

Sviluppo di una micro CT con sorgente Quasi-Monocromatica Multi-Energy per lo studio *in vivo* della crescita e della metastasi tumorale

G. Baldazzi^{ab}, S. Masetti^a, P.L. Rossi^a, L. Roma^c, G. Nicoletti^d, P. L. Lollini^e

^a *University of Bologna, Dep.t of Physics, viale Berti Pichat 6/2, 40127 Bologna, Italy*

^b *INFN of Bologna, viale Berti Pichat 6/2, 40127 Bologna, Italy*

^c *S.Orsola-Malpighi University Hospital, via Massarenti 9, 40127 Bologna, Italy*

^d *Istituti Ortopedici Rizzoli, via di Barbiano 1/10, 40136, Bologna, Italy*

^e *University of Bologna, Cancer Research Section, Viale Filopanti 22, 40128 Bologna, Italy*

ABSTRACT

Un innovativo micro scanner CT per piccolo animali – basato su di una sorgente che genera una coppia di fasci X Quasi-Monocromatici paralleli con diverse energie selezionabili – è in corso di installazione e caratterizzazione al Dipartimento di Fisica dell'Università di Bologna.

Lo scopo della ricerca è quello di effettuare l'imaging radiologico *in vivo* del tessuto tumorale e/o dei pattern di neo-angiogenesi in una fase diagnostica precoce realizzando la separazione del tessuto patologico da quello sano per mezzo della tecnica *multi-energy* che consiste nell'utilizzo di due o più fasci di raggi X quasi-monocromatici in sostituzione dell'unico fascio policromatico utilizzato nella radiologia convenzionale. Lo strumento consentirà inoltre lo studio, sui topi, della crescita tumorale e della formazione delle metastasi per differenti tipologie di tumore.

Per la diagnosi precoce del tumore è essenziale essere in grado di rivelare i cambiamenti tissutali precancerosi, come la neo-angiogenesi. Si tratta di un meccanismo che si verifica in una fase iniziale dello sviluppo della patologia ed è dovuto alla produzione di molecole che stimolano la creazione di nuovi vasi sanguigni per alimentare la crescita delle cellule cancerose.

Come dimostrato in precedenti studi di fattibilità [1], un sistema di imaging basato su due fasci di raggi X quasi-monocromatici di differenti energie fornisce maggiore sensibilità nella rivelazione di basse concentrazioni di mezzo di contrasto iodato rispetto ai tradizionali apparati RX con fascio policromatico. La *K-edge dual energy radiology* è una tecnologia potenzialmente in grado di rivelare il processo di neo-angiogenesi tumorale in uno stadio precoce quando la strumentazione convenzionale non dispone di sufficiente sensibilità.

Inoltre, la possibilità di selezionare le energie dei fasci quasi-monocromatici consente l'applicazione della *Multi-Energy Quasi-Monochromatic Radiology*: selezionando opportunamente le energie è possibile esaltare le differenze fra i coefficienti di attenuazione lineare del tessuto patologico rispetto a quello sano aumentando il contrasto della patologia. Infatti, la tecnica *multi-energy* consente di ricostruire il numero atomico efficace e persino la composizione chimica del tessuto irradiato. Tuttavia, per ottenere questo risultato, si dovrebbero conoscere le bande di energia in cui l'assorbimento dei raggi X da parte del tessuto tumorale eventualmente differisce significativamente da quello dei tessuti sani. Per questo motivo è stata iniziata una sistematica caratterizzazione radiologica di molti tipi di tessuti sani e neoplastici, murini e umani allo scopo di costituire un catalogo delle *finestre di energia* in cui sarà possibile applicare la metodica *multi-energy*.

Keywords: Quasi-monochromatic X-ray, Dual-Energy Radiology, K-edge Radiology, Multi-Energy Radiology, Linear Absorption Coefficient of Tissues, Angiogenesis, Diagnostic Radiology of Cancer.

RAZIONALE

Come dimostrato da svariati studi, il tumore richiama un incremento del flusso sanguigno per fornire i nutrienti e l'ossigeno necessari alla sua continua crescita. La neo-angiogenesi inizia non appena il tumore comincia a svilupparsi ed è una delle prime modificazioni che si producono nel tessuto patologico [2]. I nuovi vasi sono spesso più numerosi rispetto a quelli che si trovano in un equivalente volume di tessuto normale. Inoltre essi sono frequentemente incompleti e pertanto possono scambiare fluidi con i tessuti circostanti. In molti casi, la ricerca di *pattern* neoangiogenetici nel letto vascolare costituirebbe un potente metodo per la diagnosi precoce del tumore [3].

L'utilizzo di radiazione altamente monocromatica – ottenuta dal sincrotrone [4], [5] – o di radiazione quasi-monocromatica – ottenuta per mezzo di monocromatori con target di cristalli a mosaico [6] – può aumentare la quantità di informazioni radiologiche estratte dal tessuto in esame [7], [8]. In particolare il *dual-energy subtraction method* è stato utilizzato con successo nella angiografia in scansione [4], [5], [9], [10] e in mammografia [11], [12]. Nel noto lavoro di Alvarez-Makowsky [13], due differenti energie sono state utilizzate per separare i contributi all'assorbimento della radiazione dovuti agli effetti fotoelettrico e Compton. Altri ricercatori hanno utilizzato raggi X monoenergetici per separare i contributi dei differenti tessuti alla formazione dell'immagine diagnostica oppure per cancellare selettivamente dall'immagine complessiva il contributo di uno specifico tessuto [14], [15]. Recenti sviluppi hanno condotto all'utilizzo della tecnica *dual-energy* per la ricostruzione del numero atomico efficace o della composizione chimica dei materiali irradiati [16].

La tecnica *K-edge* può evidenziare il tessuto tumorale identificando i pattern angiogenetici. Tale tecnica richiede l'iniezione, nel paziente, di un mezzo di contrasto iodato e l'utilizzo – come sorgente radiogena – di una coppia di fasci di raggi X monocromatici con energie rispettivamente minore e maggiore del K-edge dello iodio (33.2 keV). L'immagine diagnostica si ottiene mediante il classico algoritmo di sottrazione dell'immagine [1]. A causa della sua alta sensibilità alle basse concentrazioni di iodio, questo metodo ha la potenzialità di rivelare i pattern angiogenetici [17] (si veda anche la Fig. 1).

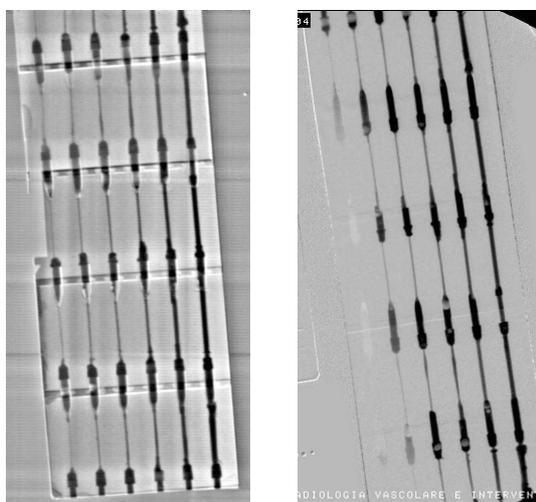


Fig. 1: Immagini di un fantoccio dinamico in cui un mezzo di contrasto iodato scorreva all'interno di sei cateteri con calibro di (0.40 ± 0.05) mm, (0.80 ± 0.05) mm, (1.00 ± 0.05) mm, (1.60 ± 0.05) mm, (1.80 ± 0.05) mm e (2.00 ± 0.05) mm rispettivamente. La concentrazione dello iodio era di 185 mg/ml. Le diverse sezioni visibili nel fantoccio sono costituite da blocchi di resina epossidica, di spessore 20 mm, entro cui sono stati ricavati i cateteri. Le miscele di resina epossidica di ogni sezione sono state scelte per simulare la densità dell'osso e di diversi tessuti molli e calibrate in TC per mezzo dei numeri Hounsfield. Alla destra le immagini ottenute con un angiografo commerciale Siemens; a sinistra le immagini ottenute con la tecnica K-edge durante le prove di fattibilità. Anche se l'immagine K-edge è row, senza filtrazioni nè software enhancement, i vasi più sottili si distinguono nettamente meglio.

D'altro canto, la tecnica *dual-energy* o, più in generale, la *multi-energy radiology*, può evidenziare le strutture tumorali misurando la differenza nelle proprietà di assorbimento dei raggi X tra il tessuto sano e quello patologico e/o rivelando la struttura chimica del tessuto tumorale [16], [18], [19]. Questa metodica richiede due o più fasci monocromatici con energie sezionate in un intervallo che dipende dal tipo di tessuto patologico che si sta cercando. Sfortunatamente, il coefficiente di assorbimento $\mu(E)$ dei tessuti patologici – e dei corrispondenti tessuti sani – è noto solamente per pochissime patologie [18], [19]. Pertanto è stato avviato uno studio sperimentale delle proprietà di attenuazione dei tessuti cancerosi per la loro caratterizzazione rispetto ai corrispondenti tessuti sani.

Per studiare sistematicamente le proprietà delle tecniche radiologiche *K-edge* e *multi-energy*, applicate alla diagnosi precoce del tumore e per l'osservazione, con tecniche di imaging fisico, della crescita e della metastatizzazione del tessuto tumorale, è stata sviluppata una apparecchiatura micro TC in grado di produrre da due a quattro fasci quasi-monocromatici nell'intervallo di energia da 20 keV a 70 keV. La micro TC consentirà di effettuare imaging radiologico *multi-energy* in scansione e tomografico su piccoli animali. L'installazione di tale strumentazione è ora in fase di ultimazione e sono cominciate le operazioni di caratterizzazione della sorgente.

STUDIO DEL TUMORE MEDIANTE IMAGING RADIOLOGICO

Ultimata la fase di caratterizzazione, l'apparato micro TC consentirà di effettuare l'imaging con le diverse metodologie innovative *K-edge* e *multi-energy* su topi con diverse tipologie tumorali forniti dal Laboratorio di Immunologia e Biologia delle metastasi presso la Sezione di Cancerologia del Dipartimento di Patologia Sperimentale dell'Università di Bologna. Il Team del Laboratorio ha esperienza di modelli in vivo per lo studio di tumori umani e murini accresciuti su topi e metterà a disposizione vari modelli murini di crescita tumorale per studi in vivo. Lo stabulario è "stabilimento autorizzato" sia per l'allevamento che per la sperimentazione. Tutti i progetti di sperimentazione vengono sottoposti per l'autorizzazione al Comitato Etico Scientifico dell'Università di Bologna e successivamente inviati al Ministero dell'Istruzione, Università e Ricerca (MIUR).

In particolare i modelli tumorali disponibili riguardano:

a) crescita nel polmone di noduli metastatici prodotti dall'inoculo endovena o sottocute di cellule tumorali di topo. Le cellule di partenza derivano da carcinomi polmonari e carcinomi mammari di topo;

b) crescita tumorale e metastatica in topi atimici. Questi topi immunodepressi consentono lo studio della crescita in vivo tumori di origine umana. Sono disponibili linee cellulari derivanti da tumori muscolo-scheletrici (rabdiosarcomi, osteosarcomi, sarcomi di Ewing) e da carcinomi (mammella, colon) umani;

c) sviluppo spontaneo di neoplasie maligne in topi geneticamente modificati. Topi con alterazioni di geni del cancro consentono lo studio dell'intero processo di cancerogenesi, e rappresentano i migliori modelli oggi disponibili per l'analisi della storia naturale dei tumori. I modelli utilizzati riguarderanno il tumore mammario (topi transgenici per l'oncogene HER-2/neu), il carcinoma prostatico (topi TRAMP), i carcinomi delle ghiandole salivari ed il rabdiosarcoma (topi transgenici HER-2/neu e knockout emizigoti p53).

La tecnica multi-energy

Utilizzando due o più fasci monocromatici, le informazioni che si possono ottenere sul tessuto in esame aumentano. Tale metodo può essere in grado di distinguere i differenti tessuti quando i loro coefficienti di attenuazione lineare sono noti e differiscono significativamente in qualche “finestra” di energia. Come già detto in precedenza, la tecnica multi-energy può essere applicata in diversi modi. Di seguito viene presentato un metodo per proiettare un’immagine in tre elementi base, acquisendo tre immagini monocromatiche a differenti energie.

Si consideri un campione costituito da tre differenti strati di diversi tessuti T_1, T_2 e T_3 (per esempio osso, tessuto molle, iodio e così via). Il tessuto T_i ha un coefficiente di attenuazione lineare noto $\mu_i(E)$, ma non se ne conoscono spessore λ_i e densità ρ_i . Se si usano tre fasci di raggi X monocromatici di energia ε_j per ottenere tre immagini, l’assorbimento logaritmico $p(\varepsilon_j)$ è:

$$p(\varepsilon_j) = \ln \left(\frac{I_0(\varepsilon_j)}{I(\varepsilon_j)} \right) = \mu_1(\varepsilon_j) \rho_1 \lambda_1 + \mu_2(\varepsilon_j) \rho_2 \lambda_2 + \mu_3(\varepsilon_j) \rho_3 \lambda_3 = \sum_i \mu_i(\varepsilon_j) \rho_i \lambda_i \quad (1)$$

In modo più compatto, posto $\mu_{ij} = \mu_i(\varepsilon_j)$ e $x_i = \rho_i \lambda_i$ si può scrivere:

$$p_j = \sum_i \mu_{ij} x_i \quad (2)$$

Il sistema lineare (2), se non è singolare, si può risolvere per x_i , che rappresenta lo spessore equivalente del tessuto T_i . Il formalismo può essere immediatamente esteso per N tessuti. La condizione è di avere N equazioni per N diverse energie e la matrice μ_{ij} non singolare.

In Fig. 2 si può vedere un fantoccio composto utilizzato per una simulazione. Il fantoccio è costituito da strati sovrapposti di tessuto molle, osso e vasi perfusi di iodio. Sono state simulate le immagini ottenute con fasci monocromatici di 30 KeV, 40KeV and 80KeV. Risolvendo il sistema (2) per ogni pixel dell’immagine, otteniamo le *proiezioni tessuto-equivalente* dell’immagine.

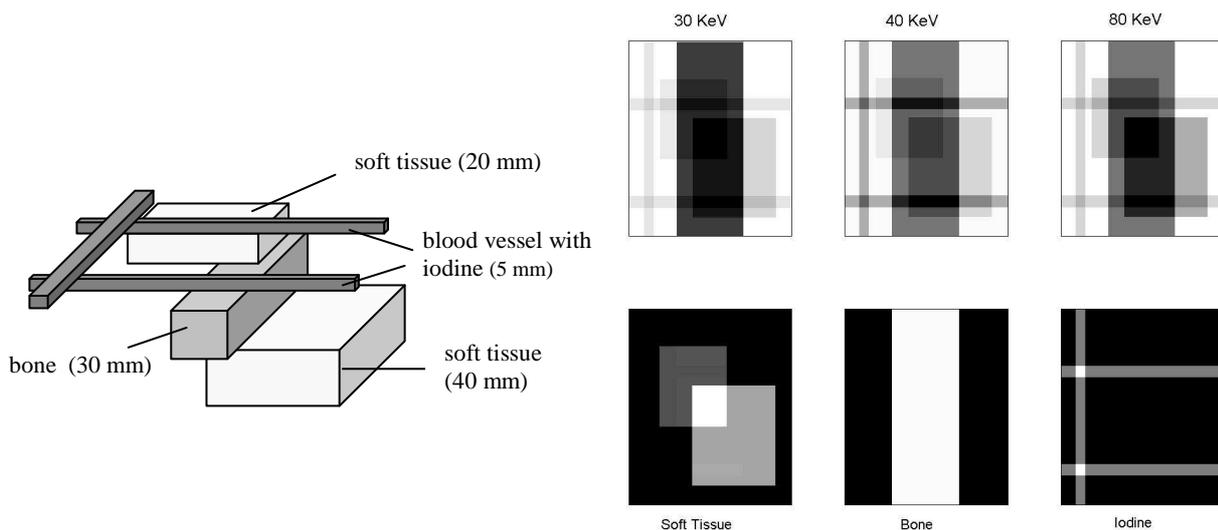


Fig. 2: a sinistra si può vedere la struttura del fantoccio composto. A destra in alto le proiezioni del fantoccio simulate alle tre diverse energie. A destra in basso le *proiezioni tessuto-equivalente* per i tre differenti tessuti.

STRUMENTAZIONE

La sorgente a raggi X quasi-monocromatica

Il fascio policromatico generato da un tubo a raggi X incide su tre cristalli a mosaico di grafite pirolitica 002 delle dimensioni di $28 \times 60 \times 1 \text{ mm}^3$ ciascuno e dispersione del mosaico di 0.26° (Highly Oriented Pyrolytic Graphyte). La scelta del target di HOPG è dettata dall'esigenza di avere un fascio diffratto con fluenza fotonica elevata e un FWHM di circa 3 keV. Questo sistema di quasi-monocromatizzazione fornisce due fasci paralleli con energia variabile [1], [22]. Il fascio primario, proveniente dal tubo RX, viene collimato da una fenditura di piombo, diffratto dal drappo di cristalli e quindi inviato a un ulteriore blocco di collimatori e alle due fenditure parallele di uscita. Il posizionamento dei cristalli e dei collimatori è automatizzato e pilotato dal software.

Nel seguito verrà brevemente descritto il modello di Zachariassen [23] per il caso generale del cristallo a mosaico. Tale modello è un'estensione del caso del cristallo a mosaico ideale e tiene conto degli effetti dovuti allo spessore finito e dell'assorbimento secondario nel cristallo. L'accuratezza del modello fino al 5° ordine di diffrazione è stato misurato sperimentalmente da altri autori [24], [25].

Il potere riflettente P del cristallo viene scritto come funzione dell'energia E e dell'angolo di incidenza della radiazione ϑ :

$$P(E, \vartheta) = \frac{(WQ + \mu_0) - \sqrt{(WQ + \mu_0)^2 - W^2 Q^2}}{WQ} \times \left[1 - \frac{U \sin \vartheta \exp(-UT_0)}{(WQ + \mu_0) \sinh(UT_0) + U \sin \vartheta \cosh(UT_0)} \right] \quad (3)$$

$$U = \frac{1}{\sin \theta} \sqrt{(WQ + \mu_0)^2 - W^2 Q^2} \quad (4)$$

$$Q = r_0^2 \frac{\eta^2 \lambda^3}{\sin 2\vartheta_B} |F|^2 \left(\frac{1 + \cos^2 2\vartheta_B}{2} \right) \quad (5)$$

$$W(\vartheta_B - \vartheta) = \frac{1}{\eta \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(\vartheta_B - \vartheta)^2}{2\eta^2}\right) \quad (6)$$

$$2\alpha = 2\eta \sqrt{2 \ln 2} = \text{mosaic spread (FWHM of } W)$$

$$2d \sin \vartheta_B = n\lambda \quad \text{Formula di Bragg} \quad (7)$$

dove r_0 è il raggio classico dell'elettrone, λ la lunghezza d'onda, n l'ordine di diffrazione, μ_0 il coefficiente di attenuazione lineare del carbonio, η la densità delle celle di diffusione, F il fattore di struttura del cristallo, ϑ_B l'angolo di Bragg, T_0 lo spessore del cristallo. I termini Q e W sono rispettivamente il fattore dipendente dall'energia e il fattore di dispersione angolare gaussiano del cristallo a mosaico ideale:

$$P_{Ideal\ Mosaic}(E, \vartheta) = \frac{1}{2\mu_0} QW \quad (8)$$

Se lo spettro del fascio primario è noto, lo spettro diffratto $S_{diffracted}$ e l'intensità $I_{diffracted}$ può essere calcolata per mezzo dell'equazione (3):

$$S_{\text{diffracted}}(E, \vartheta) = S_{\text{incident}}(E) \cdot P(E, \vartheta) \quad (9)$$

$$I_{\text{diffracted}}(\vartheta) = \int S_{\text{diffracted}}(E, \vartheta) dE \quad (10)$$

Il calcolo include i contributi fino al 3° ordine di diffrazione. In Fig. 3 sono riportati lo spettro e l'intensità del fascio diffratto calcolati secondo il modello generale del cristallo a mosaico.

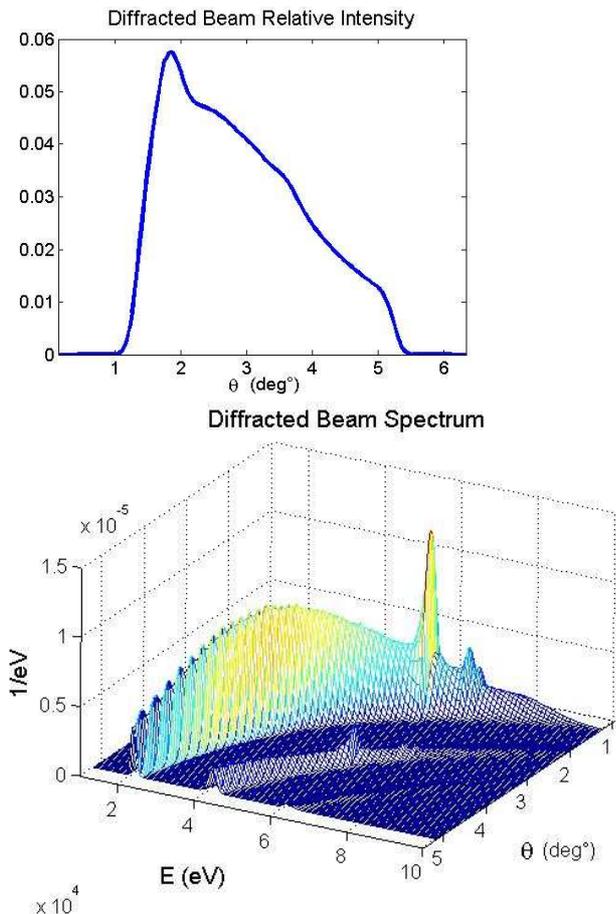


Fig.3: Spettro del fascio diffratto e sua intensità. Lo spettro incidente utilizzato per il calcolo è un tipico spettro generato da anodo di tungsteno a 120 kV. Tutti i dati sono espressi in unità di intensità del fascio incidente $I_o=1$. L'intensità ha un massimo a circa 1.8° (60 KeV) e decresce all'aumentare dell'angolo (quando l'energia del fascio diffratto decresce). La risoluzione energetica, al contrario, è migliore a grandi angoli.

Il sistema di rivelazione

Il rivelatore è costituito da due CCD lineari accoppiati con CsI(Tl), prodotti dalla Hamamatsu, montati parallelamente per leggere contemporaneamente i due fasci generate dal monocromatore. Ogni rivelatore è costituito da 3072×128 pixel quadrati con un'area attiva di circa $150 \times 6 \text{ mm}^2$. La dimensione del pixel è di $48 \times 48 \text{ }\mu\text{m}$. Lo CsI(Tl) è stato accresciuto in forma di microaghi di scintillatore, del diametro di circa $2 \text{ }\mu\text{m}$ allo scopo di evitare la dispersione della luce di scintillazione e mantenere una buona risoluzione spaziale. Il sistema di rivelazione – con l'elettronica di front-end appositamente sviluppata – è stato montato in un contenitore a tenuta di vuoto e raffreddato mediante una batteria di celle Peltier per ridurre il rumore termico. L'elettronica di condizionamento e acquisizione, anch'essa sviluppata appositamente per la specifica applicazione, consente di eseguire fino a otto letture per secondo dell'intero sistema di rivelazione. In Fig. 4 è riportata l'immagine in scansione di un test-pattern commerciale.

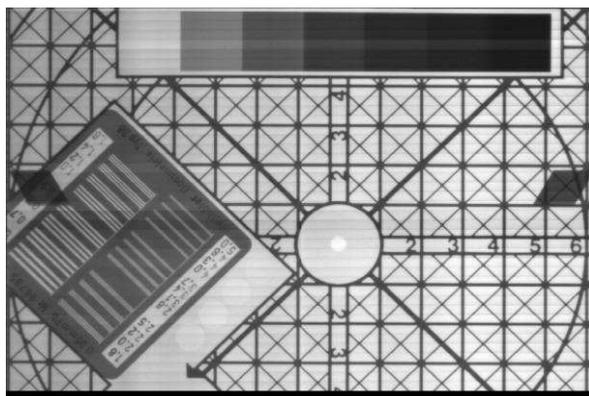


Fig. 3: Immagine del Wellhofer ETR1 multipurpose test pattern eseguita per la verifica delle proprietà di imaging del sistema di rivelazione. L'immagine è stata acquisita con uno dei due CCD lineari, in modalità scansione, con un fascio quasi-monocromatico di energia al centroide pari a 35 keV.

Il sistema tomografico

Il sistema CT include le parti meccaniche e strutturali per la scansione e la rotazione dell'animale, i motori e i loro sistemi di controllo (encoder), i sensori per il controllo delle variabili critiche: la temperatura del tubo RX, l'esposizione, la tensione e la corrente anodiche che vengono campionate con continuità e registrate assieme all'immagine. Tutti i controlli sono integrati in un pacchetto software appositamente sviluppato in linguaggio LabVIEW. Il diagramma a blocchi in Fig. 4 evidenzia le parti principali del sistema CT. Lo stadio di traslazione ha una corsa di 400 mm e una precisione di 10 μm . Lo stadio di rotazione ha una ripetibilità di circa 0.1° su una corsa di 180° . Il tubo RX con il monocromatore e il rivelatore sono fissati agli estremi opposti del braccio rotante. Il gantry ha un diametro di 300 mm. In Fig. 5 una foto della micro CT.



Fig. 5: Foto del sistema CT in cui si evidenziano il braccio rotante con il tubo radiogeno e il supporto per il rivelatore. Attualmente il monocromatore è in fase di caratterizzazione. Si può vedere il tubo di supporto per l'animale, entro tale tubo scorreranno i gas (ossigeno, anestetico, aria calda) per il supporto vitale del topo.

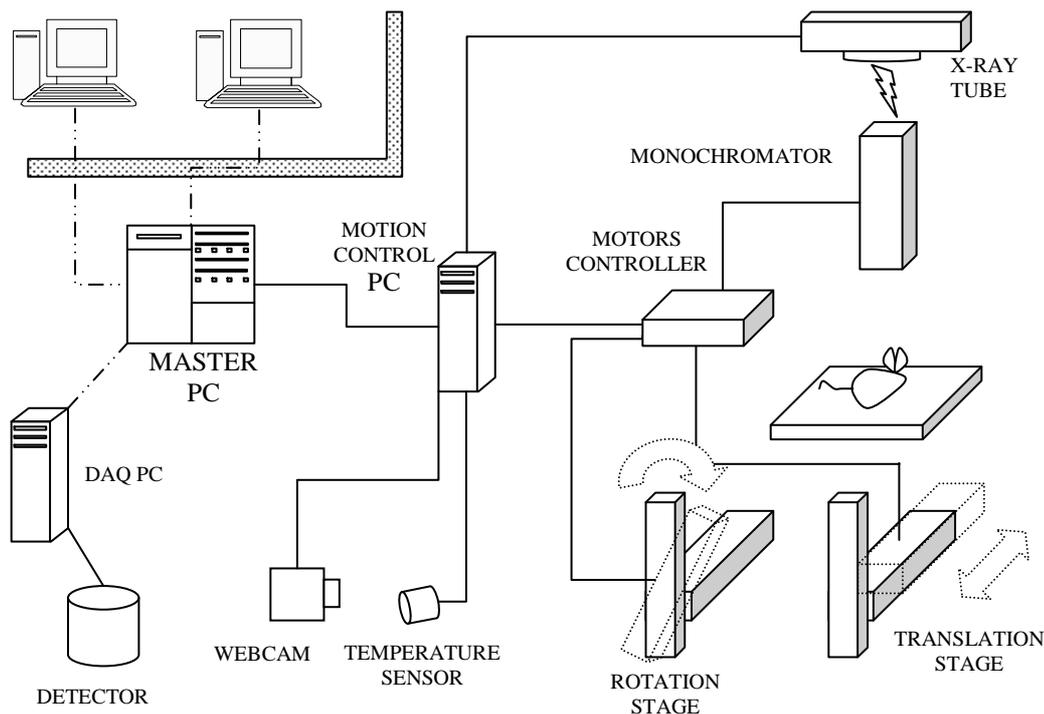


Fig. 4: Diagramma a blocchi del sistema CT.

BIBLIOGRAFIA

1. A. Tuffanelli, A. Taibi, G. Baldazzi, D. Bollini, M. Gombia, L. Ramello, M. Gambaccini, "Novel x-ray source for dual-energy subtraction angiography", SPIE Medical Imaging Conference Record 2002, San Diego (Ca), 2002.
2. S.B. Fox, G. Gasparini, A.L. Harris, "Angiogenesis: pathological, prognostic and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs", *Lancet Oncol.* **2**, 278-289 (2001).
3. Miller J.C., Pien H.H., Sahani D., Sorensen A.G., Thrall J.H., "Imaging angiogenesis: applications and potential for drug development.", *J. Natl. Cancer. Inst.* **97**, 172-187 (2005).
4. A.C. Thompson, E. Rubenstein, H. D. Zeman et al., "Coronary angiography using synchrotron radiation", *Rev. Sci. Instrum.* **60**, pp. 1622-1627, (1989).
5. H. Elleuame et al., "First human transvenous coronary angiography at the European Synchrotron Radiation Facility", *Phys. Med. Biol.* **45**(9),39-43 (2000).
6. M. Gambaccini, A. Tuffanelli, A. Taibi, A. Fantini and A. Del Guerra, "Bragg diffraction-based quasi-monochromatic source for mammography using mosaic crystals", *Proc. SPIE* **3770** 174-84.
7. Frank E. Carroll, "Tunable Monochromatic X Rays: A New Paradigm in Medicine", *Am.J.Roent.* 2002; **179**:583-590
8. J.M Boone, J.A. Seibert, "A figure of merit comparison between Bremsstrahlung and Monoenergetic X-ray sources for Angiography", *Journal of X-ray Science and Technology*, **4**, 334-345, (1994).

9. C. Gary, M. Piestrup, D. Boyers, C. Pincus, R. Pantell, G. Rothbart, "Noninvasive digital energy subtraction angiography with a channeling-radiation x-ray source", *Med. Phys.* **20**, pp. 1527-1535 (1993).
10. G. Baldazzi, I. Corazza et al., "In Vivo Effectiveness of Gadolinium Filter for Paediatric Cardiac Angiography in Terms of Image Quality and Radiation Exposure", *Phys. Med.* Vol. XVIII (3) - July/Sept.2002, 109-114.
11. P.C. Johns and M.J. Yaffe, "Theoretical optimization of dual energy x-ray imaging with application to mammography", *Med. Phys.*, **12**, 289-296 (1985).
12. M. Gambaccini et al. "Narrow energy band X-rays via mosaic crystal for mammography application", *Nucl. Instr. and Meth.*, **A442**, 346-354 (2000).
13. R.E.Alvarez, A. Macovsky, "Energy-selective reconstruction in X-ray computerized tomography", *Phys. Med. Biol.* **21**, 733-744 (1976).
14. L.A. Lehmann et al., "Generalized image combinations in dual kVp digital radiography", *Med. Phys.*, **17**, 665-675 (1990).
15. M. Marziani et al., "Dual-energy tissue cancellation in mammography with quasi-monochromatic x-rays" *Phys. Med. Biol.* **47** 305-313 (2002).
16. S. V. Naydenov, V. D. Ryzhnikov et al., "Direct reconstruction of the effective atomic number of materials by the method of multi-energy radiography", Los Alamos Archives (<http://xxx.lanl.gov>), physics / 0310118.
17. A. Sarnelli, A. Taibi, A. Tuffanelli, G. Baldazzi et al., "K-edge digital subtraction imaging based on a dichromatic and compact X-ray source", *Phys. Med. Biol.* **49** (2004) 3291–3305.
18. P.C. Johns, M.J. Yaffe, "X-ray characterization of normal and neoplastic breast tissues", *Phys. Med. Biol.* **32**, 675-695 (1987).
19. F.E. Carroll et al., "Attenuation of monochromatic X-ray by normal and abnormal breast tissues", *Invest. Radiol.* **29**, 266-272 (1994).
20. J.S. Yadav, S. Savitri, J.P. Malkar, "Near room temperature X-ray and γ -ray spectroscopic detectors for future space experiments", *Nucl. Instr. And Meth. A* **552** (2005), 399-408
21. G. Baldazzi et Al., "Dual Energy Angiography: performances in terms of image quality to patient's exposure ratio", 8th EFOMP congress, 30th NVKF annual scientific meeting, May 20-23, 2003, Eindhoven, The Netherlands.
22. G. Baldazzi et al., Imaging characterization of an experimental Apparatus for Dual Energy Angiography, IEEE-MIC Conference Record 2002, Norfolk (USA), November 2002
23. W.H. Zachariasen, "Theory of X-ray Diffraction in Crystals", Dover, New York (1967).
24. M. Chabot, P. Nicolai et al., "X-ray reflectivities, at low and high order of reflection, of flat highly oriented pyrolytic graphite crystals" *Nucl. Instr. and Meth.* **B61**, 377-384 (1991).
25. J.L. Lawrence, *Acta Cryst.* **A38**, 859 (1982).