

Aus dem Institut für Medizinische Physik
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Willi A. Kalender, Ph.D.

**Advanced Methods for the Quantification of
Trabecular Bone Structure and Density in Micro
Computed Tomography Images**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
(Dr. rer.biol.hum.)

vorgelegt von
Jing Lu
aus Jiangsu, V.R. China
Erlangen, 2010



**Gedruckt mit Erlaubnis der
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg**

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jürgen Schüttler
Klinik für Anästhesiologie

Referent: Prof. Dr. Klaus Engelke
Institut für Medizinische Physik

1. Korreferent: Prof. Dr. Willi A. Kalender
Institut für Medizinische Physik

2. Korreferent: Prof. Dr. Günther Greiner
Lehrstuhl für Informatik 9 (Graphische Datenverarbeitung)

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dez. 2010

Berichte aus dem Institut für Medizinische Physik
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Band 20

Jing Lu

**Advanced Methods for the Quantification
of Trabecular Bone Structure and Density in
Micro Computed Tomography Images**

D 29 (Diss. Universität Erlangen-Nürnberg)

Shaker Verlag
Aachen 2011

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: Erlangen-Nürnberg, Univ., Diss., 2010

Copyright Shaker Verlag 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-0230-0

ISSN 1616-0142

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

To my parents and husband.

Contents

| | |
|---|-----------|
| Summary | ix |
| Zusammenfassung | xi |
| 1 Introduction | 1 |
| 2 Background | 3 |
| 2.1 Medical Motivation..... | 3 |
| 2.1.1 Bone Remodeling and Immune System..... | 3 |
| 2.1.2 Macro- and Microstructure of Bone | 6 |
| 2.2 High Resolution Imaging Techniques of Bone..... | 7 |
| 2.2.1 Histological Sections | 7 |
| 2.2.2 Microcomputed Tomography | 8 |
| 2.2.3 Micromagnetic Resonance Imaging | 10 |
| 2.2.4 3D Quantification of Bone with μ CT | 10 |
| 2.2.4.1 Image Quality..... | 10 |
| 2.2.4.2 Segmentation of Trabecular Bone..... | 12 |
| 2.2.4.2.1 Global Threshold Methods..... | 12 |
| 2.2.4.2.2 Local Threshold Methods..... | 13 |
| 2.2.4.3 Analysis of Bone Structure and Mineral Density..... | 15 |
| 3 VOI Definition in the Proximal Tibia | 16 |
| 3.1 Introduction..... | 16 |
| 3.2 Segmentation of the Periosteal Surface | 18 |
| 3.2.1 Volume Growing | 19 |
| 3.2.2 Combined Morphological Operations..... | 20 |
| 3.2.3 Interactive Corrections..... | 21 |
| 3.3 Segmentation of the Primary Spongiosa..... | 21 |
| 3.3.1 Automatic Threshold Estimation | 23 |
| 3.3.2 Volume Growing with Geometrical Constraints | 25 |
| 3.3.3 Interactive Corrections..... | 27 |
| 3.3.4 Closing of the Primary Spongiosa | 28 |
| 3.4 Segmentation of the trabecular VOI of the Metaphysis..... | 29 |
| 3.4.1 Definition of the Proximal Epiphysis and Metaphysis | 29 |
| 3.4.2 Definition of the Trabecular VOI | 31 |
| 4 Segmentation of the Trabeculae | 33 |
| 4.1 Introduction..... | 33 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.2 | Local Adaptive Threshold Approach | 33 |
| 4.2.1 | Automatic Threshold Estimation | 34 |
| 4.2.2 | Local Adaptive Thresholding | 35 |
| 5 | Quantitative Analysis of Trabeculae..... | 38 |
| 5.1 | Assessment of Trabecular Bone Structure | 38 |
| 5.1.1 | Model-dependent Measurements | 38 |
| 5.1.2 | Model-independent Measurements | 42 |
| 5.1.2.1 | Bone Surface and Volume | 42 |
| 5.1.2.2 | Structure Model Index | 42 |
| 5.1.2.3 | Thickness Assessment..... | 43 |
| 5.1.2.4 | Other Morphometric Parameters..... | 45 |
| 5.2 | Assessment of Bone Mineral Density | 46 |
| 5.2.1 | Bone Mineral Density | 46 |
| 5.2.2 | Theoretical Background..... | 46 |
| 5.2.3 | Phantom Design and Analysis | 49 |
| 5.2.4 | Experimental Validation | 51 |
| 5.2.4.1 | Homogeneity of the Inserts of the μ BDC Phantom | 51 |
| 5.2.4.2 | Water Equivalence of Epoxy Resin-Based Plastic..... | 53 |
| 5.2.4.3 | Beam Hardening and Streak Artifacts..... | 54 |
| 5.2.4.4 | Stability of μ CT Calibration | 56 |
| 5.2.4.5 | Summary | 58 |
| 6 | Validation | 59 |
| 6.1 | Validation of the Implementation of Structural Parameters | 60 |
| 6.1.1 | Digital Model of Trabecular Bone..... | 60 |
| 6.1.2 | Histological Sections | 61 |
| 6.1.3 | Simulated Digital Models of Simplified Trabecular Structure | 64 |
| 6.2 | Validation of the Segmentation | 65 |
| 6.2.1 | Simulated μ CT Scan of a Designed Phantom..... | 65 |
| 6.2.2 | μ CT Scans with Different Voxel Sizes | 68 |
| 6.3 | Intra- and Inter-observer Reproducibility | 70 |
| 6.4 | Impact of Different Analysis Regions | 71 |
| 6.4.1 | Histological Sections | 72 |
| 6.4.2 | μ CT Scans..... | 73 |
| 6.5 | Comparison between μ CT Scans and Digitized Histological Sections | 74 |
| 6.6 | Quantification of Different Mouse Models..... | 78 |
| 7 | Discussion and Outlook..... | 81 |

| | |
|-------------------------------|-----------|
| Bibliography | 83 |
| Abbreviations..... | 89 |
| Acknowledgements..... | 91 |
| Curriculum Vitae | 93 |

Summary

Introduction: Bone remodeling is a life long process composed of bone formation and resorption. Imbalance between bone formation and resorption is a cause of metabolic bone diseases. Thus, the understanding of factors that affect the remodeling balance is of great importance. Conventionally bone structure is measured using histomorphometry of thin stained sections which is destructive and non-reproducible. In contrast, volumetric microcomputed tomography (μ CT) imaging is a powerful tool for quantifying bone quality of small samples non-destructively. The aim of this thesis is to develop an analysis tool to quantify trabecular bone of mouse tibiae with high efficiency, accuracy and reproducibility.

Materials and Methods: The trabecular volume of interest (VOI) definition in the proximal metaphysis of mouse tibiae includes three segmentation steps: the periosteal surface, the primary spongiosa and the proximal metaphysis. All these segmentation algorithms are hybrid volume growing-based approaches including automatic threshold estimation, volume growing with different criterions and combined morphological operations. To preserve the connectivity of the trabecular network volume growing with local adaptive thresholding (LAT) is used for the segmentation of the trabeculae. In order to accelerate this process the algorithm is only applied to voxels with gray values in an interval defined by two global thresholds. These are automatically determined and depend on the voxel-to-object-size ratio of the dataset.

Standard bone structural parameters were implemented [29, 30, 62]. For the assessment of tissue mineral density (TMD), a calibration phantom made of epoxy resin-based material with two hydroxyapatite (HA) inserts was developed. Experiments were performed with the μ CT FORBILD¹ scanner of the IMP to validate the homogeneity of the phantom inserts, the water equivalence of the epoxy resin-based plastic, the effect of beam hardening and the stability of the μ CT calibration.

The implementation of structural parameters was validated with two digital models and with histological sections. The segmentation of the trabeculae was validated with a simulated μ CT scan of a simulated phantom and μ CT scans of excised mouse tibiae with different voxel sizes (9-20 μ m). Intra- and inter-observer analysis reproducibility was validated with five μ CT scans by three operators. The impact of different analysis VOIs on structural parameters was

¹ FORBILD is short for Bayerische Forschungsverbund für Medizinische Bildgebung und Bildverarbeitung.

investigated. μ CT scans of four mouse vertebra samples were also compared with digitized histological sections.

Results: With respect to calibration and TMD assessment the following results were obtained:

- (1) Cone beam reconstruction artifacts can be neglected.
- (2) To avoid an influence of the material inhomogeneity of the phantom inserts on the calibration, measured HU values inside the inserts should be averaged over their full length.
- (3) Epoxy resin-based plastic is not water-equivalent for voltages between 40 and 60 kV, which causes a constant offset of the TMD assessment compared to a water equivalent phantom material.
- (4) The quantification error caused by beam hardening was up to 5.7% at the kV settings used, which should be corrected.
- (5) A simultaneous scan of the bone sample and the calibration phantom is recommended.

The validation confirmed that the structural parameters were correctly implemented. The simulations (simulated μ CT acquisition of a rods phantom) showed that the LAT segmentation gave more accurate results in particular for trabecular thickness than the global threshold method. Moreover, the LAT method is also robust to variations of spatial resolution. Decreasing the resolution by about a factor of 2 changed bone volume fraction (BV/TV) by only 3.4%. Intra and inter observer precision errors ($\%CV_{RMS}$) were smaller than 1.2%. The results further demonstrated that position and size of the analysis VOI had a great influence on BV/TV (up to 24.3% in 2D sections and 38.1% in μ CT scans). The comparison between μ CT scans and digitized histological sections shows that μ CT imaging with adequate resolution combined with the LAT segmentation method is a good alternative to the traditional histological methods.

Conclusions: A 3D image analysis approach has been developed for a 3D quantification of the trabecular structure and density of mouse tibiae in μ CT scans. The analysis workflow is highly automated, efficient, robust to changes in image quality and requires only minor user interactions. Precision errors were less than 1.2%. This framework is now ready for preclinical use.

Zusammenfassung

Einleitung: Knochen-Remodeling ist ein lebenslang andauernder Prozess, der Knochenformation und -resorption beinhaltet. Ein Ungleichgewicht dazwischen ist ein Grund für Stoffwechselerkrankungen des Knochens. Daher sind Erkenntnisse über Faktoren, die das Remodeling beeinflussen, von großer Bedeutung. Die Knochenstruktur wird üblicherweise durch Histomorphometrie, angefärbter Dünnschnitte bestimmt, was allerdings die Zerstörung der Proben bedeutet. Im Gegensatz hierzu ist die volumetrische Mikro-Computertomographie (μ CT) ein wertvolles Mittel zur zerstörungsfreien Quantifizierung der Knochenqualität kleiner Proben. Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Analysewerkzeugs zur hocheffizienten, genauen und reproduzierbaren in-vitro Quantifizierung von trabekulärem Knochen aus in der Tibia von Mäusen.

Material und Methoden: Die Definition des trabekulären Auswertevolumens (VOI) in der proximalen Metaphyse von Mäusetibiae beinhaltet drei Segmentierung Schritte: die periostalen Oberfläche, die primären Spongiosa und die proximalen Metaphyse. All diese Segmentierungsalgorithmen basieren auf volumenwachstumsbasierten Verfahren mit automatischer Schwellwertschätzung, kombiniert mit verschiedenen Suchkriterien und morphologischen Operationen. Um die Konnektivität des trabekulären Netzwerks bei der Segmentierung der Trabekel zu erhalten, wird das Volumenwachstum mit einem lokal-adaptiven Schwellwertverfahren (LAT) verwendet. Um diesen Prozess zu beschleunigen, werden ausschließlich Voxel, die in einem durch zwei globale Schwellwerte definierten Intervall liegen, vom lokalen Schwellwertkriterium überprüft. Diese globalen Schwellwerte, die automatisch aus dem Datensatz ermittelt werden, hängen u.a. vom Verhältnis Voxel- zu Objektgröße, d.h. von der Auflösung ab.

Zunächst wurden die Standardstrukturparameter implementiert [29-30, 62]. Zur Abschätzung der Mineraldichte des Knochengewebes (TMD), also in diesem Fall der Trabekel wurde ein Kalibrierphantom aus Epoxidharz-basiert Material mit zwei Hydroxylapatit-Einschlüssen entwickelt. Zur Validierung der Homogenität der Einschlüsse des Phantoms, der Wasseräquivalenz des Epoxidharzes-basiert Material, des Einfluss der Strahlaufhärtung, sowie der Stabilität der μ CT-Kalibrierung wurden Experimente am μ CT-Gerät des IMP durchgeführt.

Die Implementierung der Strukturparameter wurde durch zwei digitale Modelle, sowie histologischen Schnitten validiert. Die Segmentierung der Trabekel wurde mit einer simulierten μ CT-Aufnahme eines simulierten Phantoms und μ CT-Aufnahmen exzidiierter Mäusetibiae mit

unterschiedlichen Voxelgrößen (9-20 μm) überprüft. Die Intra- und Interoperator-Reproduzierbarkeit der Knochenparameter wurde durch die Analyse von fünf μCT -Aufnahmen durch drei Personen validiert. Der Einfluss unterschiedlicher Analyseregionen auf die Auswertung der Bildanalyse wurde untersucht. Des Weiteren wurden μCT -Aufnahmen mit digitalisierten histologischen Schnitten für sieben Mäusewirbel verglichen.

Ergebnisse: Für die Kalibrierung und die TMD Abschätzung wurden folgende Ergebnisse ermittelt: (1) Kegelstrahl-Rekonstruktionsartefakte können vernachlässigt werden. (2) Um einen Einfluss der Materialinhomogenität der Einschlüsse des Phantoms auf die Kalibrierung zu verhindern, sollten innerhalb der Einschlüsse gemessene HU-Werte über die gesamte Einschlusslänge gemittelt werden. (3) Epoxidharz ist für Röntgenröhren Spannungen zwischen 40 und 60 kV nicht wasseräquivalent. Das führt zu einer konstanten Verschiebung der TMD-Werte im Vergleich zu einem wasseräquivalenten Phantommaterial. (4) Der durch Strahlauhärtung hervorgerufene Quantifizierungsfehler lag bei den angegebenen Spannungen bei bis zu 5,7 %, was im Hinblick auf die Richtigkeit der Analyse korrigiert werden sollte. (5) Die simultane Aufnahme der Knochenprobe und des Kalibrierphantoms wird empfohlen.

Die Validierung bestätigte, dass die Strukturparameter korrekt implementiert wurden. Die Simulationen (simulierte μCT -Akquisition der Stäbe) zeigten, dass die LAT-Segmentierung gegenüber der globalen Schwellwertmethode zu genaueren Ergebnissen insbesondere bezüglich der trabekulären Dicke führte. Des Weiteren ist die LAT-Methode stabil gegenüber einer Variation der Ortsauflösung. Eine Verringerung der Auflösung um einen Faktor von etwa zwei führte zu einer Änderung des Knochenvolumenanteils (BV/TV) von lediglich 3,4 %.

Dank des hochautomatisierten Workflows lagen die Intra- und Interoperatorgenauigkeitsfehler (%CVrms) unter 1,2%. Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass die Position und Größe des Analysvolumens einen großen Einfluss auf die BV/TV- Werte haben (bis zu 24,3% in histologische Schnitte und 38,1% in μCT -Aufnahmen). Der Vergleich zwischen μCT -Aufnahmen und digitalisierten histologischen Schnitten zeigte, dass die μCT -Bildgebung mit einer geeigneten Auflösung kombiniert mit der LAT-Segmentierung eine gute Alternative zu den traditionellen histologischen Methoden darstellt.

Schlussfolgerung: Es wurde eine 3D-Bildanalysemethode zur 3D-Quantifizierung trabekulären Knochens von Maustibiae aus μCT -Aufnahmen entwickelt. Der Workflow ist hochautomatisiert, effizient, robust gegenüber einer Änderung der Bildqualität und benötigt wenig Benutzerinteraktion. Der Reproduzierbarkeitsfehler lag bei unter 1.2%. Das Verfahren kann jetzt zur 3D Analyse von μCT Daten eingesetzt werden.