

**POLITECNICO DI TORINO**

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea in Ingegneria dei Materiali**

Tesi di Laurea Magistrale

**Caratterizzazione morfologica e meccanica  
di tessuto osseo trabecolare  
di teste omerali umane sane ed osteoporotiche**



**Relatore**

Prof.ssa Chiara Vitale Brovarone

**Candidato**

Dalpozzi Alessio

Novembre 2018



# Indice

|                                                                   |       |
|-------------------------------------------------------------------|-------|
| Introduzione                                                      | p. 5  |
| 1. Biologia del tessuto osseo                                     | p. 7  |
| 1.1. L'osso e le sue funzioni                                     | p. 7  |
| 1.2. Morfologia dell'osso                                         | p. 9  |
| 1.3. Osteogenesi, rimodellamento osseo e cellule ossee            | p. 11 |
| 1.3.1 Osteoclasti                                                 | p. 14 |
| 1.3.2 Osteoblasti                                                 | p. 15 |
| 1.3.3 Osteociti                                                   | p. 16 |
| 1.3.4 Cellule di rivestimento osseo                               | p. 17 |
| 1.3.5 Macrofagi del tessuto osseo                                 | p. 17 |
| 1.3.6 Cellule vascolari endoteliali                               | p. 18 |
| 1.3.7 Linfociti T e Linfociti B                                   | p. 19 |
| 2. Osteoporosi                                                    | p. 20 |
| 2.1 Fattori di regolazione del rimodellamento osseo e osteoporosi | p. 22 |
| 2.2 Basi ormonali dell'osteoporosi                                | p. 28 |
| 3. Caratterizzazioni ingegneristiche per l'analisi dell'osso      | p. 30 |
| 3.1 Microtomografia computerizzata                                | p. 30 |
| 3.2 Test di compressione uniassiale                               | p. 44 |
| 3.3 Nanoindentazione                                              | p. 49 |
| 3.4 Spettroscopia Raman                                           | p. 55 |

|                                     |       |
|-------------------------------------|-------|
| 4. Materiali e metodi               | p. 65 |
| 4.1 Analisi micro-CT                | p. 65 |
| 4.2 Test di compressione uniassiale | p. 70 |
| 4.3 Nanoindentazione                | p. 72 |
| 4.4 Analisi statistica              | p. 74 |
| <br>                                |       |
| 5. Risultati                        | p. 76 |
| 5.1 Analisi micro-CT                | p. 76 |
| 5.2 Test di compressione uniassiale | p. 80 |
| 5.3 Nanoindentazione                | p. 83 |
| 5.4 Analisi statistica              | p. 86 |
| <br>                                |       |
| 6. Discussione dei risultati        | p. 87 |
| <br>                                |       |
| 7. Conclusioni e sviluppi futuri    | p. 93 |
| <br>                                |       |
| 8. Riferimenti bibliografici        | p. 95 |
| <br>                                |       |
| Appendice I                         | p. 99 |
| <br>                                |       |
| Appendice II                        | p.100 |
| <br>                                |       |
| Appendice III                       | p.104 |
| <br>                                |       |
| Ringraziamenti                      | p.105 |

# Introduzione

L'osteoporosi (OP) è un disordine dell'apparato scheletrico responsabile ogni anno di un elevato numero di fratture nella popolazione anziana. L'invecchiamento è infatti associato sia ad una diminuzione della massa ossea corticale e trabecolare, sia ad una riduzione della sostituzione dei fosfati e degli idrossidi con i carbonati all'interno della matrice inorganica del tessuto osseo, con conseguente crescita eccessiva dei cristalli ed aumento indesiderato della fragilità.

Il rimodellamento osseo è un processo che dovrebbe, durante tutto l'arco di vita di un individuo, bilanciare il riassorbimento di tessuto da parte degli osteoclasti e la sua successiva riformazione ad opera degli osteoblasti, mantenendo inalterata la massa ossea al termine di ogni ciclo. L'avanzare dell'età e l'insorgenza dell'osteoporosi possono portare ad un disequilibrio in questo processo, causando una diminuzione della massa ossea ed una perdita dell'integrità strutturale del tessuto. Le fratture causate dall'osteoporosi sono, dunque, risultato di una sequenza di eventi microstrutturali.

La tesi, è stata svolta nell'ambito del progetto ERC BOOST, che si prefigge di trattare le fratture da osteoporosi tramite la realizzazione di uno *scaffold* biomimetico che stimoli, attraverso meccanismi chimici e fisici, le cellule ossee vecchie ad agire come quelle sane, restaurando in tal modo un equilibrio nel rimodellamento. Per comprendere quali siano i corretti stimoli da fornire a queste cellule occorre quindi studiare le proprietà del tessuto osseo. È infatti sulla caratterizzazione morfologica e meccanica di teste omerali umane sane ed osteoporotiche, sia alla macro che alla micro-scala, che si concentra questa tesi, evidenziando possibili variazioni legate all'osteoporosi e coinvolte nell'infragilimento osseo.

Nel primo capitolo della tesi, dopo aver brevemente introdotto le funzioni dell'osso ed i suoi costituenti principali, si analizzano l'osteogenesi, il rimodellamento osseo e le cellule maggiormente coinvolte nel mantenimento della funzionalità dell'apparato scheletrico.

Si esaminano, nel secondo capitolo, i legami tra i fattori di regolazione del rimodellamento osseo e l'insorgenza dell'osteoporosi, di cui vengono anche presentate le basi ormonali.

Nella terza sezione, sono quindi presentate le diverse tecniche ingegneristiche di analisi per la determinazione dei parametri morfologici, meccanici e chimici del tessuto osseo sia alla macro che alla micro scala, fornendo per ciascuna anche un'indicazione dei principali risultati ottenuti da altri gruppi di ricerca nei rispettivi campi di indagine. In particolare, negli ultimi anni si è imposta come di primaria importanza la microtomografia computerizzata o micro-CT, poiché consente di determinare in modo rapido e preciso i parametri morfologici dell'osso. Alla micro-CT si aggiungono i test di compressione, i quali permettono un confronto macroscopico fra vari tipi di tessuto osseo attraverso la simulazione dei carichi fisiologici. Per l'indagine del comportamento alla micro-scala, i ricercatori concordano nell'individuare nei test di nanoindentazione una tecnica analitica valida per la determinazione delle proprietà elastiche e di durezza dei campioni ossei. Infine, essendo le patologie del tessuto osseo strettamente connesse ad una alterazione della

chimica dello stesso, l'utilizzo della spettroscopia Raman costituisce un efficace metodo per l'analisi di tali variazioni.

Il quarto capitolo introduce i materiali ed i metodi utilizzati nello svolgimento delle analisi di laboratorio condotte per la caratterizzazione morfologica e meccanica di tessuto osseo trabecolare di teste omerali umane sane ed osteoporotiche. Si sono condotte analisi micro-CT, test di compressione e nanoindentazione su 53 biopsie di teste omerali appartenenti a soggetti sottoposti ad artroplastica della spalla di età compresa tra 54 e 85 anni, dividendole tra sane (H), sane vecchie (HO), osteopeniche (OPen) ed osteoporotiche (OP). È quindi stato studiato l'impatto di struttura e morfologia del tessuto sulle proprietà dell'osso trabecolare, analizzando le caratteristiche di quest'ultimo associate all'infragilimento osseo tramite una micro-CT ad elevata risoluzione, la SkyScan 1272. Secondo quanto riportato da altre ricerche, la qualità dell'osso dipende dalla struttura trabecolare a livello microscopico. Perciò, per ogni campione sono stati ottenuti parametri morfologici quali porosità, *structure model index* (SMI), grado di anisotropia (DA), spessore trabecolare (Tb.Th.), distanza intertrabecolare (Tb.Sp.), *bone e tissue mineral density* (BMD e TMD). La determinazione delle proprietà meccaniche dell'osso trabecolare è ugualmente necessaria al fine di un corretto differenziamento tra osso sano e osteoporotico. Per l'analisi delle caratteristiche macroscopiche, si sono effettuati test di compressione su 37 biopsie tramite un macchinario universale CRITERION C43.504 MTS. Per verificare le proprietà meccaniche alla micro-scala, altri 14 campioni, scelti fra quelli di dimensione inadatta per costituire un provino valido per i test di compressione, sono stati inglobati in resina epossidica e sottoposti ai test di nanoindentazione tramite l'Hysitron Ti950 Triboindenter equipaggiato con indentatore Berkovich.

Il quinto capitolo espone i risultati della ricerca, mentre nel sesto questi vengono interpretati con l'ausilio dell'analisi statistica. In particolare, vengono confrontati i parametri morfologici e densitometrici quali SMI, DA, Tb.Th, Tb.Sp, porosità percentuale, BMD e TMD sia fra loro sia con i parametri determinati dalle prove meccaniche micro e macroscopiche, Er, H,  $\sigma_{ult}$ . Condotta l'analisi di regressione lineare, per ogni confronto si sono calcolati coefficiente di correlazione e valore di significatività, indicato attraverso il *p-value*.

In conclusione, la tesi ha permesso di evidenziare, grazie all'utilizzo delle più recenti tecniche analitiche, le differenze morfologiche e meccaniche fra osso sano ed osteoporotico. I risultati emersi saranno essenziali per l'estrapolazione di un modello CAD che riproduca le caratteristiche strutturali dell'osso sano per la realizzazione, tramite stampa 3D, di uno *scaffold* biomimetico secondo quanto previsto negli obiettivi del progetto ERC BOOST.

# 1. Biologia del tessuto osseo

## 1.1 L'osso e le sue funzioni

Il sistema scheletrico ha un ruolo essenziale durante tutta l'esistenza di un individuo: regola l'omeostasi minerale, ospita gli elementi emopoietici, fornisce sostegno meccanico rendendo possibile il movimento e protegge gli organi interni [7]. Si tratta di un organo complesso, la cui omeostasi è regolata contemporaneamente a livello centrale ed a livello locale in accordo alla legge di Wolff secondo cui l'osso si rimodella in funzione degli sforzi a cui è sottoposto [61]. Inoltre, l'osso è soggetto ad un continuo rinnovamento lungo tutto l'arco della vita dell'individuo al fine di mantenere la propria funzionalità e solidità.

Le ossa sono dotate di consistenza solida ad elevata resistenza meccanica, posseggono varia forma e volume, e hanno colore bianco o giallastro. Morfologicamente si suddividono in tre gruppi: ossa lunghe, ossa piatte ed ossa brevi [3].

Le ossa lunghe presentano una delle tre dimensioni superiore rispetto alle altre, si trovano soprattutto negli arti e posseggono un corpo centrale e due estremità. Il corpo, detto diafisi, è perlopiù prismatico e triangolare e presenta al suo interno il canale midollare. Le parti terminali, o epifisi, sono generalmente più voluminose del corpo e posseggono una o più superfici lisce deputate all'articolazione con le ossa vicine. Le epifisi sono distinte in prossimali o distali in base alla loro vicinanza al cingolo articolare, che connette l'osso al tronco assile. Il tratto osseo compreso tra diafisi ed epifisi viene detto metafisi.

Nelle ossa lunghe le epifisi sono formate quasi esclusivamente da tessuto spugnoso mentre le diafisi sono formate prevalentemente da tessuto compatto (Fig. 1.1). Nel canale centrale delle ossa lunghe si trova una cavità longitudinale, detta canale midollare, atta ad accogliere il midollo osseo, sostanza di consistenza polposa che si trova anche nelle porosità del tessuto spugnoso. Se nel feto e nel bambino il midollo è quasi interamente adibito a funzione emopoietica e si dice quindi midollo rosso, nell'adulto viene pressoché del tutto sostituito da matrice grassa, midollo giallo, mentre permane midollo rosso nel corpo delle vertebre e nella cresta iliaca [3].

Le ossa piatte, in cui lunghezza e larghezza prevalgono sullo spessore, sono costituite da due lamine di tessuto compatto all'interno del quale è presente uno strato più o meno consistente di tessuto spugnoso.

Le ossa brevi si estendono in ugual misura nelle tre dimensioni e sono costituite da una massa centrale di tessuto spugnoso circondata da uno strato sottile di tessuto compatto.

Tutte le ossa sono avvolte in superficie dal periostio, membrana connettivale fibrosa molto vascolarizzata e innervata. Il periostio si ancora al sottostante tessuto osseo tramite fasci connettivi di derivazione tendinea, detti fibre di Sharpey.

La funzione del periostio assume un'evidenza considerevole durante il periodo di ossificazione, nel quale diviene la membrana nutritiva dell'osso in crescita, fornendo i vasi sanguigni ed i materiali necessari alla nutrizione delle ossa. Il suo spessore è molto variabile, tuttavia generalmente proporzionato alla dimensione dell'osso. Il periostio avvolge quasi

tutta la superficie esterna delle ossa tranne in corrispondenza dei grossi tendini, dei legamenti e delle parti rivestite dalle cartilagini articolari, in corrispondenza delle quali si confonde con la capsula fibrosa dell'articolazione.

La sostanza ossea propriamente detta è di colorito biancastro e di consistenza legnosa e si dispone in due diverse strutture: il tessuto osseo compatto ed il tessuto osseo spugnoso.

Il tessuto compatto costituisce circa l'80% della massa ossea di un individuo maturo, ha minor rateo di *turnover* e fornisce resistenza alla torsione [43]. L'osso corticale è costituito da lamelle ossee saldate da sostanza cementante. La lamella ossea è formata da fibrille di collagene parallele sovrapposte concentricamente su più strati e da una sostanza amorfa. La sostanza amorfa è in parte organica (osseina e osteomucoide) e in parte inorganica (prevalentemente fosfato di calcio e carbonato di calcio). Nell'adulto le lamelle si organizzano in osteoni, cilindri ossei consolidati intorno ad un canale centrale contenente un vaso sanguigno, detto canale di Havers. Negli spazi fra gli osteoni del tessuto osseo compatto si individua la breccia, ovvero gruppi di lamelle parallele disposte irregolarmente [8]. Vari strati di lamelle sono inoltre presenti sulla superficie ossea a contatto con il periostio e con l'endostio completando la struttura corticale dell'osso. Quest'ultima è tale da permettere un'elevata vascolarizzazione del tessuto osseo rendendo possibile la nutrizione e l'innervazione del tessuto fino agli strati più profondi [8].

Il tessuto spugnoso è formato da lamine ossee unite fra loro a costruire un sistema di cavità interconnesse: si tratta dunque di un'architettura caratterizzata da elevata porosità che presenta un maggior rapporto superficie/volume ed ha elevata resistenza alla compressione. Le trabecole del tessuto spugnoso non presentano canali Haversiani in quanto la nutrizione avviene per diffusione dalle cavità midollari [8]. Le lamelle dell'osso trabecolare risultano orientate secondo le linee di pressione che si esercitano sull'osso, generando differenti architetture nelle ossa dello scheletro.

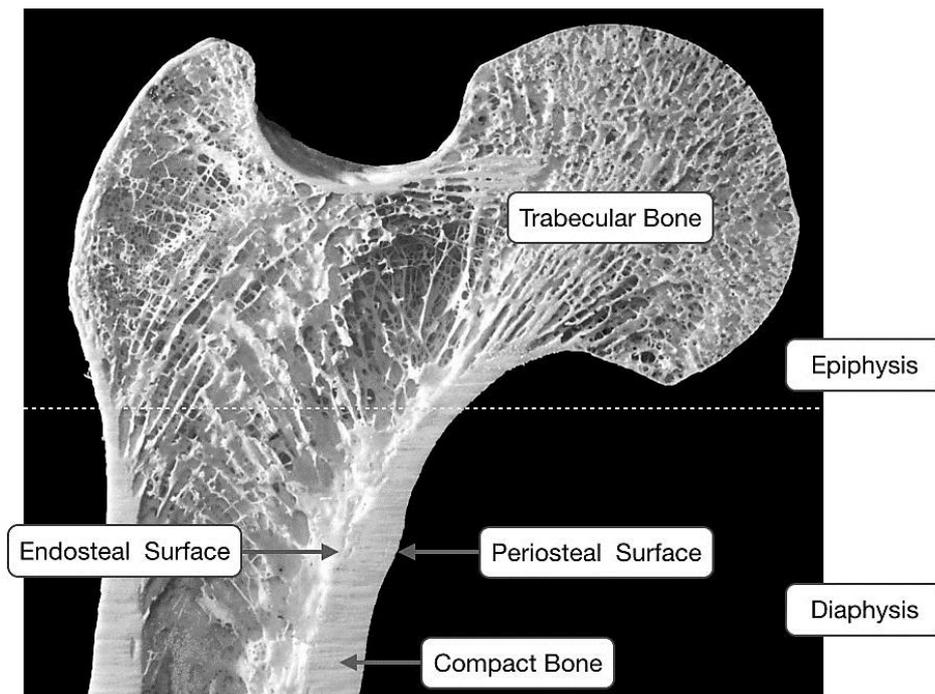


Figura 1.1. Sezione trasversale di testa femorale [63].

## 1.2 Morfologia dell'osso

L'osso è una tipologia altamente specializzata di tessuto connettivo composto da una matrice organica arricchita da cristalli inorganici e cellule osteogeniche. L'unità base dell'osso, *bone structural unit* (BSU), è formata da una struttura lamellare di strati sovrapposti di fibrille che differiscono per l'orientamento lungo l'asse principale (Fig. 1.2) [5]. Le lamelle longitudinali conferiscono resistenza alla trazione ad alla flessione, mentre le lamelle trasversali influenzano la resistenza a compressione [5].

L'osso lamellare è composto da una matrice organica e da una frazione mineralizzata. La matrice organica è costituita per circa il 90% da collagene di tipo I e fornisce alle ossa resistenza alla trazione. La frazione rimanente consiste in proteoglicani e proteine quali osteonectina, osteocalcina ed osteopontina [5, 7].

Il collagene di tipo I è costituito da due catene polipeptidiche del tipo  $\alpha 1$  ed una  $\alpha 2$  unite in una tripla elica. Le molecole sono assemblate in modo sfalsato in fibrille di lunghezza variabile, da alcune decine di nanometri fino anche al millimetro, e sono stabilizzate da legami inter-fibrillari [5, 60].

Nell'osso maturo i fasci di fibrille sono disposti parallelamente fra loro in ciascuna lamella, secondo una disposizione elicoidale rispetto all'asse dell'osteone. Ciascuna lamella, tuttavia, presenta un orientamento variabile così da assicurare la massima resistenza alla struttura dell'osso [60]. Nell'osteone, quindi, si alternano lamelle con andamento destrorso e con andamento sinistrorso, ognuna con una propria inclinazione.

La struttura di questo materiale ne determina la capacità di irrigidire le fibrille durante l'allungamento fino al carico di rottura e di allungarsi elasticamente sotto trazione grazie allo srotolamento delle molecole di collagene ed allo scorrimento intermolecolare [5].

I legami enzimatici intermolecolari stabilizzano il collagene e ne migliorano le caratteristiche meccaniche, mentre i legami non enzimatici sono associati ad un peggioramento delle sue proprietà meccaniche. I legami enzimatici sono formati tramite l'azione della lisil-ossidasi, che stabilisce legami molecolari divalenti agli estremi degli amminoacidi lisina. Nel tempo tali legami maturano, reagendo con i gruppi aldeidici ed instaurando un legame trivalente più rigido.

L'ammontare dei legami enzimatici e la frazione di legami immaturi influenzano le proprietà meccaniche dell'osso. All'aumentare del numero di legami maturi si osserva un aumento del carico di rottura ed una maggiore tenacità sotto carichi di compressione [5, 56]. Una diminuzione della tenacità per contro si ha laddove vi sia un accumulo degli *advanced glycation end product*. Risultanti da reazioni non enzimatiche di riduzione di uno zucchero, questi prodotti irrigidiscono il reticolo del collagene limitando lo scorrimento intermolecolare. Lo zucchero reagisce con i gruppi amminici liberi della lisina o dell'arginina presenti all'interno delle fibre di collagene creando dei legami in posizioni casuali [5, 43].

Le proteine di origine non collagenica, quali osteopontina, osteocalcina ed osteonectina, costituiscono il rimanente 10% della matrice organica. Queste proteine sono classificabili come proteine di adesione e contribuiscono alla tenacizzazione del tessuto osseo a livello

nanometrico, creando un collante fra il collagene e la fase minerale, fra le varie fibre di collagene e fra l'osso e le cellule ossee.

La fase minerale ossea è composta da cristalli di apatite non stechiometrica. I cristalli di apatite, sotto forma di piastrine di dimensione nanometrica, sono disposti in modo tale da formare colonne di lunghezza 50 - 150 nm immerse nella matrice organica. Il tipo principale di apatite presente all'interno del tessuto osseo è l'idrossiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) [5, 60].

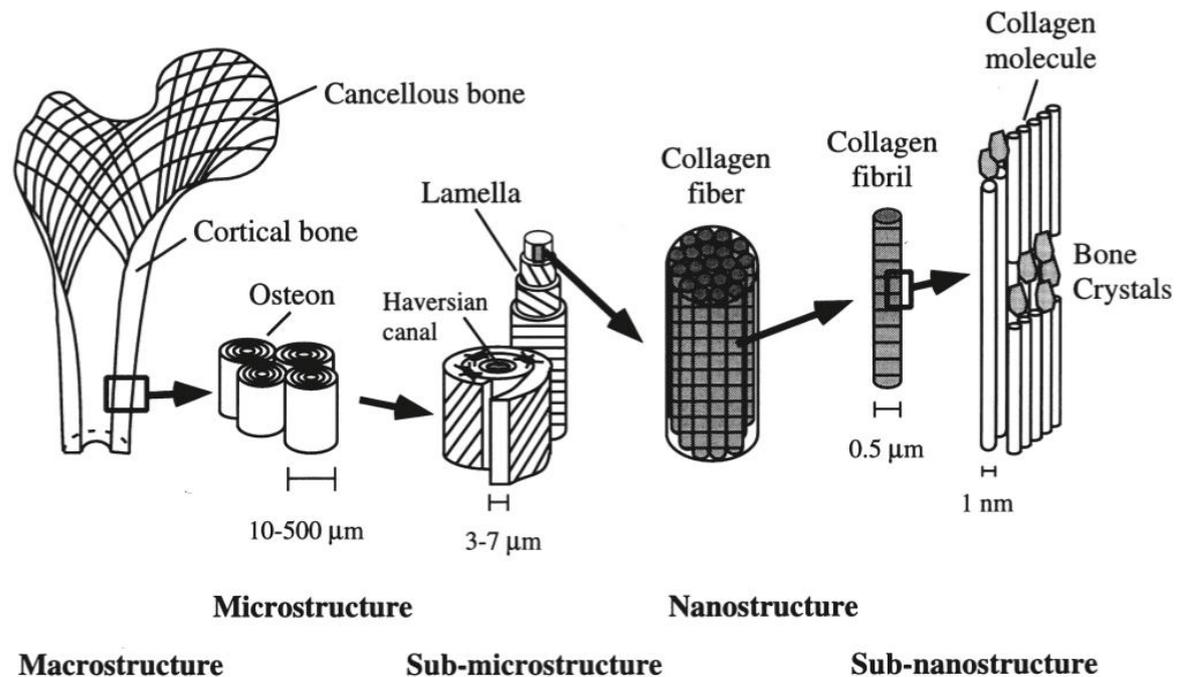


Figura 1.2. Organizzazione gerarchica della struttura ossea [53].

La mineralizzazione dell'osteotide avviene in due fasi: nei primi giorni si ha l'aumento del numero e delle dimensioni dei cristalli, fino a raggiungere il 70% della mineralizzazione massima [5]. Durante le prime fasi della mineralizzazione i cristalli sono orientati lungo l'asse delle fibrille di collagene: negli osteoni la rigidità sarà tanto più grande quanto più il collagene e la matrice minerale sono orientati lungo la direzione principale del carico [39].

A questa fase segue la lenta maturazione tramite una seconda mineralizzazione che può impiegare mesi o anni per giungere al termine. Il compito principale della fase minerale è di conferire all'osso la necessaria resistenza a compressione. La mineralizzazione incrementa anche la rigidità del tessuto, a discapito tuttavia della tenacità: aumentando la dimensione dei cristalli aumenta la superficie di interazione fra cristallo e collagene che limita la capacità di deformazione delle fibrille [5, 56].

Nell'osso umano il 20-25% della variazione delle proprietà meccaniche è influenzato dalla diversa cristallinità. Maggiore è la cristallinità più elevato sarà il modulo elastico, ma a discapito dell'allungamento a rottura [5, 42].

La mineralizzazione termina una volta raggiunto il 95% della quantità di contenuto minerale ospitabile dalla matrice organica [5]. L'interazione con gli ioni presenti nell'ambiente rende possibile la sostituzione nel reticolo cristallino dei gruppi fosfato o idrossido con carbonati, associati ad una riduzione della capacità di accrescimento dei cristalli. L'invecchiamento è associato ad una riduzione nella sostituzione dei fosfati e degli idrossidi con i carbonati, con una conseguente crescita eccessiva dei cristalli ed un aumento indesiderato della fragilità [5]. Con l'avanzare dell'età, infatti, l'apparato scheletrico è soggetto a rimodellamenti e rimaneggiamenti, ed il rateo di rimodellamento influenza la qualità del tessuto osseo determinando la dimensione degli osteoni ed il loro numero per unità di volume.

L'acqua ha un ruolo importante per la corretta fisiologia dell'osso: legata al collagene presente nella matrice, costituisce circa il 10-20% della massa dell'osso. A livello cristallino è presente un sottile strato di acqua che circonda l'apatite permettendo gli scambi fra il cristallo ed i fluidi extracellulari e consentendo la crescita del cristallo. La diminuzione del contenuto di acqua disponibile durante l'invecchiamento è associata ad una riduzione del diametro delle fibre ed alla perdita di tenacità. Inoltre, la diminuzione del contenuto di acqua fa anche sì che i cristalli siano di minor dimensione a causa della diminuzione della distanza reciproca [5].

### **1.3 Osteogenesi, rimodellamento osseo e cellule ossee**

Dopo aver brevemente introdotto le funzioni dell'osso ed i suoi costituenti principali, si analizzano l'osteogenesi, il rimodellamento osseo e le cellule maggiormente coinvolte nel mantenimento della funzionalità dell'apparato scheletrico.

L'osso si sviluppa sempre partendo da un abbozzo di tessuto connettivo embrionale, il mesenchima. Si conoscono due tipi di osteogenesi: intramembranosa ed endocondrale.

Nel primo tipo, anche detto ossificazione diretta, l'osso si forma direttamente da un tessuto connettivo primitivo per differenziamento delle cellule mesenchimali in osteoblasti.

Nell'ossificazione endocondrale, il tessuto osseo si forma partendo da tessuto osseo spugnoso immaturo, detto spongiosa primaria, successivamente sostituito dall'osso maturo [3, 35].

L'osteogenesi intramembranosa o mesenchimale interessa le ossa piatte della volta del cranio e parte del massiccio facciale. Nel mesenchima si osserva, oltre alla creazione di una rete capillare, un addensamento della matrice, la quale si arricchisce in fibronectina e collagene di tipo I in corrispondenza dei cosiddetti centri di ossificazione.

Alcuni elementi mesenchimali vanno quindi incontro a modificazioni citologiche trasformandosi in osteoblasti, i quali secernono una trama trabecolare omogenea e ricca di fibre di collagene detta matrice osteoide. Inizialmente priva di sali minerali, la matrice osteoide dopo breve tempo va incontro a mineralizzazione. Il successivo accrescimento delle trabecole ossee avviene esclusivamente per apposizione di nuovi strati di matrice osteoide a quelli formati in precedenza [3, 35].

Alcuni osteoblasti, intrappolati nella matrice neoformata, emettono prolungamenti citoplasmatici e vanno incontro alla differenziazione in osteociti. Simultaneamente, attorno alle trabecole di tessuto osseo in formazione, si differenziano nuovi osteoblasti a partire dalle cellule mesenchimali che continuano la creazione di nuovi strati di tessuto osseo, ispessendo ed allungando le trabecole che invadono il mesenchima circostante. Il tessuto osseo primitivo presenta fibre di collagene non orientate e non ancora raccolte in lamelle ed è poi sostituito, nel corso del successivo rimodellamento, da tessuto organizzato in lamelle che contengono fibre di collagene ordinate parallelamente tra loro [35].

Le trabecole in formazione tendono ad irradiarsi in modo centrifugo dai centri di ossificazione e il loro rimodellamento porta alla formazione di osso spugnoso o compatto di tipo lamellare [35]. Il mesenchima che circonda l'osso in accrescimento si condensa, quindi, per formare il periostio.

Le ossa della colonna vertebrale, del bacino e degli arti hanno origine da un abbozzo cartilagineo che serve da modello per il successivo sviluppo. Il processo di ossificazione di queste ossa prende il nome di osteogenesi condrale in quanto comprende sia un'ossificazione per sostituzione dall'interno dell'abbozzo cartilagineo, sia un'ossificazione a carico del pericondrio e successivamente del periostio [3, 35].

I due processi osteogenici procedono simultaneamente. Le cellule cartilaginee proliferano e depongono sali di calcio nella matrice, e vanno in seguito incontro ad apoptosi dando origine ad ampie cavità irregolari in cui la matrice residua viene riassorbita [35]. Le cavità formate dal riassorbimento della cartilagine vengono occupate da vasi provenienti dal pericondrio e da cellule mesenchimali le quali differenziano in osteoblasti, depositando nuova matrice ossea sulla matrice cartilaginea calcificata residua.

Durante l'accrescimento dell'osso le trabecole di cartilagine calcificata sono riassorbite dagli osteoclasti. La cartilagine ialina rimane solamente sulle superfici epifisarie dando origine alle cartilagini articolari ed alla giunzione fra epifisi e diafisi dove forma la piastra di crescita, permettendo alle ossa lunghe di estendersi durante la crescita [3, 35].

Contemporaneamente all'ossificazione, dal centro primario il pericondrio assume una funzione osteogenica estendendosi ed ispessendosi fino ad originare il periostio che continuerà ad avere una funzione osteogenica per tutta la durata dello sviluppo osseo.

L'osso è inizialmente formato da un reticolo tridimensionale di trabecole a fibre intrecciate che delimitano cavità irregolari occupate dai vasi sanguigni e da tessuto connettivo. Successivamente l'osso spugnoso primario è sostituito da osso compatto tramite un processo che va sotto il nome di rimodellamento osseo, il quale prevede il riassorbimento dell'osso precedente e la sua sostituzione con osso di neoformazione.

Il processo di rimodellamento non si arresta completato lo sviluppo dell'apparato scheletrico ma prosegue per tutta la vita dell'individuo, al fine di mantenere l'efficienza dell'osso nel tempo e permettere la regolazione dell'omeostasi minerale.

Il rimodellamento osseo è reso possibile dall'azione coordinata di una serie di cellule altamente specializzate che vanno a formare l'unità multicellulare base (BMU). La BMU

(Fig. 1.3) è composta dagli osteoclasti, il cui compito è quello di riassorbire l'osso, dagli osteoblasti che creano nuovo tessuto, dagli osteociti che ne regolano il funzionamento.

La struttura e la composizione della BMU variano in base alla sua localizzazione sull'osso trabecolare o sull'osso corticale. La BMU situata sull'osso trabecolare si presenta come un avvallamento che prende il nome di lacuna di Howship. Sull'osso corticale, invece, il sito di rimodellamento si presenta come un cono di taglio che penetra nell'osso, all'interno del quale viene depositato concentricamente nuovo tessuto da parte degli osteoblasti [21, 25].

In entrambe le tipologie la BMU è coperta da una struttura cellulare che delinea il compartimento di rimodellamento osseo (BRC). Il BRC definisce quindi l'area di rimodellamento in cui si ha stretto accoppiamento di osteoblasti ed osteoclasti [25].

La prima fase del ciclo di rimodellamento prevede il reclutamento dei precursori degli osteoclasti, la loro differenziazione in cellule mature, l'attivazione e il mantenimento del riassorbimento osseo.

L'evento iniziale è la formazione del compartimento di rimodellamento osseo, con la separazione delle cellule di rivestimento osseo dall'osso sottostante. Successivamente si ha l'adesione degli osteoclasti maturi alla matrice bersaglio attraverso recettori integrinici.

All'adesione segue la comparsa nella zona periferica del sincizio di una zona sigillante a stretto contatto con la matrice in cui sono presenti delle strutture puntiformi ricche di actina, i podosomi. I podosomi hanno il compito di isolare l'ambiente ventrale dell'osteoclasto in cui si svolgerà l'azione erosiva del tessuto osseo tramite l'acidificazione dello spazio extracellulare nella zona sigillante grazie al rilascio di HCl, che solubilizza l'idrossiapatite esponendo la componente organica della matrice alla degradazione enzimatica. La degradazione della matrice organica avviene attraverso il rilascio di una proteasi lisosomiale collagenolitica, la catepsina K [35].

La seconda fase del rimodellamento consiste nella generazione di nuovo tessuto. La superficie esposta dal riassorbimento viene preparata per la deposizione della nuova matrice ossea, si ha l'apoptosi degli osteoclasti e l'inizio del reclutamento degli osteoblasti. Il riassorbimento e la deposizione di nuovo osso avvengono quindi in parallelo, bilanciandosi.

La fase di formazione del tessuto osseo può essere suddivisa in due parti: la prima prevede la deposizione della matrice organica formata da collagene di tipo I, la seconda prevede la mineralizzazione dell'osteoida da parte degli osteoblasti.

La mineralizzazione, ovvero il processo in cui i cristalli di idrossiapatite sono depositati tra le fibre di collagene, è controllata dai livelli sistemici di calcio e fosfati. Terminata la mineralizzazione, gli osteoblasti vanno incontro ad apoptosi o si differenziano in cellule di rivestimento osseo e osteociti, i quali segnalano la fine del rimodellamento tramite la secrezione di antagonisti dell'osteogenesi [25, 51].

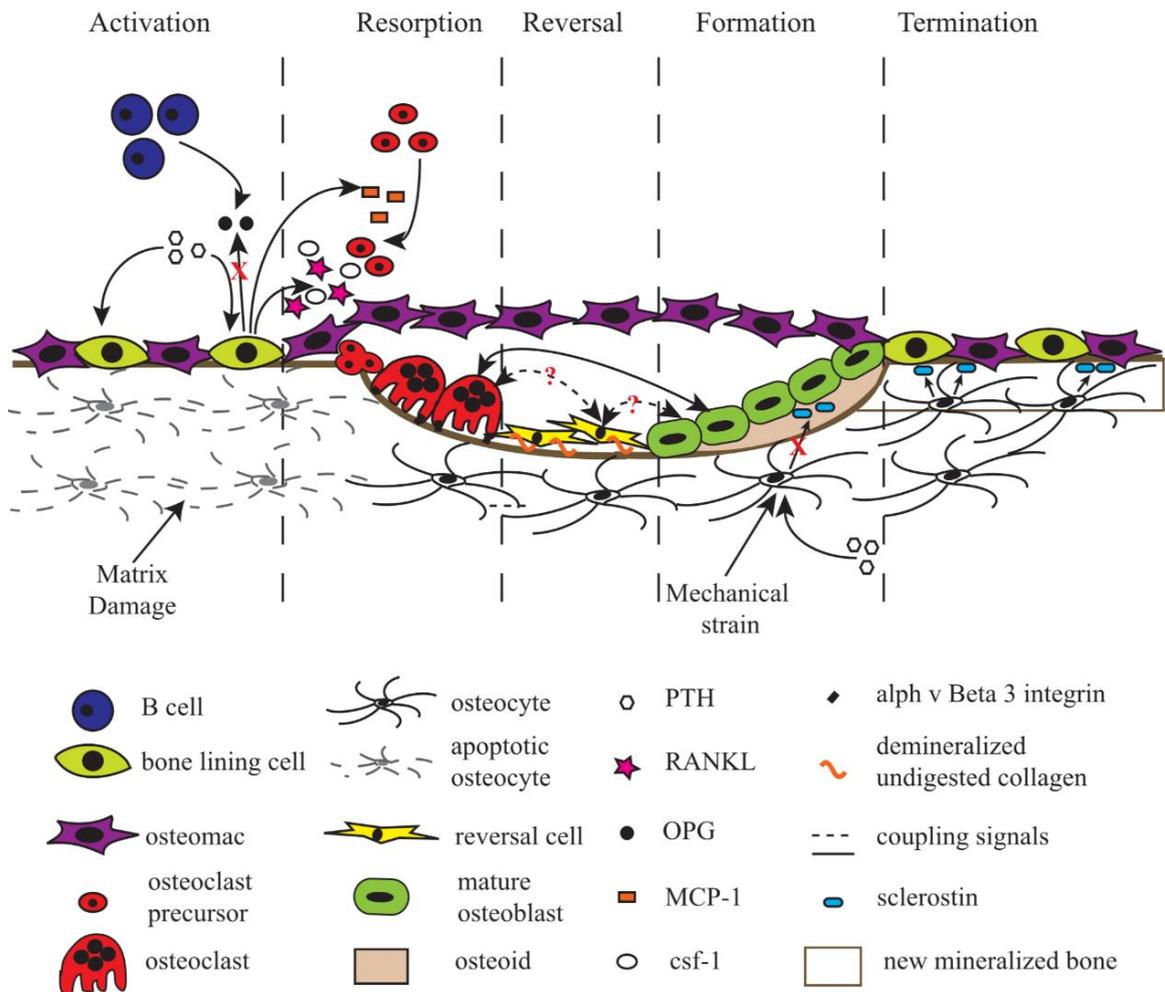


Figura 1.3. Rappresentazione schematica della BMU e del processo di rimodellamento osseo [51].

L'estensione del rimodellamento osseo varia in base alla sede, risultando più breve nell'osso corticale rispetto all'osso spugnoso. La durata media del rimodellamento dell'osso spugnoso è di circa 200 giorni dei quali la maggior parte risultano impiegati per la formazione del nuovo tessuto, essendo la generazione di tessuto osseo meno veloce rispetto al riassorbimento [21, 25].

### 1.3.1 Osteoclasti

Gli osteoclasti sono cellule giganti multinucleate formate dalla fusione di progenitori mononucleati della famiglia dei macrofagi. Situati sulla superficie endossea all'interno del canale Haversiano e sulla superficie periostale al di sotto del periostio, presentano due stadi di attività: una fase motile ed una fase di riassorbimento.

Durante la fase motile sono in grado di migrare dal midollo verso il sito di riassorbimento presentandosi come cellule appiattite non polarizzate. Una volta raggiunto il sito di riassorbimento si polarizzano attraverso una riorganizzazione del citoscheletro, dando origine a differenti zone della membrana: un bordo corrugato, una zona di tenuta, una zona

funzionale di secrezione [29, 51]. La zona di tenuta costituisce il sito specifico di riassorbimento del tessuto osseo operato tramite un ambiente acido.

Durante la fase di riassorbimento gli osteoclasti presentano una forma a cupola. Il differenziamento degli osteoclasti e la loro fusione in cellule multinucleate richiedono numerosi passaggi ed un elevato numero di fattori di regolazione osteoclastogenici. Le cellule staminali ematopoietiche originano i precursori degli osteoclasti sotto forma di cellule mononucleate. Queste cellule richiedono dei fattori di regolazione prodotti dalle cellule staminali del midollo, dagli osteoblasti o dai linfociti T per differenziarsi ulteriormente.

Alcuni dei fattori fondamentali all'osteoclastogenesi sono il *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) ed il *receptor for activation of nuclear factor kappa B* (RANK) *ligand* (RANKL) [29, 51].

L'M-CSF, prodotto dagli osteoblasti e dalle cellule staminali, risulta critico per la maturazione dei macrofagi e ne promuove la sopravvivenza e la proliferazione. Il RANKL, espresso dagli osteoblasti, dalle cellule T e dalle cellule endoteliali, è essenziale per la creazione degli osteoclasti e si lega al recettore RANK presente sui medesimi e sui loro precursori. Il RANKL fa sì che i precursori cellulari esprimano il fenotipo degli osteoclasti, inducendo così queste cellule ad esprimerne i *marker* principali. In seguito a successive stimolazioni i pre-osteoclasti si fondono per formare cellule multinucleate.

L'attività del RANKL può essere inibita dalla presenza dell'osteoprotegerina (OPG) impedendo il differenziamento degli osteoclasti [21]. L'OPG è prodotta dagli osteoblasti, il cui ruolo è quindi fondamentale nella regolazione del rateo di rimodellamento osseo. Anche se il ruolo del RANKL è stato dimostrato essere essenziale per la differenziazione degli osteoclasti, sono necessari dei percorsi di co-stimolazione per l'attuazione di questo processo [29, 51].

Nonostante la funzione primaria degli osteoclasti sia il riassorbimento dei tessuti, essi svolgono anche un ruolo nella regolazione della formazione di nuovo osso. Ciò è dovuto alla secrezione di fattori che regolano la formazione di nuovo osso o dalla diretta interazione con le cellule coinvolte nel rimodellamento. A questo metodo di regolazione si affianca quello della topografia della lacuna di riassorbimento.

### **1.3.2 Osteoblasti**

Gli osteoblasti originano dalle cellule staminali mesenchimali attraverso quattro stadi di maturazione: pre-osteoblasti, osteoblasti, osteociti e cellule di rivestimento osseo o *bone-lining cells* [29].

In presenza di un appropriato stimolo le cellule staminali mesenchimali si trasformano in pre-osteoblasti, istologicamente simili agli osteoblasti tuttavia ancora non in grado di produrre tessuto mineralizzato. L'evoluzione in osteoblasti può essere identificata dall'assunzione di una morfologia cuboidale e da un'elevata positività della fosfatasi alcalina. Queste cellule sono localizzate lungo la superficie dell'osso presso i siti attivi per

la formazione dell'osso. Gli osteoblasti secernono collagene di tipo I e proteine non collageniche quali osteocalcina e fosfatasi alcalina essenziali per la successiva mineralizzazione [29].

Gli osteoblasti maturi sono per il 50-70% soggetti ad apoptosi, mentre i rimanenti possono differenziarsi ulteriormente in osteociti o diventare cellule di rivestimento osseo.

La funzione primaria degli osteoblasti consiste nella formazione di tessuto osseo, che può avvenire attraverso due meccanismi distinti: ossificazione intramembranosa e ossificazione endocondrale [29, 51].

Oltre al loro ruolo nella formazione dell'osso, gli osteoblasti ricoprono un'importante funzione nello sviluppo degli osteoclasti in quanto depositano all'interno della matrice fattori che vengono successivamente rilasciati dagli osteoclasti durante il riassorbimento osseo o tramite interazioni cellula-cellula similmente a come gli osteoclasti contribuiscono alla regolazione degli osteoblasti. Gli osteoblasti producono M-CSF, RANKL e OPG, che si ricordano essere essenziali alla formazione ed al buon funzionamento degli osteoclasti [29].

Oltre a regolare il differenziamento degli osteoclasti, gli osteoblasti ne controllano il movimento tramite il rilascio di fattori chemiotattici: in particolare, l'osteocalcina e il collagene-I liberati dagli osteoclasti durante la fase di riassorbimento incrementano il reclutamento dei precursori degli osteoclasti nelle vicinanze del sito di riassorbimento. Concluso il ciclo di riformazione ossea, gli osteoblasti non destinati ad apoptosi possono diventare osteociti o cellule di rivestimento osseo.

### ***1.3.3 Osteociti***

Circa il 20% degli osteoblasti maturi si circonda di una matrice extracellulare, composta perlopiù da collagene di tipo I, formando così l'osteoido e differenziandosi in osteociti. In seguito alla mineralizzazione dell'osteoido gli osteociti risultano completamente circondati dal tessuto osseo. Il processo di inglobamento comporta la creazione di un sincizio di osteociti, altamente interconnessi ai loro vicini all'interno della matrice ossea e alle cellule sulla superficie tramite lunghi pseudopodi. Gli pseudopodi assicurano l'apporto di nutrienti dai vasi sanguigni verso gli osteociti e permettono la comunicazione fra le cellule grazie al passaggio delle molecole di segnalazione [50, 51].

Gli osteociti sono cellule di dimensioni minori rispetto agli osteoblasti e con un minor numero di organuli citoplasmatici. Queste cellule risiedono all'interno delle lacune ossee nella matrice di nuova formazione per lunghi periodi ed alla fine del loro ciclo vanno incontro ad apoptosi.

La funzione principale degli osteociti è il mantenimento della struttura ossea. Sono in grado, inoltre, di trasdurre i segnali muscoloscheletrici di origine meccanica derivanti dagli sforzi sostenuti dall'osso. Proprio grazie alla loro posizione all'interno della matrice ossea, infatti, gli osteociti hanno la capacità di percepire gli stimoli meccanici comportandosi da

trasduttori meccanici, e di segnalare alle cellule di rimodellamento, ossia osteoclasti ed osteoblasti, la necessità di intervenire [35].

Gli osteociti situati vicino ad un sito danneggiato sono sottoposti ad apoptosi, aumentando quindi la quantità di RANKL presente. Ciò contribuisce al reclutamento di nuovi osteoclasti per l'avvio del processo di riassorbimento osseo. Recenti studi hanno dimostrato come il RANKL derivato dagli osteociti sia fondamentale per il rimodellamento osseo, ne è un'evidenza l'insorgere di osteopetrosi in topi in cui è stata soppressa la trascrizione di RANKL negli osteociti [50].

Il RANKL può essere esposto sia sotto forma di soluto sia legato alla membrana. In particolare, è quest'ultima modalità di presentazione ad essere fondamentale per il differenziamento e l'attività degli osteoclasti, per cui sono gli osteociti più vicini alla superficie ad avere maggior rilevanza nel rimodellamento osseo.

Oltre al RANKL gli osteociti producono anche il suo soppressore, l'osteoprotegerina, che cattura il RANKL impedendone il legame al suo recettore RANK. Da questo risulta che il rapporto fra RANKL e osteoprotegerina è un indicatore della capacità di riassorbimento osseo [50].

Una proteina secreta dagli osteociti e ritenuta essere mediatore degli stimoli scheletrici è la sclerostina, che sembra essere essenziale nella risposta dell'osso alla riduzione dello stimolo meccanico. Si ipotizza che la sclerostina si sposti attraverso la rete formata dagli osteociti fino a raggiungere la superficie dell'osso dove inibisce la proliferazione degli osteoblasti e ne aumenta il rateo di apoptosi. Inoltre, studi recenti suggeriscono che la sclerostina promuova la formazione e il differenziamento degli osteoclasti agendo anche su questa tipologia cellulare [29].

#### ***1.3.4 Cellule di rivestimento osseo***

Alcuni osteoblasti che non vanno incontro ad apoptosi alla fine del ciclo di riformazione dell'osso si differenziano in cellule di rivestimento osseo. Situate sulle superfici delle ossa non sottoposte a rimodellamento, le cellule di rivestimento osseo sono probabilmente implicate nella prevenzione di interazioni indesiderate con gli osteoclasti [29].

Si è osservato come i segnali che precedono il differenziamento degli osteoclasti siano in grado di stimolare questa popolazione cellulare, preparando il sito interessato dal riassorbimento osseo. La preparazione del sito di rimodellamento prevede l'intervento della collagenasi, che rimuove un sottile strato di osso non mineralizzato esponendo la matrice mineralizzata sottostante. Le cellule di rivestimento, quindi, formano una copertura al di sopra della zona di rimodellamento creando un ambiente favorevole al processo.

#### ***1.3.5 Macrofagi del tessuto osseo***

I macrofagi del tessuto osseo, o *osteal tissue macrophage*, o *osteomacs*, appartengono alla linea dei macrofagi residenti nei tessuti e sono presenti vicino alla superficie periostale o endostale. Sono in genere localizzati sulla superficie dell'osso, spesso associati alle cellule

di rivestimento osseo. Si è osservato che questo tipo di macrofagi ha un'azione anabolica sull'osso e promuove l'osteoblastogenesi [29, 51].

Gli *osteomacs* sono stati rilevati vicino agli osteoclasti nei siti catabolici, suggerendo che contribuiscano al rimodellamento. Si ipotizza che la funzione fagocitica propria dei macrofagi conferisca loro la capacità di rimuovere gli osteoblasti andati incontro ad apoptosi, innescando il ciclo paracrino che mantiene la disponibilità locale di cellule mesenchimali-progenitrici, sostenendo dunque la formazione di nuovo osso. Inoltre, si crede che gli *osteomacs* contribuiscano alla compartimentalizzazione del rimodellamento osseo, in quanto prevengono la dispersione di mediatori paracrini e di sottoprodotti dell'attività di rimaneggiamento osseo [6].

Gli *osteomacs* giocano anche un ruolo fondamentale dopo il riassorbimento osseo, fase in cui espongono fibrille collagene che preparano la superficie per la deposizione di nuovo tessuto [6]. Durante il rimodellamento osseo creano una struttura di rivestimento sopra gli osteoblasti maturi, regolando la loro mineralizzazione in seguito all'abbandono del sito di rimodellamento da parte degli osteoclasti [29].

### ***1.3.6 Cellule vascolari endoteliali***

Le cellule vascolari endoteliali sono uno dei componenti chiave della BMU in quanto formano i capillari necessari per fornire ossigeno e nutrienti al tessuto in crescita e per rimuovere i prodotti del riassorbimento osseo.

L'osso risulta essere uno dei tessuti più vascolarizzati del corpo e l'angiogenesi gioca un ruolo fondamentale nella formazione dell'osso e nel suo rimodellamento, influenzando la *bone mineral density* (BMD) [29]. Il sistema vascolare veicola il trasferimento dei segnali sistemici permettendo la regolazione dell'omeostasi del calcio e fornendo un *feedback* sul rimodellamento osseo [29].

Uno dei principali elementi trasportati attraverso il sistema vascolare è l'ossigeno, indispensabile per i processi cellulari e in particolare per la produzione di energia. L'ossigeno è fondamentale anche per il funzionamento di alcuni enzimi necessari per la produzione del collagene, fra cui la prolil-4-idrossilasi. In carenza di ossigeno gli osteoblasti non sono in grado di produrre collagene efficacemente e la loro proliferazione diminuisce. Inoltre, una ridotta disponibilità di ossigeno stabilizza il fattore inducibile dall'ipossia HIF, il quale incrementa l'attività degli osteoclasti, aumentandone il numero. In aggiunta, HIF è stato recentemente identificato come regolatore negativo della risposta osteoblastica a carico meccanico [29]. Da ciò si evince che l'apporto ematico è fondamentale per garantire un microambiente ben ossigenato e prevenire in tal modo il riassorbimento osseo.

HIF è prodotto da cellule in condizioni di ipossia e stimola la trascrizione del *vascular endothelial growth factor* (VEGF), il quale è coinvolto nei processi di angiogenesi. Oltre a questo suo ruolo, il VEGF è stato associato al rimodellamento osseo in quanto funge da chemoattraente per gli osteoclasti.

### ***1.3.7 Linfociti T e Linfociti B***

Sia le cellule immunitarie che le cellule ematopoietiche hanno origine nel midollo osseo, indicando un'interconnessione tra i due sistemi.

Numerosi fattori secreti dalle cellule immunitarie risultano influenzare l'attività degli osteoclasti, un esempio è il RANKL secreto dai linfociti T. Ad oggi il ruolo delle cellule immunitarie nel mantenimento della fisiologia ossea non è del tutto chiaro. Si ritiene che i linfociti T abbiano un ruolo inibitorio nell'osteoclastogenesi. [29].

Gli studi riguardanti i linfociti T e B hanno sottolineato che una loro mancanza influenza l'omeostasi dell'osso e il raggiungimento del picco di massa ossea.

Nonostante non sia ancora stata completamente specificata la natura dell'influenza del sistema immunitario sulla fisiologia ossea [51], patologie autoimmuni come l'artrite reumatoide inducono estensiva distruzione dell'osso. Citochine infiammatorie come IL-1, IL-16 e TNF sono in grado di indurre l'espressione di RANKL e la secrezione di IL-17 da parte di una sottopopolazione particolare di linfociti T helper, i  $T_H17$ , i quali sono ritenuti particolarmente importanti nell'osteoclastogenesi [29].

## 2. Osteoporosi

L'osteoporosi si presenta come un disordine dell'apparato scheletrico caratterizzato da una ridotta resistenza meccanica dell'osso e da un incremento della fragilità di quest'ultimo, le cui manifestazioni principali sono le fratture vertebrali e femorali [24].

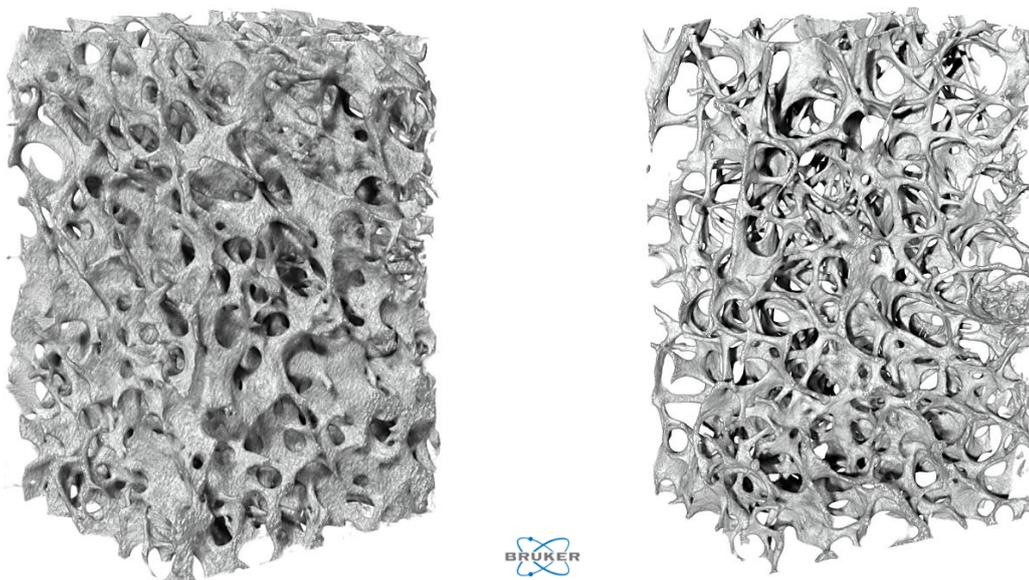


Figura 2.1. Confronto tra struttura dell'osso sano e affetto da osteoporosi. Le immagini sono state ricostruite dalla scansione tramite micro-CT delle biopsie 5736 (H) e 5592 (OP).

La resistenza meccanica dell'osso è determinata dalla sua densità e dalla sua qualità. La densità ossea è espressa come grammi di costituente minerale per unità di area o volume. La qualità dell'osso è determinata dalla sua architettura, dal suo rateo di rinnovamento, dall'eventuale presenza di danneggiamento e dal grado di mineralizzazione. Ad oggi non è ancora stato individuato un indice accurato per la determinazione della resistenza dell'osso. Il metodo più comunemente utilizzato consiste nella determinazione della densità minerale dell'osso o *bone mineral density* (BMD), in quanto quest'ultima contribuisce per circa il 70% alla resistenza dell'osso [36, 48].

L'Organizzazione Mondiale della Sanità definisce operativamente l'osteoporosi come la variazione standard di 2,5 unità sotto alla media della BMD misurata tramite *dual X-ray absorptiometry* nelle donne adulte di razza caucasica, nonostante non sia ancora chiaro come applicare questo criterio diagnostico agli uomini, ai bambini o all'interno dei vari gruppi etnici [17, 36].

L'osteoporosi si può suddividere in osteoporosi primaria o secondaria. L'osteoporosi primaria può insorgere in entrambi i sessi ed indipendentemente dall'età, ma spesso si riscontra dopo la menopausa nelle donne mentre insorge in età più avanzata nei soggetti di sesso maschile. L'osteoporosi secondaria, per contro, è determinata da farmaci o deriva da altre condizioni patologiche [17].

Nonostante nel passato si ritenesse che dalla fine della pubertà fino all'inizio della mezza età sia gli uomini che le donne mantenessero la loro massa ossea senza sostanziali perdite di tessuto o variazioni nella microarchitettura ossea, le ricerche più recenti condotte tramite la Tomografia Computerizzata Quantitativa (QCT) hanno dimostrato che una diminuzione della BMD ha inizio fin dalla terza decade in entrambi i sessi, seppur ad un rateo ridotto fino alla mezza età.

La diminuzione della BMD risulta accelerata nelle donne dall'inizio della menopausa, con una perdita stimata fra il 20% ed il 30% della massa di osso trabecolare nel corso dei 6-10 anni del periodo peri-menopausale. In questa fase solo fra il 5% ed il 10% di osso corticale risulta compromesso. Successivamente si verifica una perdita di tessuto osseo più lenta, seppur continua, in cui la perdita di osso trabecolare e corticale procede con un'intensità simile [17].

Gli uomini non sono soggetti al calo repentino dei livelli di estrogeni e dunque non sono soggetti alla perdita accelerata di osso trabecolare (Fig. 2.2), che risulta quindi inferiore rispetto a quella riscontrabile nelle donne [17].

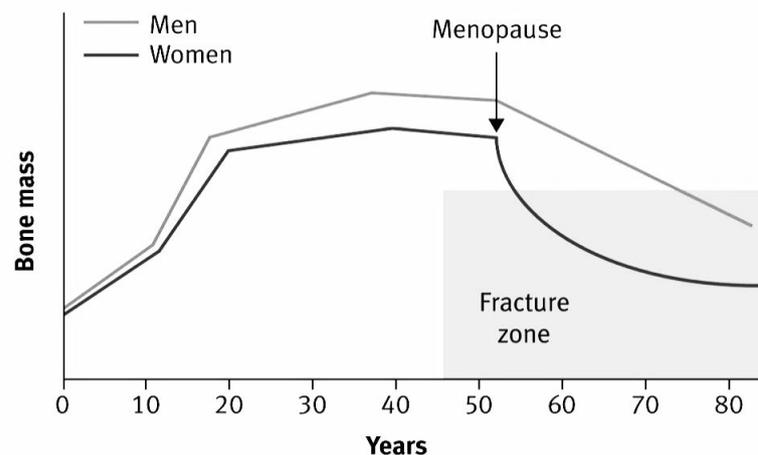


Figura 2.2. Diminuzione della massa ossea con l'invecchiamento in soggetti di entrambi i sessi. Diminuzione che risulta marcata in seguito alla menopausa con conseguente precoce rischio di frattura nelle donne [7].

Oltre alla diminuzione della massa ossea corticale e trabecolare, con l'invecchiamento si verificano importanti alterazioni nella geometria dello scheletro. Queste variazioni, dato il loro effetto nella resistenza dell'osso, risultano di particolare interesse soprattutto per quanto riguarda l'osso corticale. Una delle più rilevanti è il riassorbimento di osso endocorticale e la sua conseguente diminuzione di spessore e area. A questo processo si contrappone l'apposizione di osso sulla superficie periostale, la quale produce spostamento della cortecchia ossea ad una maggiore distanza dall'asse dell'osso. Tale spostamento verso l'esterno aumenta la resistenza dell'osso mitigando gli effetti deleteri dovuti all'assottigliamento ed all'aumento della porosità dell'osso corticale. Nonostante questi effetti di compensazione, la progressiva perdita di osso ed i suoi cambiamenti, sia macro

che micro-architetture, predispongono gli adulti in fase di invecchiamento ad un significativo incremento del rischio di frattura [17, 27].

## 2.1 Fattori di regolazione del rimodellamento osseo e osteoporosi

L'osteoporosi è generata sia da una perdita di tessuto osseo a causa delle fisiologiche modificazioni del rimodellamento osseo legate all'età, sia dall'intervento di fattori intrinseci ed estrinseci che amplificano questo processo. Il rimodellamento osseo è regolato da fattori endocrini e paracrini (Fig. 2.3). Tali fattori disciplinano in modo specifico il rapporto fra riassorbimento e deposizione di nuovo tessuto osseo.

L'ormone paratiroideo (PTH) può essere secreto in conseguenza ad un insufficiente apporto di calcio e stimola l'idrossilazione della vitamina D da parte del rene e, quindi, dell'assorbimento intestinale di calcio, e riduce anche la perdita renale di calcio. Questi effetti, volti a ristabilire il bilancio del calcio, aumentano il rimodellamento osseo e accelerano la perdita di tessuto. Tutto ciò è regolato dall'effetto del PTH sulla modulazione del sistema di segnalazione OPG-RANKL-RANK, in cui si osserva un incremento nella produzione di RANKL ed una diminuzione dell'osteoprotegerina che comportano una maggiore osteoclastogenesi. Al contrario, una produzione intermittente di PTH risulta avere un effetto anabolizzante stimolando un aumento della formazione di tessuto osseo tramite la modulazione del percorso di segnalazione Wnt con conseguente incremento dell'osteoblastogenesi [25]. Per questo motivo si utilizzano, per il trattamento dell'osteoporosi, iniezioni giornaliere di PTH [24].

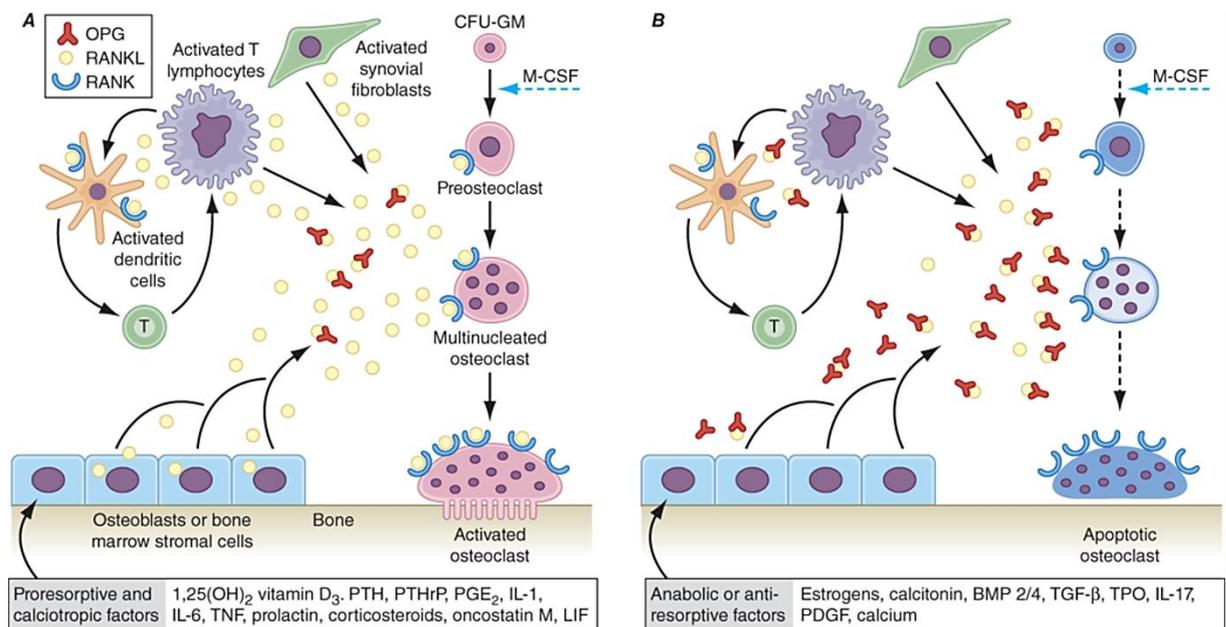


Figura 2.3. Controllo ormonale del riassorbimento osseo [24].

Un altro fattore di regolazione essenziale per la mineralizzazione ossea è la vitamina D, la quale favorisce l'assorbimento intestinale di calcio e fosfato. Inoltre, è stato dimostrato come gli osteoclasti, gli osteoblasti e gli osteociti esprimano un recettore per la vitamina D suggerendo un suo effetto diretto nella regolazione del processo di rimodellamento osseo [25].

In aggiunta all'apporto insufficiente di calcio e al deficit di vitamina D, altro fattore predisponente all'insorgenza di osteoporosi è la diminuzione dell'esposizione agli estrogeni. Questa è una condizione fisiologica nella donna dopo la menopausa ma può comparire anche in seguito alla somministrazione di inibitori dell'aromatasi nel trattamento del tumore alla mammella [24].

I recettori degli estrogeni sono espressi in modo pressoché ubiquitario: si possono individuare anche in osteoblasti, osteociti ed osteoclasti in cui, tramite l'*oestrogen receptor- $\alpha$* , controllano il rateo di apoptosi. Una perdita di estrogeni, quindi, riduce la longevità degli osteoblasti, e allo stesso tempo aumenta la produzione di RANKL e riduce la produzione di OPG, favorendo la formazione e l'attività degli osteoclasti. L'osso trabecolare è la porzione primariamente interessata dal deficit di estrogeni.

Anche nel maschio, nonostante gli androgeni in particolare in età puberale abbiano un ruolo significativo nella formazione di nuovo osso, è stato dimostrato che la carenza di estrogeni è impattante sul rimodellamento osseo e che il ristabilirsi dei livelli di estrogeni ha un'azione maggiore sul rateo di rimodellamento rispetto al riequilibrio dei livelli di androgeni [24].

Anche i glucocorticoidi hanno un effetto diretto nella regolazione dell'omeostasi ossea. Se da un lato una loro concentrazione fisiologica ha un effetto anabolizzante sul rimodellamento osseo, livelli farmacologici di glucocorticoidi sono fra le cause dell'insorgenza dell'osteoporosi. I glucocorticoidi inibiscono la differenziazione degli osteoclasti e ne aumentano il rateo di apoptosi. Inoltre, questi ormoni incrementano l'attività osteoclastica riducendo la quantità di OPG ed incrementando l'espressione del RANKL negli osteoblasti e del RANK negli osteoclasti [25]. Altri farmaci che influenzano negativamente l'omeostasi ossea sono gli anticonvulsivanti e gli immunosoppressori, gli inibitori di pompa protonica, gli inibitori dell'aromatasi già citati, gli androgeni utilizzati nel trattamento del tumore alla prostata, gli antidepressivi [24].

Fra i fattori di regolazione paracrini, le prostaglandine da un lato stimolano il riassorbimento osseo tramite un incremento del rapporto fra RANKL ed osteoprotegerina determinando un aumento dell'osteoclastogenesi, dall'altro hanno un effetto nella stimolazione della proliferazione e del differenziamento degli osteoblasti [25]. Anche le citochine hanno un ruolo importante nella determinazione del numero di osteoclasti disponibili per il riassorbimento osseo in quanto alcune (IL-6 e TNF $\alpha$ ) favoriscono l'osteoclastogenesi mentre altre (IL-4 e  $\gamma$ -interferone) la inibiscono. Nelle donne in stato post-menopausale queste citochine svolgono un ruolo importante nella patofisiologia dell'osteoporosi in quanto aumentano l'espressione del RANKL [25].

L'osteoporosi è anche favorita dall'inattività fisica prolungata, dovuta ad allettamento o paralisi. Il fumo favorisce il riassorbimento osseo direttamente, con effetti tossici sugli osteoblasti, e indirettamente, modificando il metabolismo degli estrogeni.

Alcune malattie croniche sono correlate all'insorgenza di osteoporosi, tra cui, in particolare, il diabete mellito tipo I e II [24].

La regolazione temporale del ciclo di rimodellamento osseo fa sì che vi siano delle limitazioni all'entità di osso riassorbito o neoformato. Il rateo di attivazione del rimodellamento osseo ha quindi un'influenza fondamentale sull'entità del riassorbimento e dell'osteogenesi dell'intero corpo e, in generale, il bilancio verso l'aumento della massa ossea o una sua diminuzione dipende dalla direzione del ciclo di rimodellamento in ogni BMU attiva verso la formazione di nuovo osso o il suo riassorbimento (Fig. 2.4) [46].

Il rateo di riassorbimento osseo (BRR) è il prodotto del numero delle nuove cavità generate nell'unità di tempo per il volume medio di ogni lacuna. Per contro, il rateo di formazione ossea (BFR) è il prodotto di ogni BSU riformata nell'unità di tempo per il volume medio di ogni BSU. Ogni lacuna ed ogni BSU sono il risultato di un processo di attivazione, quindi il numero di lacune e di BSU riformate è il medesimo e corrisponde al rateo di attivazione [46].

La dimensione media delle lacune e delle BSU è identica durante il periodo in cui si ha il raggiungimento del picco della massa ossea e successivamente non varia per più del 10%. Tutto ciò suggerisce come le differenze più marcate siano causate dal rateo di rimodellamento più che dal volume delle BSU. Di conseguenza, sia il rateo di riassorbimento che di deposizione, nonché gli indici cinetici e biochimici legati al rimodellamento osseo, sono definiti dalla variazione del rateo di attivazione del *turnover* osseo [46].

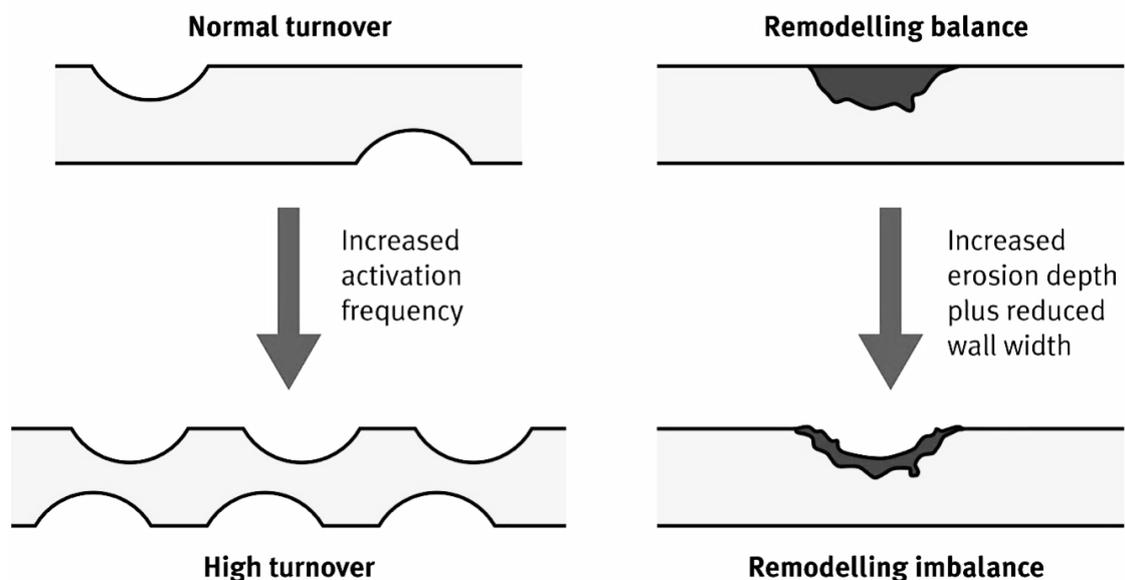


Figura 2.4. Meccanismi che influenzano la riduzione della densità ossea a causa di un disequilibrio nel rimodellamento [7].

Il bilancio dopo il rimodellamento in ogni BSU è la somma dell'osso rimosso e dell'osso depositato. Un leggero disequilibrio in questi due processi può influenzare l'intero apparato scheletrico: se la lacuna ossea non viene completamente riempita con nuovo tessuto si osserva una diminuzione della massa ossea.

Lo sbilanciamento verso la diminuzione della massa ossea legato all'età può derivare da un aumento delle dimensioni della lacuna a parità di quantità di osso generato (riassorbimento osteoclasto-dipendente), da una diminuzione del volume di osso depositato senza cambi nella profondità della lacuna di riassorbimento (riassorbimento osteoblasto-dipendente) o per una concomitanza dei due effetti precedenti (Fig. 2.5) [46].

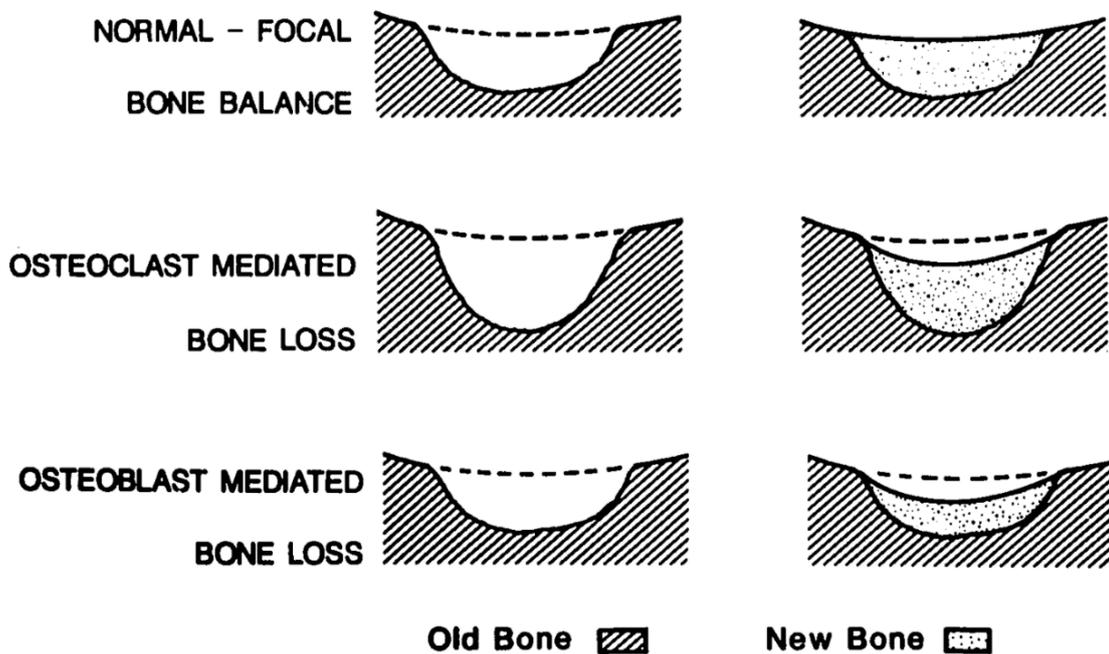


Figura 2.5. Possibili meccanismi di disequilibrio nel rimodellamento osseo locale [46].

Una valutazione del disequilibrio può essere ottenuta dalla semplice equazione:

$$\text{BRR-BFR} = \text{Rateo di attivazione} \cdot (\text{V}_{\text{medio riassorbito}} - \text{V}_{\text{medio della BSU}}) \quad (2.1)$$

Dato un certo livello di sbilanciamento, si osserva come un cambio nel volume dell'osso sia proporzionale al rateo di attivazione del rimodellamento. L'aumento del rateo di rimodellamento di per sé non causa la perdita di osso, tuttavia esalta il disequilibrio fra riassorbimento e riformazione laddove questo sia presente, indipendentemente dalle cause che determinano lo sbilanciamento [46]. Ogni eventuale perdita di massa ossea diventa irreversibile una volta che l'azione di rimodellamento si è conclusa ed è necessario attendere un successivo ciclo di rimodellamento.

In condizioni normali il rimodellamento osseo avviene in modo asincrono in varie zone dell'apparato scheletrico: alcuni cicli sono al loro inizio, altri in via di conclusione e l'osso

riassorbito è bilanciato dall'osso neoformato. Se questo stato stazionario è perturbato, la prima risposta in genere è un cambio nel rateo di attivazione cui segue una variazione sistemica del rateo di riassorbimento e di deposizione della nuova matrice. A causa dell'intervallo fra riassorbimento e formazione di nuovo osso, ogni BSU presenta una riduzione temporanea di mineralizzazione, le cui cause principali sono riconducibili al volume di osso riassorbito, al volume del nuovo osteoide che risulta mineralizzato, ed al tempo richiesto per la completa mineralizzazione dell'osso di neoformazione.

L'osso durante l'invecchiamento è influenzato anche dalla variazione dell'architettura interna e dalla sua dimensione, oltre che della sua massa. A questo riguardo è utile differenziare nuovamente l'osso nelle sue costituenti corticali e trabecolari.

La perdita di osso corticale comporta un suo assottigliamento. La riduzione legata all'età si manifesta come un aumento della porosità dell'osso compatto la cui severità aumenta dal periostio spostandosi verso l'endostio. Nella parte periostale l'aumento di porosità è piccolo (1-2%) ed è per lo più determinato dall'aumento del numero di canali Haversiani derivante dal maggior rateo di *turnover*. Spostandosi verso l'endostio l'effetto diventa più marcato ed è legato più all'aumento della dimensione che ad un incremento del numero di porosità. Il sito più critico risulta essere la parete endocorticale, dove l'aumento di porosità si può assimilare ad un aumento della cavità midollare. L'allargamento e la coalescenza delle cavità fanno sì che l'osso endocorticale assomigli all'osso spugnoso per porosità e rapporto superficie/volume ma con elementi "trabecolari" più spessi ed irregolari. L'assottigliamento dell'osso corticale è dovuto principalmente ad un aumento della profondità di riassorbimento [46].

La perdita di osso trabecolare si manifesta prevalentemente come riduzione del numero di trabecole, e risulta più marcata nelle donne in menopausa a causa della mancanza di estrogeni. Oltre a ciò, si osserva anche una progressiva diminuzione della sezione delle trabecole, tuttavia questo fenomeno ha un impatto minore sulla quantità totale di osso perso. La perdita di osso si osserva principalmente nelle regioni centrali delle trabecole appiattite e conduce ad una perforazione di poche centinaia di micrometri (100-400  $\mu\text{m}$ ). Un ulteriore incremento della perforazione comporta la conversione delle trabecole appiattite in trabecole cilindriche, fino ad arrivare alla rimozione di alcune di esse. Data la casualità del processo, le trabecole rimanenti sono meno interconnesse: la rimozione di elementi strutturali ha un impatto rilevante sulla resistenza dell'osso e sul rischio di frattura. Inoltre, è anche da tenere in considerazione l'assenza di osso su cui gli osteoblasti possono intervenire per la deposizione di nuovo tessuto [46].

La forma più diffusa di disequilibrio nel rimodellamento dell'osso trabecolare è quella osteoblasto-dipendente, in cui gli osteoblasti depositano uno strato di nuovo tessuto insufficiente a riempire completamente la lacuna ossea. Questo risulta in una diminuzione dello spessore delle trabecole che, tuttavia, non è sufficiente a spiegare il perforamento delle trabecole appiattite. Escludendo cicli di rimodellamento ripetuti nello stesso sito, sarebbe necessario che la perforazione delle trabecole fosse preceduta da una riduzione generalizzata del loro spessore. Tuttavia, l'aumento della separazione delle trabecole si registra prima del loro assottigliamento, suggerendo che altri meccanismi siano coinvolti

nel deterioramento dell'osso spugnoso indipendentemente dal completo riempimento delle lacune formate durante il riassorbimento [46].

Una possibile spiegazione risiede nella grande dispersione statistica delle profondità delle lacune create e negli spessori delle trabecole. È così possibile che trabecole sottili siano interessate da riassorbimenti profondi. Questa interpretazione trae forza dal fatto che la perdita di osso inizia breve tempo dopo il raggiungimento del picco massimo di massa ossea in entrambi i sessi. Inoltre, l'aumento del rateo di *turnover* come conseguenza della minore presenza di estrogeni spiega l'aumento notevole della probabilità di perforazione, nei primi anni successivi alla menopausa. Una teoria alternativa attribuisce l'accelerazione della perdita di osso dopo la menopausa alla comparsa di osteoclasti particolarmente aggressivi, i quali hanno una maggiore profondità di erosione rispetto agli osteoclasti normali [46].

A questi due meccanismi, durante l'invecchiamento, si associa una globale riduzione dell'attività degli osteoblasti dovuta o al minor numero di osteoblasti presenti nel sito di rimodellamento, oppure alla minore capacità di questi ultimi di sintetizzare efficacemente la matrice ossea. Ciò comporta una diffusa diminuzione dello spessore delle trabecole e dell'osso corticale. Inoltre, si riduce la risposta osteoblastica agli stimoli biomeccanici, che produrrebbe invece un ispessimento delle trabecole e quindi un rinforzo osseo [46].

Le considerazioni precedenti portano ad individuare due possibili tipi di perdita di osso (Fig. 2.6). La prima è più rapida e dovuta all'eccessiva profondità del riassorbimento osteoclastico, il quale comporta la perforazione dell'osso spugnoso e l'aumento della porosità dell'osso compatto: il risultato è una struttura di tipo trabecolare all'interfaccia endossea, a sua volta interessata dalle variazioni subite dall'osso trabecolare. La seconda è più lenta e deriva dall'incompleto riempimento della lacuna ossea di riassorbimento, il quale porta ad un graduale assottigliamento delle trabecole ossee e dell'osso compatto.

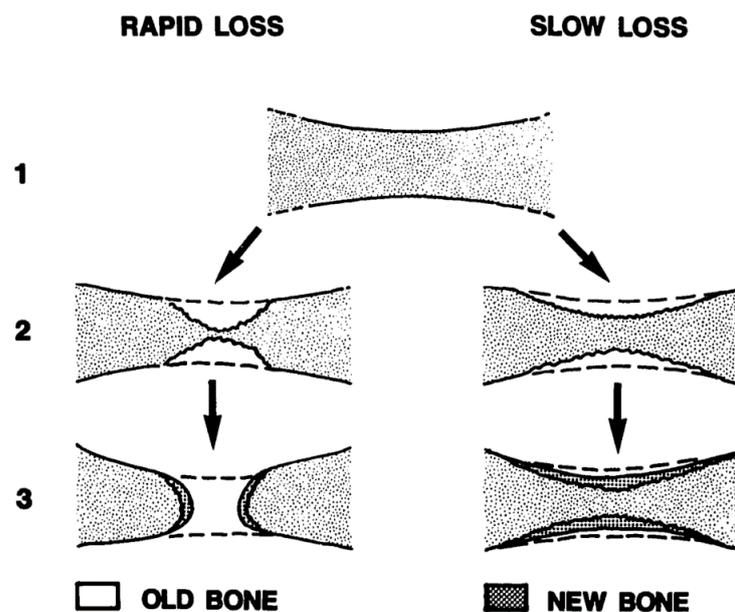


Figura 2.6. Perdita di osso trabecolare rapida e lenta. La perdita rapida è osteoclasto-dipendente con un aumento della profondità di riassorbimento. La perdita lenta è osteoblasto-dipendente con una riduzione progressiva dello spessore delle trabecole [46].

I due meccanismi differiscono per timing, rateo ed intensità e sono, inoltre, influenzati dal tipo di rimodellamento locale e dalla frequenza dell'attività di rimodellamento (Tab. 2.1). Il tipo di sbilanciamento osteoclasto-dipendente è spesso associato ad un aumento del rateo di attivazione, mentre per il meccanismo osteoblasto-dipendente si osserva una diminuzione dell'attivazione del rimodellamento.

| <b>CARATTERISTICA</b>                 | <b>MECCANISMO<br/>OSTEOCLASTO-DIPENDENTE</b>  | <b>MECCANISMO<br/>OSTEOBLASTO-DIPENDENTE</b> |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <b>DIFETTO<br/>CULLULARE</b>          | Mancanza di interruzione del riassorbimento   | Mancanza del numero di osteoblasti attivi    |
| <b>MECCANISMO<br/>COINVOLTO</b>       | Aumento della profondità di riassorbimento    | Rideposizione insufficiente                  |
| <b>DIFETTO<br/>INTRODOTTO</b>         | Perforamento della trabecola e disconnessione | Assottigliamento della trabecola             |
| <b>RIDUZIONE DELLA<br/>RESISTENZA</b> | Maggiore del previsto                         | Come previsto                                |
| <b>INSORGENZA</b>                     | Precoce                                       | Tarda                                        |
| <b>VELOCITÀ</b>                       | Rapida                                        | Lenta                                        |
| <b>RATEO DI<br/>ATTIVAZIONE</b>       | Spesso incrementato                           | Spesso ridotto                               |

*Tabella 2.1. Confronto tra i due tipi morfologici di perdita di osso riadattato da [46].*

La combinazione di un incremento nel rimodellamento e di un aumento della profondità di riassorbimento si riscontra principalmente nei primi anni dopo la menopausa, avendo un impatto non solo sulla maggior perdita di osso durante questo periodo ma anche nell'alterazione dell'architettura ossea.

Nella maggior parte delle donne il rateo di attivazione del rimodellamento diminuisce alcuni anni dopo l'inizio della menopausa e si sposta gradualmente da un riassorbimento rapido di tipo osteoclasto-dipendente ad uno più lento di tipo osteoblasto-dipendente. Questo spostamento si verifica in modo più pronunciato per l'osso trabecolare rispetto all'osso corticale [46].

## **2.2 Basi ormonali dell'osteoporosi**

Come evidenziato precedentemente, esistono delle differenze nella diminuzione della massa ossea fra uomini e donne, attribuibili alla diversa espressione degli ormoni nei due sessi.

Nelle donne, all'inizio della menopausa, si assiste ad un rapido declino nella concentrazione degli estrogeni. Durante il periodo menopausale le concentrazioni nel siero di estradiolo diminuiscono fra l'85% e il 90% e la concentrazione di estrone decresce fra il 65% e il 75%.

Questa diminuzione è correlata ad un periodo di accelerazione nella perdita di tessuto osseo. Tale effetto è prodotto dall'aumento del rateo attivazione del rimodellamento osseo, in cui gli osteoblasti della BMU riassorbono una maggiore quantità di osso rispetto a quella depositata dagli osteoblasti [17].

La comprensione dell'influenza della riduzione di estrogeni sui meccanismi molecolari legati al mantenimento dell'omeostasi ossea è ancora incerta. Una delle maggiori evidenze sorte durante gli anni è l'effetto degli estrogeni come soppressori del RANKL che, come si è già detto, risulta essere uno dei fattori chiave nella regolazione delle cellule ossee [17].

Normalmente espresso dalla membrana dei precursori degli osteoblasti e dai linfociti T e B, il RANKL promuove il differenziamento degli osteoclasti e la loro sopravvivenza. Inoltre, gli estrogeni aumentano l'espressione dell'osteoprotegerina (OPG), recettore-trappola per RANKL. L'aumento del RANKL e la contemporanea diminuzione dell'OPG comportano, quindi, un aumento dell'osteoclastogenesi ed una maggiore attività degli osteoclasti [17].

Oltre alla regolazione del rapporto RANKL/OPG, gli estrogeni influenzano anche l'espressione di altre citochine fra le quali il *macrophage colony-stimulating factor*, le interleuchine 1 e 6, il *tumor necrosis factor* e le prostaglandine.

Gli estrogeni risultano avere anche un ruolo diretto nell'apoptosi dei precursori degli osteoclasti e degli osteoclasti maturi tramite il controllo della loro attività trascrizionale. Sulla popolazione osteoblastica, gli estrogeni favoriscono il differenziamento delle cellule mesenchimali, riducono l'apoptosi degli osteoblasti e degli osteociti, e riducono la quantità di sclerostina, proteina in grado di inibire la segnalazione Wnt, favorendo dunque la formazione di tessuto osseo [17].

Nonostante l'osteoporosi sia una patologia che colpisce principalmente il sesso femminile, anche per quello maschile la sua insorgenza è legata all'avanzare dell'età, superato il raggiungimento del picco della massa ossea attorno ai trent'anni. A differenza delle donne l'osteoporosi negli uomini risulta meno severa, con una perdita percentuale di osso che si attesta intorno alla metà rispetto a quella femminile e un'incidenza delle fratture ridotta ad un terzo [17].

Infatti, la popolazione maschile non va incontro ad un calo repentino nella concentrazione degli ormoni sessuali ma si osserva, con l'invecchiamento, un aumento progressivo di testosterone legato alla globulina. Il testosterone disponibile per l'aromatizzazione a estradiolo si riduce così a circa un terzo del totale presente durante le prime fasi il ciclo vitale [54]. Recenti studi hanno infatti dimostrato come l'estradiolo sia responsabile del mantenimento della massa ossea anche negli uomini e vi sia una soglia minima di estradiolo, corrispondente a circa 15 pg/ml, al di sopra della quale non si verifica perdita di osso [54].

### 3. Caratterizzazioni ingegneristiche per l'analisi dell'osso

Per la determinazione dei parametri morfologici, meccanici e chimici sia alla macro che alla micro scala utili allo studio del tessuto osseo e delle sue patologie, vengono impiegate diverse tecniche di analisi. In particolare, negli ultimi anni si è imposta come di primaria importanza la microtomografia computerizzata o micro-CT, poiché permette di determinare in modo rapido e preciso i parametri morfologici dell'osso. Alla micro-CT si aggiungono i test di compressione, i quali consentono un confronto macroscopico fra vari tipi di tessuto osseo attraverso la simulazione dei carichi fisiologici. Per l'indagine del comportamento alla micro-scala, i ricercatori concordano nell'individuare nei test di nanoindentazione una tecnica analitica valida per la determinazione delle proprietà elastiche e di durezza dei campioni ossei. Essendo le patologie del tessuto osseo strettamente connesse ad una alterazione della chimica dello stesso, l'utilizzo della spettroscopia Raman costituisce un efficace metodo per l'analisi di queste variazioni.

Di seguito, ciascuna tecnica di analisi citata è presa in esame e descritta fornendo, inoltre, un'indicazione dei principali risultati ottenuti da altri gruppi di ricerca nei rispettivi campi di indagine.

#### 3.1 Microtomografia computerizzata

La micro-tomografia computerizzata, o micro-CT, è un metodo di analisi utilizzato per lo studio delle caratteristiche morfologiche dell'osso e per la determinazione della densità del campione osseo preso in esame. Si tratta dunque di una tecnica analitica utile nello studio dell'osteoporosi, in quanto permette il confronto tra le proprietà di ossa sane e osteoporotiche. La micro-CT si basa sull'utilizzo di raggi X per la creazione di immagini del campione, riprese da più angolazioni durante una rotazione di 180 o 360 gradi (Fig. 3.1).

Le singole *shadow-image* costituiscono una proiezione 2D del campione e, una volta ricostruite, forniscono le sezioni trasversali dell'oggetto. Dall'unione delle immagini trasversali, impilate da un software come ad esempio CTvox, è possibile ottenere un'immagine tridimensionale del campione.

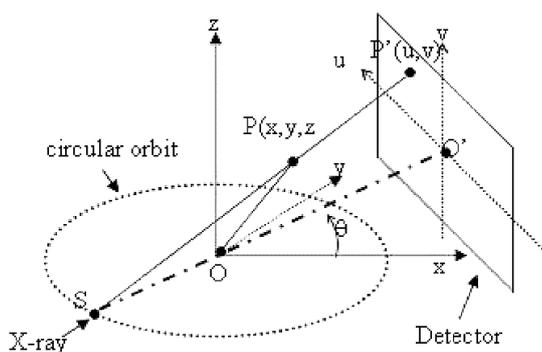


Figura 3.1. Principio di funzionamento della Micro-CT [11].

Supponendo il fascio dei raggi X come parallelo, ogni punto della *shadow-image* contiene le informazioni sull'assorbimento della radiazione all'interno dell'oggetto tridimensionale lungo il percorso del raggio corrispondente. In ogni immagine ricostruita la posizione del campione è determinata dalla somma delle proiezioni acquisite durante la sua rotazione. Maggiore è il numero delle proiezioni acquisite, ottenute impostando un minore step di rotazione, maggiore risulta la precisione nella determinazione della posizione dell'oggetto (Fig. 3.2) [10].

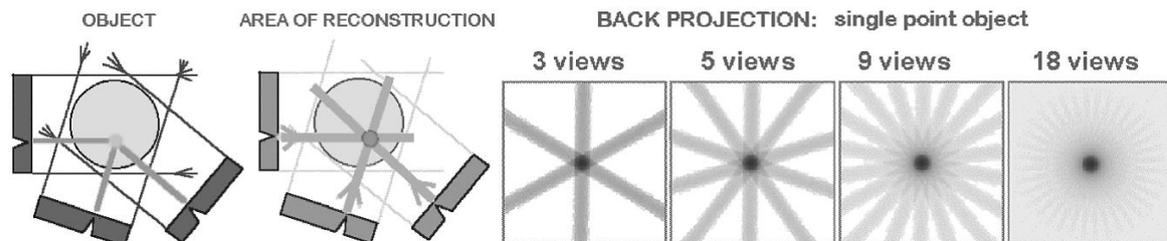


Figura 3.2. Ricostruzione dell'oggetto tramite retroproiezione [10].

Durante la ricostruzione della posizione dell'oggetto si crea un'area di sfocatura dovuta alla sovrapposizione delle proiezioni con diversa rotazione. Per eliminare questo difetto ed ottenere un'immagine più definita, è possibile impostare una pre-correzione alle informazioni iniziali applicando un assorbimento negativo al di fuori della regione d'ombra prodotta dall'oggetto.

L'analisi tramite raggi X è possibile grazie alla parziale permeabilità del tessuto osseo alla radiazione utilizzata. Se l'intero oggetto presentasse la stessa assorbanza l'immagine risultante sarebbe costituita da un unico tono di grigio, invece è possibile ottenere informazioni dal campione poiché esso presenta un assorbimento differenziale all'interno dell'intervallo di energie valido per la formazione dell'immagine.

È quindi utile ricordare i principali modi di interazione dei raggi X con la materia in funzione della loro energia e del numero atomico ( $Z$ ) dell'elemento assorbente (Fig. 3.3). L'effetto fotoelettrico è predominante per basse energie dei raggi e con  $Z$  alti. Si tratta del metodo di interazione preferibile nell'analisi micro-CT in quanto si verifica una completa cessione dell'energia della radiazione incidente al campione, ottenendo un fascio uscente con un intervallo di energie ristretto. Per contro, l'effetto Compton rimuove solo una parte dell'energia del fotone incidente durante lo *scattering* e può causare la creazione di artefatti sull'immagine se il fotone scatterato incide sul rivelatore di raggi X. Il terzo ed ultimo modo di interazione con la materia implica l'assorbimento di un fotone a più alta energia che viene convertito in una coppia elettrone-positrone in prossimità dell'atomo che ha assorbito la radiazione. Questo fenomeno non è tuttavia rilevante nell'analisi micro-CT in quanto richiede energie molto maggiori di 1 MeV, valore non raggiungibile dalla strumentazione.

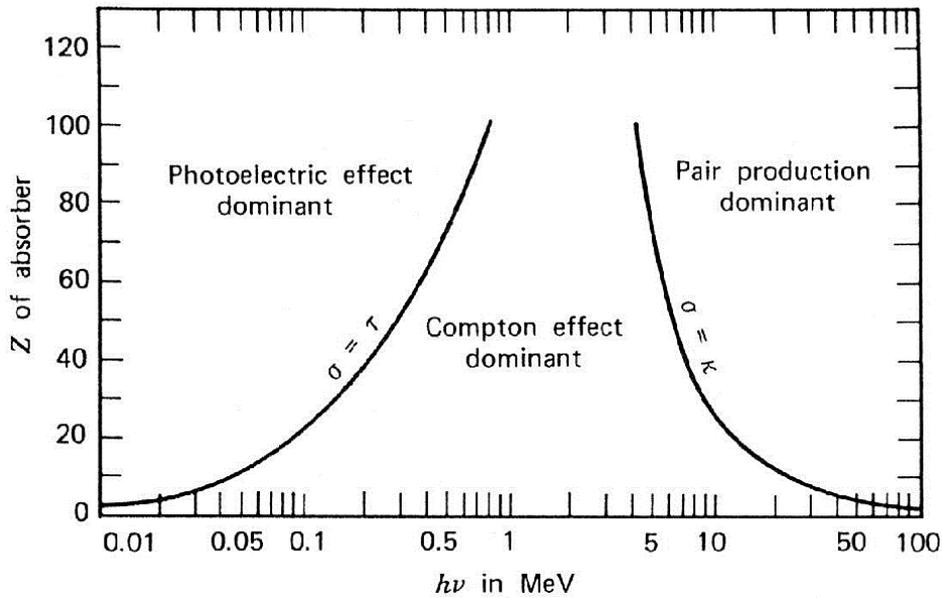


Figura 3.3. Modi di interazione dei raggi X con la materia [11].

L'utilizzo dell'effetto fotoelettrico ai fini della scansione dell'osso con la micro-CT permette, dunque, di ottenere immagini ben contrastate [10].

Ulteriore vantaggio associato all'assorbimento fotoelettrico è la sua stretta dipendenza dal numero atomico dell'elemento soggetto all'interazione con il fotone. La sezione trasversale di interazione è definita, infatti, come

$$\sigma = \text{cost} \cdot Z^n / E^3 \quad (3.1)$$

dove  $Z$  è il numero atomico,  $n$  è una costante che varia fra 4 e 5 ed  $E$  è l'energia della radiazione incidente.

La dipendenza della sezione trasversale di assorbimento dal numero atomico è ciò che permette di ottenere il differenziamento tra diversi materiali nelle immagini della micro-CT.

La propagazione dei raggi X all'interno di un materiale segue un andamento esponenziale decrescente, descritto dall'equazione di Lambert-Beer [10]:

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad (3.2)$$

dove  $I$  è l'intensità alla profondità  $x$ ,  $I_0$  l'intensità della radiazione incidente e  $\mu$  il coefficiente di attenuazione.

Le immagini ricostruite delle sezioni trasversali dell'oggetto, ottenute tramite micro-CT, sono costituite da una scala di grigi compresi fra il nero ed il bianco in base alla profondità del bit impostata: i valori di attenuazione al di sotto del limite inferiore di assorbimento impostato risulteranno neri, mentre quelli al di sopra del limite superiore verranno

rappresentati in bianco. La figura ricostruita sarà quindi un'immagine in toni di grigio della sezione trasversale con una conversione lineare in 256 toni all'interno dell'intervallo selezionato [10].

L'analisi micro-CT è composta da tre step: effettuata la scansione e compiuta la ricostruzione del volume dell'oggetto, l'ultimo passaggio riguarda l'analisi dei parametri morfologici e della densità del campione.

Per la realizzazione di un'analisi morfologica è richiesta la binarizzazione del *dataset* ricostruito e la definizione del volume di interesse (VOI).

Nella binarizzazione le immagini in scala di grigio prodotte dalla ricostruzione vengono convertite in immagini binarie in bianco e nero, con il bianco che rappresenta il tessuto osseo analizzato ed il nero la porosità aperta, da escludere dall'analisi.

La tecnica più semplice e rapida per ottenere questo risultato è il *thresholding* globale in cui ogni voxel con un valore di grigio superiore alla soglia impostata viene rappresentato come solido (bianco) ed ogni valore inferiore come volume non occupato (nero). La definizione del VOI precisa il volume che dovrà essere preso in considerazione dal software per eseguire le analisi morfometriche.

L'analisi morfologica del tessuto osseo si basa sulla determinazione dei principali parametri strutturali dell'osso: il volume relativo di osso (BV/TV); lo spessore delle trabecole (Tb.Th.), la loro distanza (Tb.Sp.) ed il loro numero (Tb.N); lo *structure model index* (SMI) ed il grado di anisotropia (DA).

Il volume relativo di osso (BV/TV) si definisce come la percentuale del VOI occupata dalle trabecole ossee dopo la binarizzazione.

Il parametro Tb.Th. fornisce un valore medio dello spessore delle trabecole ossee del sito di interesse e, grazie all'avvento della micro-CT, è calcolabile direttamente, senza assunzioni legate al tipo di trabecole presenti all'interno del tessuto osseo [12, 22].

Il calcolo della Tb.Th. si basa sulla ricerca condotta da *Hildebrand e Ruegsegger* [22], che si fonda sulla determinazione del diametro massimo locale di una sfera inscritta in ogni singolo punto della trabecola.

Sia  $\Omega \subset \mathbf{R}^3$  un luogo dei punti della struttura in esame e sia  $\tilde{p} \in \Omega$  un punto arbitrario di questa struttura. Lo spessore locale della struttura  $\tau(\tilde{p})$  è definito come il più grande diametro della sfera che contiene il punto  $\tilde{p}$  e che è al contempo inscritta nella struttura (Fig. 3.4 A):

$$\tau(\tilde{p}) = 2 \cdot \max(\{r | \tilde{p} \in \text{sph}(\tilde{x}, r) \subseteq \Omega, x \in \Omega\}) \quad (3.3)$$

Dove  $\text{sph}(\tilde{x}, r)$  sono i punti di una sfera centrata in  $\tilde{x}$  di raggio  $r$ .

Lo spessore medio della struttura analizzata è definito quindi come il valore aritmetico medio dello spessore locale calcolato in tutti i punti della struttura:

$$\bar{\tau} = \frac{1}{\text{Vol}(\Omega)} \iiint_{\Omega} \tau(\tilde{x}) d^3 \tilde{x}, \quad \text{Vol}(\Omega) = \iiint_{\Omega} d^3 \tilde{x} \quad (3.4)$$

Per l'implementazione pratica della misura dello spessore locale è richiesta la suddivisione della definizione di spessore locale in espressioni più semplici, descrivendolo attraverso la mappa delle distanze.

Tale mappa è calcolata grazie al principio di trasformazione della distanza, che assegna ad ogni punto della struttura la sua distanza euclidea dal punto più vicino esterno alla trabecola. La trasformazione della distanza definita come:

$$D_{map}(\tilde{q}) = \max(\{r > 0 \mid sph(\tilde{q}, r) \subseteq \Omega, \tilde{q} \in \Omega\}) \quad (3.5)$$

corrisponde al raggio della più grande sfera centrata nel punto ed ancora completamente contenuta nella struttura.

Lo spessore locale può quindi essere riscritto basandosi sulla mappa delle distanze:

$$\tau(\tilde{p}) = 2 \cdot \max_{\tilde{q} \in X(\tilde{p})} (D_{map}(\tilde{q})) \quad (3.6)$$

Dove  $X(\tilde{p})$  rappresenta il punto centrale di tutte le sfere aventi raggio uguale alla loro distanza corrispondente e contenenti il punto  $\tilde{p}$ :

$$X(\tilde{p}) = \{\tilde{x} \in \Omega \mid \tilde{p} \in sph(\tilde{x}, D_{map}(\tilde{x}))\} \quad (3.7)$$

Il calcolo dello spessore locale delle trabecole si ottiene, quindi, in due fasi: la prima consiste nella definizione della mappa delle distanze, tramite l'applicazione di  $D_{map}(\tilde{q})$ , mentre la seconda prevede la determinazione dei punti centrali appartenenti a tutte le sfere non ridondanti, che vanno a definire l'asse mediale della struttura:

$$\Omega_R = \{\tilde{p} \in \Omega \mid sph(\tilde{p}, D_{map}(\tilde{p})) \not\subseteq sph(\tilde{x}, D_{map}(\tilde{x})), \tilde{p} \neq \tilde{x}, \tilde{x} \in \Omega\} \quad (3.8)$$

In ultimo, successivamente alla determinazione dell'asse mediale della struttura, si esegue il controllo dello spessore locale delle sfere corrispondenti per determinare lo spessore trabecolare medio. Il vantaggio principale della misurazione dello spessore locale consiste nella riduzione dell'errore indotto dall'orientamento tridimensionale [12].

La distanza delle trabecole (Tb.Sp.) viene misurata come lo spessore degli spazi intertrabecolari dopo la binarizzazione all'interno del VOI. Questo parametro si ricava utilizzando lo stesso procedimento di misura dello spessore delle trabecole ma prendendo in considerazione le porosità aperte presenti tra le trabecole (Fig 3.4 B).

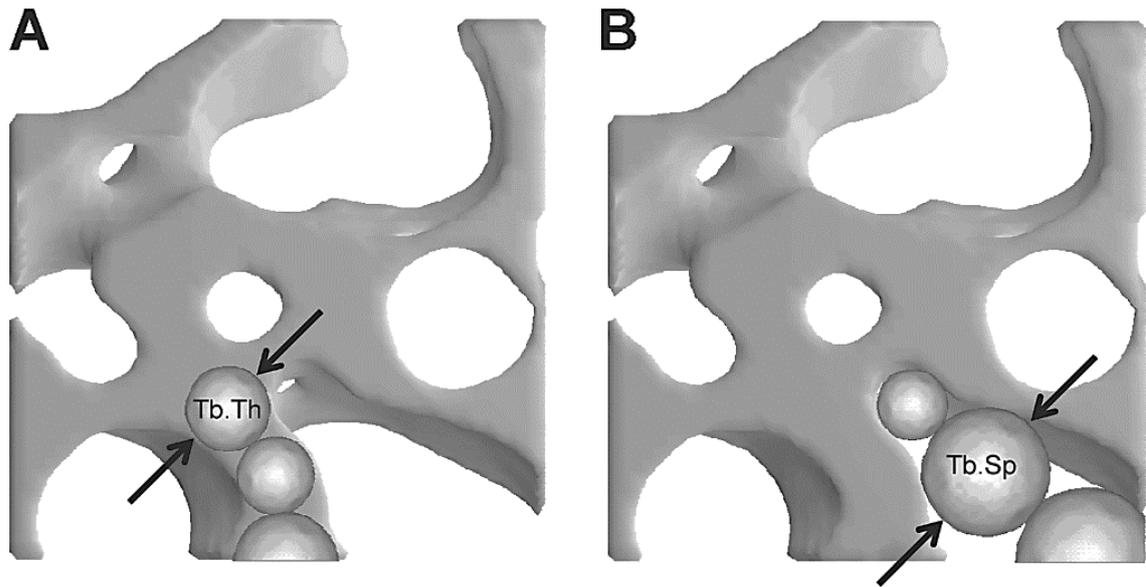


Figura 3.4. Applicazione del criterio di Hildebrand e Ruesegger per il calcolo dello spessore delle trabecole (A) e della loro spaziatura (B) [9].

Il numero delle trabecole (Tb.N.) viene calcolato come il numero di strutture trasversali incontrate da una linea ideale avente un percorso casuale tracciata all'interno del VOI selezionato nella struttura trabecolare. Una definizione alternativa del numero di trabecole basata sulla misurazione 3D della loro distanza è:

$$Tb.N = 1 / (Tb.Th + Tb.Sp) \quad [12]. \quad (3.9)$$

Lo *structure model index* (SMI) fornisce un'indicazione sulla prevalenza relativa di strutture aciculari o appiattite all'interno dell'osso trabecolare. I valori ideali dell'SMI per una piastra rettangolare, un cilindro ed una sfera sono rispettivamente 0, 3 e 4. Questi valori divengono negativi in presenza di una cavità.

Il calcolo dell'SMI si basa sul modello proposto da *Hildebrand e Ruesegger* nel 1997 [23]. Questa analisi si fonda sulla definizione di un modello generale che permetta di fornire un'indicazione quantitativa del tipo di struttura osservata tramite la micro-CT. I ricercatori hanno adottato un modello secondo il quale una struttura di volume  $V$  dipende da una quantità lineare  $r$ , definita come il semi-spessore dell'elemento strutturale analizzato, ed in cui la superficie  $S$  è definita come derivata del volume rispetto ad  $r$ .

Un modello particolarmente semplice è quello definito come:

$$V = kr^e, \quad e \geq 1 \quad (3.10)$$

In cui  $e$  fornisce un'indicazione del tipo di struttura e  $k$  e  $r$  ne sono i parametri geometrici.

La trattazione prosegue con l'assunzione che il volume, la superficie e lo spessore siano direttamente dipendenti dalla struttura, il che permette di definire l'esponente  $e$  dell'equazione precedente come:

$$e = \frac{S \cdot r}{V} = \text{Structure Volume Exponent (SVE)} \quad (3.11)$$

Per una struttura in cui siano presenti sia trabecole aciculari che appiattite il volume totale è la somma dei volumi che competono ai due tipi di struttura:

$$V = V_p + V_r = k_1 r + k_2 r^2 \quad (3.12)$$

L'SVE è pertanto riformulato come:

$$SVE = \frac{1+2\epsilon}{1+\epsilon} \quad (3.13)$$

Dove  $\epsilon$  è il rapporto fra volume delle strutture aciculari e volume delle strutture appiattite:

$$\epsilon = \frac{V_r}{V_p} = \frac{k_2}{k_1} r \quad (3.14)$$

Una struttura geometrica ideale presenta SVE pari a 1, 2 o 3 a seconda che la sua forma sia appiattita, aciculare o sferica. Nel caso delle trabecole, quindi, l'SVE è compreso fra 1 e 2.

Per far sì che l'equazione sia rispettata anche in casi non ideali viene definita la deviazione relativa della superficie dall'idealità ( $S'(r)/S(r)$ ) e, essendo l'esponente dell'equazione dell'area superficiale pari a  $1-e$  è possibile la definizione dell'esponente legato alla struttura superficiale (SSE):

$$SSE = \frac{S' \cdot r}{S} = \frac{ke(e-1)r^{e-2}}{ker^{e-1}} \cdot r = \frac{2\epsilon}{1+2\epsilon} \quad (3.15)$$

Poiché la determinazione dello spessore non è sempre possibile, è necessario definire un parametro indipendente dallo spessore che descriva il tipo di struttura. Le equazioni precedenti suggeriscono di dividere l'esponente della superficie per l'esponente del volume, ottenendo così:

$$\frac{e-1}{e} = \frac{S'(r) \cdot V(r)}{S(r)^2} = SMI \quad (3.16)$$

Il quale, una volta generalizzato nel caso di una struttura contenente un misto di trabecole aciculari ed appiattite, porta alla definizione dello *Structure Model Index* o SMI:

$$SMI = 12 \cdot \frac{\epsilon + \epsilon^2}{1 + 4(\epsilon + \epsilon^2)} \quad (3.17)$$

Una volta definito l'SMI è quindi necessario procedere alla definizione di un processo di calcolo che ne permetta la misura. Nel loro articolo *Hildebrand e Ruegsegger* [23] propongono un metodo che prevede il calcolo della superficie totale del tessuto osseo seguito dal calcolo del volume della struttura.

Lo spessore delle trabecole è successivamente calcolato secondo il metodo discusso in precedenza, mentre per la determinazione della derivata prima dell'area superficiale  $S'$  è applicato il principio di espansione dell'area superficiale, in cui ogni voxel superficiale viene traslato in direzione normale alla superficie di una quantità  $\Delta r$ . L'area viene quindi ricalcolata e la sua derivata prima è definita come:

$$S' = \frac{S(r+\Delta r) - S(r)}{\Delta r} \quad (3.18)$$

A questo punto, per ottenere il valore numerico dell'SMI, non resta che applicarne la definizione (3.17).

Si noti che, in base alla sua definizione, l'SMI può essere negativo nel caso in cui il solido contenga cavità chiuse, in quanto la dilatazione delle strutture binarizzate causa una riduzione della superficie della cavità generando un valore di  $S'$  negativo. Anche la creazione di angoli e bordi a causa dell'intersezione di un oggetto (trabecola) con i contorni del VOI può influenzare il valore dell'SMI determinandone l'incremento.

Il grado di anisotropia (DA) fornisce un'indicazione sull'orientamento preferenziale delle trabecole lungo un asse specifico. Si tratta di un valore che varia da 0, cioè perfettamente isotropo, a 1, ossia completamente anisotropo.

Un ulteriore punto di forza dell'analisi micro-CT consiste nella possibilità di ottenere dati dettagliati sui valori della densità dell'osso in 3D tramite la misura della *bone mineral density* (BMD).

In letteratura la BMD è definita come la densità volumetrica di idrossiapatite presente nel tessuto calcificato, espressa in  $\text{g}/\text{cm}^3$ . Questa misura è una media delle densità di un volume di osso contenente sia osso sia tessuti molli: non costituisce dunque una misura della densità reale dell'osso, ma dà una misura della densità apparente.

La BMD, ricavata tramite analisi micro-CT non è una misura diretta della densità, ma viene ricavata invece dal livello di assorbimento dei raggi X da parte del campione, dipendente a sua volta dal coefficiente di attenuazione del materiale e dallo spessore di quest'ultimo. Essendo noto il materiale da analizzare, è possibile correlare il coefficiente di attenuazione rilevato in seguito all'analisi analisi micro-CT alla quantità del costituente analizzato all'interno del campione in esame tramite l'utilizzo di *phantom* di calibrazione, aventi densità note di idrossiapatite e le stesse dimensioni del campione.

La misura reale della densità del tessuto osseo è invece indicata dalla *tissue mineral density* (TMD) che prende in considerazione solo l'analisi dell'osso, escludendo i tessuti molli circostanti. Per la misurazione della TMD nel tessuto osseo trabecolare è necessaria un'elevata risoluzione dell'immagine: lo spessore minimo delle trabecole deve dunque

essere almeno equivalente a 10 pixel. È per questo motivo che per l'analisi della densità dell'osso trabecolare si preferisce fare riferimento alla BMD [12].

La determinazione della qualità dell'osso è uno dei principali campi di applicazione della micro-CT. In particolare, la definizione della BMD è significativa nell'indicazione della resistenza meccanica dell'osso e nel confronto fra osso sano ed osso osteoporotico. È tuttavia importante sottolineare che esistono rilevanti differenze nei valori della BMD e nei parametri morfologici in base al sito anatomico considerato. È sempre più evidente che la BMD da sola non rappresenta un buon indicatore del rischio di frattura, poiché mostra un certo grado di sovrapposizione fra soggetti sani ed osteoporotici [45].

Ulteriore criticità nella determinazione della densità riguarda la possibilità di essere influenzata da tre tipi di artefatti che inducono errori nella sua definizione: l'effetto del volume parziale, il *beam hardening* e l'effetto dello spessore del materiale che circonda l'area presa in analisi [10].

L'effetto del volume parziale comporta una sottostima del valore della densità negli oggetti di spessore prossimo allo spessore minimo analizzabile. Questa incertezza nell'analisi è causata dal gradiente di densità presente nel voxel fra le parti a maggiore e minore densità. Per un oggetto sottile, i gradienti di densità si incontrano prima che sia possibile determinare il reale valore della densità del materiale, facendo sì che la densità misurata tramite la micro-CT per l'osso trabecolare rifletta maggiormente lo spessore delle trabecole piuttosto che la reale densità del materiale [10].

Il *beam hardening*, causato dall'assorbimento dei raggi X meno energetici da parte degli strati superficiali dell'osso, è un effetto che porta ad una sovrastima della densità degli strati superficiali del campione. In questo caso l'errore può essere prevenuto tramite software oppure rimuovendo la componente meno energetica dei raggi X attraverso un filtro metallico ed applicando il giusto voltaggio alla sorgente.

La stima della densità di un oggetto è influenzata anche dallo spessore del materiale che lo circonda: infatti quest'ultimo agisce come un filtro addizionale per i raggi X. Perciò lo stesso oggetto scansionato senza materiale di contorno mostra una densità maggiore.

Attraverso l'individuazione di una procedura sperimentale corretta, le tre fonti di errore sopracitate possono essere minimizzate garantendo una valida misura della BMD. Un importante step della procedura consiste, dunque, nella corretta calibrazione del software attraverso l'utilizzo di *phantom* di densità nota, la cui scansione si effettua nelle medesime condizioni dei campioni da analizzare [10].

Numerosi studi si sono avvalsi della micro-CT per l'analisi delle caratteristiche morfologiche e della densità del tessuto osseo, sia sano sia affetto da disturbi metabolici.

*Ozan et al.* [45] hanno condotto una campagna di misurazioni volta a confrontare campioni di teste femorali osteoporotiche ed osteopeniche tramite analisi micro-CT e test di compressione. Dall'analisi con la micro-CT di campioni di osso trabecolare prismatici ( $3 \times 2 \times 2 \text{ cm}^3$ ) sono stati ricavati i valori degli indici strutturali (BV/TV, Tb.Th, Tb.N Tb.Sp e Conn.D) (Tab. 3.1).

|                             | Osteopenic<br>(n = 9) | Osteoporotic<br>(n = 9) | p-Value |
|-----------------------------|-----------------------|-------------------------|---------|
| BV (mm <sup>3</sup> )       | 1.34 (0.5)            | 1.001 (0.3)             | 0.114   |
| BV/TV (%)                   | 0.16 (0.06)           | 0.12 (0.03)             | 0.111   |
| Conn.D (1/mm <sup>3</sup> ) | 198.7 (26.6)          | 64.67 (3.4)             | 0.234   |
| Tb.N (1/mm)                 | 2.25 (0.9)            | 1.83 (0.4)              | 0.3     |
| Tb.Th (mm)                  | 0.09 (0.04)           | 0.09 (0.02)             | 0.689   |
| Tb.Sp (mm)                  | 0.45 (0.04)           | 0.71 (0.1)              | 0.003   |

BV: bone volume; TV: total volume; Conn.D: connectivity density; Tb.N: trabecular number; Tb.Sp: trabecular separation; Tb.Th: trabecular thickness.

<sup>a</sup>Data are listed as mean (standard deviation).

Tabella 3.1. Parametri morfologici ricavati da Ozan et al. nei gruppi osteopenico e osteoporotico [45].

La BMD è stata ricavata utilizzando la *dual-energy X-ray absorptiometry*. I test meccanici di compressione hanno fornito il modulo elastico, il carico di snervamento ed il carico massimo dei campioni (Tab. 3.2). Per ogni gruppo si è calcolata la densità di energia di deformazione. La BMD media del gruppo osteoporotico risulta essere di 0,59 g/cm<sup>2</sup>. Dai test meccanici è emerso come sia presente una differenza significativa nel carico di snervamento e nel carico massimo tra i due gruppi, con un valore rispettivo di 1,94 MPa e 3,03 MPa per il gruppo osteoporotico contro i 2,94 MPa e 4,56 MPa del gruppo osteopenico. Per quanto riguarda gli altri parametri meccanici non è invece emersa nessuna differenza significativa.

|                                               | Osteopenic<br>(n = 14) | Osteoporotic<br>(n = 28) | p-Value |
|-----------------------------------------------|------------------------|--------------------------|---------|
| Strain energy density<br>(kJ/m <sup>3</sup> ) | 260.76 (14.5)          | 179.5 (11.1)             | 0.321   |
| Stiffness (N/mm)                              | 1560.82 (85.7)         | 1328.99 (72.8)           | 0.349   |
| Young's modulus (MPa)                         | 83.38 (4.7)            | 60.71 (3.3)              | 0.143   |
| Yielding stress (MPa)                         | 2.94 (1.8)             | 1.94 (1.2)               | 0.048   |
| Maximum stress (MPa)                          | 4.56 (1.8)             | 3.03 (1.3)               | 0.017   |

<sup>a</sup>Data are listed as mean (standard deviation).

Tabella 3.2. Parametri meccanici macroscopici ricavati da Ozan et al. nei gruppi osteopenico e osteoporotico [45].

Anche se i parametri strutturali sono risultati più elevati nel gruppo osteopenico, non è stata osservata, da Ozan et al. [45], una differenza sostanziale fra i due gruppi. L'analisi statistica ha inoltre dimostrato come non vi sia una correlazione significativa fra la BMD ed i principali parametri morfologici (BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N), il modulo di Young, il carico di snervamento o il carico massimo nel gruppo di pazienti osteoporotici. L'assenza

di correlazione fra BMD e parametri strutturali e meccanici evidenzia quanto già detto in precedenza, e cioè che la BMD, a causa del carattere locale della misurazione, da sola non è sufficiente a discernere fra soggetti a rischio di frattura e soggetti sani.

Nel loro studio, invece, *Ciarallo et al.* [16] hanno confrontato le proprietà meccaniche dell'osso trabecolare delle parti prossimali del femore con le proprietà strutturali ricavate da un'analisi ad elementi finiti basata sulla scansione con la micro-CT. La ricerca si è prefissa lo scopo di individuare eventuali correlazioni fra parametri meccanici e parametri morfologici: si presume una diminuzione della resistenza dell'osso all'aumentare della porosità o al diminuire della BMD. In effetti, lo studio ha verificato la correlazione fra modulo elastico e resistenza meccanica, osservando anche una maggiore porosità dell'osso osteoporotico rispetto ai campioni di controllo. Inoltre, riportando su differenti grafici la resistenza a compressione verso lo spessore delle trabecole, il loro numero e la loro spaziatura si è rilevato come i parametri strutturali non presentino correlazioni significative con le caratteristiche biomeccaniche dell'osso. *Ciarallo et al.* [16] hanno quindi individuato nella BMD e nel grado di porosità due fattori particolarmente indicativi per la determinazione della resistenza meccanica dell'osso: sia la resistenza meccanica che il modulo elastico aumentano esponenzialmente al diminuire della porosità relativa o all'aumentare della BMD.

Una ricerca che si è concentrata sull'efficacia con la quale gli indici microstrutturali riflettono le caratteristiche biomeccaniche dell'osso trabecolare in diversi siti anatomici è quella di *Ulrich et al.* [58]. In particolare, lo studio ha valutato l'effetto dell'utilizzo dei parametri strutturali in un intervallo di valori nel quale la BMD da sola non è in grado di discernere fra campioni osteoporotici e sani. Per il progetto sono stati utilizzati campioni di osso trabecolare provenienti dalla testa del femore, dalla seconda vertebra lombare, dal calcagno e dalla parte anterosuperiore della cresta iliaca. I campioni sono stati analizzati tramite micro-CT per la definizione dei parametri strutturali: BS/TV, BV/TV, Tb.th, Tb.Sp, Tb.N e DA (Tab. 3.3).

I moduli elastici ( $E_1, E_2, E_3$ ), i moduli di Poisson ( $\nu_{12}, \nu_{13}, \nu_{23}$ ) e i moduli di taglio ( $G_{12}, G_{13}, G_{23}$ ) dell'osso sono stati ricavati da *Ulrich et al.* [58] tramite un'analisi ad elementi finiti assumendo un comportamento lineare elastico del tessuto. I valori di volume di osso (BV/TV) ricavati si situano tra quelli della vertebra lombare fino a quelli dell'osso femorale, che presenta i valori maggiori. Infatti, in accordo a ciò, l'osso femorale mostra il maggiore spessore trabecolare ed il minore spazio intertrabecolare. Concordemente a queste osservazioni, è stato sottolineato come sia nelle teste femorali che si rilevano i valori maggiori di modulo elastico e modulo di taglio.

Scopo ultimo sono state la determinazione delle costanti elastiche e degli indici strutturali dell'osso trabecolare di vari siti anatomici e l'analisi della capacità di predizione delle costanti elastiche grazie all'inclusione dei parametri strutturali. *Ulrich et al.* [58] hanno concluso che l'introduzione dei parametri strutturali in aggiunta alla semplice considerazione del volume relativo di osso permette di aumentare la predittività della varianza delle costanti elastiche, sottolineando l'importanza di questi parametri nella determinazione della qualità dell'osso.

| Variable                         | Mean  | SD    | Minimum | Maximum |
|----------------------------------|-------|-------|---------|---------|
| Calcaneus samples<br>(N = 60)    |       |       |         |         |
| BV/TV (%)                        | 11.65 | 3.33  | 5.37    | 18.69   |
| BS/TV (/mm)                      | 21.82 | 3.09  | 14.51   | 28.34   |
| Tb.Th (mm)                       | 0.127 | 0.017 | 0.102   | 0.169   |
| Tb.Sp (mm)                       | 0.684 | 0.109 | 0.456   | 0.982   |
| Tb.N (/mm)                       | 1.45  | 0.20  | 1.00    | 2.09    |
| DA                               | 1.74  | 0.15  | 1.36    | 2.17    |
| Femoral head samples<br>(N = 58) |       |       |         |         |
| BV/TV (%)                        | 20.67 | 5.19  | 8.30    | 31.68   |
| BS/TV (/mm)                      | 15.25 | 3.12  | 8.88    | 22.94   |
| Tb.Th (mm)                       | 0.172 | 0.029 | 0.120   | 0.257   |
| Tb.Sp (mm)                       | 0.706 | 0.110 | 0.480   | 0.984   |
| Tb.N (/mm)                       | 1.42  | 0.21  | 0.98    | 1.91    |
| DA                               | 1.73  | 0.22  | 1.27    | 2.18    |
| Iliac crest samples<br>(N = 62)  |       |       |         |         |
| BV/TV (%)                        | 15.22 | 5.11  | 5.73    | 27.88   |
| BS/TV (/mm)                      | 17.63 | 3.05  | 10.30   | 23.72   |
| Tb.Th (mm)                       | 0.150 | 0.027 | 0.101   | 0.225   |
| Tb.Sp (mm)                       | 0.754 | 0.143 | 0.523   | 1.306   |
| Tb.N (/mm)                       | 1.39  | 0.24  | 0.79    | 1.98    |
| DA                               | 1.50  | 0.18  | 1.17    | 1.97    |
| Lumbar spine samples<br>(N = 58) |       |       |         |         |
| BV/TV (%)                        | 8.15  | 1.87  | 4.35    | 12.33   |
| BS/TV (/mm)                      | 23.37 | 2.56  | 18.74   | 32.45   |
| Tb.Th (mm)                       | 0.123 | 0.016 | 0.082   | 0.157   |
| Tb.Sp (mm)                       | 0.800 | 0.133 | 0.612   | 1.269   |
| Tb.N (/mm)                       | 1.26  | 0.19  | 0.77    | 1.63    |
| DA                               | 1.43  | 0.17  | 1.16    | 1.96    |

KEY: BS/TV, relative bone surface; BV/TV, relative bone volume; DA, degree of anisotropy; Tb.N, trabecular number; Tb.Sp, trabecular separations; Tb.Th, mean trabecular thickness.

Tabella 3.3. Parametri morfologici ricavati da Ulrich et al. per vari siti anatomici [58].

Zhang et al. [62] hanno condotto uno studio sull'osso trabecolare di donne in menopausa affette da osteoartrite o osteoporosi scansionando, tramite micro-CT, campioni cilindrici di 10 mm di altezza e 5 mm di diametro. Dall'analisi dei parametri strutturali è stato possibile ricavare i valori della frazione volumetrica di osso (BV/TV), lo spessore delle trabecole (Tb.Th), il loro numero e la loro distanza reciproca (Tb.N, Tb.Sp), lo *structure model index* (SMI) e il grado di anisotropia (DA). I campioni sono successivamente stati sottoposti a test di compressione per ricavare il modulo elastico ( $E_c$ ), il carico di snervamento ( $R_{ec}$ ), il carico massimo a compressione ( $R_{mc}$ ) e la forza di compressione massima ( $F_{mc}$ ) come indicatori

principali delle proprietà meccaniche. Un test di Mann-Whiney è stato utilizzato per confrontare la proprietà strutturali e meccaniche fra i due gruppi di campioni. Inoltre, si è utilizzata un'analisi di correlazione bivalente per determinare le potenziali correlazioni fra parametri microstrutturali e meccanici. I parametri strutturali hanno mostrato una differenza statistica significativa per quanto riguarda BV/TV e Tb.Th, mentre non è stata rilevata alcuna differenza per il Tb.N. ed il Tb.Sp. Anche lo SMI ha rilevato una differenza significativa fra i due gruppi, con il gruppo osteoporotico che presenta una prevalenza più marcata della struttura trabecolare aciculare rispetto a quello osteoartritico, in cui si rilevano trabecole più appiattite.

Per quanto riguarda la correlazione fra parametri strutturali e indici meccanici *Zhang et al.* [62] hanno rilevato come la frazione di osso (BV/TV) sia correlata positivamente con Tb.N. e Tb.Th. e negativamente con Tb.Sp. Ancora una volta, l'osservazione di queste relazioni conferma come gli indici strutturali siano implicati nella regolazione delle proprietà meccaniche dell'osso trabecolare. Si sottolinea inoltre nuovamente l'assenza di una differenza significativa nella BMD dei due gruppi in analisi.

Nella sua analisi sulla correlazione tra gli indici strutturali dell'osso trabecolare e le proprietà meccaniche dell'osso trabecolare femorale, *Anna Nikodem* [37] ha confrontato le proprietà di tre gruppi distinti di osso trabecolare dell'epifisi femorale: un primo gruppo di controllo con pazienti senza patologie ossee, un secondo gruppo di pazienti affetti da osteoporosi ed un ultimo di soggetti affetti da osteoartrosi. I provini ossei, in forma di campioni cubici di 10 mm di lato, sono stati realizzati in modo tale da facilitare la determinazione delle proprietà strutturali e meccaniche. Ogni campione è stato scansionato tramite micro-CT al fine di determinare i parametri morfologici, con particolare riferimento al numero delle trabecole, al loro spessore, alla loro spaziatura, al grado di anisotropia, alla densità di connessione, allo *structure model index* e alla *bone mineral density* (Tab. 3.4).

| Variable                             |      | Physiology (F) |          | Osteoporosis (OP) |          |
|--------------------------------------|------|----------------|----------|-------------------|----------|
| Structural properties                | Unit | Value          | $\pm SD$ | Value             | $\pm SD$ |
| Bone volume /total volume (BV/TV)    | %    | 25.32          | 5.67     | 18.86             | 5.00     |
| Bone surface/bone volume (BS/BV)     | 1/mm | 13.38          | 1.97     | 15.96             | 2.97     |
| Trabecular number (Tb.N)             | 1/mm | 1.42           | 0.15     | 1.32              | 0.18     |
| Trabecular thickness (Tb.Th)         | mm   | 0.18           | 0.02     | 0.17              | 0.03     |
| Trabecular spacing (Tb.Sp)           | mm   | 0.67           | 0.08     | 0.72              | 0.11     |
| Degree of structural anisotropy (DA) | 1    | 1.59           | 0.15     | 1.71              | 0.26     |

Tabella 3.4. Parametri morfologici ricavati da *Nikodem* per osso sano e osteoporotico [37].

| Variable                     |                       | Physiology (F) |          | Osteoporosis (OP) |          |
|------------------------------|-----------------------|----------------|----------|-------------------|----------|
| Structural properties        | Unit                  | Value          | $\pm SD$ | Value             | $\pm SD$ |
| Connectivity density (ConnD) | 1/mm <sup>3</sup>     | 6.49           | 2.25     | 5.02              | 1.38     |
| Structure model index (SMI)  | 1                     | 1.12           | 0.08     | 1.10              | 0.43     |
| Mineral density (rminer)     | mg HA/cm <sup>2</sup> | 211.99         | 73.43    | 116.72            | 62.96    |

Tabella 3.5. Ulteriori parametri morfologici ricavati da *Nikodem* per osso sano e osteoporotico [37].

Per la determinazione delle proprietà meccaniche (Tab. 3.5) i campioni sono sottoposti da *Anna Nikodem* [37] ad un test di compressione uniassiale in due fasi: durante la prima fase sono state determinate le proprietà elastiche del tessuto osseo nelle tre direzioni ortogonali, mentre durante la seconda è stato realizzato il test fino a rottura per la determinazione della resistenza meccanica.

Dall'analisi morfologica si è osservato come l'osso osteoporotico presenti il minor rapporto relativo osso/volume totale, e la maggior superficie ossea rispetto al volume osseo. I campioni osteoporotici presentano, rispetto a quelli di controllo e a quelli osteoartritici, valori inferiori per il numero e lo spessore delle trabecole ed un maggior grado di anisotropia. Il numero di trabecole ed il numero di connessione fra ognuna di loro diminuisce sia nei campioni osteoartritici sia in quelli osteoporotici se comparati al gruppo di controllo, tuttavia la diminuzione è maggiore nel caso dei campioni osteoporotici. Lo SMI per i campioni osteoporotici varia tra -1,12 e 0,79 indicando un tessuto trabecolare misto aciculare ed appiattito con una prevalenza degli elementi appiattiti.

Per quanto riguarda le proprietà meccaniche, si è osservato che nelle tre strutture ossee oggetto di studio la variazione dell'anisotropia meccanica concorda con la variazione dell'anisotropia strutturale. Tuttavia, un incremento dell'anisotropia strutturale ha impatto ridotto sull'anisotropia meccanica. L'analisi statistica ha inoltre permesso di esaminare la dipendenza dell'SMI dalla frazione in volume di osso e dalla BMD, la densità di connessione tra le trabecole come funzione del loro numero e della loro spaziatura, la dipendenza del modulo elastico dalla frazione in volume di osso, dall'SMI e dalla BMD ed infine la dipendenza del carico di rottura dalla frazione in volume, dal logaritmo della densità di connessione e dallo SMI.

*Nikodem* [37] conclude che una struttura composta da trabecole ossee spesse e ben distribuite, e cioè con un minore SMI e Tb.N., trasferisce carichi maggiori, cioè presenta un maggiore  $\sigma_{ult}$ , rispetto ad una composta da trabecole più sottili ed in numero maggiore.

La micro-CT ed i test di compressione sono stati utilizzati anche nella ricerca di *Catarina Vale et al.* [14] per la caratterizzazione del tessuto osseo in vista di un'analisi di correlazione fra parametri morfologici e meccanici dell'osso trabecolare. Punto di partenza è stata l'assimilazione del tessuto osseo ad un solido cellulare il cui modulo elastico e la cui resistenza a compressione sono correlati alla densità attraverso i modelli pubblicati da Gibson ed Ashby [20].

Nello studio di *Catarina Vale et al.* [14] sono stati valutati gli effetti dell'osteoartrite e dell'osteoporosi tramite l'utilizzo di campioni di osso trabecolare di forma cilindrica con diametro di 5 mm e altezza 15 mm per i campioni sottoposti alla micro-CT e, rispettivamente, 15 mm e 30 mm per i campioni destinati ai test di compressione.

Tramite la micro-CT sono stati ricavati la frazione in volume di osso, la superficie di osso specifica, l'SMI, lo spessore, il numero e la separazione delle trabecole nonché il grado di anisotropia (Tab. 3.6).

| Parameter                 | C (n = 20)     |        | F (n = 11)     |        |
|---------------------------|----------------|--------|----------------|--------|
|                           | Mean ± SD      | Range  | Mean ± SD      | Range  |
| Age (years)               | 70 ± 5         | 18     | 81 ± 5         | 18     |
| BV/TV (%)                 | 14.165 ± 7.553 | 25.183 | 13.813 ± 5.543 | 15.775 |
| BS/BV (mm <sup>-1</sup> ) | 19.405 ± 5.261 | 19.036 | 18.947 ± 2.853 | 7.655  |
| Tb.Th (mm)                | 0.217 ± 0.047  | 0.176  | 0.210 ± 0.020  | 0.063  |
| Tb.N (mm <sup>-1</sup> )  | 0.621 ± 0.244  | 0.857  | 0.648 ± 0.227  | 0.665  |
| Tb.Sp (mm)                | 0.770 ± 0.127  | 0.407  | 0.754 ± 0.099  | 0.359  |
| SMI (none)                | 1.777 ± 0.504  | 1.778  | 1.723 ± 0.326  | 1.134  |
| DA (none)                 | 0.942 ± 0.043  | 0.160  | 0.914 ± 0.079  | 0.270  |
| FD (none)                 | 2.078 ± 0.129  | 0.402  | 2.106 ± 0.080  | 0.258  |

Tabella 3.6. Parametri morfologici ricavati da *Catarina Vale et al.* per osso affetto da coxartrosi (C) e con evidenza di frattura fragile (F) [14].

Tramite i test di compressione uniassiale sono stati determinati il modulo di Young, il carico massimo di compressione e l'energia di frattura (Tab. 3.7).

| Parameter                         | C (n=20)          |         | F (n=11)          |         |
|-----------------------------------|-------------------|---------|-------------------|---------|
|                                   | Mean ± SD         | Range   | Mean ± SD         | Range   |
| E (MPa)                           | 443.281 ± 154.286 | 610.680 | 502.449 ± 224.347 | 705.975 |
| $\sigma_{ULT}$ (MPa)              | 9.045 ± 4.226     | 17.763  | 10.722 ± 4.673    | 16.624  |
| $W_{ULT}$ (N mm/mm <sup>3</sup> ) | 0.171 ± 0.152     | 0.706   | 0.219 ± 0.141     | 0.417   |

Tabella 3.7. Parametri meccanici macroscopici ricavati da *Catarina Vale et al.* per osso affetto da coxartrosi (C) e con evidenza di frattura fragile (F) [14].

Dall'analisi statistica dei dati è emerso come i parametri meccanici mostrino una correlazione positiva con la frazione in volume di osso ed il numero delle trabecole ed una correlazione negativa con l'SMI ed il Tb.Sp. Inoltre, nei campioni osteoporotici le proprietà meccaniche aumentano all'aumentare del grado di anisotropia. Si sono inoltre rappresentate, assieme ai dati sperimentali, le curve teoriche del modulo elastico e della resistenza meccanica al fine di determinare un modello che approssimi al meglio i risultati dello studio. L'applicazione di tali modelli ha quindi permesso a *Catarina Vale et al.* [14] di rilevare come in un regime elastico lineare l'osso malato si deformi tramite flessione, e come l'osso trabecolare sano collassi tramite deformazione elastica mentre quello patologico si spezzi tramite un mix di deformazione elastica e frattura fragile.

### 3.2 Test di compressione

I test meccanici di compressione, dal momento che simulano le condizioni a cui viene sottoposto l'osso durante le sue normali funzioni, sono da sempre considerati i test di riferimento per la determinazione delle proprietà meccaniche dell'osso.

I principali parametri ottenuti dai test di compressione sono il modulo elastico lungo la direzione principale di allineamento delle trabecole ( $E$ ), il carico di snervamento ( $\sigma_{ys}$ ) ed il carico massimo prima della rottura ( $\sigma_{ult}$ ). Ulteriore parametro, rilevante in particolar modo per lo studio del tessuto osteoporotico, è la quantità di energia richiesta per la frattura in quanto indicazione della tenacità dei tessuti.

Uno dei principali limiti connessi alla realizzazione dei test di compressione consiste nel carattere distruttivo di questa prova, che rende inutilizzabili i campioni in successive analisi che ne richiederebbero l'integrità.

Differenti gruppi di ricerca hanno condotto analisi tramite test di compressione sul tessuto calcificato, tuttavia ad oggi non esiste una procedura standard per la realizzazione dei test meccanici. I siti principali da cui vengono prelevati i campioni sottoposti ai test di compressione sono le vertebre, le tibie, i femori ed in particolare le teste femorali. Le principali differenze fra i protocolli possono individuarsi in variazioni geometriche e dimensionali fra i campioni, nel tipo di supporto utilizzato, nel metodo per la determinazione della deformazione e nella velocità di spostamento della traversa durante il test di compressione.

Le geometrie maggiormente indicate per i test di compressione sono quella cubica o cilindrica. In particolare, i campioni cilindrici hanno il vantaggio di essere facilmente ottenibili tramite trapanazione. La letteratura suggerisce la produzione di provini cilindrici aventi un *aspect ratio* compreso fra 1.5 e 2 [2]. Ovviamente, l'*aspect ratio* può essere diverso anche fra campioni provenienti dallo stesso osso a causa di certo grado di variazione dimensionale all'interno dell'osso medesimo.

Per quanto riguarda la metodologia con cui si effettua il test di compressione, è possibile utilizzare una configurazione della macchina in cui i campioni sono posti direttamente in contatto con le piastre di compressione oppure, al fine di limitare l'eventuale scorrimento del campione durante il test, inglobare le estremità dei campioni di osso in cappucci polimerici o all'interno di adattatori metallici.

La prima procedura comporta, tuttavia, una maggiore incertezza della misura dovuta alla deformabilità della macchina ed agli effetti di frizione fra provino e macchinario [2]. Infatti, in questa tecnica, la deformazione del campione può essere misurata direttamente dallo spostamento della traversa mobile del macchinario, tuttavia la deformazione stessa della macchina può condurre ad una sovrastima della deformazione del campione. Si tratta però di un errore trascurabile vista la sostanziale differenza fra i moduli elastici dell'osso e dei costituenti del macchinario per il test.

La seconda tecnica, prevedendo l'inglobamento delle estremità del campione all'interno di cappucci di materiale polimerico, presenta il vantaggio di poter utilizzare un estensimetro collegato ai cappucci polimerici così da evitare un eventuale danneggiamento delle trabecole durante la preparazione del test. I difetti di questa procedura sono l'impossibilità di controllare con precisione lo spessore dei cappucci polimerici terminali, l'insorgenza di una concentrazione degli sforzi nella zona di passaggio fra polimero ed osso e l'aumento artificioso della deformazione [2]. Per questa ragione, ad oggi, la tecnica più utilizzata

consiste nell'utilizzo dello spostamento della traversa mobile del macchinario per misurare la deformazione del campione.

Ulteriore aspetto che differenzia i protocolli dei test di compressione è la velocità di spostamento della traversa. Si è osservato che per velocità ridotte, nel range 0,005 – 0,4 mm/s, l'effetto della viscoelasticità dell'osso è ridotto e non si verifica una variazione marcata delle proprietà meccaniche al variare della velocità di carico [2].

Particolarmente interessante ai fini della valutazione delle proprietà meccaniche dell'osso trabecolare risulta essere il lavoro di *Aleixo et al.* [2], nel quale l'osso trabecolare viene assimilato ad un materiale cellulare di cui vengono individuati tre principali regimi caratteristici all'interno della curva sforzo-deformazione sotto carichi compressivi. La curva sforzo-deformazione può essere descritta da un primo regime di deformazione lineare elastica, seguito da un *plateau* causato dalla densificazione dovuta al cedimento graduale delle trabecole e concluso da un ultimo regime di compressione del tessuto ormai compattato. Le imperfezioni presenti all'interno della struttura ossea comportano un certo grado di decremento dello stress dopo il raggiungimento del carico di snervamento. Nello studio sono stati sottoposti a compressione ad una velocità di deformazione costante di 0,1 mm/s campioni cilindrici di 15 mm di diametro e 30 mm di lunghezza tramite un macchinario universale equipaggiato con una cella di carico da 10 kN.

I risultati di *Aleixo et al.* [2] evidenziano la presenza di tre tipologie di andamento delle curve sforzo-deformazione, che si differenziano per lo più nel secondo tratto della curva (Fig. 3.5). Nel primo tipo di grafico si evidenzia una regione di *plateau* nella quale la curva cresce leggermente all'aumentare della deformazione senza fluttuazioni significative, viceversa il secondo tipo di curva presenta andamento crescente ma con fluttuazioni più marcate. L'ultimo tipo di curva è caratterizzata da una serie di fluttuazioni dello stress nella parte che dovrebbe corrispondere al *plateau*, con un valore uguale o inferiore al carico di snervamento. Quest'ultimo tipo di andamento è incompatibile con quello osservato per l'osso sano e richiama quello delle schiume fragili, mentre i primi due sono più simili a quelli di un materiale cellulare che va incontro a cedimento plastico. Anche l'andamento dei primi due tipi di curva non è tuttavia attribuibile ad un cedimento puramente plastico: se ne ipotizza pertanto l'associazione ad un meccanismo di frattura fragile in cui le brusche diminuzioni del carico possono essere dettate dall'inizio della propagazione di microcricche all'interno del provino.

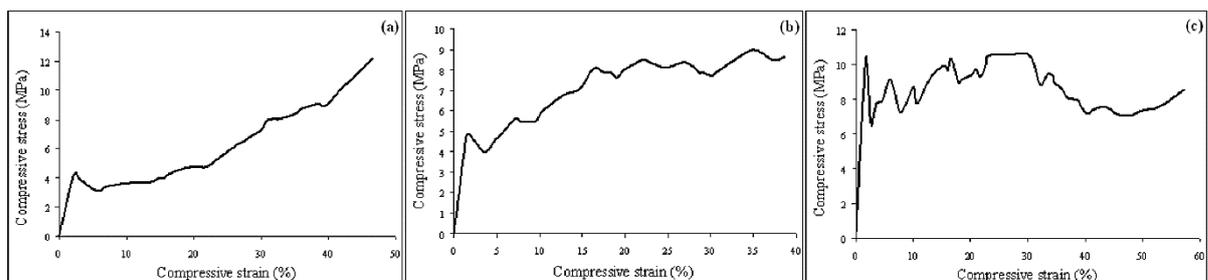


Figura 3.5. Differenti tipi di curva sforzo-deformazione: (a) elastoplastica primo tipo, (b) elastoplastica secondo tipo, (c) fragile [2].

Nonostante queste evidenze, *Aleixo et al.* [2] non hanno potuto suddividere i campioni osteoporotici o osteoartritici in due soli gruppi a causa della notevole variabilità intrinseca del tessuto biologico.

*Kopperdahl et al.* [30] hanno condotto uno studio sul comportamento dell'osso trabecolare durante le condizioni di snervamento. Le ipotesi di partenza, fondate sulle osservazioni di Gibson ed Ashby, hanno assimilato il tessuto osseo ad un solido cellulare composto da puntoni e sottoposto ad un carico lungo la direzione assiale. Secondo questa analisi, la deformazione di snervamento dovrebbe essere correlata positivamente con la densità apparente a causa del meccanismo di instabilità al carico di punta che determina il cedimento delle trabecole. Poiché il rapporto lunghezza/spessore delle trabecole diminuisce all'aumentare della densità, la significatività della correlazione fra deformazione e densità dovrebbe diminuire all'aumentare di quest'ultima in quanto le trabecole sono meno soggette a flessione sotto un carico assiale.

Nello studio di *Kopperdahl et al.* [30] sono state analizzate delle vertebre comprese fra T10 e L4 dalle quali si ricavano campioni cilindrici di 8 mm di diametro e 25 mm di lunghezza. I campioni sono stati dunque sottoposti al test di compressione tramite una macchina servo-idraulica utilizzando il metodo che ne prevede l'incappucciamento delle estremità. Il test ha previsto cinque cicli non distruttivi nel range  $\pm 0,1\%$  di deformazione, con un incremento della deformazione dello  $0,5\%$  al secondo a cui segue un ciclo distruttivo fino al  $3\%$  di deformazione. Il modulo elastico è stato definito come l'inclinazione della linea retta che approssima meglio la curva sforzo-deformazione nel range  $0,20-0,24\%$ . Il carico di snervamento è stato indicato basandosi sul criterio dello  $0,20\%$  di deformazione.

I risultati ottenuti hanno indicato una leggera correlazione della deformazione di snervamento alla densità apparente e, come atteso, una forte dipendenza del modulo elastico, del carico di snervamento e del carico complessivo massimo dalla densità. La correlazione fra densità apparente e deformazione di snervamento è risultata più forte al diminuire della densità dei tessuti. Lo studio ha indicato inoltre come la diminuzione di densità dell'osso che si verifica con l'avanzare dell'età dei soggetti comporti una riduzione del modulo elastico del tessuto osseo il quale, divenendo più deformabile, avvicina la deformazione funzionale a quella di snervamento. Riguardo al meccanismo di snervamento, è stata evidenziata la presenza di una densità apparente al di sotto della quale, a causa del *buckling*, si è osservato un cedimento delle trabecole ed al di sopra della quale è prevalso invece uno snervamento assiale. La densità critica rilevata da *Kopperdahl et al.* [30] è di  $0,40 \text{ g/cm}^3$ , corrispondente anche alla densità intorno a cui si è osservata la modificazione della struttura trabecolare da prevalentemente aciculare ad appiattita.

*Li ed Aspden* [31] hanno svolto, invece, uno studio che ha condotto un'analisi composizionale e meccanica dell'osso trabecolare di soggetti affetti da osteoporosi ed osteoartrite, utilizzando provini cilindrici di 9 mm di diametro provenienti da diverse zone della testa del femore scelti in modo tale da rappresentare regioni sottoposte a differenti sollecitazioni durante la vita del paziente. I test meccanici sono stati realizzati attraverso un test di compressione libera ad una velocità di carico di  $0,0033 \text{ mm/s}$ . Il test è stato interrotto manualmente al decremento della pendenza della curva, ritenuto punto di inizio del

cedimento del materiale. L'interruzione trova la sua ragione nella volontà di evitare un ulteriore danneggiamento del materiale che avrebbe potuto pregiudicare le misure di densità successive. Il carico di snervamento è stato definito come il carico al quale la rigidità del campione risulta ridotta del 3% rispetto alla rigidità massima, mentre l'energia di frattura è stata calcolata come l'area sottesa alla curva. Di ogni campione è stata inoltre calcolata la densità apparente come massa del campione privato della componente midollare divisa per il volume totale del provino. L'analisi statistica ha dimostrato come il modulo elastico ed il carico di snervamento differiscano nel gruppo osteoporotico rispetto a quello di controllo. La densità apparente dell'osso osteoporotico è risultata essere inferiore rispetto al gruppo di controllo, tuttavia non si sono rilevate differenze composizionali fra i due gruppi. È emersa inoltre una correlazione significativa fra il modulo elastico e la densità apparente. In accordo al principio secondo il quale zone differenti dell'osso presentano caratteristiche meccaniche diverse in base agli sforzi sopportati, si è osservato come i valori maggiori di resistenza meccanica si riscontrino nella parte superiore della testa femorale.

Una ricerca che si è concentrata sull'influenza che la tessitura ossea ha sulle proprietà meccaniche dell'osso trabecolare è quella di *Matsuura et al.* [33], che hanno analizzato osso trabecolare proveniente da diversi siti anatomici sottoponendolo a test di compressione quasi statici. Campioni cilindrici di 8 mm di diametro e 14 mm di lunghezza sono stati ricavati dalla seconda vertebra lombare, dalla decima vertebra toracica, dal collo del femore, dal grande trocantere, dal calcagno e dalla porzione distale del radio.

Tutti i siti anatomici analizzati da *Matsuura et al.* [33] sono stati precedentemente radiografati al fine di escludere fratture pregresse. I campioni sono stati quindi analizzati tramite la micro-CT per determinare la frazione in volume di osso ed il grado di anisotropia e, una volta ridotti a 12 mm di lunghezza, sono stati incapsulati in PMMA per il primo millimetro e mezzo da entrambi i lati. Il test è stato eseguito tramite una macchina servo-idraulica equipaggiata con una cella di carico da 1.5 kN, utilizzando un estensimetro per determinare la deformazione. Si è innanzitutto applicato un pre-ciclo variabile di  $\pm 0,35\%$  di deformazione per 12 volte, a cui ha fatto seguito il test di compressione fino ad una deformazione complessiva del 6% alla velocità di 0,005 mm/s. Il modulo elastico è stato definito come la pendenza della curva fra + 0,35 e - 0,35 durante gli ultimi due cicli. Ai fini della determinazione del carico di snervamento si è applicato il criterio dello 0,2% di deformazione. Il modulo elastico apparente misurato dimostra un'elevata variabilità da un sito anatomico all'altro. La frazione in volume di osso spiega solo fra il 27% ed il 72% della variabilità del modulo elastico nei diversi siti anatomici, correlazione aumentata considerando anche la trama ossea. Il carico di snervamento misurato varia tra 0,05 MPa e 14,6 MPa. Come per il modulo elastico, la frazione di osso in volume spiega dal 36% al 74% della variabilità, correlazione aumentata se si considera anche la trama ossea. Diversamente dal modulo elastico e dal carico di snervamento, la deformazione alla quale si verifica lo snervamento è all'incirca costante in tutti i siti anatomici. Il carico di compressione massimo sopportabile dall'osso è in media maggiore del 27% rispetto al corrispondente carico di snervamento. A differenza di altri parametri microstrutturali, quali lo spessore delle trabecole e la loro separazione o lo SMI, il grado di anisotropia è indipendente dalla frazione in volume di osso e rappresenta un indice rilevante per il

miglioramento della predittività delle proprietà meccaniche se associato alla frazione in volume di osso. I dati ricavati dai test meccanici sono in accordo con gli studi precedenti, anche se vi si riscontra una maggiore variabilità dei risultati dovuta al grande numero di campioni considerati.

### 3.3 Nanoindentazione

La nanoindentazione è un test di durezza nel quale vengono utilizzati carichi ridotti e dimensioni della punta tali da ottenere un'area di indentazione dell'ordine di alcuni micrometri o nanometri quadrati. Si tratta di una prova che prevede la misurazione del carico e dello spostamento durante un ciclo di carico e scarico, al fine di determinare una curva carico-spostamento da cui si possa calcolare la durezza ed il modulo di indentazione del materiale. Durante la fase di penetrazione si ha una deformazione elastica e plastica del materiale, mentre nel corso di quella di scarico è possibile studiare le caratteristiche elastiche del materiale.

Per la determinazione delle caratteristiche meccaniche è fondamentale la teoria di Oliver-Pharr, che adatta la teoria di Sneddon per una punta conica alle punte utilizzate nella nanoindentazione grazie ad un fattore correttivo  $\beta$  dipendente dalla geometria dell'indentatore [15, 59]. La geometria dell'indentatore più diffusa nei test sul tessuto osseo è la punta Berkovich, una piramide conica a tre lati con semi-angolo di  $65,35^\circ$  e rapporto area proiettata/profondità pari all'indentatore Vickers. Questa geometria garantisce la presenza di un angolo vivo sulla punta dell'indentatore [15].

La possibilità di monitorare in modo continuativo carico e spostamento della punta è una delle principali motivazioni per l'utilizzo della nanoindentazione come tecnica analitica. Ciò consente infatti la rilevazione dei gradienti locali e delle eterogeneità dei tessuti, permettendo lo studio della loro organizzazione gerarchica. Ulteriore punto a favore per l'utilizzo della nanoindentazione è il ridotto lavoro necessario per la preparazione del campione, in quanto sono sufficienti il suo inglobamento in resina polimerica ed una successiva lucidatura per assicurare la correttezza dell'analisi. Inoltre, la nanoindentazione assicura un'ampia flessibilità attraverso la variazione dei tempi di indentazione, della geometria dell'*indenter* e delle condizioni di carico.

Una delle principali discriminanti nell'analisi di una curva di nanoindentazione è la determinazione dei modi di deformazione attivi nel materiale testato, i quali sono riconducibili a: deformazione elastica, deformazione plastica, deformazione viscosa e frattura.

Per determinare il modo di deformazione attivo nel materiale testato è necessario anche individuare la scala temporale dell'esperimento rispetto al tempo richiesto per la deformazione viscosa [44]. Un'indicazione empirica del tempo richiesto per la deformazione viscosa è la costante di tempo, definita come funzione del rapporto fra la viscosità del sistema ed il modulo elastico. Essa segue, nel caso più semplice, il modello di Maxwell:

$$\tau = \eta/E \quad (3.19)$$

mentre per un sistema poroelastico è espressa dalla legge di Darcy:

$$\tau = l^2/E\kappa \quad (3.20)$$

dove  $l$  è la lunghezza caratteristica e  $\kappa$  il coefficiente di permeabilità.

La deformazione elastica è indipendente dal tempo di applicazione dello sforzo e dalla velocità di variazione del carico, è inoltre reversibile e priva di *threshold*. Nell'analisi di un materiale anisotropo, quale l'osso, è più spesso utilizzato il modulo d'indentazione  $M$ , ricavato come media pesata delle costanti elastiche anisotrope lungo la direzione di indentazione.

La deformazione viscosa è fortemente dipendente dal tempo e risulta irreversibile. Il flusso di un materiale viscoso fa sì che si osservi una variazione del modulo apparente in funzione del tempo dell'esperimento. La connessione tra modulo elastico e deformazione viscosa comporta l'associazione del comportamento viscoso con quello elastico, originandone uno viscoelastico [44].

La deformazione plastica e la frattura, irreversibili e sensibili alla velocità di variazione del carico, possono creare delle discontinuità nel grafico carico-spostamento della nanoindentazione [44].

Per la descrizione della deformazione plastica è fondamentale la definizione del carico di snervamento ( $\sigma_{ys}$ ) in cui si osserva un discostamento della curva sforzo-deformazione dalla linearità. La principale misura della plasticità di un materiale durante una prova di indentazione è rappresentata dalla durezza e più in particolare dalla durezza di contatto ( $H_C$ ), definita come:

$$H_C = P_{max}/A_C \quad (3.21)$$

dove  $P_{max}$  è la massima pressione sopportata dal materiale ed  $A_C$  l'area di contatto dell'indentatore.

La proporzionalità fra durezza e carico di snervamento è spesso lineare, ciò si verifica in particolar modo quando l'indentazione è prevalentemente di tipo plastico [44]. È quindi evidente, da quanto esposto, come la determinazione dei modi di deformazione sia fondamentale per la corretta comprensione dei risultati dei test di nanoindentazione.

I modi di deformazione possono essere facilmente previsti attraverso l'osservazione delle curve carico-spostamento ottenute durante il test. Il flow-chart (Fig. 3.6) permette un'agile interpretazione degli andamenti delle curve propri di materiali elastici, fragili, elastoplastici, viscoelastici e viscoelastoplastici [44].

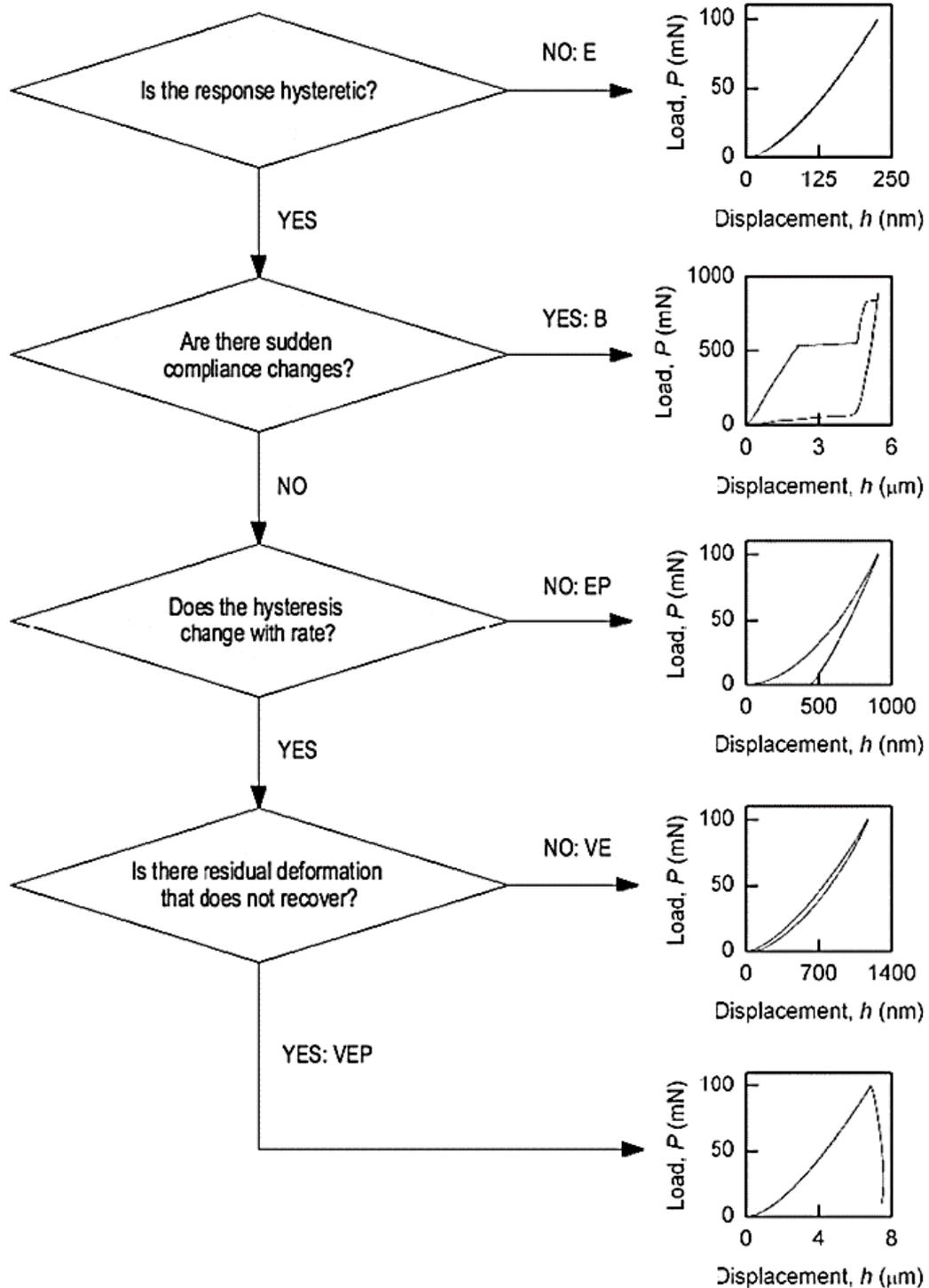


Figura 3.6. Flowchart per la determinazione del modo di deformazione dall'osservazione delle curve di nanoindentazione [44].

Il comportamento di un materiale varia, inoltre, anche in base ai parametri impostati per il test: *indenter* molto appuntiti e prove lunghe favoriscono la deformazione plastica, mentre lunghi periodi di contatto favoriscono una deformazione di tipo viscoso. Allo stesso modo, sonde appuntite e tempi di applicazione del carico brevi favoriscono l'analisi delle

caratteristiche elastoplastiche, mentre *indenter* sferici con lunghi tempi di applicazione del carico sono indicati per lo studio delle caratteristiche viscoelastiche.

L'utilizzo della nanoindentazione, associato ad una spettroscopia Raman, è ciò di cui si sono serviti *Toledano et al.* [57] per condurre uno studio sulla struttura delle trabecole delle donne in menopausa. La nanoindentazione, in questo caso, è stata utilizzata per lo studio delle caratteristiche viscoelastiche dell'osso alla nanoscala, assicurando dunque un'elevata risoluzione spaziale senza essere distruttiva a livello macroscopico e garantendo una forte sensibilità all'anisotropia del materiale. Si tratta di un'analisi che presuppone la determinazione del modulo complesso come misura della resistenza del materiale alla deformazione dinamica, successivamente suddiviso nelle sue componenti di accumulo e di dissipazione. Per la realizzazione della prova sono state inglobate in PMMA biopsie della base del collo femorale di donne in menopausa soggette a frattura dell'anca. I campioni sono stati successivamente lucidati ottenendo una superficie liscia adatta alla nanoindentazione. La punta del nanoindentatore è stata calibrata con un provino di quarzo utilizzando una forza di contatto quasi statica di  $5\mu\text{N}$  alla quale è stata sovrainposta una forza oscillatoria di  $5\mu\text{N}$  alla frequenza di 200 Hz. Il test vero e proprio è stato condotto applicando ad una forza quasi statica di  $5\mu\text{N}$  una forza di  $1,8\mu\text{N}$  con andamento sinusoidale ed una frequenza di 200 Hz. Il modulo complesso ricavato è pari a 12,02 GPa con un valore del modulo di perdita di 5,68 GPa e del modulo di accumulo di 8,37 GPa.

L'analisi condotta da *Toledano et al.* [57] ha permesso di osservare zone con modulo elastico complesso medio più elevato rispetto ad altre limitrofe: questa struttura potrebbe ostacolare la dissipazione dell'energia attraverso l'interfaccia comportando una concentrazione degli sforzi nelle regioni a maggior modulo elastico. Tale concentrazione potrebbe determinare una presenza di micro-danneggiamenti all'interno della singola trabecola spiegando il comportamento fragile dell'osso, maggiormente esaltato nel caso di urti. Il modulo di perdita caratterizza il comportamento viscoso ed è una misura dell'energia dissipata all'interno della struttura, di primaria importanza nei sistemi dinamici quale l'osso poiché determina un comportamento diverso rispetto a quello dei solidi elastici fragili. All'aumentare della differenza del modulo di perdita fra le varie zone dell'osso si assiste ad una minore capacità di dissipazione dell'energia. Il modulo di accumulo dà un'indicazione dell'energia elastica accumulata all'interno del sistema che è rilasciata in seguito alla frattura.

Le regioni di osso neoformato, essendo ricche di collagene, hanno mostrato un comportato prevalentemente viscoelastico. Una diminuzione del fattore di smorzamento è in genere indice di un maggior grado di maturità delle ossa. La viscoelasticità della matrice ossea è particolarmente influenzata dal numero e dalla qualità dei legami fra le fibre di collagene. Negli individui osteoporotici si è individuato un deterioramento di questi legami a causa della formazione preferenziale di legami non enzimatici, che diminuiscono l'energia assorbita favorendo la formazione di micro-danneggiamenti. Il tessuto è quindi più fragile sia a causa dell'inibizione del rilassamento degli stress sia per la più facile propagazione delle cricche preesistenti. Pertanto, secondo *Toledano et al.* [57], la resistenza dell'osso diminuisce all'aumentare della quantità di collagene denaturato, sebbene non sia possibile identificare una variazione del modulo elastico.

Anche *Ojanen et al.* [42] hanno condotto un'analisi sulle proprietà viscoelastiche e composizionali dell'osso trabecolare. Per questa si sono avvalsi di provini cilindrici del diametro di 10 mm ricavati dalla parte prossimale del femore di soggetti senza evidenze di precedenti disturbi metabolici dell'osso. La nanoindentazione è stata realizzata con un nanoindentatore Berkovich del diametro di 50 nm. Il test è stato condotto con campioni immersi in PBS applicando un carico di 30 mN con una rampa di carico di 5 mN/s ed un tempo di mantenimento al carico massimo di 60 s. La determinazione del modulo ridotto e della durezza è stata realizzata tramite l'applicazione del metodo di Oliver-Pharr, mentre è attraverso la spettroscopia Raman che si è realizzata la caratterizzazione composizionale. Anche questa ricerca è in accordo con la teoria secondo la quale il comportamento viscoelastico dell'osso è importante nella dissipazione di energia in presenza di carichi applicati. Gli autori sottolineano, inoltre, come modulo elastico e viscoso siano significativamente correlati alla cristallinità e che la viscoelasticità dell'osso deriva principalmente dalla sua matrice collagenica.

Le ricerche di *Mittra, Akella e Qin* [34] hanno invece come obiettivo l'analisi dell'effetto generato dall'inglobamento dell'osso in una matrice polimerica sulla misura delle proprietà meccaniche tramite nanoindentazione. Nello studio sono stati inoltre considerati gli effetti sul modulo elastico ridotto e sulla durezza prodotti dalla scelta dei parametri utilizzati per il test. Sono stati utilizzati campioni cilindrici di osso trabecolare canino di diametro 10mm ed altezza variabile fra i 3 ed i 5 mm conservati in una soluzione al 70% di etanolo fino al momento dell'inglobamento nella resina. Prima dell'inglobamento i campioni sono stati lavati con un getto di acqua intermittente per eliminare lo strato superficiale di grasso e midollo e sono stati in seguito sottoposti ad un ciclo di disidratazione per immersione in soluzioni a concentrazioni crescenti di etanolo. Al momento dell'inglobamento sono stati utilizzati vari tipi di resina per determinare se una variazione nelle caratteristiche di quest'ultima possa influenzare anche l'analisi delle caratteristiche meccaniche dell'osso. Una volta completato il consolidamento della resina i campioni sono stati lucidati con carte abrasive a grana via via più fine. La lucidatura è stata completata con l'utilizzo di una pasta diamantata.

Lo studio di *Mittra, Akella e Qin* [34] ha valutato l'effetto di quattro differenti variabili nella determinazione del modulo elastico e della durezza dei campioni: il materiale utilizzato per l'inglobamento dei provini, la forza massima di indentazione, la velocità di carico e le variazioni temporali derivate dallo stoccaggio dei provini per periodi diversi prima della nanoindentazione.

Per testare l'effetto della profondità di indentazione sono stati utilizzati profili di indentazione a carichi via via crescenti. Il primo test consiste nel raggiungimento di un primo carico di 250  $\mu\text{N}$ , nella discesa fino a 25  $\mu\text{N}$  e nella salita a 500  $\mu\text{N}$ , seguiti da una discesa a 50  $\mu\text{N}$  e da un ulteriore incremento fino a 750  $\mu\text{N}$ , cui segue lo scarico totale del pezzo. Ogni raggiungimento del picco di carico corrisponde ad un mantenimento del carico per 6 s e ogni scarico è seguito da 2 s di mantenimento. Il test ha dimostrato che le caratteristiche meccaniche misurate sono sostanzialmente indipendenti dal carico massimo applicato.

Il test sull'effetto della velocità di carico è stato condotto da *Mittra, Akella e Qin* [34] utilizzando tre ratei di aumento del carico, in accordo a quanto impostato per studi compiuti da altri gruppi di ricerca: 200, 500 e 800  $\mu\text{N/s}$ . Anche in questo caso non si sono trovate correlazioni significative fra velocità di carico impostata e modulo ridotto o durezza. Per contro è stato rilevato che le tempistiche di stoccaggio hanno un'influenza non trascurabile sui valori del modulo elastico: all'aumentare del tempo di conservazione dei provini inglobati in resina si è osservato un generale aumento del modulo elastico. Inoltre, anche il tipo di materiale in cui è inglobato il campione osseo influenza il valore di durezza misurato, sia in base alla sua viscosità sia secondo il modulo del materiale utilizzato per l'inglobamento.

Uno studio che ha cercato di verificare l'esistenza di differenze intrinseche nel tessuto osseo di donne fertili e in menopausa è quello di *Polly et al.* [49], che hanno realizzato una nanoindentazione sia in condizioni quasi-statiche sia in condizioni dinamiche su campioni provenienti da soggetti sani prima dell'inizio della menopausa e ad un anno dall'inizio di quest'ultima. È stata compiuta, oltre alla nanoindentazione, anche un'analisi tramite la micro-CT per la determinazione dei parametri morfologici. I campioni sono stati inglobati in una resina polimerica e successivamente lucidati, prima con carte abrasive e successivamente con paste diamantate fino all'ottenimento della rugosità ideale per i test di nanoindentazione.

Anche in questo caso i test sono stati condotti utilizzando un indentatore commerciale equipaggiato con una punta Berkovich per un totale di 25 test quasi-statici e 25 test dinamici per campione. I test statici sono stati condotti con una rampa di 0,6 mN/s per un totale di 10 s, seguita da un mantenimento a 6 mN e da uno scarico sempre con velocità 0,6 mN/s. Dai test è emersa una elevata variazione fra i moduli di indentazione ricavati, con risultati che variano fra 9,13 e 20,40 GPa per i campioni di controllo e fra 10,04 e 20,46 GPa per i campioni ricavati durante la menopausa. Similmente, la durezza dei provini di controllo varia fra 0,310 e 0,705 GPa e quella del secondo set di campioni è compresa fra 0,370 e 0,835 GPa. Tuttavia, nonostante questa variabilità, i test statistici hanno evidenziato l'assenza di una correlazione fra l'età ed i parametri meccanici misurati.

Secondo gli autori [49], la mancanza di differenze fra i due set di campioni potrebbe essere dovuta ai campioni considerati: entrambi i set di provini sono costituiti, infatti, da osso proveniente da pazienti senza evidenze di osteoporosi e differenziati solo per l'età dei soggetti. I valori del modulo elastico e della durezza riportati in questo studio sono in linea con quanto rilevato anche da altri ricercatori [52]. Anche modulo di perdita e modulo di accumulo sono conformi ai risultati di altri studi [49] e non c'è evidenza di variazioni fra il gruppo di controllo ed i campioni prelevati in età più avanzata.

*Smith, Schirer e Fazzalari* [55] hanno associato la nanoindentazione alla *quantitative backscattered electron microscopy* per l'analisi della correlazione fra fase minerale, modulo ridotto e durezza. Ipotesi particolarmente interessante è che le zone centrali delle trabecole, essendo più vecchie, siano maggiormente mineralizzate. Lo studio si è proposto quindi di analizzare, oltre al modulo elastico ridotto ed alla durezza, la loro correlazione alla zona di analisi tramite la determinazione del contenuto di calcio. I provini ossei sono stati ricavati

da tre donne senza evidenze di disturbi all'apparato muscoloscheletrico. In seguito ad un lavaggio in soluzione salina, i campioni hanno subito un ciclo di disidratazione progressiva e sono stati poi inglobati in polimetilmetacrilato. La nanoindentazione, controllata in questo studio in base allo spostamento dell'indentatore, è stata realizzata con una punta Berkovich selezionando in modo arbitrario tre trabecole per ogni provino. Il ciclo di indentazione ha previsto una rampa lineare di 10 s fino al raggiungimento di uno spostamento di 400 nm, seguito da un mantenimento di 40 s a cui segue uno scarico lineare di 10 s fino allo spostamento nullo. Dopo la nanoindentazione i campioni sono stati preparati per l'analisi al microscopio elettronico così da poter realizzare la *quantitative backscattered electron microscopy*. Il picco medio di nanoindentazione realizzato è stato di 2,8 mN, con un valore medio di durezza del modulo elastico di 22,34 GPa, una durezza media di 0,74 GPa ed un quantitativo medio di calcio del 24,93%. L'analisi di regressione lineare ha evidenziato una stretta correlazione fra durezza di contatto e modulo elastico, e fra contenuto di calcio e durezza di contatto. A conferma delle ipotesi iniziali, il modulo elastico, la durezza e la quantità di calcio delle zone periferiche hanno presentato valori inferiori rispetto alle zone centrali delle trabecole. Tuttavia, in disaccordo rispetto a quanto atteso e nonostante il differente contenuto di calcio, la resistenza alla deformazione plastica non ha presentato sostanziali differenze fra le zone più esterne e più interne delle trabecole analizzate. Quest'ultima evidenza porta ad ipotizzare che le trabecole conservino una resistenza globale omogenea rispetto alla deformazione plastica nonostante zone interne ed esterne presentino proprietà elastiche differenti.

È dunque sempre più evidente che gli studi attuali si concentrino sulla funzione delle proprietà del collagene nella definizione delle performance meccaniche dell'osso, nonostante in passato l'attenzione fosse invece posta maggiormente sul ruolo dell'idrossiapatite.

### 3.4 Spettroscopia Raman

La spettroscopia Raman realizza analisi non invasive e non distruttive dei tessuti tramite spettroscopia vibrazionale. Permette così di ottenere informazioni fondamentali per la caratterizzazione del tessuto osseo, in particolare riguardo alla sua superficie e composizione chimica. Fra i principali vantaggi delle tecniche spettroscopiche si possono annoverare: costo ridotto, rapidità dell'analisi, risultati quantitativi precisi, flessibilità nella definizione dell'area di indagine e del processo di analisi. In particolare, l'elevata precisione della spettroscopia Raman per le analisi chimiche la rende particolarmente adatta per lo studio dei processi intercellulari, delle patologie e dell'efficacia dei metodi di cura [38].

L'effetto Raman si basa sullo *scattering* inelastico di fotoni aventi lunghezza d'onda compresa tra  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  cm che avviene in seguito alla loro interazione con i modi vibrazionali delle molecole che costituiscono il campione (Fig.3.7).

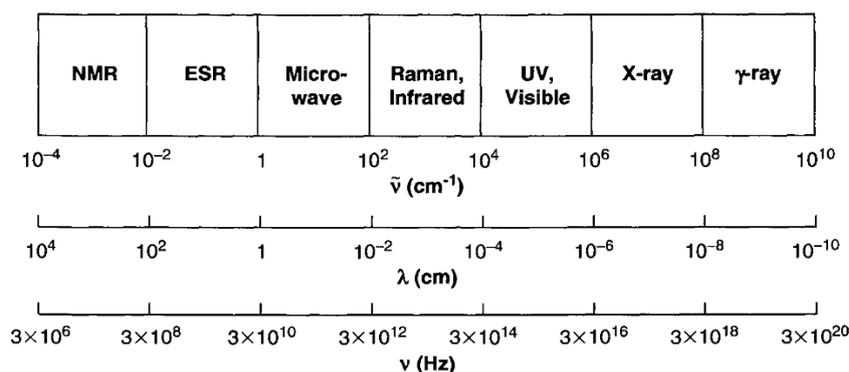


Figura 3.7. frequenze e lunghezze d'onda delle varie regioni dello spettro elettromagnetico [18].

Differentemente dallo *scattering* elastico, che presuppone una conservazione dell'energia della radiazione incidente, lo *scattering* anelastico comporta uno *shift* nella lunghezza d'onda dei fotoni. Le interazioni dei fotoni incidenti, infatti, comportano una variazione della loro frequenza in quanto trasferiscono o ricevono energia dal campione analizzato. La variazione dell'energia dei fotoni è legata ai livelli vibrazionali propri delle molecole analizzate: ogni spettro fornisce informazioni univoche sullo stato fisico e chimico del campione [38].

L'univocità delle informazioni fornite dalla spettroscopia Raman si basa, quindi, sull'interazione del fascio laser incidente con la materia e sui momenti di dipolo indotto prodotti dalla polarizzabilità delle molecole interessate [28]. Lo *shift* nella lunghezza d'onda provocato dall'interazione Raman è indipendente dalla frequenza di eccitazione e definisce una proprietà intrinseca del materiale in esame [28].

Nell'ottica dello *scattering* è possibile individuare tre tipi di interazione radiazione/materia. Il primo modo di interazione, che non riguarda la spettroscopia che verrà qui presa in esame, prevede che la radiazione uscente abbia la stessa lunghezza d'onda e frequenza della radiazione incidente dando origine ad uno *scattering* elastico, e prende il nome di effetto Rayleigh [28].

Un secondo modo di interazione, lo *scattering* Raman, prevede che i fotoni siano diffusi anelasticamente con una variazione della loro frequenza pari alla quantità di energia vibrazionale persa o guadagnata dalla molecola. A sua volta lo *scattering* Raman può verificarsi in due diverse modalità: se la molecola acquista energia vibrazionale dal fotone incidente si parla di Stokes Raman Scattering e l'energia del fotone uscente è in questo caso inferiore rispetto a quella della radiazione incidente; se invece la molecola cede energia vibrazionale al fotone incidente si realizza uno *scattering* anti-Stokes Raman (Fig. 3.8) [28].

Essendo la probabilità che si verifichi uno *scattering* anti-Stokes Raman molto ridotta, il principale meccanismo coinvolto nell'analisi spettroscopica è lo *scattering* Stokes Raman.

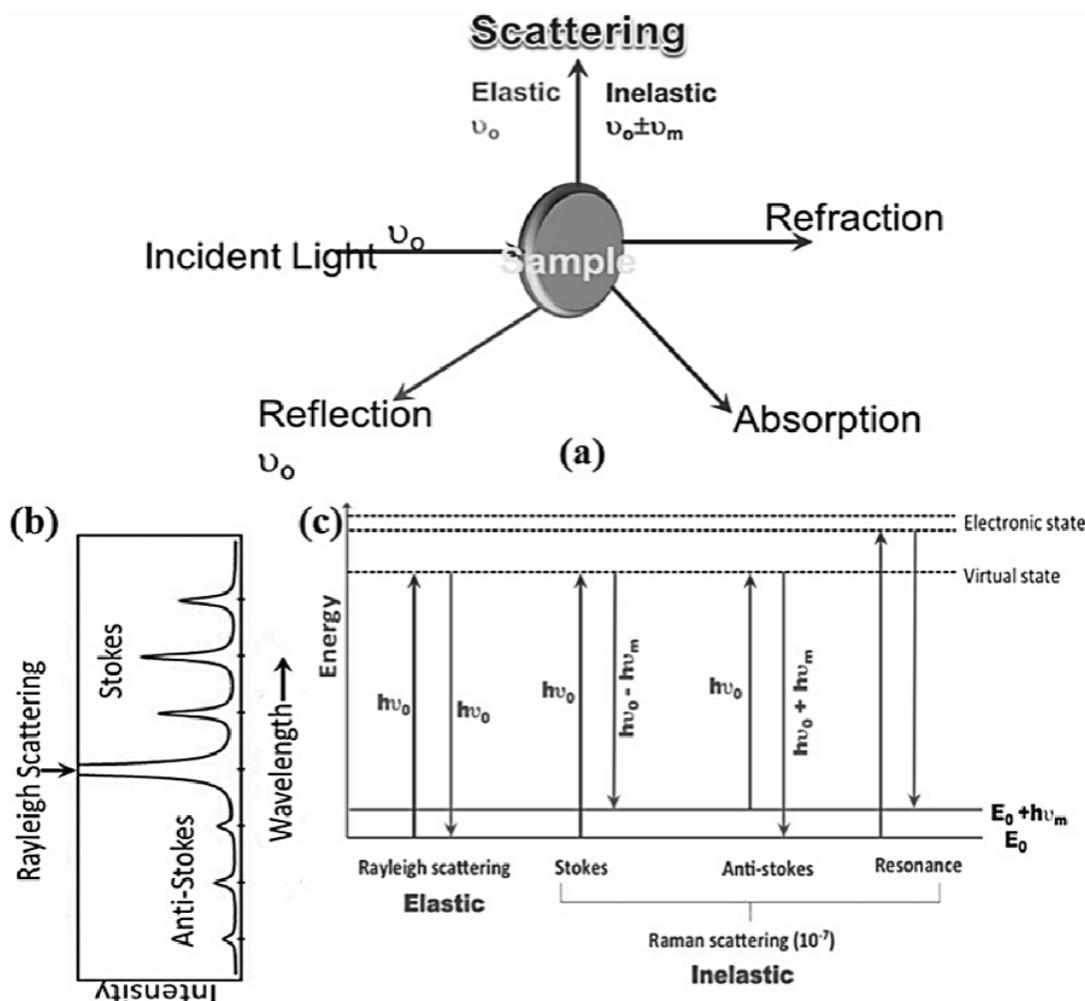


Figura 3.8. (a) Principali modi di interazione radiazione-materia, (b) esempio di spettro Raman, (c) transizioni energetiche coinvolte nello scattering Rayleigh e Raman [28].

Per definire la spettroscopia Raman è utile sottolineare ciò che la differenzia dalla spettroscopia IR. Infatti, sebbene entrambe si avvalgano dello *shift* della lunghezza d'onda della radiazione incidente, alcune transizioni, a causa delle regole di selezione, sono possibili solo per la spettroscopia Raman mentre altre solo per quella IR, rendendo le due tecniche complementari [28].

In generale, la spettroscopia Raman è indicata nello studio delle vibrazioni simmetriche di gruppi non polari, mentre la spettroscopia IR è consigliata nell'analisi delle vibrazioni asimmetriche dei gruppi polari. I modi di vibrazione studiati dalla spettroscopia IR sono quindi quelli in cui si assiste ad un cambio del dipolo della molecola, mentre quelli rilevanti per la Raman sono quelli in cui un cambio della polarizzabilità della molecola comporta uno *scattering* Raman [28].

Uno spettroscopio Raman è costituito da una fonte di eccitazione, generalmente un laser, un sistema di illuminazione del campione che opera anche come rilevatore, un selettore delle lunghezze d'onda di interesse ed un sistema di controllo (Fig. 3.9).

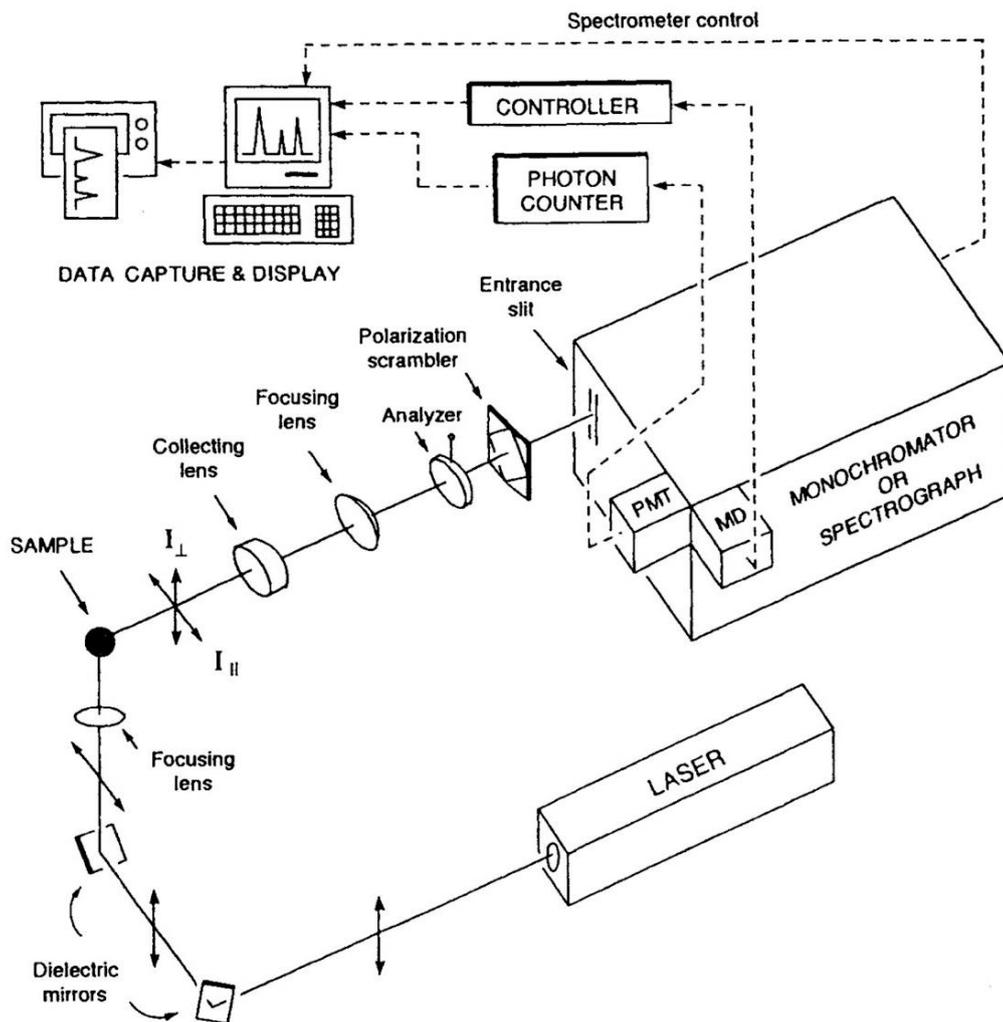


Figura 3.9. Diagramma dello spettrometro Raman [18].

Le principali differenze fra i vari spettroscopi dipendono dalla lunghezza d'onda della fonte di eccitazione, dal tipo di selettore di lunghezza d'onda e dal sistema di rilevazione [18]. Prima dello sviluppo dei laser, che sono oggi lo standard, la fonte di eccitazione per la spettroscopia Raman consisteva in una lampada a mercurio.

I laser sono fonti di eccitazione ideali dal momento che è possibile controllarne con precisione la potenza, forniscono un fascio altamente monocromatico e le lunghezze d'onda indesiderate possono essere facilmente rimosse tramite filtri. A questi vantaggi si aggiunge la ridotta dimensione del fascio generato, che può essere diminuita anche attraverso un sistema di lenti, e che permette dunque lo studio di campioni anche molto piccoli. Inoltre, i fasci laser sono linearmente polarizzati e ciò li rende sonde ideali per la misura dei gradi di depolarizzazione [18].

Essendo lo *scattering* Raman intrinsecamente debole a causa della ridotta probabilità che questo si verifichi rispetto ad altri modi di interazione fotone/materia, è necessario

focalizzare attentamente il fascio laser sul campione e rilevare la radiazione riemessa in modo efficiente.

La focalizzazione del laser è facilmente ottenibile grazie al ridotto diametro del fascio stesso, circa 1 mm. La rilevazione della radiazione riemessa avviene attraverso una serie di lenti che la focalizzano su un detector oppure, nei sistemi più recenti, tramite un detector composto da fibre ottiche [18].

In aggiunta alla rilevazione, fattore essenziale per la spettroscopia è l'amplificazione del segnale. Negli ultimi anni ha acquistato sempre più credito l'utilizzo di dispositivi ad accoppiamento di carica (CCD). I CCD si basano sulla realizzazione di un *array* di elementi fotosensibili costituiti da semiconduttori al silicio. I fotoni incidenti vengono convertiti in una piccola carica conservata in ogni pixel individuale dell'*array*. In ogni pixel si avrà, quindi, una carica proporzionale al numero di fotoni incidenti sul pixel stesso. I CCD permettono dunque una riduzione del rumore durante la lettura, rendendoli la scelta migliore rispetto ad altri rilevatori multicanale. Inoltre, la loro notevole efficienza quantica rende superflua la presenza di un eventuale amplificatore ottico e permette un'elevata sensibilità in un ampio intervallo di lunghezza d'onda [18].

Nei primi anni di utilizzo della spettroscopia Raman, uno dei problemi principali riscontrati è stato quello della fluorescenza, che mascherava completamente lo spettro Raman. La soluzione si trovò con l'avvento della *Fourier Transform Raman Spectroscopy*, capace di limitare la fluorescenza attraverso la misurazione degli spettri nel vicino infrarosso [18].

Fra i principali parametri ricavabili dall'analisi Raman vi sono: il rapporto fra frazione minerale e matrice organica, il grado di cristallinità della fase minerale, il contenuto di carbonati, il numero di legami fra le fibrille di collagene [47].

Il rapporto fra frazione minerale ed organica è uno dei parametri più studiati dalla spettroscopia vibrazionale. La sua determinazione si basa sulla correlazione fra area sottesa al picco e quantità della specie chimica che determina la presenza della banda nella misura spettroscopica. I picchi di maggiore interesse in questa misura sono i picchi  $\nu_1$  o  $\nu_2$  del  $\text{PO}_4^{3-}$  e quelli dell'amide I o III.

Il valore del rapporto frazione minerale/matrice organica è, a differenza della BMD che abbiamo sopra trattato, una misura diretta dei contenuti minerali ed organici presenti nel tessuto osseo. Si tratta di una misura particolarmente significativa per la sua correlazione con le caratteristiche meccaniche dell'osso: è stato ampiamente dimostrato come queste siano direttamente influenzate sia dalla qualità sia dalla quantità di matrice collagenica e fase minerale [47].

Il rapporto matrice organica/fase minerale è calcolabile come rapporto fra l'area del picco  $\nu_1$  del  $\text{PO}_4^{3-}$  e quella sottesa al picco corrispondente all'amide I e risulta indipendente dall'orientamento dei tessuti. L'indicatore aumenta in funzione dell'età del tessuto e all'aumentare dell'età nei soggetti sani, mentre diminuisce in pazienti affetti da osteoporosi. Un'alternativa per il calcolo del rapporto matrice organica/fase minerale è costituita dalla considerazione del picco  $\nu_2$  del  $\text{PO}_4^{3-}$  rispetto a quello dell'amide III. Si tratta di un indice

di particolare interesse in quanto è influenzato anche dall'orientamento delle fibrille di collagene e dei cristalli della fase minerale [47].

Altro parametro basilare per la determinazione delle proprietà ossee ricavabile con la spettroscopia Raman riguarda la quantità e la qualità dei legami fra le fibrille di collagene che costituiscono la matrice organica. Questi legami sono infatti fondamentali per il loro impatto nella determinazione delle proprietà meccaniche dell'osso, dal momento che ne influenzano la resistenza a trazione ed il comportamento viscoelastico [47].

Nei soggetti affetti da osteoporosi si osserva una diminuzione della resistenza meccanica direttamente legata a modificazioni della chimica dei legami e dei profili intermolecolari dei legami: si tratta di fenomeni in accordo al maggiore rateo di rimodellamento osseo riscontrato nell'osteoporosi. Dalla spettroscopia Raman, ed in particolare dall'analisi della derivata seconda dello spettro, sono facilmente ricavabili informazioni riguardanti la struttura del collagene grazie all'abbondanza di bande caratteristiche dei gruppi peptidici e delle catene laterali.

Si è inoltre osservato che, nei soggetti osteoporotici, il contenuto di piridinolina dipende dall'età dei tessuti e presenta un andamento gaussiano in funzione dell'età dei soggetti e a parità di età dell'osso. È un parametro particolarmente sensibile nella discriminazione dei cambiamenti della matrice collagenica correlati all'osteoporosi rispetto a quelli semplicemente legati all'età [47]. Il controllo tramite la spettroscopia vibrazionale del rapporto fra legami piridinolitici e legami divalenti presenti fra le proteine collageniche risulta essere, quindi, un valido indicatore della resistenza delle ossa e della loro tenacità.

Il grado di cristallinità della fase minerale dipende significativamente, oltre che dai costituenti della fase cristallina, sia dall'età del soggetto sia da quella dei tessuti. Si tratta di un parametro di forte interesse poiché si è verificato che stati patologici del tessuto osseo portano ad un discostamento della dimensione dei cristalli di apatite da quella presente nell'osso sano [47]. Il grado di maturazione della fase minerale è determinabile dall'ampiezza alla semi-altezza del picco  $\nu_1$  del  $\text{PO}_4^{3-}$ .

Altro parametro rilevato dalla spettroscopia Raman è il contenuto di carbonati, che viene studiato in relazione alla chimica delle apatiti presenti nel corpo umano. Una delle principali sostituzioni riscontrabili nella fase minerale dell'osso è proprio quella con il carbonato, il quale si può sostituire sia allo ione  $\text{PO}_4^{3-}$  (carbonato di tipo B), sia allo ione  $\text{OH}^-$  (carbonato di tipo A). Il tipo e la quantità di questa sostituzione influenzano la solubilità, la forma e la dimensione dei cristalli di carbonatoapatite [47]. Nei soggetti sani il contenuto di carbonati è intorno al 6%, mentre risulta alterato nei soggetti che presentano fratture fragili. Nella spettroscopia Raman i picchi di interesse per la determinazione di questo parametro sono quelli del carbonato di tipo B ( $1070\text{ cm}^{-1}$ ) e del carbonato di tipo A ( $1103\text{ cm}^{-1}$ ). Criticità associate allo studio di questo indicatore sono dovute alla sovrapposizione con i picchi dei fosfati, di lipidi e del PMMA eventualmente utilizzato per l'inglobamento dei campioni.

Grazie alla spettroscopia Raman è possibile inoltre determinare la quantità di fosfati di calcio presenti nell'osso misurando la frequenza di vibrazione e l'intensità dello stretching vibrazionale del gruppo  $\text{PO}_4^{3-}$  [38].

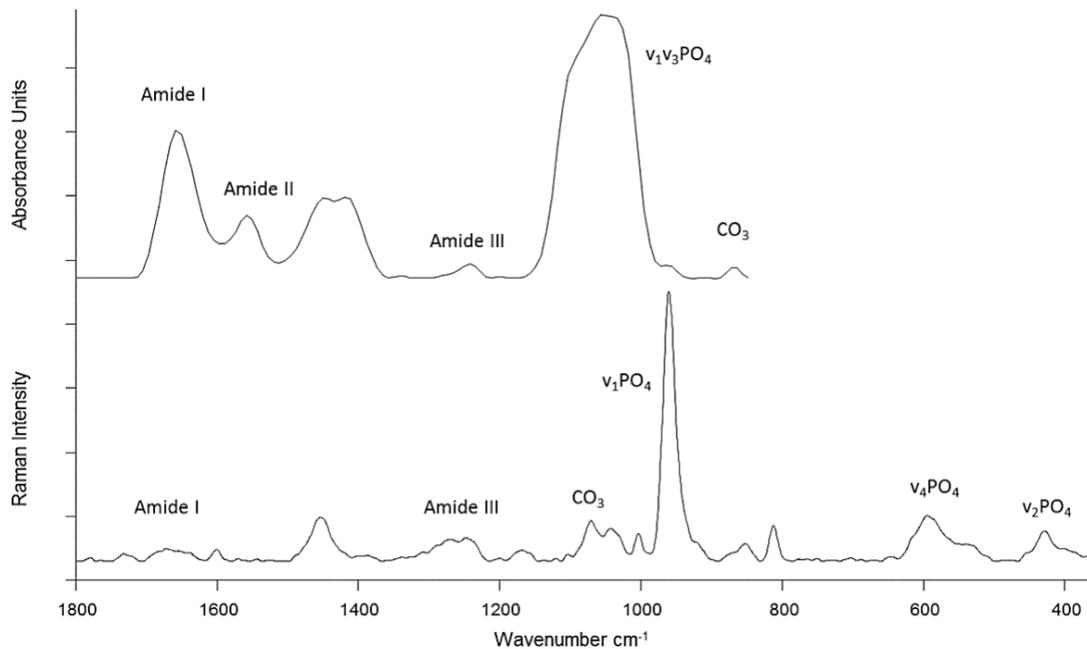


Figura 3.10. Spettri FTIR (sopra) e Raman (sotto) e principali picchi di interesse nell'analisi del tessuto osseo [47].

In particolare, uno studio che si è servito della spettroscopia Raman per determinare le relazioni che intercorrono tra la composizione dell'osso, la deformazione massima e la tenacità a frattura è quello di *Carretta et al* [13]. L'analisi è stata condotta prendendo in considerazione le proprietà meccaniche del tessuto osseo, desunte da un test di tensione e flessione sulle singole trabecole di campioni ricavati da un soggetto osteoporotico e da un soggetto sano utilizzato come controllo. Prima dei test meccanici, le composizioni dei provini sono state analizzate grazie alla spettroscopia Raman per determinare le proprietà delle fibre di collagene che costituiscono la matrice ossea. Il test Raman è stato condotto con un laser di lunghezza d'onda 532 nm, compensando la variabilità locale nella composizione del tessuto attraverso la realizzazione di dieci misure in posizioni casuali sulla superficie di ogni singola trabecola. I parametri del materiale sono stati estratti basandosi sulla massima intensità dei picchi della spettroscopia, in particolare del segnale legato alla amide I che si suppone influenzato dalla presenza dei legami fra le fibrille di collagene. Inoltre, l'analisi Raman ha permesso di ricavare i parametri della frazione minerale rispetto alla matrice e del grado di sostituzione dei carbonati di tipo  $\beta$ . Dall'analisi statistica è emerso come il rateo di sostituzione dei carbonati e la quantità di legami fra le fibre di collagene siano negativamente correlati alla deformazione massima ed al lavoro di deformazione plastica. In particolare, da un'analisi di regressione multivariata, è emerso come il parametro principale sia rappresentato dalla quantità di legami presenti nella matrice collagenica. Pertanto, lo studio di *Carretta et al.* [13] è riuscito a correlare le proprietà meccaniche del tessuto alla struttura del collagene ed all'organizzazione della matrice ossea.

La ricerca di *Kim et al.* [26] si è invece rivolta alla valutazione degli effetti dell'osteoporosi sulla riduzione della rigidità e sulla mineralizzazione del tessuto osseo. Sono state utilizzate le vertebre comprese fra T11 e L4 di donne caucasiche, sia affette da osteoporosi sia sane. I due gruppi sono stati divisi secondo la BMD ricavata attraverso *dual X-ray*

*absorptiometry*. I campioni cilindrici, del diametro di 8,25 mm, sono stati successivamente inglobati in PMMA, quindi lucidati per realizzare i test di nanoindentazione e determinare così il modulo elastico e la durezza delle trabecole. Successivamente alla nanoindentazione, i campioni sono stati sottoposti ad analisi Raman con microscopio ottico equipaggiato con un laser di lunghezza d'onda pari a 785 nm. La spettroscopia Raman ha permesso la determinazione del grado di mineralizzazione del tessuto osseo. La frazione minerale rispetto alla matrice è stata definita attraverso la valutazione del picco corrispondente ai fosfati rispetto al picco corrispondente allo stretching del CH<sub>2</sub>. È stato anche rilevato il grado di sostituzione dei carbonati di tipo B.

I risultati hanno sottolineato come il gruppo dei soggetti con osteoporosi presenti un modulo di indentazione inferiore ed una minore quantità di frazione minerale presente nella matrice, per contro la durezza non differisce tra i due gruppi. Le analisi di regressione lineare hanno evidenziato un aumento proporzionale del modulo di indentazione rispetto all'incremento della frazione di minerale. Il grado di cristallinità ed il grado sostituzione dei carbonati, se considerati singolarmente, non sono apparsi significativi nella predizione dei parametri di nanoindentazione, invece, se accoppiati, hanno concorso a spiegare il 56% della variabilità del modulo di indentazione ed il 38% della variabilità della durezza. Il livello di mineralizzazione tende a diminuire con l'età dei soggetti, per contro la cristallinità, il grado di sostituzione dei carbonati, il modulo elastico e la durezza di indentazione non risultano associati all'età. Anche in questo studio gli autori concordano nel correlare la variazione delle proprietà meccaniche fra osso sano ed osso osteoporotico ad una differenza nelle frazioni di legami fra le fibrille di collagene. Tuttavia, per *Kim et al.* [26] non è stato possibile verificare questa ipotesi a causa della sovrapposizione fra i picchi del materiale di inglobamento e quelli della amide I soggetta a deformazione plastica.

*Ojanen et al.* [42], come già evidenziato nel capitolo precedente, hanno associato la spettroscopia Raman alla nanoindentazione per lo studio delle relazioni fra composizione e proprietà viscoelastiche dell'osso trabecolare umano. La spettroscopia, grazie a cui è stata analizzata la composizione della matrice calcificata, è stata condotta prendendo come riferimento per il sito di analisi le impronte precedentemente create dalla nanoindentazione. Il laser utilizzato ha lunghezza d'onda di 785 nm e potenza di 100 mW. Sono state realizzate cinque misurazioni ad intervalli di 60 s per ogni sito in analisi, e successivamente è stato calcolato lo spettro medio. Per determinare le informazioni composizionali sono stati considerati: l'altezza del picco dell'amide I normalizzata rispetto al picco vibrazionale della CH<sub>2</sub> per la raccolta delle informazioni sul collagene; il rapporto fra il picco  $\nu_1$  del PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e quello dell'amide I per la determinazione del rapporto fra fase minerale e matrice collagenica; il picco dei carbonati di tipo B rispetto al  $\nu_1$  per la determinazione del grado di sostituzione dei carbonati. La cristallinità è stata calcolata come inverso dell'ampiezza alla semi-altezza del picco  $\nu_1$ . Lo studio non ha riscontrato correlazioni significative fra i parametri viscoelastici ed il grado di mineralizzazione o il contenuto di carbonati, assenza imputabile forse all'utilizzo di osso trabecolare. Si è invece riscontrato che i valori di modulo elastico e viscosità sono significativamente correlati alla cristallinità. Sebbene altre ricerche abbiano correlato comportamento viscoelastico e contenuto di collagene, questo studio non è stato in grado di verificare tale associazione ed ha anzi suggerito che siano le

caratteristiche della fase minerale a contribuire al comportamento viscoelastico dell'osso. Secondo *Ojanen et al.* [42], non essendo la cristallinità correlabile all'età, le proprietà dei cristalli di apatite dipendono maggiormente dall'età dei cristalli stessi piuttosto che dall'età dei soggetti, suggerendo dunque che il contenuto minerale dell'osso dipende dall'età del tessuto medesimo.

Per lo studio delle variazioni microstrutturali di fase minerale e collagene dell'osso trabecolare, *Toledano et al.* [57] hanno proposto un metodo di analisi tramite spettroscopia Raman. Da colli di ossa femorali di donne in menopausa sottoposte ad artroplastica dell'anca in seguito a frattura, sono state ricavate biopsie poi inglobate in resina epossidica e sottoposte a lucidatura. L'analisi spettroscopica è stata realizzata con una sorgente luminosa di lunghezza d'onda pari a 685 nm, alla potenza di 100 mW. Ogni sito di indagine, della dimensione di 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$ , è stato scansionato cinque volte per la determinazione dello spettro medio. Il contenuto minerale dell'osso è stato analizzato prendendo in considerazione i picchi dei fosfati (960  $\text{cm}^{-1}$ ) e dei carbonati (1070  $\text{cm}^{-1}$ ) e le rispettive aree. Il rapporto fra fase minerale e fase organica è stato calcolato come rapporto fra l'intensità del picco  $\nu_1$  del fosfato e quello delle catene laterali metileniche. Il grado di cristallinità dei fosfati è stato ricavato grazie all'osservazione dell'ampiezza alla semi-altezza sia per il picco dei fosfati, sia per quello dei carbonati. Il grado di sostituzione dei carbonati è stato calcolato prendendo in considerazione il picco dei carbonati di tipo B e quello dei fosfati  $\nu_1$ . I risultati sono stati normalizzati in base al gruppo fenile a 1003  $\text{cm}^{-1}$ .

La valutazione dei legami fra le fibrille collageniche è stata realizzata da *Toledano et al.* [57] considerando il picco di vibrazione del piridinio per l'analisi dei legami enzimatici, mentre i legami non enzimatici sono stati valutati considerando il picco legato agli *advanced glycation products*. Per lo studio della natura e della struttura delle proteine collageniche si sono utilizzati i picchi dell'amide I e III, sensibili alla conformazione molecolare delle catene peptidiche. Inoltre, si è osservata una diminuzione del picco dell'amide I correlabile ad una rottura dei legami del collagene o ad una sua modificazione a causa dell'età e del grado di idratazione. I risultati hanno evidenziato che la resistenza meccanica dell'osso dipende sia dal grado di mineralizzazione, sia dal livello di cristallinità della fase inorganica. Si sono individuati, inoltre, un restringimento della banda legata ai fosfati ed un minor grado di sostituzione dei carbonati da cui si è evinto un maggior grado di cristallinità della fase minerale. Come precedentemente descritto, il collagene è fondamentale poiché funge da *template* per la mineralizzazione del tessuto osseo. Da ciò consegue che le proprietà dell'osso dipendenti dal tempo sono maggiormente influenzate dalla componente organica rispetto alla fase minerale. Un danneggiamento dei legami della matrice collagenica, infatti, molto spesso si traduce in variazioni permanenti di quest'ultima favorendo la comparsa fratture ossee.

Lo studio di *Toledano et al.* [57] pone pertanto l'attenzione sul ruolo del picco del piridinio per la determinazione dei legami enzimatici, e suggerisce l'osservazione dei picchi degli *advanced glycation products* per la determinazione del numero di legami non enzimatici associati all'infragilimento dell'osso.

*Ager et al.* [1] hanno utilizzato la spettroscopia Raman ultravioletta per indagare l'effetto dell'invecchiamento sull'osso corticale umano. Sono stati sottoposti ad analisi campioni provenienti dalla sezione diafisaria dell'omero di donatori senza evidenze di patologie ossee. Lo spettro è stato ricavato utilizzando un laser di lunghezza pari a 244 nm, con una potenza di 5 mW. Gli spettri raccolti sono stati normalizzati in base al picco vibrazionale del CH<sub>2</sub>. Si sono evidenziate in particolar modo le bande I e III dell'amide, ritenute indicatori affidabili della conformazione delle proteine collageniche. Dall'analisi statistica è emerso come la banda dell'amide I sia dipendente dall'età, con uno spostamento ad energie maggiori all'aumentare degli anni (Fig. 3.11).

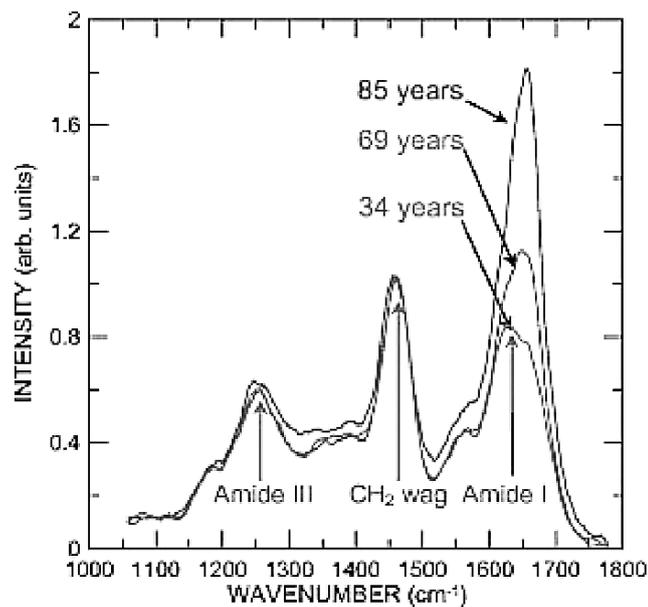


Figura 3.11. Variazioni nel picco dell'amide I all'aumentare dell'età [1].

L'analisi di regressione lineare, condotta da *Ager et al.* [1] prendendo in considerazione l'area dei picchi sottesi all'amide I rispetto alla tenacità legata all'iniziazione della cricca ed alla tenacità legata alla propagazione della cricca, ha sottolineato come la qualità del collagene abbia una maggiore influenza sulla tenacità legata all'iniziazione della cricca nell'osso corticale. L'effetto dell'età sulla tenacità sarebbe da attribuire ad una variazione nella chimica dei legami fra le fibre di collagene.

### 3. Materiali e metodi

Le analisi per lo sviluppo della tesi sono svolte su sezioni di teste omerali provenienti da nove pazienti di età compresa tra i 50 ed i 85 anni sottoposti ad artroplastica della spalla, di cui sette soggetti sani, una affetta da osteoporosi ed una osteopenica.

Le teste omerali, precedentemente fissate in formalina e lavate in *phosphate buffering solution* (PBS), sono state conservate in una soluzione al 70% in volume di etanolo alla temperatura di 4 °C. Sono quindi state sottoposte, previa reidratazione per 24 h in PBS, ad una scansione tramite micro-CT per determinarne le caratteristiche morfologiche ed estrarre in seguito le biopsie dalle zone ritenute significative.

Le biopsie sono state ricavate attraverso la trapanazione delle teste omerali con una fresa a tazza per uso odontoiatrico del diametro di 8 mm sotto irrigazione continua di acqua distillata. I campioni sono quindi stati riposti in contenitori sigillati contenenti una soluzione di etanolo al 70% in volume fino al successivo utilizzo, prima del quale si è provveduto ad una reidratazione in PBS.

Per determinare le caratteristiche meccaniche macroscopiche si sono sottoposte 37 biopsie a test di compressione uniassiale, mentre i campioni non utilizzati per il test di compressione, in totale 14, sono stati inglobati in resina epossidica per la realizzazione dei test di nanoindentazione e l'analisi delle proprietà meccaniche alla micro scala.

#### 4.1 Analisi micro-CT

La scansione dei campioni è stata realizzata con una micro-CT ad elevata risoluzione, la SkyScan 1272 (Fig. 4.1).

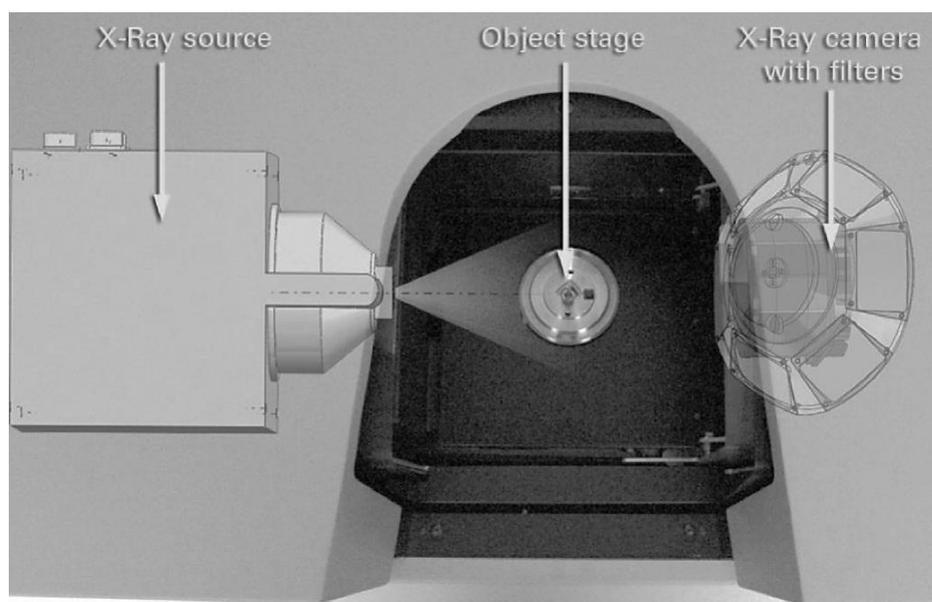


Figura 4.1. SkyScan 1272, particolare della camera di analisi [10].

La sorgente dei raggi X ha uno *spot-size* di dimensione inferiore a  $5\ \mu\text{m}$  ed è posizionata sulla sinistra dell'apparecchiatura: opera ad una potenza massima di 10W, con un voltaggio impostabile che varia dai 20 ai 100 kV. La ridotta dimensione della sorgente assicura una migliore risoluzione dei dettagli dell'oggetto analizzato.

La SkyScan 1272 si basa sulla propagazione naturale dei raggi nella camera di analisi e consente un ingrandimento del campione proporzionale al rapporto fra distanza della sorgente dalla camera per i raggi X e distanza del campione dalla sorgente [10].

Uno dei punti di forza di questa apparecchiatura consiste nella geometria di acquisizione variabile (Fig. 4.2): differentemente dalle altre Micro-CT, la SkyScan 1272 prevede la possibilità di variare, oltre alla distanza del campione dalla sorgente, anche la distanza del detector da quest'ultima assicurando l'ottimizzazione dei tempi e della qualità delle scansioni.

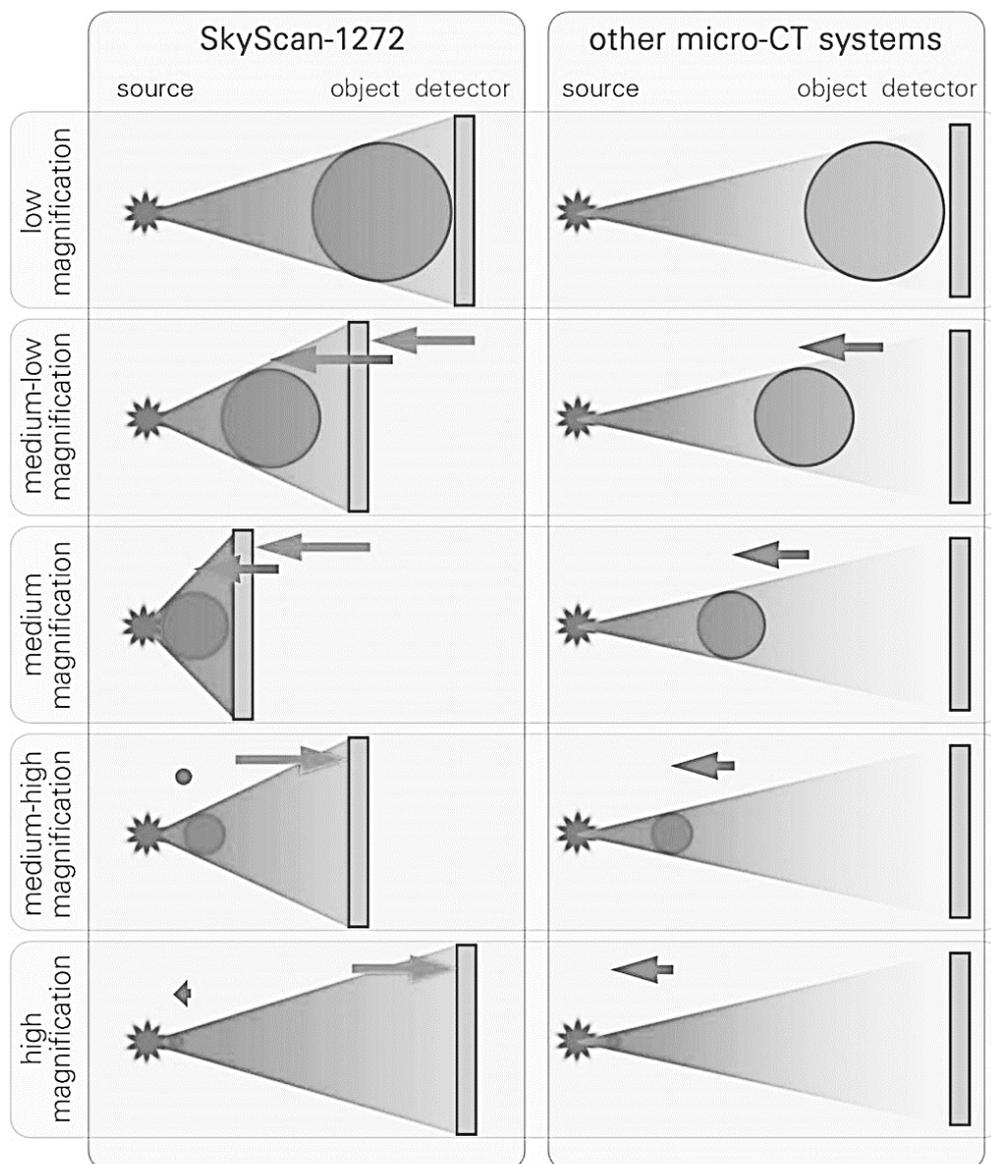


Figura 4.2. Geometria di acquisizione variabile della SkyScan 1272 [10].

La strumentazione di acquisizione delle immagini, posta nella parte destra della micro-CT è combinata con un portafiltri motorizzato contenente sei filtri per assicurare la corretta selezione delle energie rilevate (Fig. 4.1). Il detector permette sia un'acquisizione delle immagini in posizione centrale, sia acquisizioni *offset* che prevedono il movimento del campione all'interno della camera, con un'estensione del campo visivo. Il processo è automatizzato ed impostabile tramite il software di controllo dell'apparecchiatura.

La parte centrale dell'apparecchiatura è occupata dal portacampioni rotante con possibilità di movimento nelle tre direzioni che rende possibile il preciso posizionamento del campione scansionato. Il portacampioni è movimentato da un sistema di motori elettronici che ne permettono il micro-posizionamento in modo continuo.

L'analisi del flusso di dati (Fig. 4.3) favorisce la comprensione del workflow seguito per l'ottenimento dei parametri morfologici attraverso la micro-CT. La procedura prevede tre passaggi: l'acquisizione dei dati, la loro ricostruzione tramite NRecon e l'analisi con CTan.

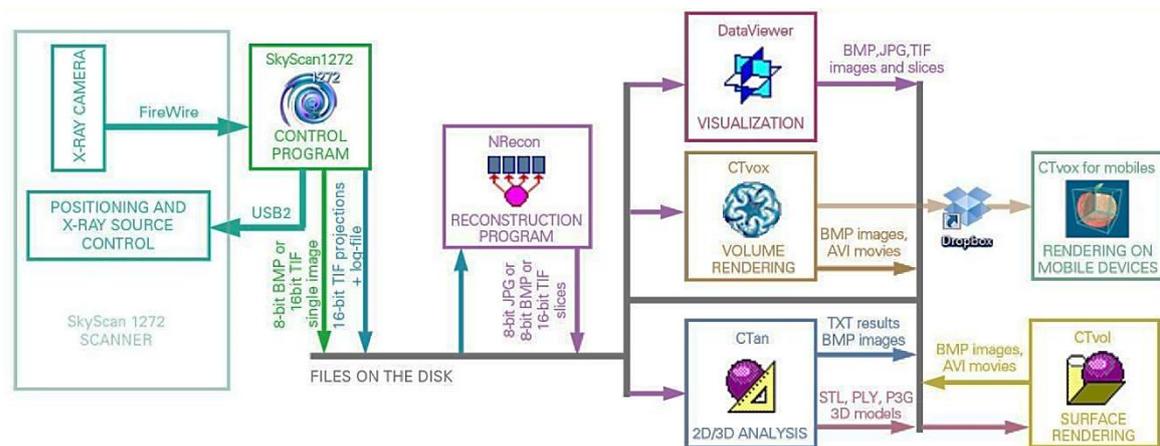


Figura 4.3. Flusso di dati fra la SkyScan1272 ed i programmi coinvolti nell'analisi dei parametri morfologici [10].

Prima dell'inizio delle scansioni è stata impostata la *flat-field correction*. Tale correzione, applicata ad ogni immagine subito dopo la sua cattura da parte della camera a raggi X, fa sì che l'analisi non risenta degli effetti legati alla variabilità della sensibilità di ogni singolo pixel nonché degli effetti delle correnti generate dagli effetti quantistici legati al funzionamento del dispositivo ad accoppiamento di carica (CCD). La *flat-field correction* è calcolata acquisendo innanzitutto un'immagine con la sorgente spenta: ciò rende possibile il calcolo delle *dark currents*. In seguito, si sottopone il sensore ad una seconda esposizione con la camera di analisi vuota per permettere la correzione dei difetti dovuti all'efficienza dei singoli pixel [10].

Per l'acquisizione dei dati relativi alle teste omerali ad una risoluzione di  $5,4 \mu\text{m}$  è stata adottata un'intensità di  $100 \mu\text{A}$ , con un voltaggio di  $100 \text{ kV}$  e l'interposizione di un filtro di Cu spesso  $0,25 \text{ mm}$ . Per la copertura dell'intera larghezza del campione è stata necessaria una scansione con la camera in posizione di *offset* impostando tre posizioni affiancate del campione rispetto ad detector. Inoltre, essendo l'altezza del campione superiore all'altezza

analizzabile dalla camera a raggi X, è stata impostata una scansione di tipo *batch* che consente l'estensione anche in altezza dei limiti del rilevatore.

La rotazione totale del campione durante l'analisi è stata impostata a 180° con step di 0,1 deg. Per assicurare l'idratazione durante tutta la durata dell'analisi e simulare al meglio le condizioni fisiologiche, i campioni sono stati dapprima avvolti in carta assorbente impregnata con PBS e, successivamente al loro posizionamento sul portacampione, nel parafilm.

Le scansioni delle teste omerali hanno richiesto circa 24 h per ogni campione. I parametri di scansione sono stati scelti in modo tale da assicurare la massima risoluzione impostabile e per garantire la migliore qualità delle informazioni ricavabili tramite micro-CT, compatibilmente con la dimensione del campione.

Per la corretta acquisizione delle immagini e per ridurre degli artefatti si è attentamente considerato l'assorbimento medio dei campioni, cercando di mantenere la trasparenza ai raggi X compresa fra il 30% ed il 60%, intervallo indicato come ideale dai produttori della strumentazione [10].

Le biopsie ricavate dopo la scansione delle teste omerali sono state a loro volta scansionate attraverso la SkyScan 1272 con una risoluzione di 3  $\mu\text{m}$ , impostando un'intensità di 111  $\mu\text{A}$ , un voltaggio di 90 kV ed interponendo un filtro Al 0,5 mm accoppiato ad uno di Cu 0,038 mm fra il campione e la camera tenuta in posizione centrale. Nella scansione delle biopsie è richiesta una maggiore filtrazione dei raggi X rispetto a quanto impostato per le teste omerali al fine di assicurare la corretta soglia di assorbimento. Anche in questo caso è stata necessaria una scansione di tipo *batch* in quanto, vista l'elevata risoluzione, i campioni si estendono oltre i limiti permessi dalla sola scansione in posizione centrale. Sempre al fine di simulare le condizioni fisiologiche, si sono avvolti i campioni in carta assorbente impregnata in PBS inserendoli all'interno di un apposito portacampioni per la successiva analisi.

Le immagini acquisite sono state ricostruite tramite il software NRecon, fornito insieme alla micro-CT, che permette il consolidamento dell'intero dataset in un modello tridimensionale e l'applicazione delle correzioni per il miglioramento della qualità delle immagini.

Le prime operazioni durante la fase di ricostruzione consistono nel controllo dell'allineamento del campione durante l'acquisizione e nell'impostazione della gamma dinamica, corrispondente ai limiti entro cui si situa il contrasto dell'immagine. Per l'impostazione della gamma dinamica, dopo un primo periodo in cui questa veniva valutata di caso in caso, si è deciso di trattare tutte le biopsie scansionate impostandone i limiti fra 0,000 e 0,0039, assicurando in tal modo una costanza nel contrasto dei file ricostruiti pur mantenendo un range che permette una buona differenziazione dei tessuti.

Il rumore è un problema rilevante nelle immagini ottenute tramite micro-CT in quanto la sorgente della radiazione è di dimensioni puntuali, limitando di fatto la potenza massima utilizzabile ed il flusso della radiazione. Una possibile soluzione consiste nel diminuire l'angolo di rotazione aumentando il rapporto segnale/rumore, pur con un aumento dei tempi di scansione.

Sempre legato al rumore è l'artefatto che va sotto il nome di *mottle*, in cui l'immagine appare chiazziata se vista ad elevati ingrandimenti a causa della distribuzione stocastica dei fotoni che colpiscono i pixel del rilevatore. Il rumore in un'immagine è ridotto all'aumentare della forza del segnale oppure è rimovibile tramite uno *smoothing* dell'immagine in post-produzione, che tuttavia produce anche una perdita di dettaglio [10]. Lo *smoothing* è stato impostato per tutte le biopsie con un valore pari a 6.

Altri artefatti strettamente legati alla tomografia computerizzata che si sono cercati di limitare durante il processo di ricostruzione sono il *ring artifact* ed il *beam hardening*.

Il *ring artifact* (Fig. 4.4) ha origine dalla rotazione dell'oggetto rispetto al detector e dalla disomogeneità nella capacità di lettura di ogni singolo pixel. Questo difetto è contrastato con una tecnica basata sull'analisi di Fourier oppure impostando un'oscillazione lineare del detector in modo che ogni voxel sia ripreso da più pixel. Dal momento che quest'ultima tecnica aumenta i tempi di scansione ed è limitata dalla precisione del movimento della camera di ripresa, si è preferito utilizzare l'approccio software impostando in NRecon un valore compreso fra 11 e 13.

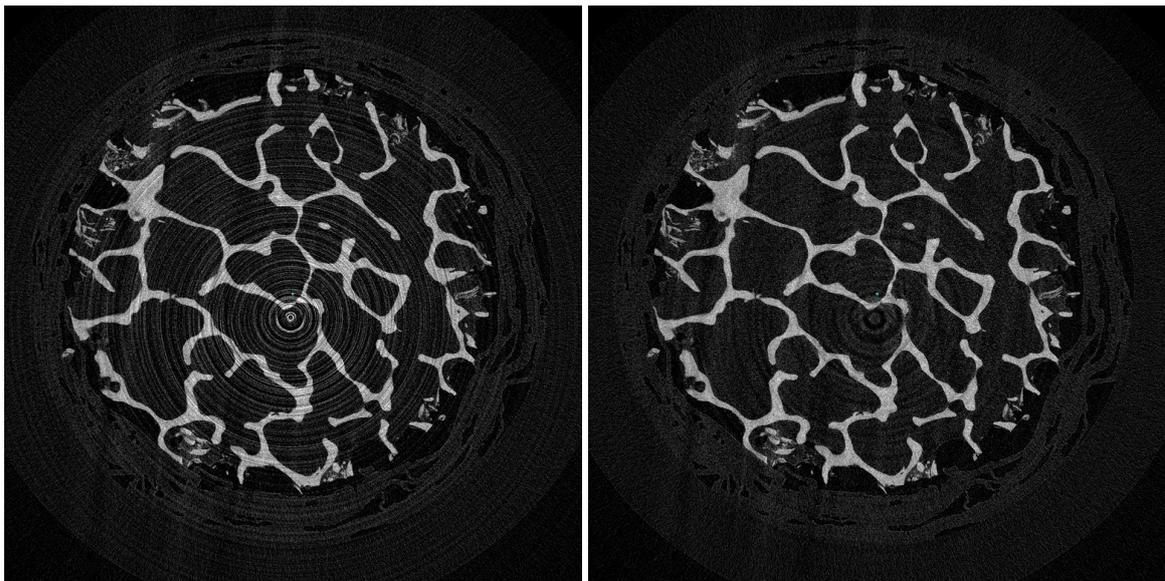


Figura 4.4. Shadow image prima e dopo la correzione del ring artifact.

Il *beam hardening* nasce dalla mancanza di monocromatura del fascio di raggi X prodotto dalla sorgente. Man mano che il fascio di fotoni passa attraverso il campione, quelli di minore energia sono assorbiti provocando un progressivo spostamento dei fotoni rimanenti verso energie maggiori. Questo effetto è deleterio per l'ottenimento di immagini tramite la micro-CT in quanto la loro ricostruzione si regge sull'algoritmo di Feldkamp, basato sulla retroproiezione e sulla convoluzione.

La retroproiezione deriva la posizione di un oggetto dalla sua ombra ripresa da diverse angolazioni, mentre la convoluzione permette di rimuovere l'alone di sfocatura presente intorno all'oggetto tramite un meccanismo di sottrazione selettiva. L'algoritmo di Feldkamp

si basa sull'assunzione che si verifichi un'attenuazione uniforme del fascio di fotoni all'interno del campione così che il segnale di ogni voxel risulta indipendente dal percorso del fotone. Il *beam hardening* inficia proprio questa fondamentale assunzione.

È possibile contrastare il *beam hardening* introducendo una correzione all'algoritmo di ricostruzione o posizionando un filtro davanti alla sorgente della radiazione, così da rimuovere la componente meno energetica del fascio di raggi X. Si può anche diminuire il voltaggio in modo da restringere l'intervallo di energie emesse [10].

Tutte le biopsie sono state scansionate utilizzando un filtro Al 0,5 + Cu 0,038, inoltre durante la fase di ricostruzione è stata applicata una correzione del *beam hardening* pari al 25%.

L'analisi 3D dei parametri morfologici e della BMD è stata realizzata tramite il software di analisi CTAn ricavando i valori di porosità, SMI, DA, Tb.Th, Tb.Sp e BMD. Inoltre, per le biopsie centrali, destre e sinistre è stata calcolata anche la TMD al fine di avere un valore più significativo della quantità di fase minerale presente nel tessuto osseo.

La prima operazione per l'analisi dei parametri tramite CTAn consiste nella definizione della *region of interest* (ROI), corrispondente al volume del campione interessato dalla determinazione dei parametri morfologici e densitometrici. Si è deciso di impostare una ROI cilindrica di diametro 5 mm ed altezza 5 mm, posizionata al centro delle biopsie. Successivamente alla determinazione della ROI, si sono impostati i valori di *thresholding* per una corretta binarizzazione del file. Il valore di *threshold* impostato varia da biopsia a biopsia in un range tra 73 e 115.

Infine, tramite la definizione di un processo personalizzato, utilizzando la funzione *despeckle* di CTAn, è stata realizzata una raffinazione della binarizzazione tramite un comando che elimina i difetti della binarizzazione e si sono successivamente calcolati i parametri di interesse per la caratterizzazione del tessuto osseo, forniti poi dal software come file .txt al completamento dell'analisi.

## 4.2 Test di compressione uniassiale

I test di compressione uniassiale sono stati condotti per verificare, come riportato dalla letteratura sull'argomento, le differenze tra le caratteristiche meccaniche macroscopiche dell'osso affetto da osteoporosi rispetto a quelle del tessuto sano. Inoltre, dalle curve sforzo deformazione si è ricavato il carico compressivo massimo del tessuto osseo trabecolare.

Nello svolgimento di questa tesi, a causa dell'alta variabilità della morfologia dei campioni provenienti dalla sala operatoria è stato impossibile prelevare le biopsie ossee lungo la direzione principale di orientamento delle trabecole [40]: ci si è dunque limitati ad un'osservazione visiva dei campioni per la realizzazione dei provini ossei.

I campioni per il test di compressione sono stati ottenuti dalle biopsie avvalendosi di una sagoma per il taglio delle facce superiori ed inferiori che ne garantisse il più possibile il parallelismo. Dopo il taglio di ogni campione, ne sono stati registrati diametro ed altezza, ricavati come media di tre misure effettuate ruotando il campione di circa 120° dopo ogni

rilevamento. Il diametro e l'altezza media dei provini sono rispettivamente 7,66 mm e 7,38 mm.

I campioni sono stati conservati in una soluzione di etanolo al 70% in volume fino al momento dei test meccanici, prima dei quali sono stati reidratati in PBS per 24 h.

I test di compressione sono stati realizzati tramite un macchinario universale CRITERION C43.504 MTS equipaggiato con una cella di carico da 5 kN. Basandosi su quanto svolto in altri gruppi di ricerca [2, 14, 62], si è definito un protocollo per il test che prevede una velocità di deformazione costante pari a 1 mm/min ed un campionamento con frequenza 200 Hz.

Il test è stato interrotto una volta raggiunti i 4 mm di spostamento della traversa mobile, ritenendo ormai concluso il cedimento progressivo delle trabecole a causa dall'azione compressiva esercitata. Questo comportamento è stato desunto da una serie precedente di test per la calibrazione dei parametri sperimentali. Nelle condizioni sperimentali utilizzate si ritiene che la componente viscosa della risposta meccanica sia trascurabile: si considera quindi la deformazione del campione come elastoplastica.

Le prove sono state realizzate ponendo i campioni direttamente in contatto con il macchinario di prova e calcolando la deformazione dei campioni tramite lo spostamento della traversa mobile in accordo a quanto realizzato da altri gruppi di ricerca [2, 14]. Gli errori nella misurazione dello spostamento sono ritenuti trascurabili vista l'elevata differenza fra i moduli dell'osso e dei costituenti della macchina.

In seguito alla registrazione delle curve carico-spostamento, supponendo il materiale soggetto ad un comportamento elastoplastico, si è provveduto attraverso il software Excel alla loro trasformazione nei grafici sforzo-deformazione per la comparazione degli andamenti legati al tessuto osseo affetto da osteoporosi rispetto a quello sano.

Per il calcolo dello sforzo ( $\sigma$ ) ci si è basati sulla sua definizione ingegneristica dividendo la forza compressiva applicata (F) per la sezione del provino (A):

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (4.1)$$

La deformazione ( $\varepsilon$ ) è stata ottenuta dividendo lo spostamento ( $l - l_0$ ) per l'altezza iniziale del provino ( $l_0$ ):

$$\varepsilon = \frac{l-l_0}{l_0} = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (4.2)$$

Attraverso le curve sforzo-deformazione si è realizzato un confronto qualitativo degli andamenti dei grafici legati alle varie tipologie di osso e si è inoltre calcolato il valore di carico massimo sopportabile dal tessuto osseo sano ed osteoporotico:  $\sigma_{ult}$ , corrispondente al carico osservato ad una deformazione del 30% secondo quanto definito da *Aleixo et al.* [2].

### 4.3 Nanoindentazione

I campioni destinati alla nanoindentazione sono stati scelti fra quelli di dimensione inadatta per costituire un provino valido per i test di compressione. Per la realizzazione dei campioni per la nanoindentazione è stato seguito un protocollo che ne prevede la progressiva disidratazione prima dell'inglobamento in resina epossidica bicomponente (EpoFix Resin e Hardener).

Il protocollo di disidratazione è basato sull'aumento progressivo della percentuale di etanolo nella soluzione in cui sono immersi i campioni, in ordine 70%, 80%, 95% e 100%.

Le biopsie sono quindi inglobate nella resina lasciata solidificare sotto cappa fino al completo indurimento e, una volta estratte dagli stampi, sottoposte a lucidatura con una lappatrice a velocità variabile fino ad una rugosità di  $3 \mu m$  controllando l'assenza di righe di lucidatura attraverso un microscopio metallografico. I campioni così ottenuti sono quindi stati conservati a temperatura ambiente fino al momento dei test di nanoindentazione.

I principali parametri che influenzano un test di nanoindentazione sono: la forma dell'*indenter*, gli intervalli di tempo della prova, il profilo di carico e scarico ed il carico applicato [44].

La forma dell'*indenter* è la scelta più importante nell'impostazione dei parametri della prova di nanoindentazione, nel caso del tessuto osseo le forme più indicate sono la piramide Berkovich o quella sferica. Scegliendo la punta Berkovich si predilige lo studio del comportamento elastoplastico, mentre per l'*indenter* sferico si opta per lo studio delle proprietà viscoelastiche.

La maggior parte dei nanoindentatori sono controllati in base al carico applicato, tuttavia è anche possibile un controllo in base allo spostamento [44]. Il test di indentazione prevede la definizione di una sequenza di carico, mantenimento e scarico del provino, da ciò derivano gli altri parametri determinanti per la prova di nanoindentazione: il carico massimo del picco, la velocità di carico, il tempo di mantenimento e la velocità di scarico.

Una volta ottenuti i dati "grezzi" del test, l'analisi di tali dati va calibrata in base alla curva carico-spostamento ottenuta. Si tratta di un'operazione particolarmente importante soprattutto per i test in cui si prevede un comportamento viscoso del materiale, in quanto tale modo di deformazione è particolarmente sensibile al ciclo di carico effettuato [44].

I test di nanoindentazione quasi-statici sono stati realizzati sotto controllo di carico tramite un nanoindentatore Hysitron Ti950 Triboindenter equipaggiato con un indente Berkovich, costituito da una piramide di diamante e calibrato rispetto ad un provino di quarzo fuso.

Il ciclo di analisi inizia con la determinazione dell'area interessata dall'indagine nonché con la definizione dei siti di indentazione, in questo caso posti ad una distanza reciproca di  $10 \mu m$  lungo l'intero spessore della trabecola.

Successivamente si procede alla definizione dei parametri relativi al carico applicato che in questa tesi prevedono un aumento lineare della forza applicata con velocità di  $100 \mu N/s$  fino

a raggiungere il carico massimo pari a 5000  $\mu\text{N}$ , mantenuto per 20 secondi cui segue lo scarico sempre con velocità costante e pari a 100  $\mu\text{N/s}$  (Fig. 4.5).

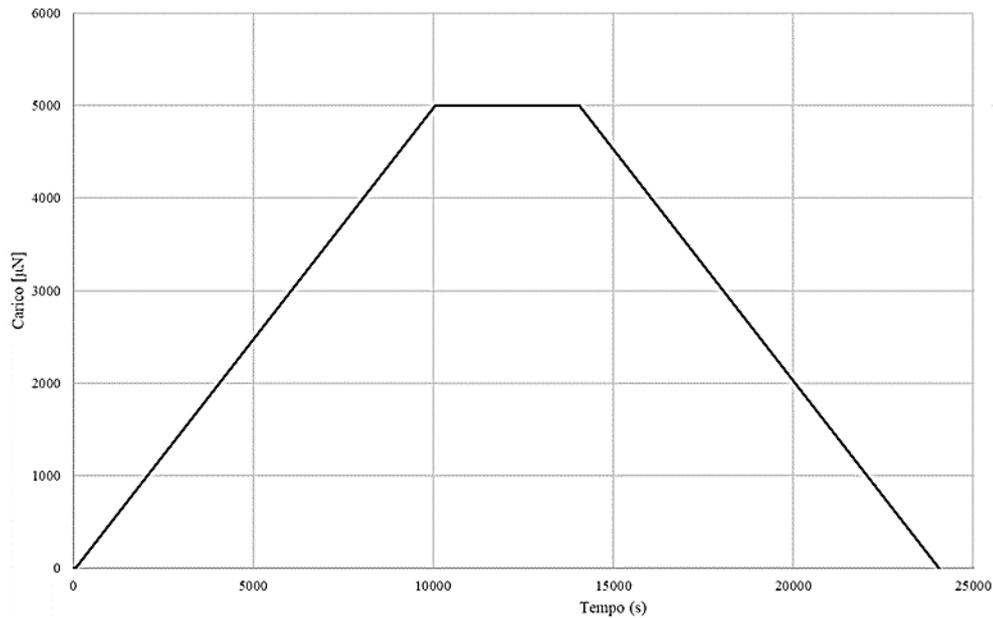


Figura 4.5. Ciclo di carico, mantenimento e scarico imposti ai campioni durante i test di nanoindentazione.

L'osservazione del grafico carico-deformazione e delle caratteristiche specifiche dei vari modi di deformazione guida quindi le successive analisi dei risultati ottenuti.

Il caso più semplice si ha nel caso in cui il comportamento sia perfettamente elastico in quanto è possibile adattare in modo diretto il grafico carico-spostamento (P-h) alla soluzione per un'indentazione elastica. Nel caso di un indentatore conico o piramidale la relazione costitutiva è quella indicata da Sneddon:

$$P = \frac{\pi \tan \psi}{2\gamma^2} \frac{E}{(1-\nu^2)} h^2 \quad (4.3)$$

Dove  $\nu$  è il modulo di Poisson (per l'osso assunto uguale a 0,3),  $\gamma = \pi/2$ , e  $\psi$  è il semiangolo di apertura dell'indentatore.

Tuttavia, come riportato in dettaglio nella sezione dei risultati (Fig. 5.12), l'analisi condotta in questa tesi fa riferimento ad un comportamento elastoplastico del materiale testato con un indentatore Berkovich.

Ci si basa quindi, per la determinazione del modulo elastico e della durezza di contatto, sulle analisi condotte da Oliver e Pharr [41]. Nell'analisi condotta da Pharr la curva carico-deformazione viene approssimata da una semplice legge esponenziale:

$$P = \alpha(h - h_f)^m \quad (4.4)$$

In cui  $\alpha, h_f, m$  sono parametri empirici per la corretta approssimazione della curva. Da questa equazione è quindi possibile ricavare la rigidità (S) in condizioni di carico massimo:

$$S = \frac{dP}{dh|_{P_{max}}} \quad (4.5)$$

La profondità di contatto è quindi calcolata a partire dalla rigidità e dai valori del punto di picco ( $P_{max}, h_{max}$ ):

$$h_c = h_{max} - \beta \frac{P_{max}}{S} \quad (4.6)$$

in cui  $\beta$  rappresenta un parametro di fitting geometrico correlato alla forma dell'*indenter* ed in genere assunto uguale a 0,75.

Una calibrazione precedente rende possibile ricavare l'area di contatto ( $A_c$ ), permettendo quindi di ricavare il modulo ridotto:

$$E_R = \frac{S\sqrt{\pi}}{2\sqrt{A_c}} \quad (4.7)$$

e la durezza:

$$H_c = \frac{P_{max}}{A_c} \quad (4.8)$$

La parte di fitting della curva viene svolta automaticamente dal software utilizzato per l'analisi una volta svolta l'operazione di calibrazione per la testa di indentazione. Il programma di analisi fornisce direttamente i parametri meccanici E,  $E_R$  ed  $H_c$  [41].

La precisione di questi risultati dipende in prima istanza dalla precisione con cui la funzione di calibrazione è stata definita dall'operatore. La semplicità di utilizzo una volta svolta correttamente la calibrazione uno dei motivi, unita alla sua flessibilità, sono le ragioni per cui questa analisi sta acquistando sempre maggiore popolarità nell'ambito dello studio dei materiali. Va sottolineato come il test in condizioni di disidratazione, nonostante fornisca indicazioni valide sulle proprietà meccaniche delle trabecole ossee, presenti delle differenze rispetto al comportamento in vivo del tessuto.

#### 4.4 Analisi statistica

I dati raccolti attraverso i test morfologici e meccanici sono stati rappresentati con grafici che permettessero l'osservazione delle tendenze generali dei tessuti sani (H), sani vecchi (HO), osteopenici (OPen) e osteoporotici (OP).

Per ciascuna delle suddette valutazioni visive si è proceduto all'esecuzione di un'analisi di varianza ad un fattore, riportando esclusivamente i casi in cui tale analisi si è dimostrata significativa (*p-value* inferiore a 0,05).

Successivamente, è stata realizzata un'analisi di regressione lineare con Excel per mettere in evidenza l'eventuale correlazione fra i dati ritenuti di interesse ai fini della determinazione delle proprietà dell'osso, senza distinzioni fra osso sano ed osso affetto da osteoporosi.

In particolare, si sono confrontati i parametri morfologici e densitometrici quali SMI, DA, Tb.Th, Tb.Sp, porosità percentuale, BMD e TMD sia fra loro sia con i parametri determinati dalle prove meccaniche micro e macroscopiche,  $E_r$ , H,  $\sigma_{ult}$ .

Per ogni analisi di regressione lineare si sono calcolati il coefficiente di correlazione, il coefficiente di determinazione ed il valore di significatività indicato attraverso il *p-value*. In accordo a quanto previsto da altri gruppi di ricerca, sono state ritenute significative le relazioni fra i parametri aventi un *p-value* inferiore a 0,05.

## 5. Risultati

Per la caratterizzazione morfologica e meccanica del tessuto osseo trabecolare, si sono analizzate dieci teste omerali di pazienti sottoposti ad artroplastica della spalla di età variabile tra i 54 e gli 85 anni: una appartenente ad un soggetto affetto da osteoporosi, una prelevata da un soggetto osteopenico e sette di soggetti sani. I campioni osteoporotici sono prelevati da pazienti con osteoporosi diagnosticata e non ancora sotto trattamento farmacologico e per tale ragione sono di difficile reperimento. Tali campioni sono stati forniti dall'Istituto Ortopedico Rizzoli, parte terza nel progetto ERC BOOST.

Da ciascuna testa omerale sono state estratte da un minimo di 5 ad un massimo di 8 biopsie, in zone ritenute significative per la determinazione dei parametri morfologici e meccanici delle stesse. Complessivamente sono state analizzate 53 biopsie, di cui: 5 di osso affetto da osteoporosi, 6 osteopeniche e 42 di osso sano.

Le teste omerali sono state suddivise, ai fini dell'analisi, in quattro gruppi. Il primo comprende le i campioni di osso sano appartenenti a soggetti tra i 50 ed i 70 anni (Healthy): 5716(H), 5736(H), 5744(H), 5745(H), 5712(H), 5602(H). Il secondo raggruppa le ossa sane appartenenti a soggetti con età maggiore di 70 anni (Healthy Old): 5500(HO), 5729(HO). Vi sono poi una testa omerale osteopenica, 5528(OPen), e una affetta da osteoporosi, 5592(OP). Le informazioni sulle singole teste omerali sono riportate in Appendice I.

### 5.1 Analisi micro-CT

Per ogni biopsia sono state analizzate la porosità, lo *structure model index* (SMI), il grado di anisotropia (DA), lo spessore delle trabecole (Tb. Th.), la loro separazione (Tb.Sp.) e la *bone mineral density* (BMD). Inoltre, per le biopsie centrali, destra e sinistra si è ricavata la *tissue mineral density* (TMD).

Dal confronto fra le biopsie si sono ottenuti, per ogni testa omerale, i valori medi dei parametri morfologici sopra indicati e le rispettive variazioni standard. In tutti i grafici rappresentanti tali valori medi e variazioni standard, il campione di osso affetto da osteoporosi è stato rappresentato in rosso, quello osteopenico in arancione, mentre i campioni sani sono indicati in azzurro.

Per quanto riguarda invece la rappresentazione grafica dei dati di confronto morfologico delle singole biopsie ossee, suddivise per zona di prelievo, si faccia riferimento all'Appendice II.

Il primo indice morfologico considerato è la porosità media dei campioni (Fig. 5.1). L'osso OP presenta la porosità massima, con un valore pari all'89% di porosità aperta. I campioni sani (H e HO) mostrano una porosità compresa fra l'81,4% e l'87,5%, e il campione osteopenico (OPen) rientra fra le porosità più basse, con un valore pari all'82,3%.

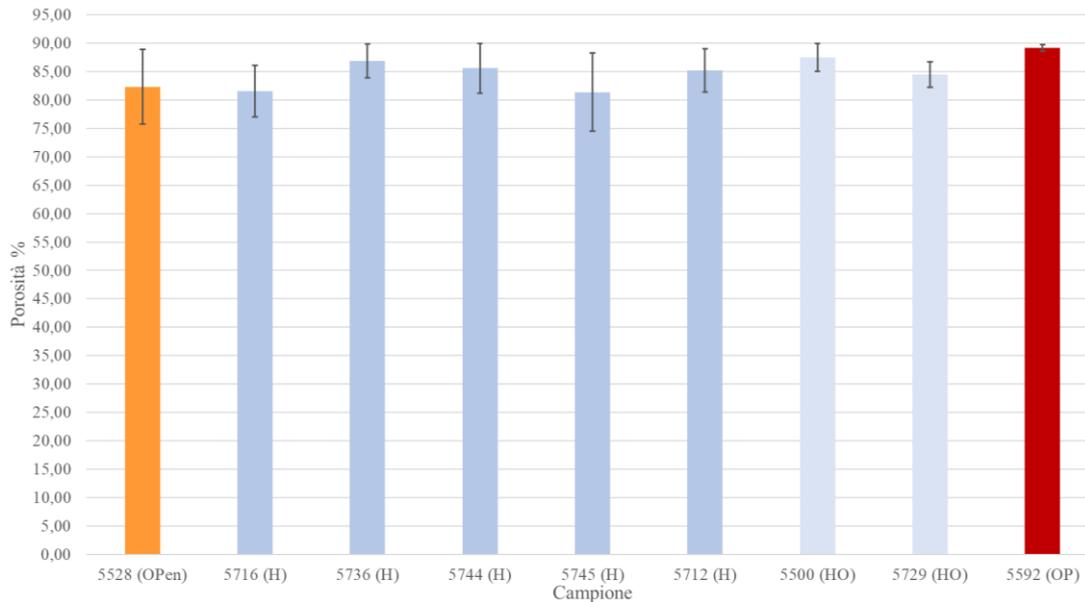


Figura 5.1. Porosità media e sua variazione standard nelle teste omerali, ricavata come media delle porosità delle singole biopsie appartenenti al campione.

Il secondo parametro morfologico analizzato è lo SMI (Fig. 5.2). In questo caso non si osserva una particolare differenza dell'indice fra osso sano ed osteoporotico. Eccezione è il campione 5716 (H), prelevato dal paziente più giovane (54 anni): tuttavia, questa evidenza non risulta statisticamente significativa data l'elevata variazione standard delle misure. Per l'osso osteoporotico si registra uno SMI medio pari a 1,35. I valori relativi alle ossa sane, escludendo il campione 5716 (H), variano fra 1 e 1,38, con i valori più elevati di SMI rilevati per quelle HO, appartenenti a soggetti di età più avanzata. Il campione osteopenico presenta valori intermedi fra quelli dell'osso sano più giovane e quello osteoporotico, con un'elevata variabilità delle misurazioni.

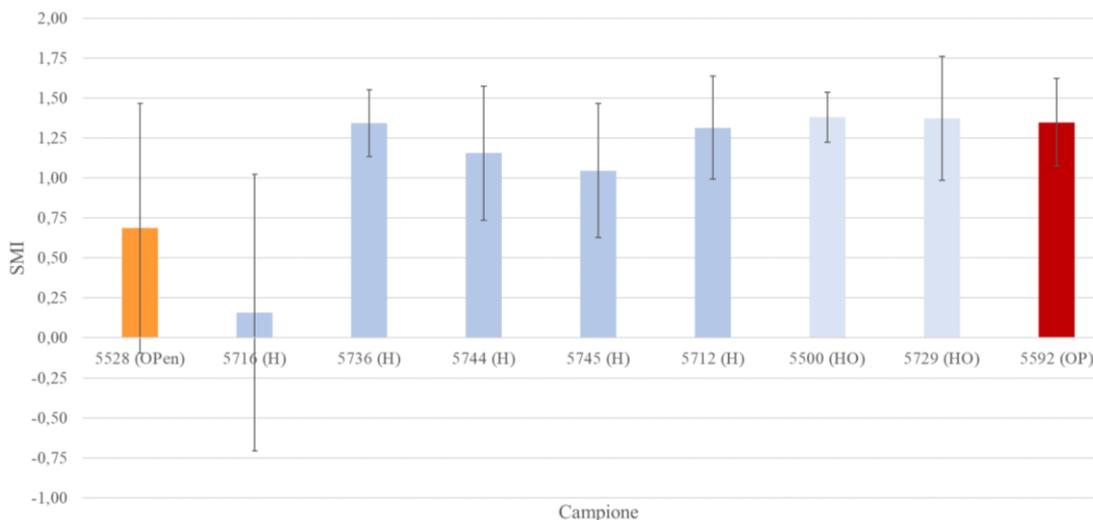


Figura 5.2. SMI medio e sue deviazioni standard nelle teste omerali, ricavato come media dei singoli SMI delle biopsie appartenenti al campione.

Il grado di anisotropia (DA) è stato il terzo indice morfometrico ad essere analizzato (Fig. 5.3). Il campione osteoporotico presenta il DA massimo, pari a 0,49, seguito dal valore di 0,47 del campione osteopenico. I campioni sani appaiono maggiormente isotropi, con valori

del DA compresi fra 0,33 e 0,44. Queste evidenze visive sono confermate dall'analisi di varianza ad un fattore, che rimarca, con una significatività dello 0,008, come i campioni di osso sano ed osso osteoporotico non siano rappresentativi di una stessa popolazione.

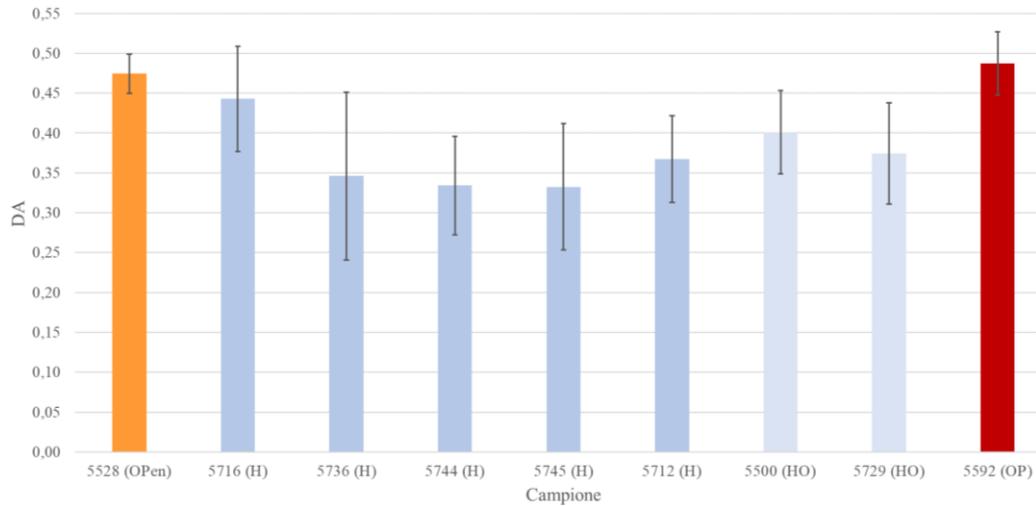


Figura 5.3. DA medio e sue deviazioni standard nelle teste omerali, ricavato come media dei singoli DA delle biopsie appartenenti al campione.

Per quanto riguarda il quarto parametro morfometrico considerato, Tb.Th. (Fig. 5.4), il campione osteoporotico presenta lo spessore trabecolare medio minimo, pari a 113,5  $\mu\text{m}$ . I campioni sani presentano una certa variabilità, con valori compresi fra i 160,2  $\mu\text{m}$  del campione 5712 (H) ed i 124,7  $\mu\text{m}$  del campione 5736 (H). Si evidenzia, anche per questa misura, come il campione osteopenico presenti valori intermedi fra lo spessore trabecolare dell'osso sano e di quello osteoporotico, con un'elevata variabilità delle misure rilevate. Anche in questo caso, quanto osservato è confermato dall'analisi di varianza ad un fattore, che rimarca, con un *p-value* di 0,008, come i campioni di osso sano ed osso osteoporotico non siano rappresentativi di una stessa popolazione.

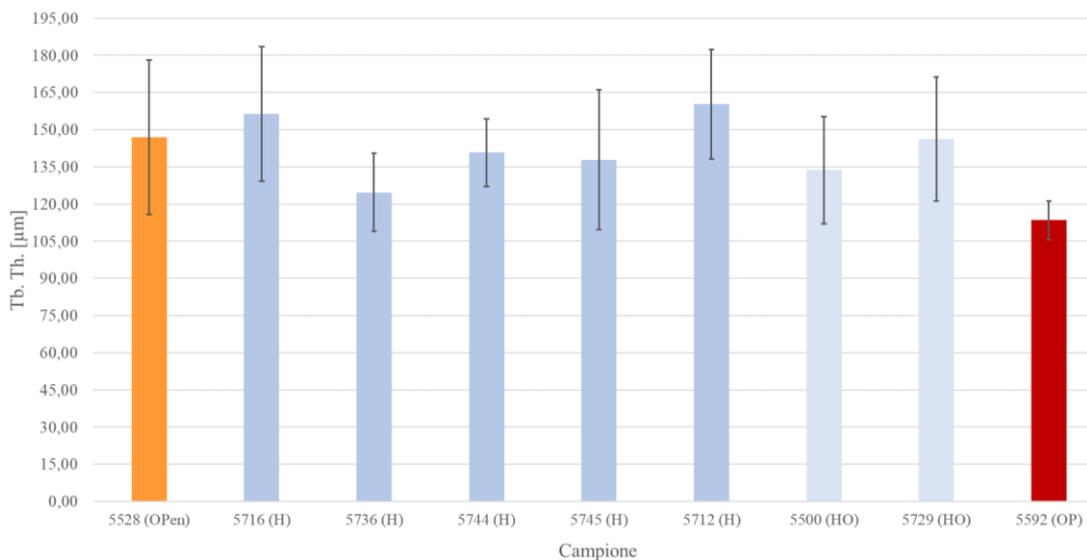


Figura 5.4. Tb.Th. media e sue deviazioni standard nelle teste omerali, ricavato come media dei singoli DA delle biopsie appartenenti al campione.

Tb.Sp. (Fig. 5.5) è un parametro che ha presentato forti variazioni e la mancanza di un andamento preciso: non sempre ad un aumento dello spessore trabecolare ha corrisposto una diminuzione della loro separazione. Per l'osso osteoporotico si registra una Tb.Sp. pari a 723,8  $\mu\text{m}$ . I campioni sani presentano valori compresi fra i 563,2  $\mu\text{m}$  del campione 5745 (H) e gli 820,4  $\mu\text{m}$  del campione 5712 (H). Per il campione osteopenico è stato ricavato un valore pari a 688,0  $\mu\text{m}$ .

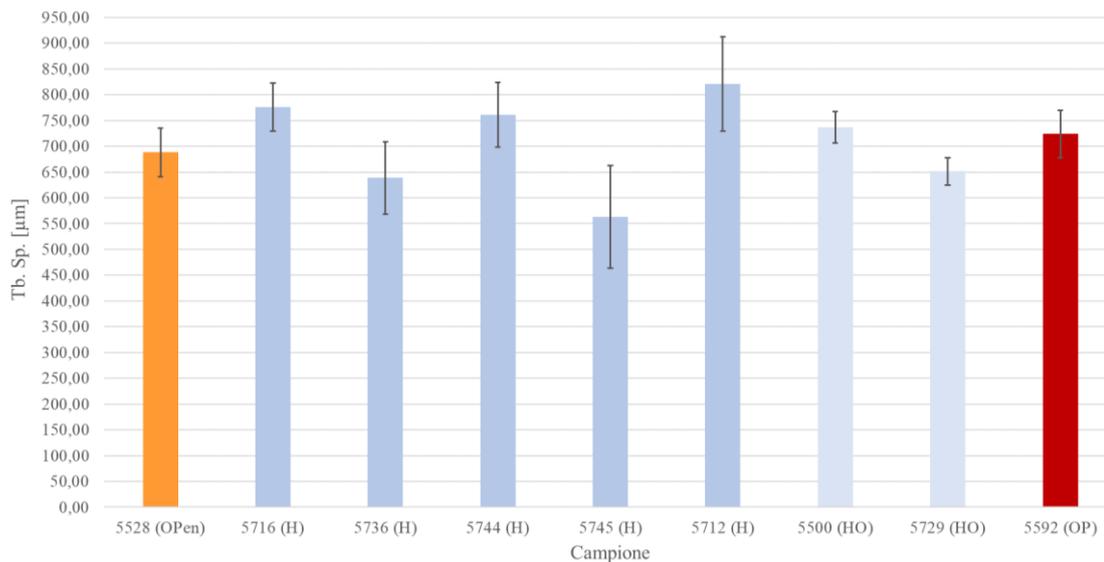


Figura 5.5. Tb.Sp. media e sue variazioni standard nelle teste omerali, ricavata come media delle singole Tb.Sp. delle biopsie appartenenti al campione.

Dopo l'analisi dei parametri morfologici sono stati analizzati i parametri densitometri del tessuto osseo, iniziando dalla misurazione della *bone mineral density* (Fig. 5.6). La BMD dell'osso osteoporotico è la minore.

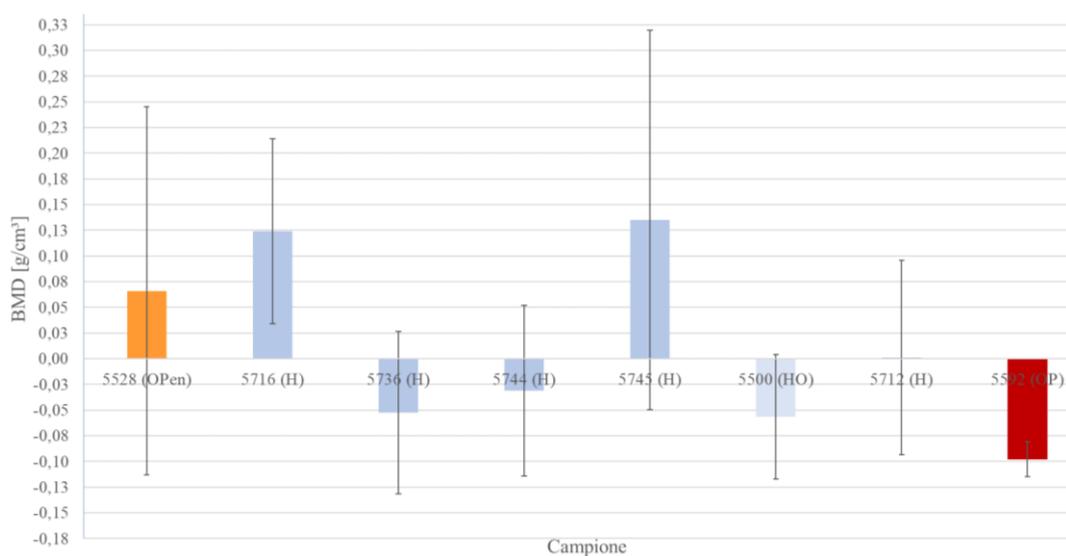


Figura 5.6. BMD media e sue variazioni standard nelle teste omerali, ricavata come media delle singole BMD delle biopsie appartenenti al campione.

Il secondo parametro densitometrico ricavato attraverso l'analisi micro-CT è la *tissue mineral density* (Fig. 5.7). La TMD, come già detto, fornisce un'indicazione del reale contenuto di fase minerale presente all'interno del tessuto osseo. La TMD massima, pari a  $1,69 \text{ g/cm}^3$ , si registra per il campione osteoporotico. I campioni sani presentano TMD simili, comprese fra gli  $1,13 \text{ g/cm}^3$  del campione 5745 (H) e gli  $1,40 \text{ g/cm}^3$  della testa 5712 (H). Per il campione osteopenico la TMD registrata è pari a  $1,20 \text{ g/cm}^3$ . Queste evidenze visive sono confermate dall'analisi di varianza ad un fattore, che rileva in modo significativo come i campioni di osso sano ed osso osteoporotico non siano rappresentativi di una stessa popolazione.

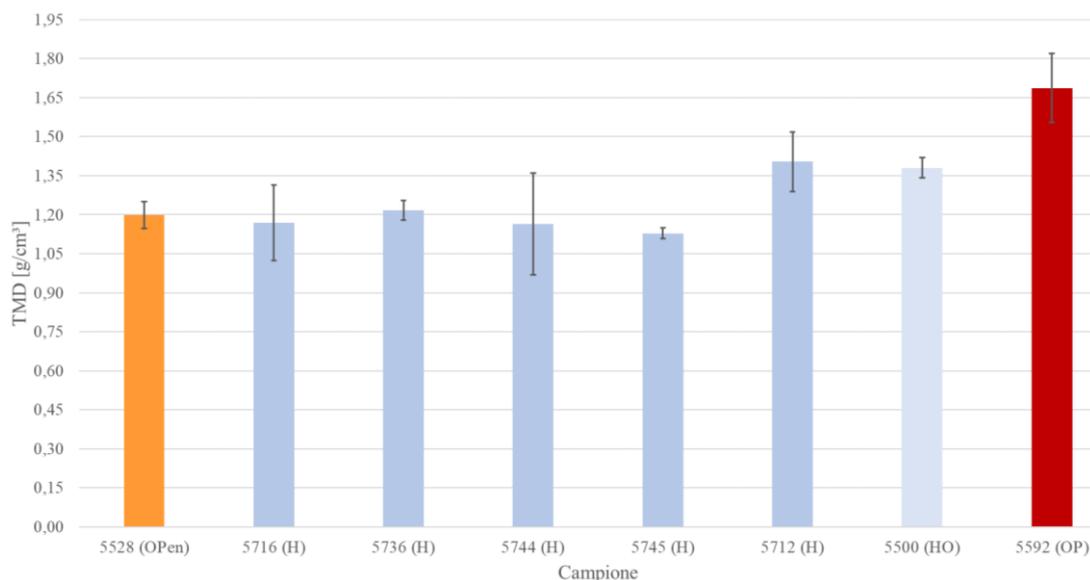


Figura 5.7. TMD media e sue variazioni standard nelle teste omerali, ricavata come media delle singole BMD delle biopsie appartenenti al campione.

## 5.2 Test di compressione uniassiale

Si riportano in seguito le curve sforzo-deformazione ottenute dai test di compressione macroscopici sulle biopsie ossee, suddivise in base al sito di prelievo dei campioni: zona sinistra, destra o inferiore della testa omerale. Vengono in questa sede riprodotte esclusivamente le curve significative per il confronto del comportamento del tessuto sano e di quello osteoporotico. Si veda l'Appendice III per ulteriori curve ricavate da biopsie prelevate in zone per cui non è stato possibile il confronto tra i due tipi di tessuto presi in esame.

Le biopsie appartenenti ad osso affetto da osteoporosi sono evidenziate, anche in questa serie di grafici, con l'utilizzo del colore rosso, mentre l'arancione individua il campione osteopenico.

Le prime curve sforzo-deformazione riportate descrivono il comportamento meccanico macroscopico delle biopsie prelevate nella zona sinistra delle teste omerali (Fig. 5.8).

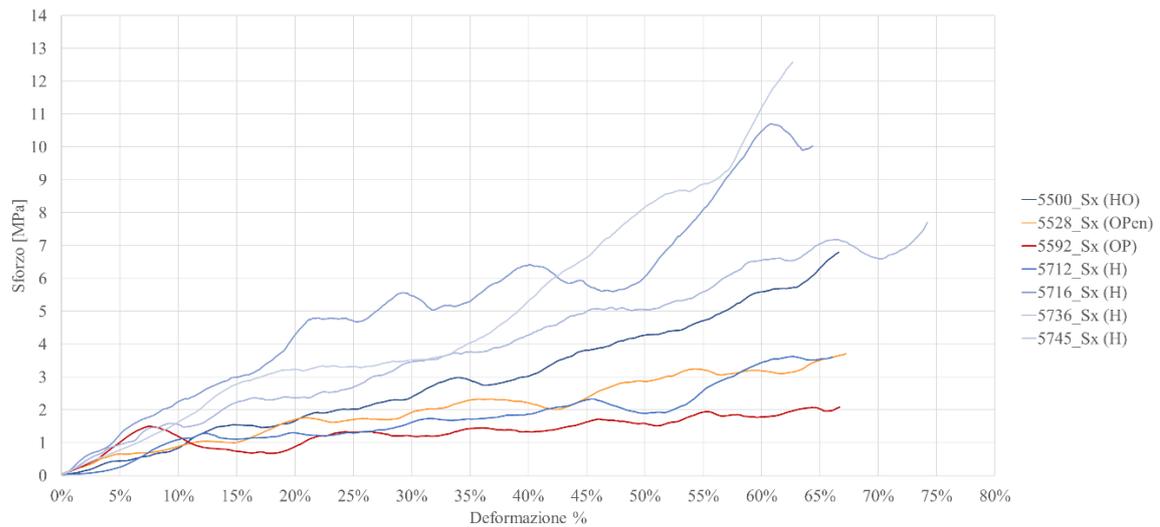


Figura 5.8. Curve sforzo-deformazione su biopsie della zona sinistra della testa femorale.

Dalla Fig. 5.8, nonostante le curve sforzo-deformazione appartenenti ai campioni sani di controllo abbiano un andamento variabile, è possibile osservare con chiarezza il peggioramento delle caratteristiche meccaniche del campione osteoporotico.

Si riportano quindi le curve risultanti dai test di compressione effettuati sulle biopsie ricavate dalla zona destra della testa omerale (Fig. 5.9). Il tessuto osseo osteoporotico presenta nuovamente, in accordo a quanto atteso, le caratteristiche meccaniche peggiori. Ciò è evidenziato ulteriormente dalla differenza più marcata negli andamenti delle curve appartenenti ai due tessuti in esame e dal più uniforme andamento delle curve dei campioni sani di controllo.

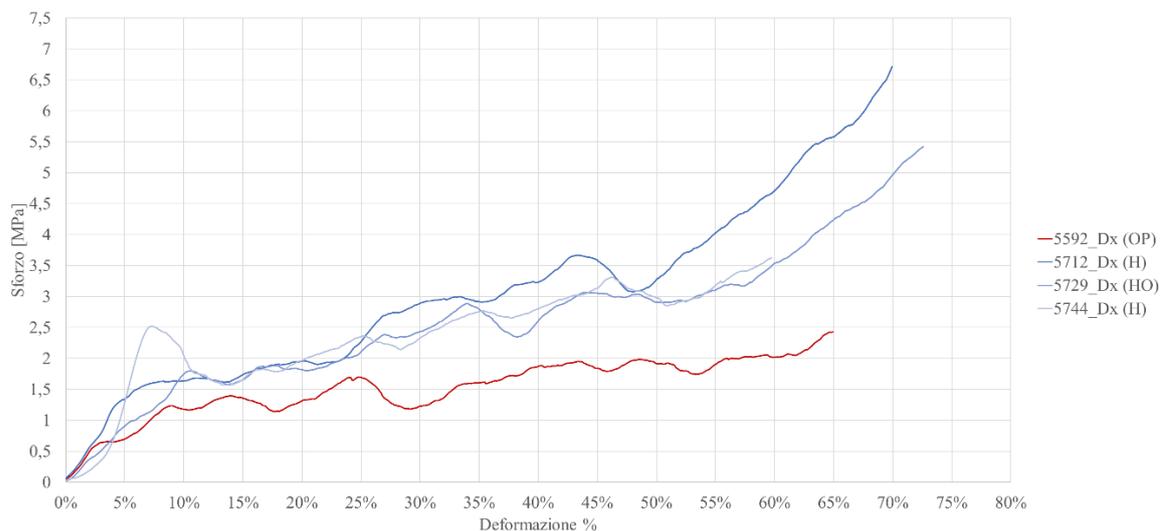


Figura 5.9. Curve sforzo-deformazione su biopsie della zona destra della testa femorale.

In ultimo sono riportate le curve ricavate per i campioni provenienti dalla zona inferiore delle teste omerali (Fig. 5.10). In questo caso, come già per i campioni della zona sinistra, si osserva una elevata variabilità nell'andamento delle curve. Dal grafico emergono, ancora una volta, le peggiori proprietà meccaniche dell'osso affetto da osteoporosi rispetto all'osso sano.

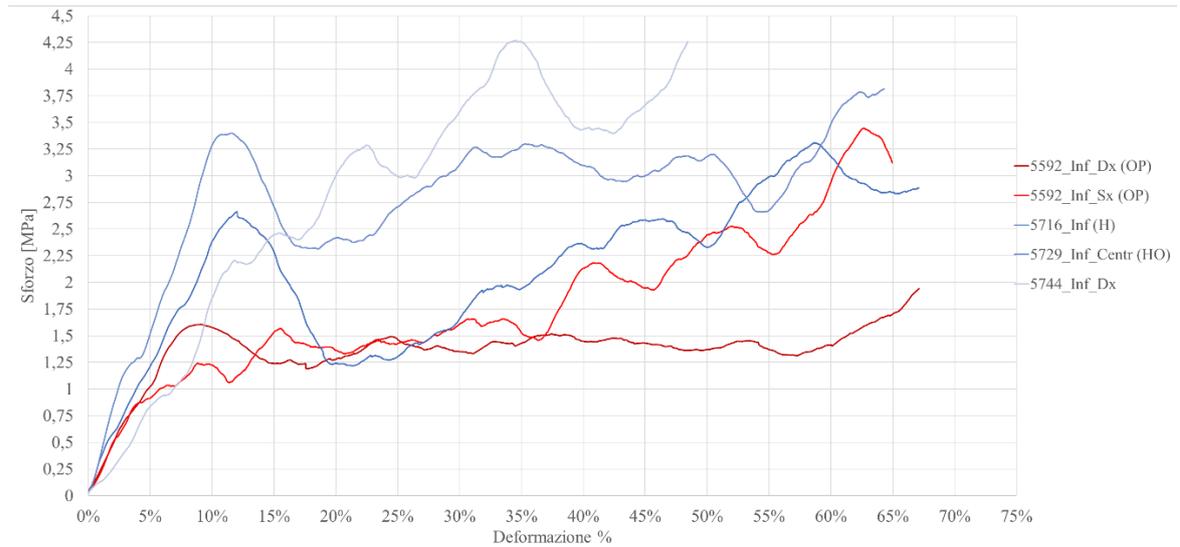


Figura 5.10. Curve sforzo-deformazione su biopsie della zona inferiore della testa femorale.

Si conclude l'esposizione dei risultati con il grafico (Fig. 5.11) riportante i carichi compressivi massimi di tutte le biopsie analizzate, calcolati, come indicato in precedenza nella sezione Materiali e Metodi, ad una deformazione pari al 30% [2]. Un confronto quantitativo è stato realizzato prendendo in considerazione il carico compressivo massimo ( $\sigma_{ult}$ ), dopo il quale si ritiene concluso il cedimento progressivo delle trabecole. È possibile osservare come, a fronte di una elevata variabilità dei campioni ossei sani, l'osso affetto da osteoporosi presenti un certo grado di costanza di  $\sigma_{ult}$  e come questi valori si situino al di sotto della media dei valori registrati per le biopsie di controllo, pari a 2,77 MPa. Queste evidenze sono confermate dall'analisi di varianza ad un fattore che, con un  $p$ -value pari a 0,025, rileva come i campioni di osso sano ed osso osteoporotico non siano rappresentativi di una stessa popolazione.

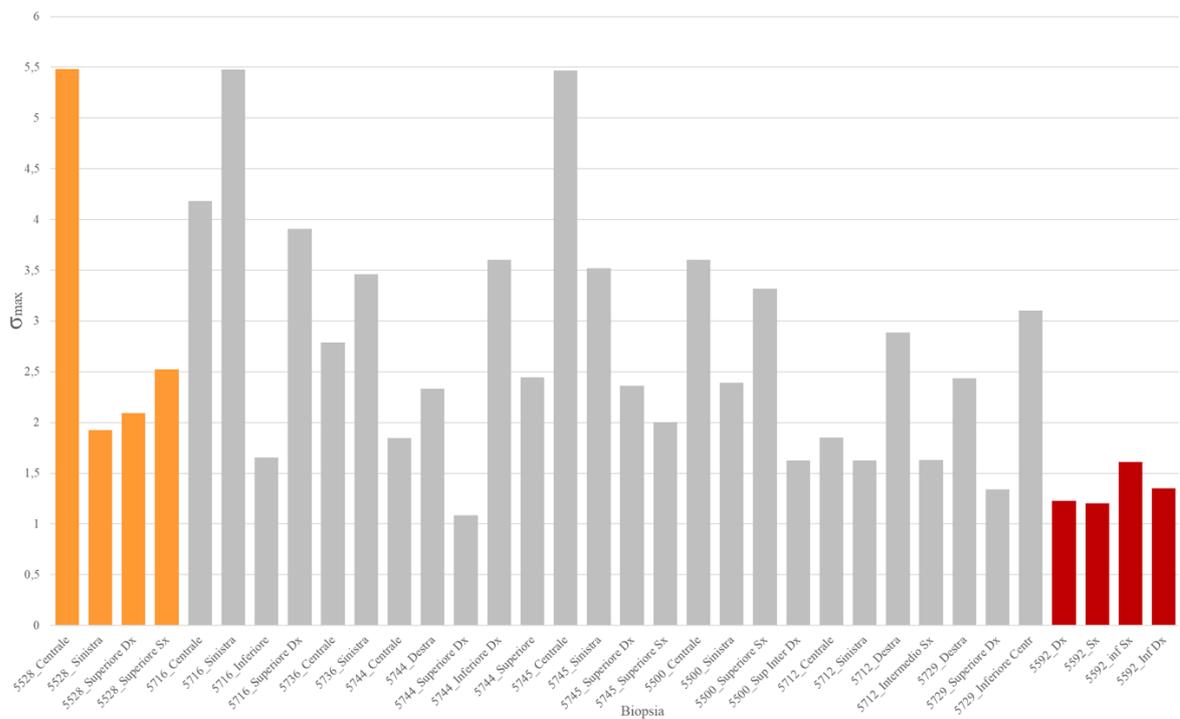


Figura 5.11. Carichi compressivi massimi dell'intero set di biopsie analizzate.

### 5.3 Nanoindentazione

La nanoindentazione ha fornito i valori di modulo ridotto ( $E_r$ ) e di durezza ( $H_C$ ) delle singole trabecole, grazie a tali valori si sono quindi calcolati i parametri meccanici per le singole teste omerali.

Si presentano nel grafico seguente (Fig. 5.12) gli andamenti delle curve carico-spostamento per i test di nanoindentazione per un campione di osso sano, 5736(H), e un campione osteoporotico, 5592(OP). Come già indicato nella sezione Materiali e Metodi, si può verificare come l'analisi condotta in questa tesi faccia riferimento ad un comportamento elastoplastico del materiale testato con un indentatore Berkovich.

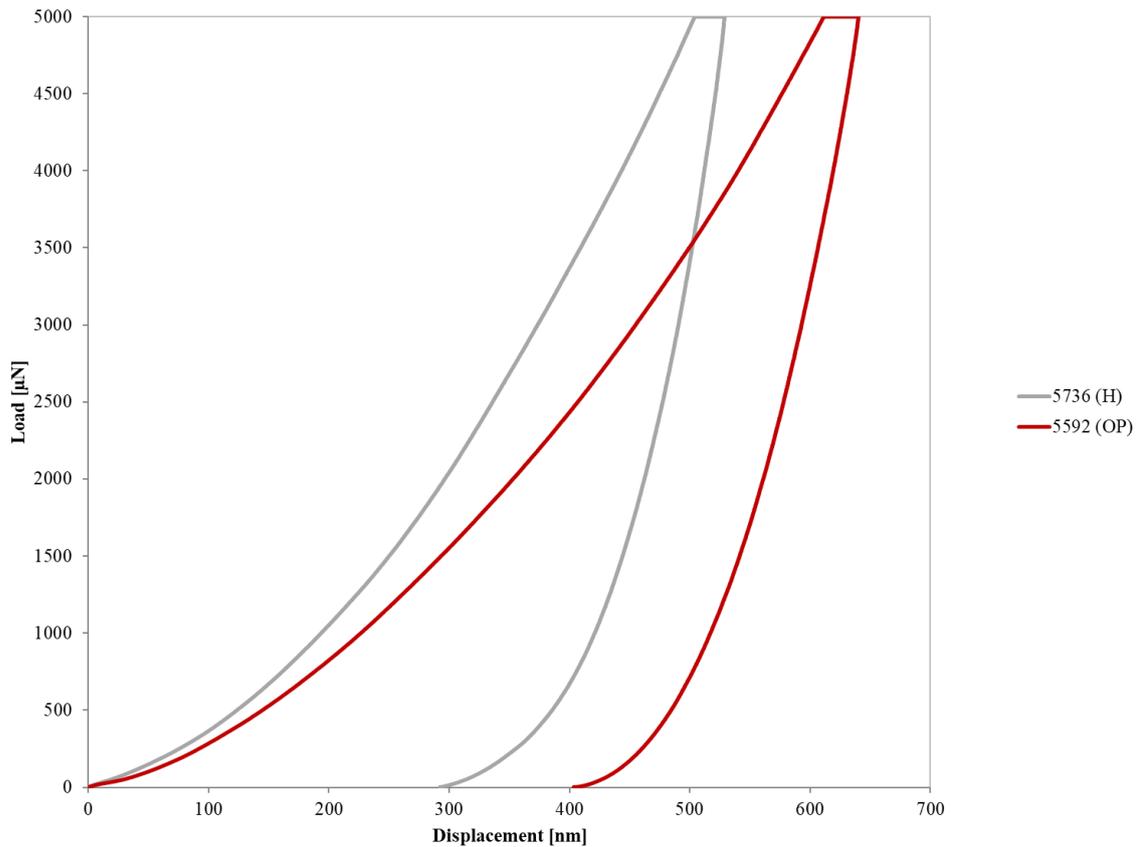


Figura 5.12. Andamenti delle curve carico-spostamento per i test di nanoindentazione in accordo ad un comportamento di deformazione elastoplastico, per un campione di osso sano (H) e un campione osteoporotico (OP).

Si è ricavato come primo indice meccanico il modulo ridotto, il quale si ritiene efficace nella descrizione delle caratteristiche elastiche dell'osso considerata l'elevata differenza fra i moduli elastici dell'osso e della piramide di diamante che costituisce l'indentatore Berkovich.

Il primo grafico (Fig. 5.13) riporta i moduli ridotti delle trabecole ossee. Per ogni biopsia analizzata sono state selezionate diverse trabecole su cui sono state effettuate delle griglie di nanoindentazioni. I dati riportati nel grafico rappresentano la media dei risultati ottenuti per ciascuna trabecola analizzata: si riportano dunque la media del modulo ridotto per sei trabecole appartenenti a biopsie del campione 5592 (OP), per quattro trabecole del 5528

(OPen) e per 17 trabecole appartenenti a campioni di osso sano (H e HO). È possibile osservare come l' $E_r$  delle trabecole osteoporotiche risulti maggiore rispetto a quello dei campioni sani, con valori compresi fra 14,00 GPa e 17,81 GPa per il primo gruppo rispetto ai 5,45-14,73 GPa del secondo gruppo. I campioni osteopenici presentano valori intermedi fra quelli del gruppo osteoporotico e quello di controllo.

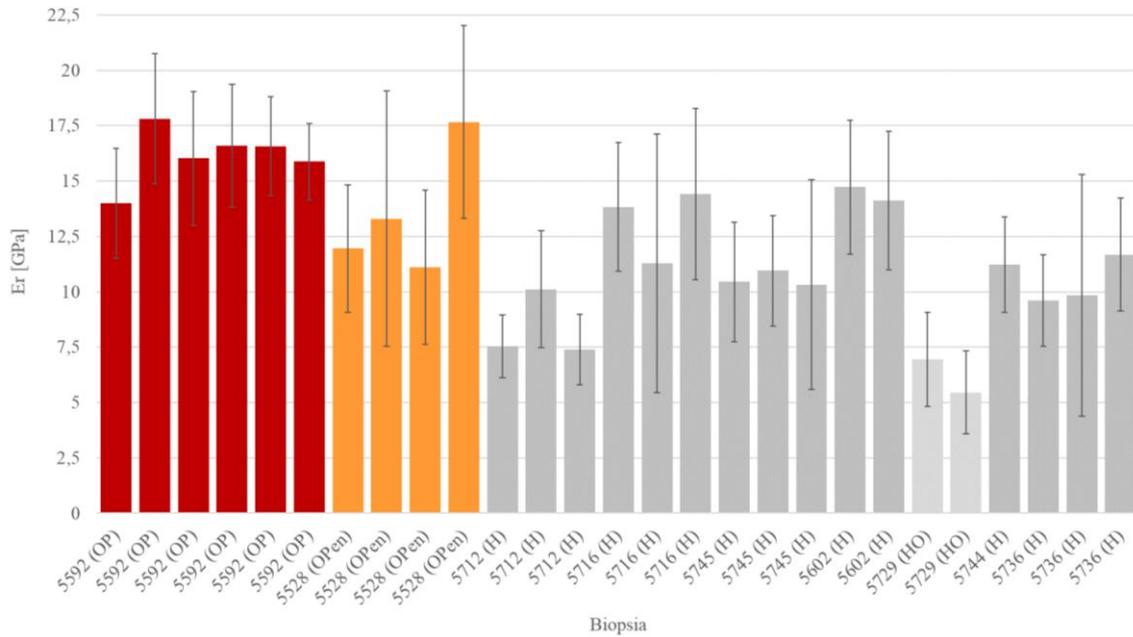


Figura 5.13. Valori medi del modulo elastico ridotto e relative deviazioni standard ricavati per le singole trabecole.

Per apprezzare meglio la differenza fra i moduli ridotti si è realizzato un grafico riportante i valori medi delle teste omerali analizzate (Fig. 5.14). Tale grafico suggerisce una certa variabilità fra i campioni sani, con valori nel range compreso fra i 6,20 GPa del campione 5729 ed i 14,42 GPa del campione 5602. Si osserva, inoltre, un valore del modulo elastico del campione OP nettamente superiore agli altri (16,15 GPa), mentre il campione OPen presenta valori intermedi fra il gruppo sano e quello osteoporotico (13,51 GPa).

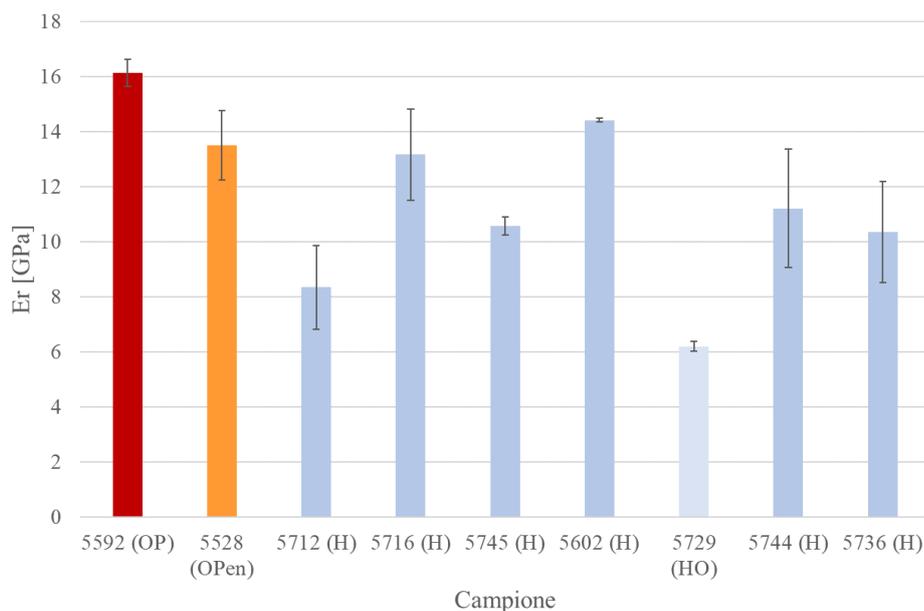


Figura 5.14 Valori medi del modulo elastico ridotto e relative dev. standard ricavati per le teste omerali analizzate.

La seconda analisi micro-meccanica prevede la determinazione della durezza del tessuto osseo ( $H_c$ ). Si riportano, anche in questo caso, due differenti grafici: il primo con l'indicazione delle durezza ricavate per le singole trabecole (Fig. 5.15), il secondo realizzato riportando i valori medi di ciascuna testa omerale (Fig. 5.16).

Dall'osservazione delle durezza ricavate per le singole trabecole emerge come il parametro meccanico presenti i valori più elevati nei campioni affetti da osteoporosi, situati fra 0,65 GPa e 0,76 GPa. I valori dei campioni sani si attestano fra i 0,38 GPa del campione 5729 (HO) ed i 0,60 GPa del campione 5602 (H). Per quanto riguarda questa analisi, i valori rilevati per l'osso osteopenico risultano comparabili con quelli dell'osso sano.

Il confronto tra i valori medi delle teste omerali appartenenti a campioni sani evidenzia una maggiore costanza della durezza rispetto a quanto rilevato per il modulo ridotto. Spicca sugli altri valori l' $H_c$  del campione affetto da osteoporosi, pari a 0,7 GPa. I valori medi dei campioni di controllo nella maggior parte dei casi si attestano intorno ai 0,45 GPa, salvo il campione 5602 (H) che presenta una durezza decisamente superiore alla media del gruppo.

L'analisi di varianza ad un fattore rimarca, con una significatività dello 0,036, come i campioni di osso sano ed osso osteoporotico non siano rappresentativi di una stessa popolazione. Come già rilevato, la durezza del campione osteopenico è del tutto comparabile a quella dei campioni non affetti da patologie ossee.

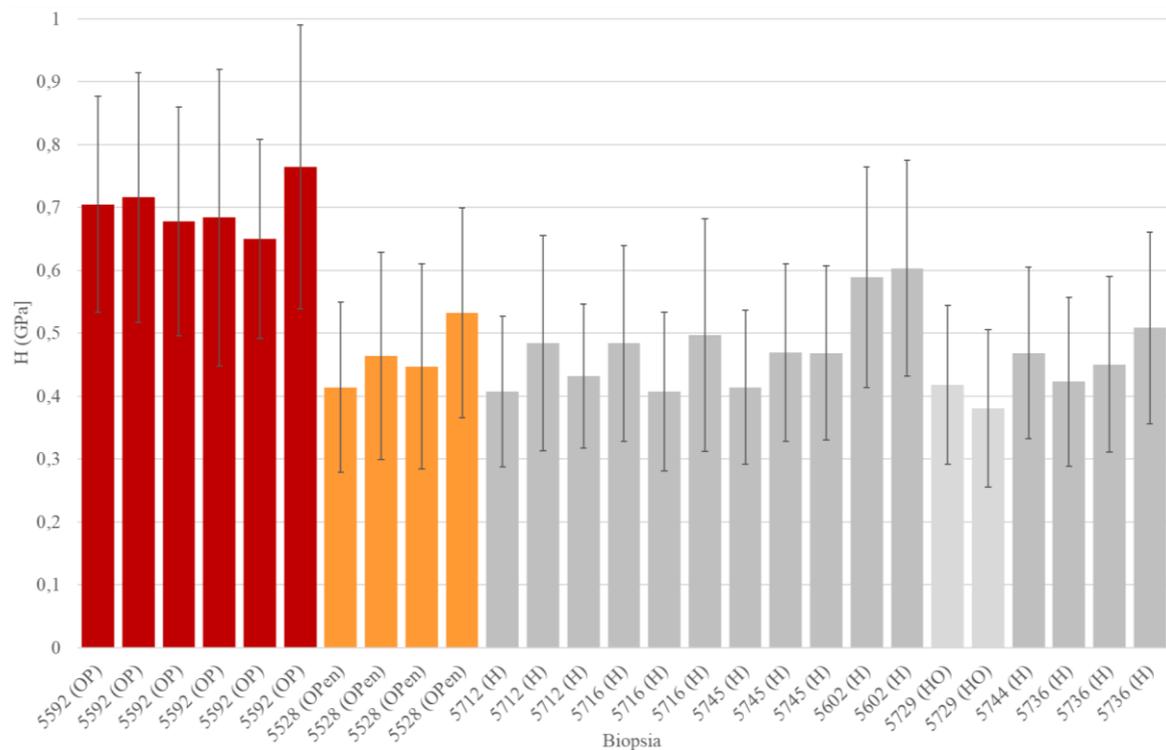


Figura 5.15. Valori medi di durezza e relative deviazioni standard ricavati per le singole trabecole.

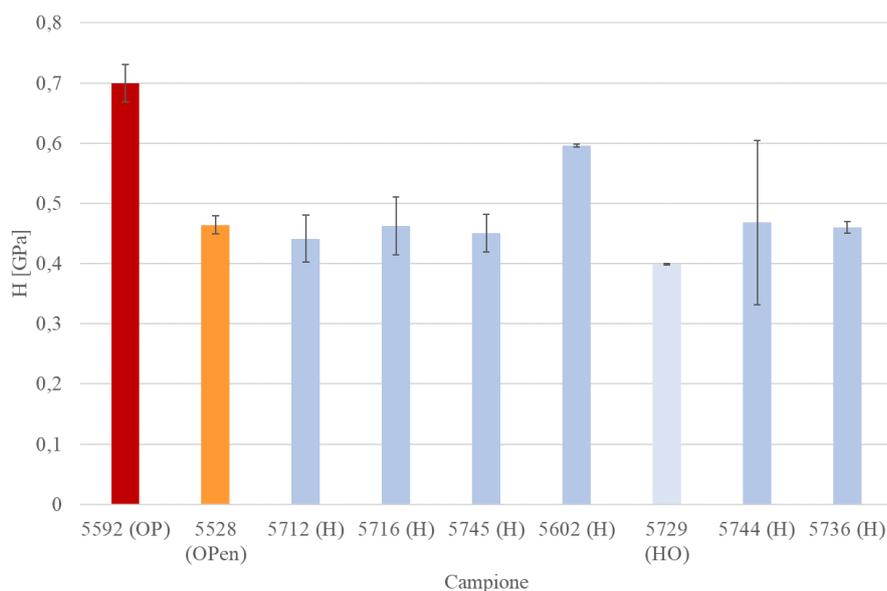


Figura 5.16. Valori medi di durezza e relative deviazioni standard ricavati per le teste omerali analizzate

## 5.4 Analisi statistica

L'analisi di regressione lineare con Excel ha evidenziato l'esistenza di correlazioni fra i dati ritenuti di interesse ai fini della determinazione delle proprietà dell'osso. In particolare, si sono confrontati i parametri morfologici e densitometrici (SMI, DA, Tb.Th, Tb.Sp, porosità percentuale, BMD e TMD) sia fra loro sia con i parametri determinati dalle prove meccaniche micro e macroscopiche ( $E_r$ , H,  $\sigma_{ult}$ ). Per ogni analisi di regressione lineare si sono calcolati coefficiente di correlazione, coefficiente di determinazione e significatività (*p-value*). Sono state ritenute significative le relazioni fra i parametri aventi un *p-value* inferiore a 0,05. Per riassumere le correlazioni riscontrate tra i parametri morfologici, meccanici e densitometrici analizzati nel corso di questo studio ci si affida alla Tab 5.1.

| CORRELAZIONE          | COEFFICIENTE DI CORRELAZIONE | COEFFICIENTE DI DETERMINAZIONE | P-VALUE |
|-----------------------|------------------------------|--------------------------------|---------|
| $\sigma_{ULT}$ VS P%  | 0,71                         | 0,56                           | 0,0003  |
| P% VS TB.TH.          | 0,61                         | 0,38                           | 0,002   |
| $\sigma_{ULT}$ VS SMI | 0,73                         | 0,54                           | 0,0001  |
| $\sigma_{ULT}$ VS BMD | 0,71                         | 0,51                           | 0,0003  |
| SMI VS BMD            | 0,58                         | 0,33                           | 0,006   |
| $\sigma_{ULT}$ VS TMD | 0,54                         | 0,29                           | 0,03    |
| H VS TMD              | 0,80                         | 0,65                           | 0,10    |
| $E_R$ VS TMD          | 0,83                         | 0,70                           | 0,08    |
| H VS $E_R$            | 0,86                         | 0,74                           | 0,005   |

Tabella 5.1. Tabella riassuntiva delle correlazioni riscontrate attraverso l'analisi di regressione lineare.

## 6. Discussione dei risultati

I dati raccolti sono discussi prima in modo qualitativo, confrontandone gli andamenti fra il gruppo sano di controllo e quello affetto dall'osteoporosi, e in seguito attraverso un'analisi di regressione lineare, che descrive la correlazione fra parametri morfologici, macro-meccanici e micro-meccanici.

È evidente, dall'osservazione dei dati, la presenza di differenze fra tessuto osseo sano e tessuto affetto da osteoporosi. Quasi tutti i parametri considerati, ad eccezione dell'SMI e della Tb.Sp. che presentano valori analoghi per il tessuto sano e quello osteoporotico, differiscono per le due tipologie di osso in esame.

L'aumento della porosità osservata nel caso del campione OP è giustificata dal tipo di patologia ossea, che prevede una perdita accelerata di tessuto osseo con l'avanzare dell'età, il che risulta inevitabilmente in un aumento della porosità di alcuni punti percentuali. L'aumento della porosità nell'osso affetto da osteoporosi è in accordo con quanto rilevato da *Ciarallo et al.* [16]. Inoltre, l'aumento della porosità è in accordo alla diminuzione del rapporto BV/TV osservata da *Ozan et al* [45], *Zhang et al.* [62] e *Nikodem* [37].

Differentemente da quanto osservato negli studi di *Zhang et al.* [62] e *Nikodem* [37], l'SMI dell'osso affetto da osteoporosi non presenta differenze significative rispetto a quello del campione sano. Nell'osso osteoporotico analizzato non vi sarebbe quindi la prevalenza di una struttura trabecolare aciculare rispetto a quella appiattita, maggiormente riscontrabile nei soggetti sani. Questo comportamento, tuttavia, potrebbe essere imputabile al differente sito anatomico considerato.

Il grado di anisotropia è maggiore nell'osso affetto da osteoporosi, se paragonato ai campioni sani di controllo. Sia i valori riscontrati per l'osso osteoporotico, sia i risultati ottenuti per i campioni di controllo sono in accordo con quanto verificato da *Zhang et al.* [62], *Nikodem* [37] ed *Ulrich et al.* [58] suggerendo un maggior orientamento lungo una direzione preferenziale del tessuto osseo malato rispetto a quello non affetto dalla patologia. Questo comportamento potrebbe essere imputabile ad una riorganizzazione del tessuto osseo osteoporotico per compensare la riduzione di massa ossea incrementando il grado di anisotropia in modo tale da massimizzare la resistenza lungo la direzione abituale di applicazione dei carichi [27].

In accordo con quanto già riscontrato da *Zhang et al.* [62] e *Nikodem* [37], lo spessore trabecolare medio del campione osteoporotico risulta leggermente inferiore rispetto ai campioni sani. Oltre a condividere la tendenza nell'andamento dello spessore trabecolare, questa tesi concorda anche con i valori misurati da altri gruppi di ricerca per le due tipologie di osso [37, 45, 58, 62].

La diminuzione della Tb.Th. trae forza anche dalla considerazione degli effetti dell'osteoporosi sull'osso. Infatti, in accordo a quanto rilevato da *Parfitt* [46] uno dei meccanismi di azione dell'osteoporosi consiste nella diminuzione della quantità di osso

depositata dagli osteoblasti dopo il riassorbimento, il che inevitabilmente comporta una riduzione dello spessore delle trabecole nel tempo.

Analogamente a quanto ricavato per lo spessore trabecolare, anche l'aumento della distanza intertrabecolare è in accordo a quanto osservato da *Zhang et al.* [62] e *Nikodem* [37]. Anche in questo caso i valori misurati concordano con quanto già determinato da *Ulrich et al.* [58] e *Nikodem* [37] per l'osso sano e da *Zhang et al.* [62], *Nikodem* [37] e *Ozan et al.* [45] per l'osso affetto da osteoporosi. L'aumento della distanza intertrabecolare sarebbe imputabile alla perdita di coesione all'interno del tessuto osseo trabecolare causata dal riassorbimento accelerato osteoclasto-dipendente riscontrato da *Parfitt* [46] nei soggetti affetti da osteoporosi.

La BMD è il parametro che mostra la maggiore variabilità fra quelli presi in analisi in questa tesi. Nonostante ad oggi sia uno dei parametri principali legati alla definizione della presenza di osteoporosi, solitamente la BMD viene misurata attraverso *dual X-ray absorptiometry* (DXA), rendendo difficoltosa la comparazione fra la BMD analizzata solitamente e quella ricavata attraverso la micro-CT. In accordo a quanto già affermato da *Ulrich et al.* [58] ed *Ozan et al.* [45], dall'analisi dei dati emerge come la BMD, a causa del suo carattere locale, non costituisca da sola un discriminante per la differenziazione del tessuto osseo sano da quello affetto da osteoporosi.

L'elevata risoluzione necessaria per la determinazione della TMD fa sì che questo parametro non risulti fra quelli solitamente inclusi nell'analisi con la micro-CT, rendendo più difficile il confronto di questo indice con altri studi. Tuttavia, l'aumento della TMD osservato nei campioni osteoporotici sembra in accordo con la maggiore durezza misurata nei test di nanoindentazione. Inoltre, la maggiore TMD riscontrata nei campioni osteoporotici è in accordo a quanto sostenuto da *Bala e Seeman* [5] secondo i quali con l'invecchiamento si osserva una riduzione nella sostituzione dei fosfati e degli idrossidi con i carbonati ed una conseguente crescita eccessiva dei cristalli presenti nella matrice organica.

Una spiegazione alternativa è quella che deriva dallo studio di *Smith, Schierer e Fazzalari* [55] secondo cui le zone centrali delle trabecole, essendo le più vecchie sono anche le più mineralizzate. Tali zone, essendo presenti nel cuore delle trabecole, risultano meno interessate dal *turnover* accelerato legato all'osteoporosi. Dunque, a causa della diminuzione della massa ossea legata all'osteoporosi ed all'invecchiamento, le zone maggiormente mineralizzate risulterebbero prevalenti nella struttura trabecolare mantenuta dopo il riassorbimento, comportando un aumento della TMD.

Un'indicazione quantitativa della resistenza meccanica dell'osso è fornita dal carico compressivo massimo. I dati raccolti sono in accordo con quanto osservato da *Ozan et al.* [45] per quanto riguarda l'osso affetto da osteoporosi e con *Aleixo et al.* [2] per il carico massimo sopportabile dall'osso sano.

Dall'osservazione delle curve sforzo-deformazione ottenute è possibile verificare la riduzione delle caratteristiche meccaniche dell'osso associate all'insorgenza dell'osteoporosi. Tuttavia, è altresì evidente l'elevata variabilità del comportamento del

tessuto osseo. Tale variabilità nei risultati è imputabile ad alcuni errori di misura dovuti sia alla mancanza di allineamento dello sforzo compressivo con la direzione principale di allineamento delle trabecole, sia alla creazione di *side-artifacts* legati al danneggiamento delle trabecole durante la creazione del provino ed alla sua dimensione.

L'effetto del disallineamento del carico compressivo è stato studiato da *Ohman et al.* [40] tramite l'utilizzo di campioni ricavati da teste femorali. L'influenza dell'allineamento del carico lungo la direzione principale di allineamento delle trabecole (MTD) è stata testata ricavando dei provini allineati lungo la MTD e confrontandoli con altri disallineati di 20° rispetto a tale direzione. Tutti i campioni presentano le stesse caratteristiche strutturali così da escludere una causa esterna al disallineamento del carico nella determinazione delle proprietà meccaniche. I risultati ottenuti dimostrano una forte correlazione fra l'allineamento del provino lungo la MTD e le proprietà meccaniche del tessuto osseo, sottolineando quindi l'importanza dell'ottimizzazione della direzione di allineamento con la MTD durante la realizzazione dei provini successivamente testati a compressione. Nello svolgimento di questa tesi, a causa dell'alta variabilità della morfologia dei campioni provenienti dalla sala operatoria è stato impossibile prelevare le biopsie ossee lungo la direzione principale di orientamento delle trabecole: ci si è dunque dovuti affidare ad un'osservazione visiva dei campioni per la realizzazione dei provini ossei.

La struttura porosa dell'osso trabecolare comporta alcune criticità durante le prove meccaniche. Infatti, durante la realizzazione dei provini alcune trabecole vengono danneggiate ed interrotte facendo sì che l'osso mostri una maggiore deformabilità durante i test meccanici rispetto a quanto avviene *in vivo*. L'effetto di questa maggiore deformabilità coincide con una sottostima sia del modulo elastico sia della resistenza a compressione dell'osso.

La causa delle differenze fra proprietà misurate e reali è il *side-artifact*, legato alla perdita di connettività dei campioni ossei con il tessuto osseo circostante lungo la loro circonferenza. Questa zona danneggiata presenta un certo spessore in funzione dell'architettura del campione: all'aumentare del diametro di un campione cilindrico il volume della zona danneggiata risulta ridotto fino a diventare trascurabile [32].

*Lievers et al.* [32] si sono avvalsi dell'utilizzo di campioni cilindrici di osso trabecolare bovino per la determinazione del diametro minimo al di sotto del quale l'effetto del *side-artifact* può essere ritenuto trascurabile. L'effetto del diametro è stato analizzato sia sperimentalmente che tramite un'analisi ad elementi finiti. Il confronto dei risultati ha evidenziato come non vi sia differenza nel valore del modulo misurato fra campioni di 8,3 mm e 10,6 mm di diametro.

Questo suggerisce che la fresa a tazza utilizzata nella presente tesi (8 mm) per la realizzazione dei provini abbia una corretta dimensione per la determinazione precisa delle proprietà meccaniche, in quanto al di sopra degli 8 mm si ha un andamento asintotico delle proprietà meccaniche alla crescita ulteriore del diametro.

Osservando gli andamenti del modulo elastico ridotto, ottenuto tramite i test di nanoindentazione, è possibile evidenziare una maggiore rigidità dell'osso affetto da

osteoporosi rispetto all'osso sano. I risultati ottenuti per l'osso sano sono in accordo con quanto rilevato da *Rho et al.* [52].

L'aumento del modulo di indentazione riscontrato nella tesi è in accordo con quanto osservato da *Polly et al.* [49] e da *Fratzl-Zelman et al.* [19] e si presenta, rispetto a questi ultimi, più marcato. Tale differenza è attribuibile, nel caso di *Polly et al.* [49], all'utilizzo di campioni ossei provenienti esclusivamente da soggetti sani, considerati per il confronto tra caratteristiche dell'osso prima della menopausa e ad un anno dal suo inizio.

L'aumento del modulo elastico misurato per l'osso osteoporotico è giustificato dal deterioramento della matrice collagenica che si verifica nei soggetti affetti da osteoporosi. Infatti, secondo quanto osservato da *Toledano et al.* [56] e da *Osterhoff et al.* [43], l'aumento degli *advanced glycation end-products* (AGEs) nell'osso affetto da osteoporosi sarebbe correlabile ad un aumento della rigidità del tessuto osseo. Risultanti da reazioni non enzimatiche di riduzione di uno zucchero, gli AGEs irrigidiscono infatti il reticolo del collagene limitando lo scorrimento intermolecolare attraverso la creazione di legami non enzimatici all'interno della matrice collagenica in posizioni casuali [5, 43].

Anche la durezza misurata risulta maggiore nei campioni osteoporotici rispetto a quelli sani, questo risultato sperimentale è in accordo con le osservazioni di *Polly et al.* [49] e *Fratzl Zelman et al.* [19]. Tuttavia, anche in questo caso, la differenza fra i campioni sani e quelli osteoporotici rilevata nella tesi risulta più marcata rispetto a quella osservata nei due articoli citati. L'aumento di durezza risulta in accordo alla maggiore TMD misurata per il campione osteoporotico: in presenza di una maggiore mineralizzazione del tessuto è lecito attendersi una maggiore durezza di quest'ultimo visto il ruolo della fase minerale nel rinforzo della matrice collagenica, tesi confermata da quanto riportato da *Smith, Schirer e Fazzalari* [55].

Si è infine eseguita un'analisi di regressione lineare per verificare le correlazioni esistenti fra i parametri morfologici e meccanici considerati durante la realizzazione della tesi. Essendo lo scopo di quest'analisi quello di osservare le eventuali correlazioni fra le proprietà analizzate e poter individuare quali siano maggiormente significative nella determinazione delle caratteristiche dell'osso, si sono presi in considerazione i campioni senza distinzione fra quelli appartenenti ad osso sano e quelli di osso osteoporotico.

La porosità risulta in particolare correlata con lo spessore trabecolare medio per cui si osserva un coefficiente di correlazione di 0,61, un coefficiente di determinazione uguale a 0,38 ed un *p-value* di 0,002. Questa correlazione sottolinea come la porosità dell'osso dipenda dallo spessore delle trabecole: in un osso affetto da osteoporosi, quindi, ad un assottigliamento delle trabecole corrisponderà un aumento della porosità registrata.

Si è realizzata una prima analisi di regressione lineare fra carico massimo e porosità, essendo ritenuta la porosità particolarmente significativa nella determinazione delle proprietà meccaniche in base agli studi già compiuti da Gibson ed Ashby [20].

L'analisi statistica conferma la correlazione fra la porosità, presa come parametro indipendente, ed il carico compressivo massimo, con un coefficiente di correlazione pari a 0,71, un coefficiente di determinazione di 0,56 ed un *p-value* di 0,0003. Appare dunque

evidente come porosità e proprietà meccaniche siano strettamente dipendenti, in accordo anche a quanto osservato da *Kopperdahl et al.* [30] e *Ciarallo et al.* [16].

In accordo a quanto osservato da *Nikodem* [37] è stata condotta un'analisi statistica per determinare la presenza di correlazione fra carico massimo e SMI. L'analisi di regressione lineare presenta un coefficiente di correlazione pari a 0,73, un coefficiente di determinazione del 54% ed un *p-value* uguale a 0,0001, confermando quindi la correlazione riscontrata da *Nikodem* [37]. Nonostante la correlazione tra carico massimo e SMI sia in disaccordo con quanto esposto nello studio di *Catarina Vale et al.* [14], si sottolinea come anche i valori dei parametri morfologici ottenuti da questo gruppo di ricerca siano in forte disaccordo non solo con quanto rilevato in questa tesi ma anche con i risultati di *Nikodem* [37] e *Zhang et al.* [62].

Si analizza inoltre la correlazione fra carico compressivo massimo e BMD, vista l'importanza che negli anni le è stata attribuita per la determinazione delle caratteristiche meccaniche dell'osso. L'analisi condotta in questa tesi risulta in accordo con le osservazioni di *Ciarallo et al.* [16], mostrando una correlazione tra i due parametri. Si è misurato un valore del coefficiente di correlazione pari a 0,71 con un coefficiente di determinazione del 51% ed una significatività maggiore del 95%. Va riportata, tuttavia, la differenza riscontrata con le analisi condotte da *Ozan et al.* [45], che nel loro studio non hanno individuato una correlazione fra la BMD ed i parametri strutturali. Tale mancanza di una correlazione certa e condivisa fra BMD e proprietà meccaniche dell'osso suggerisce, come già evidenziato dalla letteratura [4, 27, 45, 58], la necessità di adottare oltre alla BMD anche altri parametri nella determinazione delle caratteristiche dell'osso osteoporotico rispetto a quello sano.

Un ulteriore parametro che è risultato correlato con la BMD è lo SMI. Si tratta di una correlazione che trova riscontro anche nello studio condotto da *Nikodem* [37], nonostante non ci siano interpretazioni chiare riguardo questa dipendenza tra i due parametri.

Una correlazione finora mai analizzata e riscontrata in questa tesi è quella fra il carico compressivo massimo e la TMD. Non si tratta tuttavia di una forte correlazione, presentando un coefficiente di correlazione pari a 0,53, un coefficiente di determinazione di 0,28 e un *p-value* di 0,04. La correlazione fra TMD e carico massimo risulta ciononostante credibile, visto il ruolo giocato dalla fase minerale nella determinazione delle proprietà meccaniche dell'osso.

La resistenza del tessuto osseo non dipende esclusivamente dalla fase minerale ma anche dall'interazione tra quest'ultima e la matrice collagenica. Le proprietà della matrice collagenica sono, a loro volta, fondamentali per l'ottimizzazione delle caratteristiche meccaniche dell'osso. Sarebbe quindi errato affermare che all'aumento della TMD corrisponde un aumento indiscriminato delle caratteristiche meccaniche dell'osso: come è stato sottolineato precedentemente, il valore maggiore della TMD è osservato nell'osso OP che, come è riportato in letteratura [56, 57, 43], è maggiormente soggetto ad un'alterazione della matrice collagenica e dei legami fra questa e la fase minerale, con un generale peggioramento della resistenza del tessuto.

La TMD è correlata anche con  $H_C$ , come riscontrabile anche in *Smith, Schirer e Fazzalari* [55]. Gli autori sottolineano la stretta dipendenza della durezza di contatto dal contenuto di calcio: ciò è in accordo con la maggiore durezza rilevata per i campioni osteoporotici analizzati in questa tesi, per i quali si registra la TMD massima. L'indice di correlazione fra TMD e durezza ( $H_C$ ) è 0,80, con un coefficiente di determinazione di 0,65 ed un *p-value* pari a 0,10. Il *p-value*, tuttavia, essendo maggiore di 0,05, rende l'analisi non significativa in base ai criteri assunti in questa tesi. Nonostante ciò, si sottolinea come la correlazione, se ritenuta significativa, risulti in accordo con quanto osservato da *Smith, Schirer e Fazzalari* [55].

Un discorso analogo può essere fatto per quanto riguarda la correlazione fra TMD e modulo ridotto, anche in questo caso, infatti, si riscontra una forte correlazione con un valore del coefficiente di 0,83 ed una determinazione del 69%. Nuovamente, il *p-value*, con un valore di 0,08, è superiore alla soglia di accettazione. Tuttavia, a supporto della correlazione riscontrata si fa riferimento alla ricerca condotta da *Smith, Schirer e Fazzalari* [55].

Si verifica infine la dipendenza tra durezza e modulo elastico ridotto all'interno delle trabecole, correlazione che risulta fortemente marcata con un indice pari a 0,86, un coefficiente di determinazione del 74%, ed un *p-value* uguale a 0,006. Tale dipendenza appare evidente anche dall'osservazione delle mappe dei valori di modulo elastico ridotto e durezza ricavate in seguito alle prove di nanoindentazione (Fig. 6.1): nelle aree in cui si registra la maggiore durezza si può riscontrare anche un modulo elastico ridotto più elevato.

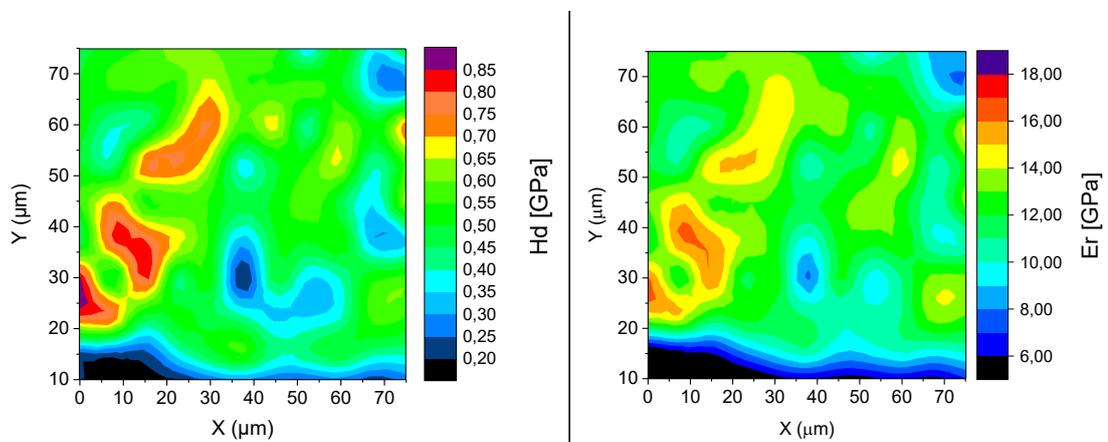


Figura 6.1. Esempio di confronto visivo fra durezza (sinistra) e modulo ridotto (destra) di una trabecola ossea appartenente ad un soggetto sano.

Le correlazioni osservate evidenziano, ancora una volta, come il tessuto osseo sia una struttura altamente complessa: il verificarsi di variazioni anche minime dei parametri analizzati genera effetti su molteplici caratteristiche dell'osso, ed è proprio attraverso l'individuazione dei parametri che hanno un maggior peso nella determinazione delle caratteristiche del tessuto osseo che si può efficacemente confrontare l'osso sano con quello affetto da patologie, quali l'osteoporosi.

## 7. Conclusioni e sviluppi futuri

La tesi, avendo introdotto la comprensione del processo di rimodellamento osseo e del suo disequilibrio con l'insorgenza dell'osteoporosi, è riuscita ad eseguire una caratterizzazione morfologica e meccanica di teste omerali umane sane (H, HO) ed osteoporotiche (OP), sia alla macro che alla micro-scala.

Infatti, dal momento che le fratture causate dall'osteoporosi sono risultato di una sequenza di eventi micro-strutturali, si è cercato di evidenziare come possibili variazioni del tessuto osseo, legate ad un disequilibrio nel processo di rimodellamento in seguito all'avanzare dell'età e all'insorgenza dell'osteoporosi, possano causare una diminuzione della massa ossea ed una perdita dell'integrità strutturale del tessuto.

La caratterizzazione delle due tipologie di tessuto osseo in analisi, sano e affetto da osteoporosi, è stata possibile grazie all'impiego di tecniche di analisi innovative quali micro-CT e nanoindentazione, associate ai più classici test di compressione.

Quasi tutti i parametri presi in considerazione hanno indicato la presenza di differenze tra osso sano ed osso affetto da osteoporosi ed i protocolli di studio seguiti sono stati in grado di mantenere le caratteristiche dell'osso prossime a quelle che si avrebbero in condizioni fisiologiche.

In particolare, la micro-CT ad elevata risoluzione SkyScan 1272 si è rivelata un'apparecchiatura di primaria importanza nell'analisi del tessuto osseo, rendendone possibile lo studio attraverso la determinazione dei parametri morfologici e densitometrici. Fra i parametri ottenuti tramite micro-CT per cui si osserva una maggiore variazione fra osso sano ed osteoporotico vi sono: porosità, grado di anisotropia, spessore trabecolare e *tissue mineral density*. Nonostante l'SMI non presenti differenze significative fra il gruppo sano e osteoporotico, se ne attesta tuttavia l'importanza nella determinazione della resistenza dell'osso in considerazione della sua correlazione con il carico compressivo massimo.

Ulteriori correlazioni fondamentali per la comprensione dell'influenza dei parametri ricavati tramite micro-CT nella determinazione delle caratteristiche meccaniche del tessuto osseo sono quelle fra  $\sigma_{ult}$  e P%, fra  $\sigma_{ult}$  e BMD e fra  $\sigma_{ult}$  e TMD.

Tutti i test meccanici hanno rilevato differenze fra le proprietà del tessuto sano e quello patologico. Nonostante sia presente un'elevata variabilità nell'andamento delle curve registrate attraverso i test di compressione, l'osso affetto da osteoporosi presenta caratteristiche meccaniche peggiori rispetto ai campioni sani di controllo. Ciò sembra in accordo con la soppressione dei meccanismi di tenacizzazione presenti nella matrice collagenica a causa dell'accumulo degli *advanced glycation end-products*, nonché con un'alterazione dei legami all'interfaccia fra la fase minerale ed il collagene. Inoltre, la diminuzione di tenacità del tessuto OP potrebbe essere imputabile alla perdita di trabecole in direzione trasversale, come confermerebbe il maggiore DA riscontrabile nell'osso affetto da osteoporosi.

La variabilità riscontrata nelle curve di compressione sarebbe in parte attribuibile ad alcuni artefatti intrinseci al metodo di misura: in particolare il *side-artifacts* e l'incertezza nella determinazione della *main trabecular direction*.

I test di nanoindentazione e di durezza alla micro-scala svolti presso l'Istituto Italiano di Tecnologia hanno evidenziato, per quanto riguarda i campioni OP, una maggiore durezza ed un maggior modulo elastico ridotto. Tali evidenze sono in accordo con l'infragilimento osseo associato all'insorgenza dell'osteoporosi.

L'aumento di modulo e durezza riscontrati nei campioni osteoporotici rispetto a quelli di controllo sembrano in accordo con la maggiore TMD misurata nei campioni OP, secondo anche quanto evidenziato da altre ricerche. Ulteriore correlazione riscontrata per i parametri micromeccanici è quella fra durezza e modulo elastico ridotto, evidente anche dall'osservazione delle mappe dei valori ricavate dalle prove di nanoindentazione.

Uno dei maggiori limiti rilevati nello svolgimento della tesi è la carenza di campioni provenienti da soggetti affetti da osteoporosi. Infatti, una delle teste omerali inizialmente classificata come affetta dalla patologia si è in seguito rivelata non utilizzabile per la realizzazione delle analisi in quanto al soggetto sono stati somministrati trattamenti farmacologici per contrastare l'osteoporosi in tempi antecedenti al prelievo del campione, che ne hanno modificato la struttura ossea. Questo ha di fatto ridotto la disponibilità di tessuto osseo osteoporotico ad una sola testa omerale. Più in generale, la difficoltà nel reperimento di tessuto osseo da sottoporre ad analisi non si è limitata al solo tessuto osteoporotico.

Tutti i test condotti per l'efficace caratterizzazione del tessuto osseo trabecolare di teste omerali umane sane ed osteoporotiche (micro-CT, nanoindentazione e test compressivi) si sono rivelati validi per la differenziazione delle due tipologie di tessuto in analisi, fornendo una valida base di dati su cui fondare ulteriori ricerche. Il completamento dell'analisi delle caratteristiche del tessuto osseo sarà possibile anche grazie all'utilizzo della spettroscopia Raman associata all'impiego della diffrazione di raggi X.

In particolare, la tesi è stata svolta nell'ambito del progetto ERC BOOST, che si prefigge di trattare le fratture da osteoporosi tramite la realizzazione di uno *scaffold* biomimetico che stimoli, attraverso meccanismi chimici e fisici, le cellule ossee vecchie ad agire come quelle sane, restaurando in tal modo un equilibrio nel rimodellamento. Ed è infatti per comprendere quali siano i corretti stimoli da fornire a queste cellule che è stato necessario iniziare da un'accurata valutazione delle proprietà del tessuto osseo. I risultati emersi saranno dunque essenziali per l'estrapolazione di un modello CAD che riproduca le caratteristiche strutturali dell'osso sano per la realizzazione, tramite stampa 3D, di uno *scaffold* biomimetico secondo quanto previsto negli obiettivi del progetto ERC BOOST.

## 8. Riferimenti bibliografici

- [1] Ager J.W. et al., 2005, “Deep-ultraviolet Raman spectroscopy study of the effect of aging on human cortical bone”, *J. of Biomed. Optics*, vol. 10(3), pp. 1-8.
- [2] Aleixo I. et al., 2013, “A Method for the Evaluation of Femoral Head Trabecular Bone Compressive Properties”, *Materials Science Forum*, vol. 730-732, pp. 3-8.
- [3] Anastasi G. et al., 2010, “Apparato locomotore” in G. Anastasi et al (eds), *Trattato di anatomia umana*, vol. 1, IV edizione, Milano, Edi. Ermes, pp. 57-67.
- [4] Augat P. et al., 1998, “Anisotropy of the elastic modulus of trabecular bone specimens from different anatomical locations”, *Medical Engineering & Physics*, vol. 20(2), pp. 124-131.
- [5] Bala Y., Seeman E., 2015, “Bone’s Material Constituents and their Contribution to Bone Strength in Health, Disease, and Treatment”, *J. of Applied Biomedicine* vol 97(3), pp 308-326.
- [6] Batoon L., Millard S. M., Raggatt L. J., Pettit A. R., 2017, “Osteomacs and Bone Regeneration”, *Current Osteoporosis Reports*, vol. 15(4), pp 385-395.
- [7] Bayliss L., Mahoney D.J., Monk P., 2012, “Normal bone Physiology, remodeling and its regulation”, *Surgery*, vol. 30 (2), pp. 47-53.
- [8] Bedini R., et al., 2010, “Analisi micromorfologica del tessuto osseo trabecolare: influenza della soglia di binarizzazione sul calcolo dei parametri istomorfologici”, Istituto Superiore di Sanità, Rapporto ISTISAN 10/15.
- [9] Bouxsein M.L. et al, 2010, “Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography”, *J. of Bone and Miner. Res.*, vol. 57 (7), pp. 1468-1486.
- [10] Bruker (ed.), 2013, *SkyScan 1272 User Manual*.
- [11] Bruker (ed.), 2013, *Analysis of bone by micro-CT General Information*.
- [12] Bruker (ed.), 2013, *Morphometric parameters measured by Skyscan-CT analyser software*.
- [13] Carretta R. et al, 2015, “Prediction of Local Ultimate Strain and Toughness of Trabecular Bone Tissue by Raman Material Composition Analysis”, *BioMed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1-9.
- [14] Catarina Vale A. et al., 2013, “Micro.computed tomography and compressive characterization of trabecular bone”, *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol 438, pp. 199-205.
- [15] Cefali G., Merlin S., 2012, “Caratterizzazione meccanica di tessuto osseo corticale mediante nanoindentazione ciclica a carichi multipli”, Tesi di laurea magistrale, Politecnico di Milano.

- [16] Ciarallo A. et al., 2006, “An approach to compare the quality of cancellous bone from the femoral necks of healthy and osteoporotic patients through compression testing and microcomputed tomography imaging”, *McGill J. of Med*, vol 9(2), pp. 102-107.
- [17] Drake M.T., Clarke B.L., Lewiecki E.M., 2015, “The Pathophysiology and Treatment of Osteoporosis”, *Clinical Therapeutics*, vol. 36(8), pp. 1837-1850.
- [18] Ferraro J.R., Nakamoto K., Brown C.W., 2003, *Introductory Raman Spectroscopy*, seconda edizione, Amsterdam, Academic Press.
- [19] Fratzl-Zelman N. et al., 2009, “Combination on Nanoindentation and Quantitative Backscattered Electron Imaging Revealed Altered Bone Material Properties Associated with Femoral Neck Fragility”, *Calcif. Tissue Int.*, vol. 85(4), pp. 335-343.
- [20] Gibson L.J., Ashby M.F., 1997, *Cellular Solids: Structure and Properties*, II edizione, Cambridge University Press, Cambridge.
- [21] Hadjidakis D. J., Androulakis I. I., 2006, “Bone Remodeling”, *Annals of the N. Y. Academy of Sciences*, vol. 1092(1), pp. 385-396.
- [22] Hildebrand T., Ruegsegger P., 1997, “A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images”, *J. of Microscopy*, vol. 185 (1), pp. 67-75.
- [23] Hildebrand T., Ruegsegger P., 2010, “Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index”, *Computer Methods in Biomech. and Biomed. Eng.*, vol. 1(1), pp. 15-23.
- [24] Jameson J. et al, 2018, “Osteoporosis”, in *Harrison’s Principles of Internal Medicine*, XX edizione, McGraw Hill, pp. 2942-2958.
- [25] Kenkre J.S., Bassett J.H.D., 2018, “The bone remodeling cycle”, *Annals of Clinical Biochemistry*, vol. 55(3), pp. 308-327.
- [26] Kim G. et al., 2014, “Reduced Tissue-Level Stiffness and Mineralization in Osteoporotic Cancellous Bone”, *Calcif. Tissue Int.*, vol.95(2), pp. 125-131.
- [27] Kreider J. M., Goldstein S. A., 2009, “Trabecular Bone Mechanical Properties in Patients with Fragility Fractures”, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 467(8), pp. 1955-1963.
- [28] Krishna R., Unsworth T.J., Edge R., 2016, “Raman Spectroscopy and Microscopy”, In: Hashmi S. (ed), *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, Oxford, Elsevier, pp. 1-15.
- [29] Kular J. et al., 2012, “An overview of the regulation of bone remodeling at the cellular level”, *Clinical Biochemistry*, vol. 45 (12), pp. 863-873.
- [30] Kopperdahl D.L., Keaveny T.M., 1998, “Yield strain behavior of trabecular bone”, *J. of Biomechanics*, vol. 31(3), pp. 601-608.
- [31] Li B., Aspden R. M., 1997, “Composition and Mechanical Properties of Cancellous Bone from the Femoral Head of Patients with Osteoporosis and Osteoarthritis”, *J. of Bone and Mineral Res.*, vol. 12(4), pp. 641-65.

- [32] Lievers W.B. et al., 2010, "Specimen diameter and "side artifacts" in cancellous bone evaluated using end-constrained elastic tension", *Bone*, vol. 47(2), pp. 371-377.
- [33] Matsuura M., Eckstein F., Lochmuller E. M., Zysset P. K., 2007, "The role of fabric in the quasi-static compressive mechanical properties of human trabecular bone from various anatomical locations", *Biomech. and Model. in Mechanobiol.*, vol. 7(1), pp. 27-42.
- [34] Mitra E., Akella S., Qin Y.X., 2006, "The effects of embedding material, loading rate and magnitude, and penetration depth in nanoindentation of trabecular bone", *J. of Biomed. Mat. Res.*, vol. 79, pp. 86-93.
- [35] Monesi V., 2012, "Tessuto osseo" in V. Monesi (ed), *Istologia*, VI edizione, Padova, Piccin Nuova Libreria, pp. 267-308.
- [36] National Institutes of Health, 2000, Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, *NIH Consensus Statement*, vol 17 (1), pp 1-36.
- [37] Nikodem A., 2012, "Correlations between structural and mechanical properties of human trabecular femur bone", *Acta of Bioeng. And Biomech*, vol. 14(2), pp. 37-46.
- [38] Notingher I., 2007, "Characterization using Raman micro-spectroscopy", in: Boccaccini A.R. (ed), Gough J.E. (ed), *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers*, Cambridge, Woodhead Publishing, pp. 248-266.
- [39] Nyman J.S. et al., 2016, "Tissue-Level Mechanical Properties of Bone Contributing to Fracture Risk", *Curr. Osteoporos. Rep.*, vol. 14(4), pp. 138-150.
- [40] Ohman C. et al., 2007, "Mechanical testing of cancellous bone from femoral head: Experimental errors due to off-axis measurements", *J. of Biomech.*, vol. 40(11), pp.2426-2433.
- [41] Oliver W.C., Pharr G.M., 1992, "An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments", *J. Mater. Res.*, vol 7(6), pp. 1564-1583.
- [42] Ojanen X. et al., 2015, "Relationship between tissue composition and viscoelastic properties in human trabecular bone", *J. of Biomechanics*, vol. 48(2), pp. 269-275.
- [43] Osterhoff G. et al., 2016, "Bone mechanical properties and changes with osteoporosis", *Injury*, vol. 47S2, pp. S11-S20.
- [44] Oyen M. L., Cook R. F., 2008, "A practical guide for analysis of nanoindentation data", *J. of Mech. Behavior of Biomed. Mat.*, vol. 2(4), pp. 396-407.
- [45] Ozan F. et al., 2017, "Micro-computed tomography and mechanical evaluation of trabecular bone structure in osteopenic and osteoporotic fractures", *J. of Orthopaedic Surgery*, vol 25(1), pp.1-6.
- [46] Parfitt A.M., Chir B., 1987, "Bone Remodeling and Bone Loss: Understanding the Pathophysiology of Osteoporosis", *Clinical Obstetrics and Gynecology*, vol 30(4), pp. 789-811.
- [47] Paschalis E.P., Gamsjaeger S., Klaushofer K., 2017, "Vibrational spectroscopic techniques to assess bone quality", *Osteoporos Int.*, vol 28(8), pp. 2275-2291.

- [48] Peel N., 2012, "Disorders of bone metabolism", *Surgery*, vol. 30(2), pp. 61-66.
- [49] Polly B. J. et al., 2012, "Intrinsic Material Properties of Trabecular bone by Nanoindentation Testing of Biopsies Taken from Healthy Women Before and After Menopause", *Calcif. Tissue Int.*, vol. 90 (4), pp. 286-293.
- [50] Prideaux M., Findlay D.M., Atkins G.J., 2016, "Osteocytes: The master cells in bone remodeling", *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 28, pp. 24-30.
- [51] Raggatt L.J., Partridge N.C., 2010, "Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling", *J. of Biological Chem.*, vol. 285(33), pp. 25103-25108.
- [52] Rho J.Y., Tsui T.Y., Pharr G.M., 1997, "Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation", *Biomaterials*, vol. 18(20), pp. 1325-1330.
- [53] Rho J.Y., Kuhn-Spearing L., Zioupos P., 1998, "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone", *Medical Engineering & Physics*, vol. 20(2), pp. 92-102.
- [54] Rochira V. et al., 2006, "Osteoporosis and male age-related hypogonadism: the role of sex steroids on bone (patho)physiology", *European J. of Endocrinology*, vol. 154(2), pp. 175-185.
- [55] Smith L.J., Schirer J.P., Fazzalari N.L., 2010, "The role of mineral content in determining the micromechanical properties of discrete trabecular bone remodeling packets", *J. of Biomechanics*, vol. 43(16), pp. 3144-3149.
- [56] Toledano M. et al., 2017, "Nanostructure in the trabecular bone of postmenopausal women: Mechanical and chemical analysis", *Injury*, vol. 48(6), pp. 26-33.
- [57] Toledano M. et al., 2018, "Biochemical assessment of nanostructures in human trabecular bone: Proposal of a Raman microspectroscopy based measurements protocol", *Injury*, vol. 49S, pp. S11-S21.
- [58] Ulrich D., 1999, "The Ability of Three-Dimensional Structural Indices to Reflect Mechanical Aspects of Trabecular Bone", *Bone*, vol. 25(1), pp. 55-60.
- [59] Vena P., Gastaldi D., 2018, "Nanoindentation-Based Characterization of Hard and Soft Tissues", *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, pp. 203-214.
- [60] Walsh J.S., 2018, "Normal bone physiology, remodeling and its hormonal regulation", *Surgery*, vol. 36 (1), pp. 1-6.
- [61] Wolff J., 1986, *The law of bone remodelling*, Berlino, Springer.
- [62] Zhang Z. M., 2010, "Micro-CT and mechanical evaluation of subchondral trabecular bone structure between postmenopausal women with osteoarthritis and osteoporosis", *Osteoporos. Int.*, vol 21(8), pp. 1383-1390.
- [63] [http://histology.med.yale.edu/bone/bone\\_reading.php](http://histology.med.yale.edu/bone/bone_reading.php)

# Appendice I

Informazioni riguardanti le teste omerali analizzate.

| <b>SAMPLES INFORMATIONS</b> |                     |               |            |
|-----------------------------|---------------------|---------------|------------|
| <b>SAMPLE NAME</b>          | <b>BONE QUALITY</b> | <b>AGE(Y)</b> | <b>SEX</b> |
| HH_5602                     | H                   | 56            | F          |
| HH_5712                     | H                   | 69            | F          |
| HH_5716                     | H                   | 54            | M          |
| HH_5736                     | H                   | 67            | M          |
| HH_5744                     | H                   | 68            | F          |
| HH_5745                     | H                   | 69            | F          |
| HH_5500                     | HO                  | 81            | M          |
| HH_5729                     | HO                  | 75            | M          |
| HH_5528                     | OPen                | 64            | F          |
| HH_5592                     | OP                  | 85            | F          |

## Appendice II

Rappresentazione grafica dei dati di confronto morfologico delle singole biopsie ossee suddivise per zone di prelievo.

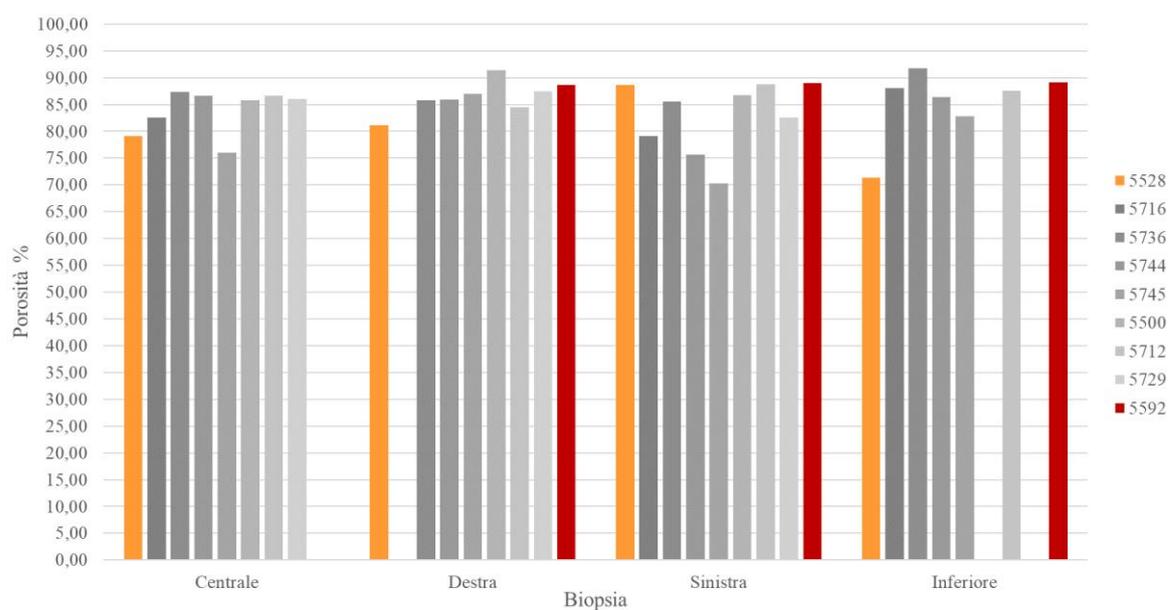


Figura I. Porosità ricavata per le singole biopsie ossee suddivise per zona di prelievo.

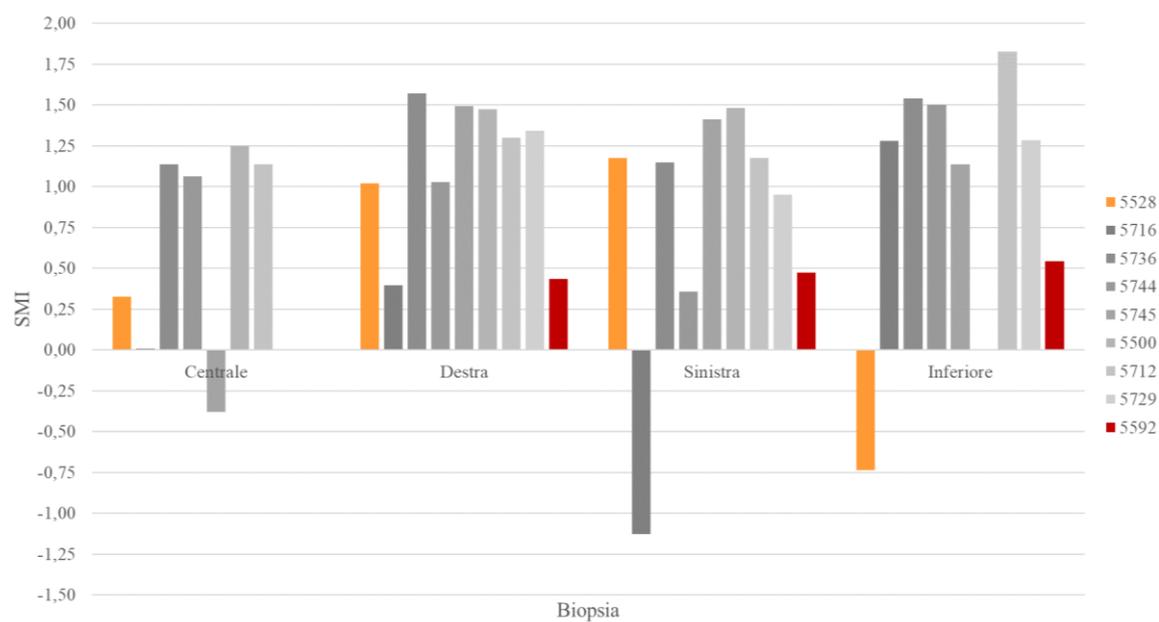


Figura II. SMI ricavato per le singole biopsie ossee suddivise per zona di prelievo.

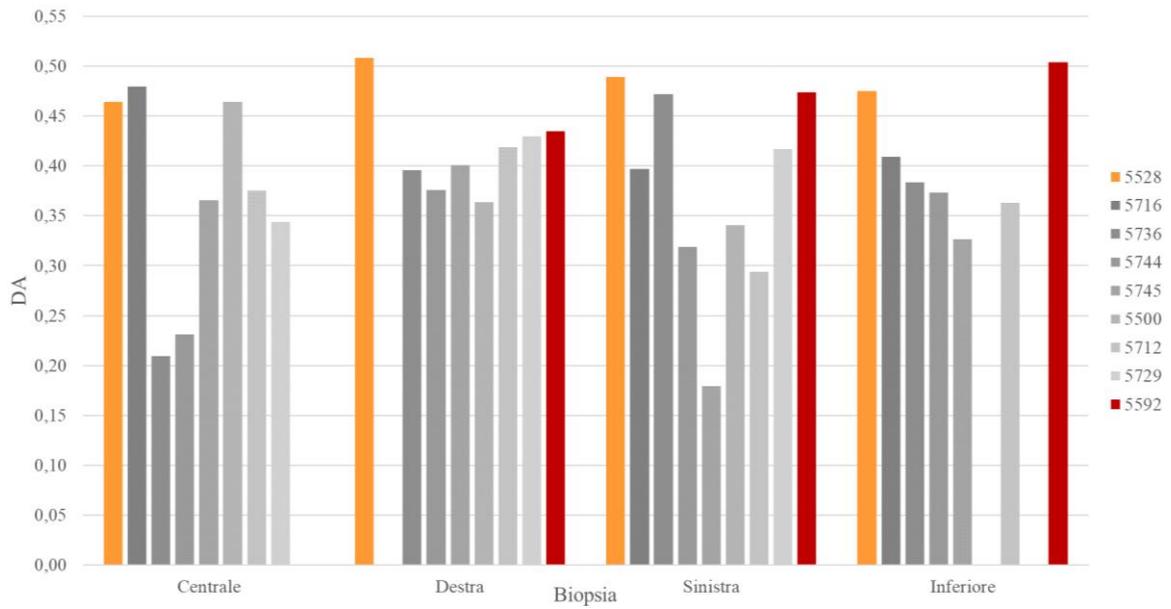


Figura III. DA ricavato per le singole biopsie ossee suddivise per zona di prelievo.

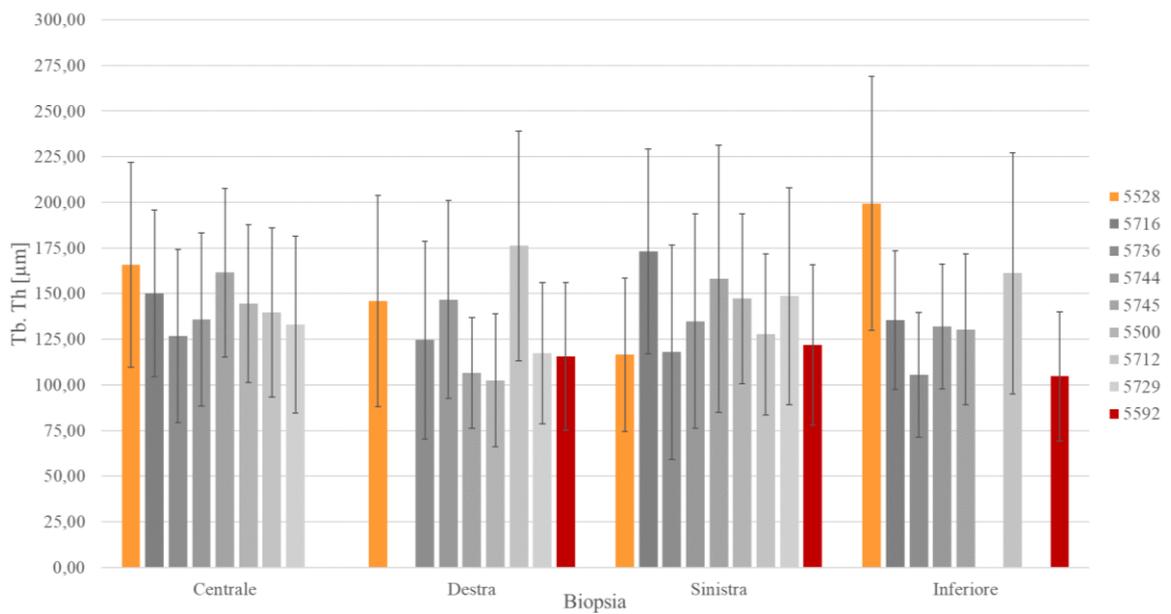


Figura IV. Tb.Th. ricavata per le singole biopsie ossee suddivise per zona di prelievo.

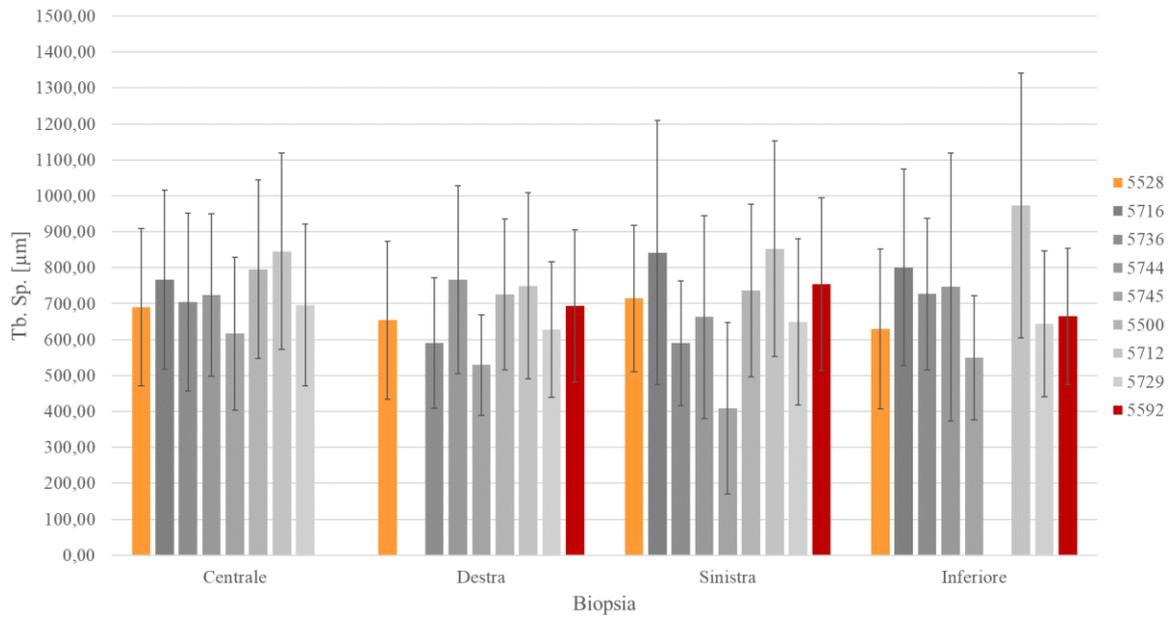


Figura V. Tb.Sp. ricavata per le singole biopsie ossee suddivise per zona di prelievo.

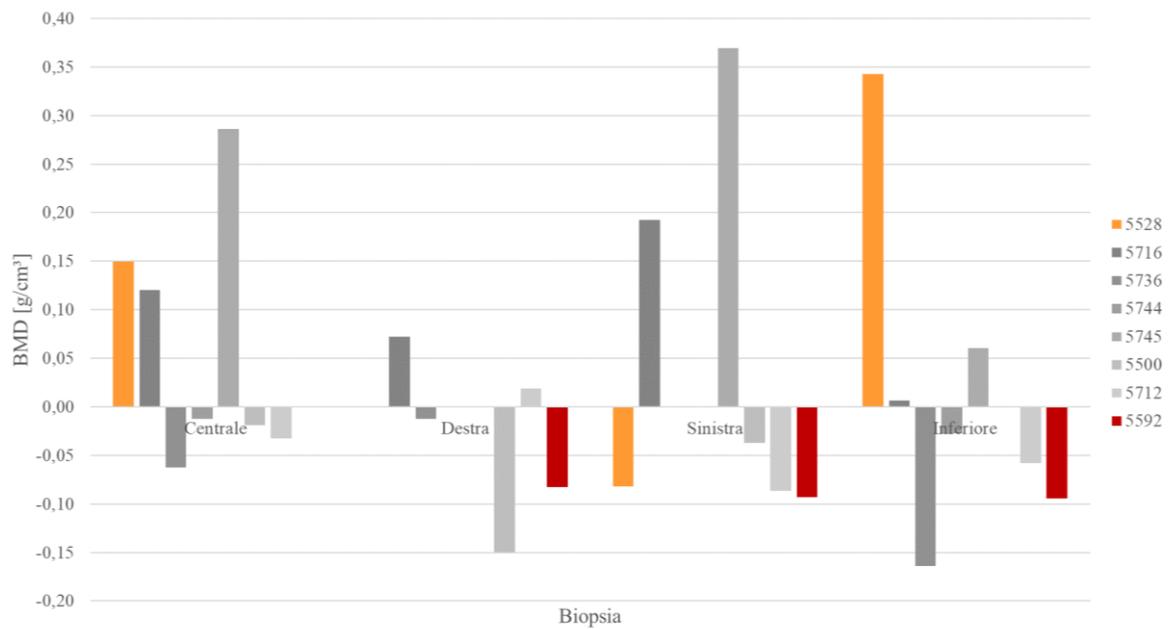


Figura VI. BMD ricavata per le singole biopsie ossee suddivise per zona di prelievo.

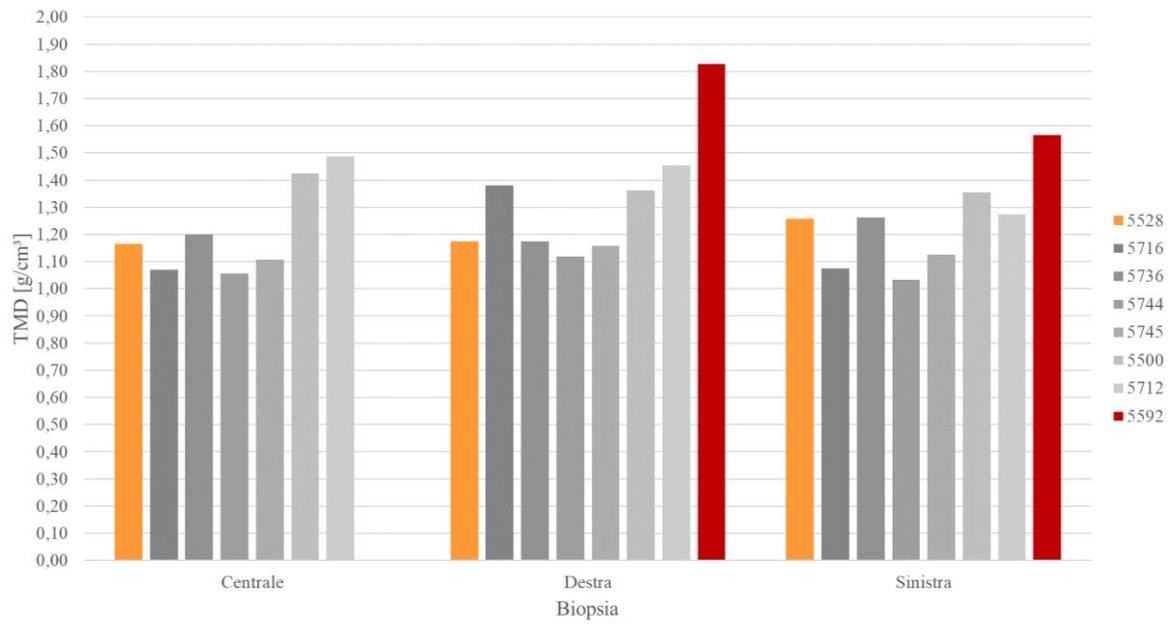


Figura VII. TMD ricavata per le singole biopsie ossee suddivise per zona di prelievo.

## Appendice III

Curve sforzo-deformazione ricavate da biopsie prelevate in zone per cui non è stato possibile il confronto tra i due tipi di tessuto presi in esame.

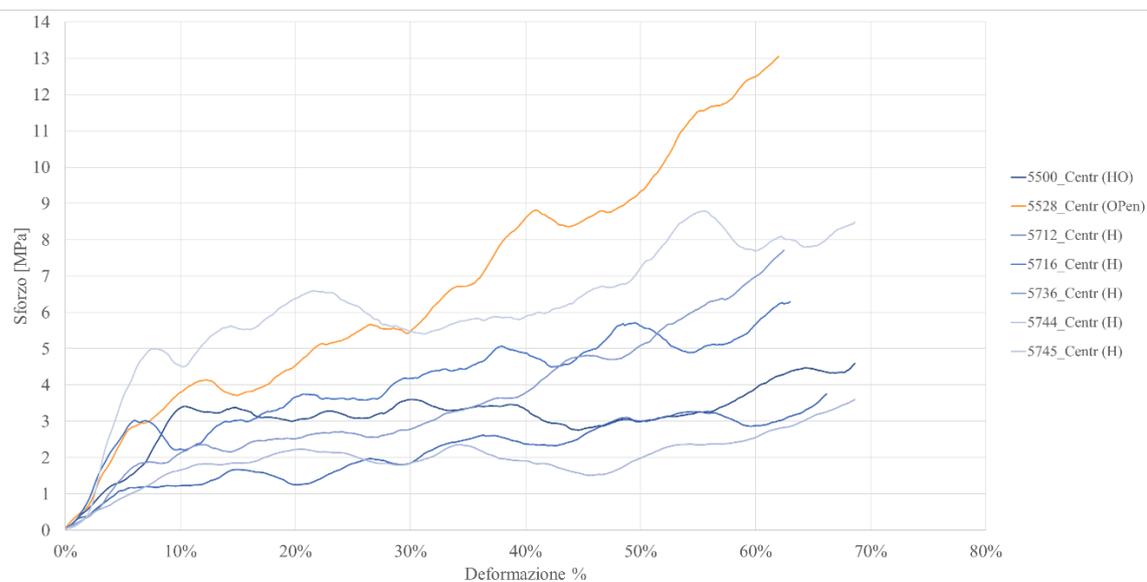


Figura VIII. Curve sforzo-deformazione ricavate per biopsie centrali H, HO e OPen per cui non è stato possibile il confronto con il campione OP.

## Ringraziamenti

Al termine di questi mesi di lavoro in laboratorio vorrei ringraziare innanzitutto la Prof.ssa Chiara Vitale Brovarone per la sua disponibilità e per le preziose indicazioni che hanno guidato la stesura dell'elaborato di tesi. Ringrazio anche l'Ing. Giulia Molino, punto di riferimento fondamentale per le operazioni di laboratorio.

Si ringrazia l'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna e in particolare la Dott.ssa Gabriela Ciapetti e il Dott. Marco Cavallo per le teste omerali fornite.

Un ringraziamento sentito al Dott. Massimo LoRusso e al Prof. Daniele Ugues per lo svolgimento delle nanoindentazioni, ed al tecnico di laboratorio Antonio Favero per l'aiuto nello svolgimento dei test di compressione.

Sono inoltre grato alla mia famiglia per aver sostenuto con entusiasmo le mie scelte in questi anni di formazione.

E grazie a Te, che da dieci anni sei il mio presente.