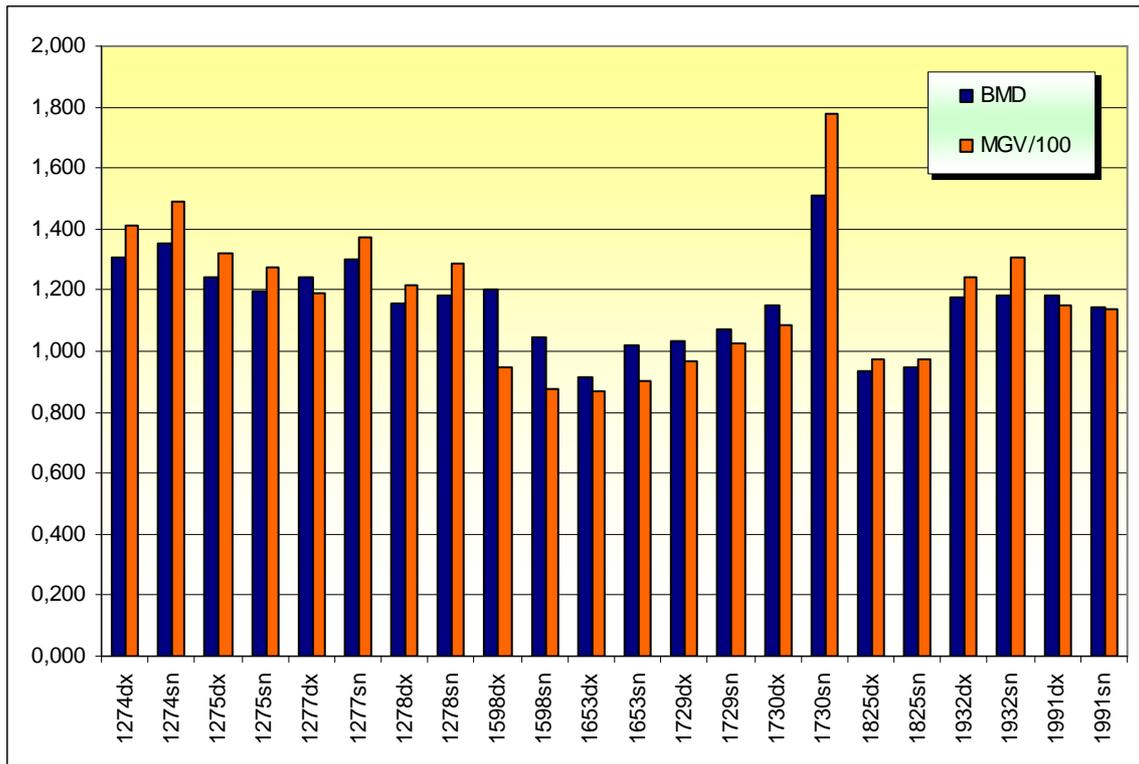


Grafico 1: rappresentazione dei dati di BMD e MG/100 della tabella 3

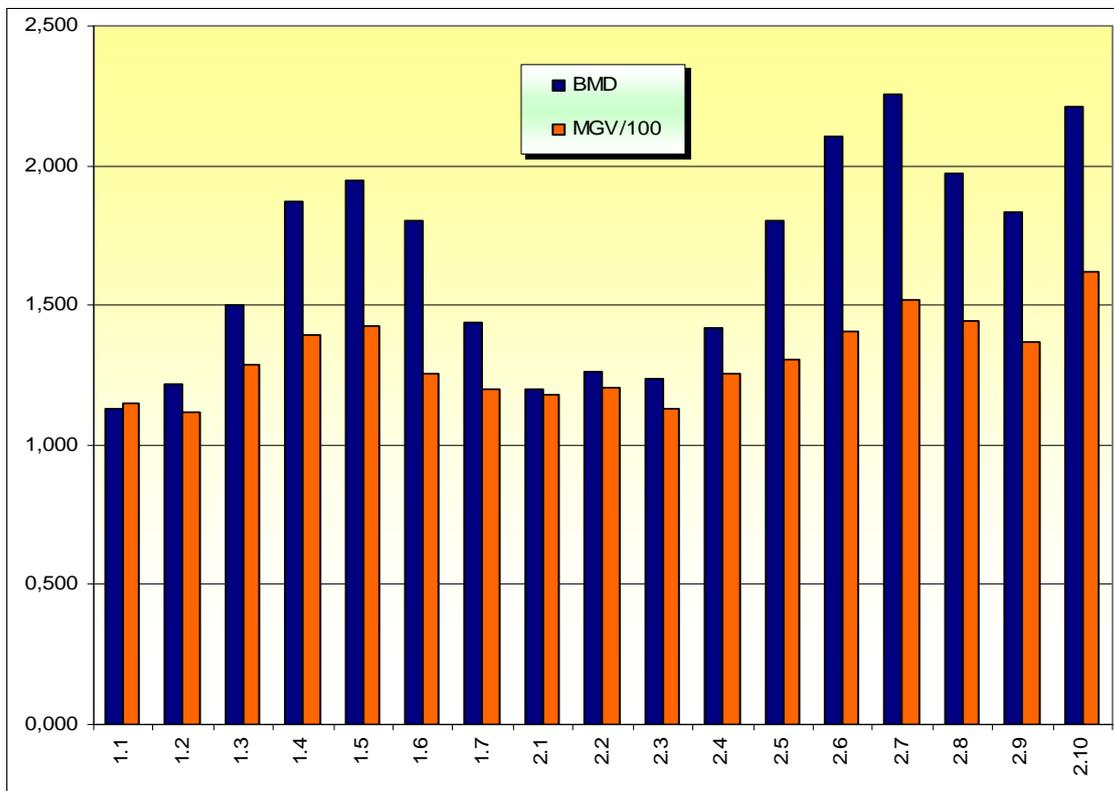


Grafico 2: rappresentazione dei dati di BMD e MG/100 della tabella 4

Analogamente a quanto eseguito per il MGV, si è considerato il coefficiente di correlazione tra BMD e OD. I risultati sono i seguenti:

- coeff. di correlazione riferito ai dati della tabella 5 (radiologia digitale): -0,93
- coeff. di correlazione riferito ai dati della tabella 6 (radiologia tradizionale): -0,91

Anche in questo caso, sebbene in senso assoluto, la radiologia digitale determina un grado di correlazione maggiore. La correlazione è ovviamente negativa, in quanto il densitometro a raggi X misura (come trattato nel paragrafo 1.1) la densità del tessuto analizzato, ovvero il grado di assorbimento dell'energia delle radiazioni da parte dell'osso, invece ImageJ misura il grado di densità ottica dell'immagine, ovvero il grado di assorbimento dell'energia delle radiazioni da parte dell'immagine radiografica (come visto nei paragrafi 3.2 e 4.6).

Nei grafici 3 e 4 e vengono rappresentati i dati riferiti rispettivamente alle tabelle 5 e 6.

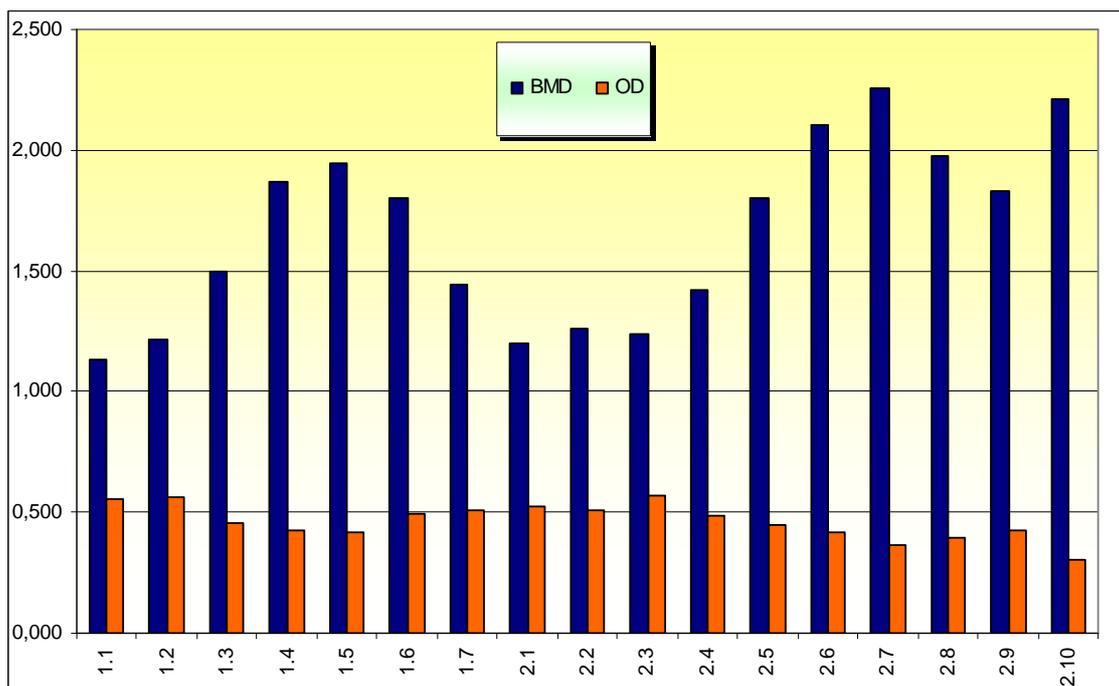


Grafico 3: rappresentazione dei dati di BMD e OD della tabella 5

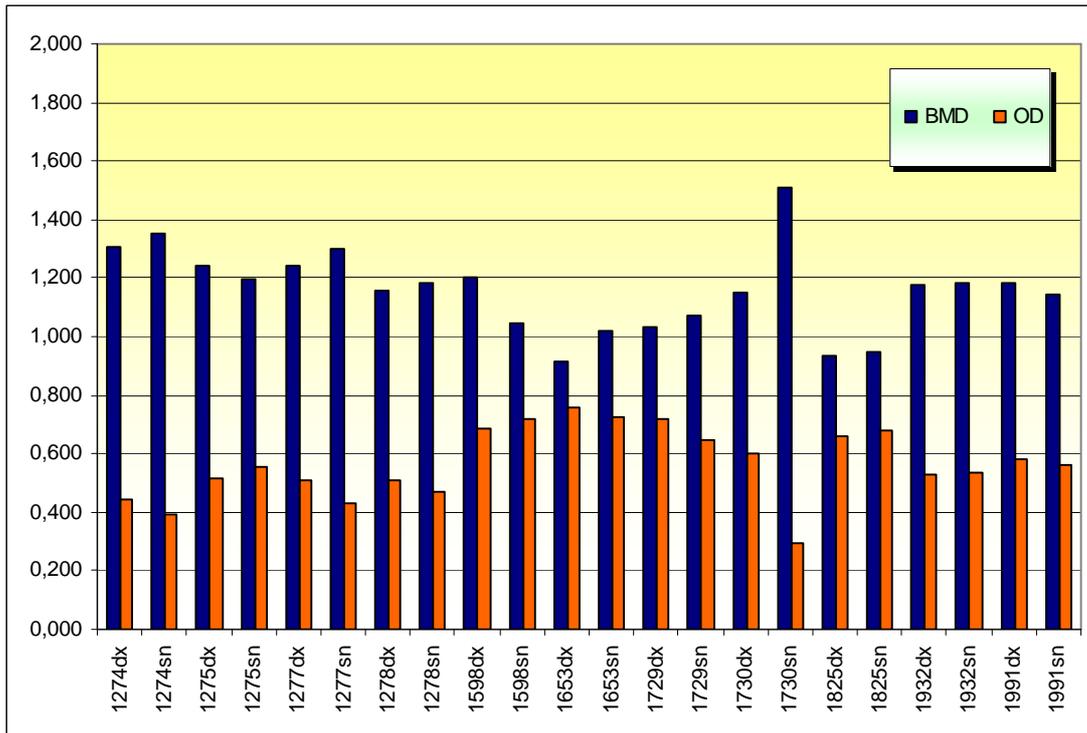


Grafico 4: rappresentazione dei dati di BMD e OD della tabella 6

6 Conclusioni

Ci siamo prefissi l'obiettivo di trovare un metodo pratico ed economico per valutare il grado di mineralizzazione del tessuto osseo senza ricorrere all'utilizzo del densitometro a raggi X, apparecchiatura specifica per questo genere di analisi.

Per l'applicazione di questo metodo si richiede la disponibilità di un personal computer e di un apparecchio radiologico digitale o tradizionale. In quest'ultimo caso è necessario digitalizzare la pellicola radiografica, utilizzando uno scanner per pellicole o una fotocamera digitale.

Il metodo si è rivelato preciso, in quanto il suo coefficiente di variazione è inferiore allo 0,5% ed anche accurato, stando all'indice di correlazione (espresso come valore assoluto) di 0,91 nel caso delle pellicole digitalizzate (da apparato radiologico tradizionale) e 0,93 nel caso delle immagini digitali (da apparato radiologico digitale). Abbiamo già avuto modo di esaminare, nel paragrafo 3.1, i vari fattori esterni che possono incidere sulle caratteristiche dell'immagine, in particolar modo nella radiologia tradizionale.

Il fatto che le radiografie digitali abbiano determinato una correlazione maggiore, dipende probabilmente dal minor numero di passaggi necessari ad ottenere l'immagine e quindi alla riduzione di possibili fattori in grado di influire sulle caratteristiche dell'immagine finale.

Non sarebbe azzardato, a questo punto, ipotizzare di ottenere una correlazione ancora più alta utilizzando un sistema di tipo digitale diretto, i comunemente detti DR.

Visti comunque i risultati incoraggianti, possiamo concludere che il MGV, misurato con questo metodo come tale, o espresso dopo opportuna calibrazione del sistema come OD, può essere considerato un parametro attendibile in tutti i casi in cui si richieda un saggio del livello di mineralizzazione dell'osso.

È essenziale che le immagini radiografiche siano ottenute a parità di condizioni, cioè applicando le medesime regolazioni della sorgente radiogena per limitare qualsiasi variazione artificiosa e indesiderata delle proiezioni radiografiche.

Al pari di un qualsiasi parametro laboratoristico, il MGV, in medicina veterinaria, può trovare il suo campo di applicazione ideale nel follow-up di pazienti a intervalli temporali regolari, permettendo di osservare eventuali variazioni di mineralizzazione

ossea, in senso positivo o negativo, in una ben delimitata porzione anatomica e di fornire quindi un indirizzo diagnostico.

7 Bibliografia

Albanese C.V., Passariello R. Osteoporosi e malattie metaboliche dell'osso. Seconda edizione. 2009. Springer, Trento, p. 469.

Aleksyniene R., Thomsen J.S., Eckardt H., Bundgaard K.G., Lind M., Hvid I. 2009. Parathyroid hormone PTH(1-34) increases the volume, mineral content, and mechanical properties of regenerated mineralizing tissue after distraction osteogenesis in rabbits. *Acta Orthopaedica*; 80(6):716-23.

Ambu E. 2003. Manuale illustrato di endodonzia. Milano: Masson, p. 28.

Ball J., Price T. 1995. Chesneys' radiographic imaging. Sesta edizione. Oxford: Blackwell science, pp. 48-50.

Barger A.M., Fan T.M., de Lorimier L.P., Sprandel I.T., O'Dell-Anderson K. 2007. Expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) in neoplasms of dogs and cats. *Journal Veterinary of Internal Medicine*; 21(1):133-40.

Butti C., Corain L., Cozzi B., Podestà M., Pirone A., Affronte M., Zotti A. 2007. Age estimation in the Mediterranean bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu 1821) by bone density of the thoracic limb. *Journal of Anatomy*; Vol 211, Issue 5, pp. 639–646.

Camussi A., Moller F., Ottaviano E., Sari-Gorla M. 1995. Metodi statistici per la sperimentazione biologica. Bologna: Zanichelli, pp. 51, 211.

Carstanjen B., Duboeuf F., Detilleux J., Lepage O.M. 2003. Equine third metacarpal bone assessment by quantitative ultrasound and dual energy X-ray absorptiometry: an ex vivo study. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*; 50(1):42-7.

- Dimopoulou M., Kirpensteijn J., Nielsen D.H., Buelund L., Hansen M.S. 2010. Nutritional secondary hyperparathyroidism in two cats: evaluation of bone mineral density with dual-energy X-ray absorptiometry and computed tomography. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology*; 23(1):56-61.
- Donabedian M., Delguste C., Perona G., Lebecque P., Duboeuf F., Lepaga O., Martin-Rosset W. 2005. Third metacarpal bone mineral density assessment in the standing horse by dual X-ray absorptiometry: suitability, precision and accuracy. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology*; 18(1):26-30.
- Ehrhart N., Eurell J.A., Tommasini M., Constable P.D., Johnson A.L., Feretti A. 2002. Effect of cisplatin on bone transport osteogenesis in dogs. *American Journal of Veterinary Research*; 63(5):703-11.
- Ellingsen-Husebye E., Lyberg T., Madsen J.E., Nordsletten L., Røise O. 2009. The early effects of intramedullary reaming of the femur on bone mineral density; an experimental study in pigs. *Scandinavian Journal of Surgery*; 98(3):189-94.
- Ettinger S.J., Feldman E.C. Clinica medica veterinaria. Malattie del cane e del gatto. 2007. Sesta edizione. Milano: Elsevier, p. 524.
- Fledelius B., Jørgensen G.W., Jensen H.E., Brimer L. 2005. Influence of the calcium content of the diet offered to leopard tortoises (*Geochelone pardalis*). *Veterinary Record*; 156(26):831-5.
- Gossellin J., Peachey S., Sherington J., Rowan T.G., Sunderland S.J. 2007 Evaluation of dirloptapide for sustained weight loss in overweight Labrador retrievers. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*; 30 suppl 1: 55-65.
- Guarda F., Mandelli G. 2002. Trattato di anatomia patologica veterinaria. Terza edizione. Milano: Utet, p.117.

- Guglielmini C., Zotti A., Bernardini D., Pietra M., Podestá M., Cozzi B. 2002. Bone density of the arm and forearm as an age indicator in specimens of stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *The Anatomical Record*, vol 267, num 3, pp. 225–230.
- Haristoy R.A., Valiyaparambil J.V., Mallya S.M. 2009. Correlation of CBCT Gray Scale Values with Bone Densities. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*; 107(4): e28.
- Hernandez-Divers S.J. 2006. Reptile Radiology Techniques, Tips and Pathology. *North American Veterinary Conference*, 7/01/2006.
- Hewitt J.D., Harrelson J.M., Dailiana Z., Guilak F., Fink C. 2005. The effect of intermittent pneumatic compression on fracture healing. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*; 19(6):371-6.
- Ikeda S., Morishita Y., Tsutsumi H., Ito M., Shiraishi A., Arita S., Akahoshi S., Narusawa K., Nakamura T. 2003. Reductions in bone turnover, mineral, and structure associated with mechanical properties of lumbar vertebra and femur in glucocorticoid-treated growing minipigs. *Bone*; 33(5):779-87.
- Jergas M., Uffmann M., Escher H., Glüer C.C., Young K.C., Grampp S., Köster O., Genant H.K. 1994. Interobserver variation in the detection of osteopenia by radiography and comparison with dual X-ray absorptiometry of the lumbar spine. *Skeletal Radiology*; 23(3):195-9.
- Johnson S. 2006. Stephen Johnson on digital photography. O'Reilly Media, Italia, pp. 7, 62-63.
- Lees G.E., Sautter J.H. 1979. Anemia and osteopetrosis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 175(8):820-4.
- Mader D. 2007. How I Treat Metabolic Bone Diseases in Reptiles. *Proceedings of the Southern European Veterinary Conference & Congreso Nacional AVEPA*, Barcelona, 11-14/4/ 2007.

Mah P, McDavid W.D. 2008. Conversion of CBCT Gray Levels to Hounsfield Units. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*; 105(4): e56.

Mazzaferro E.M., Hackett T.B., Stein T.P., Ogilvie G.K., Wingfield W.E., Walton J., Turner A.S., Fettman M.J. 2001. Metabolic alterations in dogs with osteosarcoma. *American Journal of Veterinary Research*; 62(8):1234-9.

Morgan J.P. 1999. Radiology of veterinary orthopedics: features of diagnosis. Wiley-Blackwell, p. 79.

Neri E., Marcheschi P., Caramella D. 2008. Produrre ed elaborare immagini diagnostiche. Springer, Milano, pp. 3-8.

Nielsen B.D., Waite K.L., Bell R.A., Rosenstein D.S. 2000. Long term pasture housing promotes bone mineral deposition in the third metacarpus of previously stalled wanlings. *Proceedings of conference on equine sports medicine and science-CE-SMAS*, 14-16/05/2000, Taormina (I). Arno Lindner ed. Essen, pp.157-159.

Pagani S., Duranti M. 1998. Enzimologia: dai fondamenti alle applicazioni. Padova. Piccin, p. 237.

Pellegrini P. 1998. Semeiotica reumatologica. Padova: Piccin, volume 5, p. 3230.

Porr C.A.S., Kronfeld D.S., Lawrence L.A., Pleasant R.S., Harris P.A. 2000. Diet and conditioning influence bone development. *Equine Practice*; 22 (5):18-21.

Pouilles J.M., Collard P., Tremollieres F., Frayssinet P., Railhac J.J., Cahuzac J.P., Autefage A., Ribot C. 2000. Accuracy and precision of in vivo bone mineral measurements in sheep using dual-energy X-ray absorptiometry. *Calcified Tissue International*; 66(1):70-3.

- Prokop M., Galanski M. 2008. Tomografia computerizzata spirale e multistrato. Vicenza: Elsevier, p. 5.
- Rohde C., Anderson D.E., Bertone A.L., Weisbrode S.E. 2000. Effects of phenylbutazone on bone activity and formation in horses. *American Journal of Veterinary Research*; 61(5):537-43.
- Rosati P., Colombo R. 2003. I tessuti. Milano: Edi-Ermes, pp. 175-176.
- Secor S.M., Nagy T.R. 2003. Non-invasive measure of body composition of snakes using dual-energy X-ray absorptiometry. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*; 136(2):379-89.
- Shapiro H.M. 1995. Practical flow cytometry. New Jersey: John Wiley and Sons, p.111.
- Sodikoff C.H. Medicina di laboratorio del cane e del gatto. 2001. Seconda edizione italiana. Milano: Elsevier, p. 214.
- Sternadel L.L., Packard G.C., Packard M.J. 2006. Influence of the nest environment on bone mineral content in hatchling painted turtles (*Chrysemys picta*). *Physiological and Biochemical Zoology*; 79(6):1069-81.
- Sumner-Smith G. 2002. Bone in clinical orthopedics. Seconda edizione. Donauwörth: Thieme pp. 52-54.
- Swenson M.J., Reece W.O. Dukes' physiology of domestic animal. 2002. Undicesima edizione. Idelson-Gnocchi, pp. 598-602.
- Theyse L.F., Mol J.A., Voorhout G., Terlouw M., Hazewinkel H.A. 2006. The efficacy of the bone markers osteocalcin and the carboxyterminal cross-linked telopeptide of type-I collagen in evaluating osteogenesis in a canine crural lengthening model. *Veterinary Journal*; 171(3):525-31.

Toque J.A., Herliansyah M.K., Hamdi M., Ide-Ektessabi A., Wildman M.W. 2006. The effect of sample preparation and calcination temperature on the production of hydroxyapatite from bovine bone powders. *Third Kuala Lumpur International Conference on Biomedical Engineering*, 11-14/12/2006, Malaysia. Berlin: Springer, p.152.

Tsujio M., Mizorogi T., Kitamura I., Maeda Y., Nishijima K., Kuwara S., Ohno T., Niida S., Nagaya M., Saito R., Tanaka S. 2009. Bone mineral analysis through dual energy X-ray absorptiometry in laboratory animals. *Journal of Veterinary Medical Science*; 71(11):1493-7.

Van Vechten B.J., Vasseur P.B. 1993. Complications of middiaphyseal radial ostectomy performed for treatment of premature closure of the distal radial physis in two dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 202(1):97-100.

Verbalis J.G., Barsony J., Sugimura Y., Tian Y., Adams D.J., Carter E.A., Resnick H.E. 2010. Hyponatremia-induced osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*; 25(3):554-63.

Vezzoni A., Schramme M. 2004. *Proceedings of 12th ESVOT congress*. 10-12/09/2004, Munich (Germany), p.17.

Zotti A., Poggi R., Cozzi B. 2009. Exceptional bone density DXA values of the rostrum of a deep-diving marine mammal: a new technical insight in the adaptation of bone to aquatic life. *Skeletal Radiology*; volume 38, number 12, pp. 1123-1125.

Zotti A., Selleri P., Carnier P., Morgante M., Bernardini D. 2004. Relationship between metabolic bone disease and bone mineral density measured by dual-energy X-ray absorptiometry in the green iguana (*Iguana iguana*). *Veterinary & Radiology Ultrasound*; 45(1):10-6.

Zotti A., Tacchio G., Morgante M. 2001. Densitometria ossea computerizzata, stato dell'arte e prospettive future. *Obiettivi & documenti veterinari XXII* (6):57-65.

8 Webgrafia

<<http://rsbweb.nih.gov/ij/>>

<<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/index.html>>

<<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/intro.html>>

<<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/menus/analyze.html#set>>

<<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/tools.html>>

< <http://www.sun.com/java/>>

Nessi R, <<http://www.sirm.org/it/principi/61-i-principi-fisici-della-radiologia>>

Vivino M, <<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/more-docs/Engineering/ImgEngr.html>>

Ringraziamenti

Il mio primo ringraziamento va al Dottor Alessandro Zotti, che ha creduto in me e mi ha dato l'opportunità di seguire questo particolare studio che spazia dall'imaging all'informatica in modo coinvolgente.

Inscindibilmente ringrazio il Dottor Calogero Vaccaro per il grande aiuto tecnico in generale, i consigli e le idee.

Desidero ringraziare i tecnici Emanuele Zanetti e Giuseppe Palmisano per la loro infinita disponibilità.

I miei ringraziamenti vanno ai miei genitori e ai miei fratelli, che mi hanno sempre dato un motivo per non mollare, per crescere...

Ringrazio mia zia Francesca che con sagge parole sa colmare anche i vuoti più grandi.

Un sincero grazie ai miei amici di sempre, Nicola e Matteo.

Grazie a tutti coloro che mi hanno accompagnato in questi anni universitari, in modo speciale ad Arianna, Serena e Tiziano.

Un grande grazie lo devo a Elisa e Caterina, per la loro amicizia e per essere state fonti inesauribili di appunti.

Ringrazio Luca per l'indimenticabile Erasmus insieme.

Ringrazio Elisa e Valerio e tutto lo staff del Centro Medico Equino, nella speranza che mi perdonino per non aver potuto inserire i dati pazientemente raccolti insieme.

Non posso non ringraziare la squadra rosa, che mi ha fatto vivere il miglior tirocinio possibile.

Un grazie che non è facile spiegare a parole lo dedico a Elena, per avermi donato il suo sorriso.