

Ultraschnelle hochauflösende *single breath-stop*-  
Mikro-Computertomographie thorakaler und  
abdomineller Organe der lebenden Maus unter  
Verwendung einer vereinfachten Intubationsmethode

---

**HANNE BOLL**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

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 written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem  
Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere (Chirurgie)  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

**und**

der Abteilung für Neuroradiologie  
der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg  
Betreuer: Prof. Dr. M. A. Brockmann, MSc

**Ultraschnelle hochauflösende *single breath-stop*-Mikro-  
Computertomographie thorakaler und abdomineller Organe der  
lebenden Maus unter Verwendung einer vereinfachten  
Intubationsmethode**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Hanne Boll**

Tierärztin aus Mühlacker

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer  
Prof. Dr. M. A. Brockmann, MSc

Tag der Disputation: 29.05.2012

Meinen Eltern in Dankbarkeit



# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Methoden der Bildgebung bei Versuchstieren .....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Sonographie	4
2.1.2 MRT	8
2.1.3 Optische Bildgebungsverfahren	12
2.1.4 Nuklearmedizinische Bildgebungsverfahren	16
2.1.5 Röntgenstrahlenbasierte Verfahren	20
Computertomographie.....	22
Typen und Funktionsweisen der Mikro-CT.....	25
Möglichkeiten und Limitationen der thorako-abdominellen Bildgebung in der lebenden Maus .....	32
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Mikro-CT .....</b>	<b>36</b>
3.1.1 Manipulator und Objekthalterung	37
3.1.2 Röntgenröhre und Detektor	38
3.1.3 Scanverfahren	38
<b>3.2 <i>Single breath-stop</i>-Mikro-CT der lebenden Maus .....</b>	<b>39</b>
3.2.1 Zur Intubation verwendete Materialien	39
3.2.2 Intubation der Maus	40
3.2.3 Beatmung	43
3.2.4 Relaxation und Scanparameter	44
3.2.5 Rekonstruktion der CT-Daten	45
3.2.6 Auswertung	45
<b>3.3 Einsatz der <i>single breath-stop</i>-Mikro-CT für die Verlaufsbildgebung von Lebermetastasen in der Maus .....</b>	<b>46</b>
3.3.1 Mausmodell	46
3.3.2 Kontrastmittelinjektion	46
3.3.3 <i>Single breath-stop</i> -Mikro-CT	47

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>48</b>
4.1	Intubation.....	48
4.2	Beatmung und Relaxation.....	48
4.3	Bildgebung .....	49
4.4	Verlaufsbildgebung von Lebermetastasen .....	55
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>60</b>
5.1	Intubationsmethode.....	60
5.2	Strategien zur Verminderung von Bewegungsartefakten in der thorako-abdominellen Bildgebung der lebenden Maus.....	62
5.3	Verlaufsbildgebung .....	68
5.4	Relaxation.....	70
5.5	Leberspezifische Kontrastmittel .....	71
5.6	Ausblick .....	72
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>77</b>
	<b>EIGENE PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>100</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>103</b>
	<b>ERKLÄRUNG</b> .....	<b>104</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
µA	Mikroampere
µm	Mikrometer
1H	Wasserstoff mit der Ordnungszahl 1
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
4D	vierdimensional
A.	Arteria
AMFPI	<i>active matrix flat panel imager</i>
B <sub>0</sub>	statisches Magnetfeld
BLI	<i>bioluminescence imaging</i> ; Biolumineszenz-Bildgebung
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
B-Mode	<i>brightness modulation</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCD	<i>charge coupled device</i>
CEA	Carcinoembryonales Antigen

## Abkürzungsverzeichnis

---

cm	Zentimeter
CNT	<i>carbon nanotube</i>
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
DICOM	<i>Digital Imaging and Communications in Medicine</i>
DSA	digitale Subtraktionsangiographie
EIP	endinspiratorischer Druck
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	et alii
etc.	et cetera
Fenestra LC	Fenestra Liver Contrast
Fenestra VC	Fenestra Vessel Contrast
FLI	<i>fluorescence imaging</i> ; fluoreszenzoptische Bildgebung
FoV	<i>Field of View</i> ; dargestellter Bereich
fps	<i>frames per second</i> ; Bilder pro Sekunde
G	Gauge
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
Gy	Gray
H <sub>2</sub> O	Wasser
HF-Impuls	Hochfrequenzimpuls
HU	<i>Hounsfield Units</i> ; Hounsfield Einheiten
i.d.R.	in der Regel

## Abkürzungsverzeichnis

---

In	Inch
i.p.	intraperitoneal
I.U.	<i>International Units</i> ; internationale Einheiten
i.v.	intravenös
IIBH	<i>intermittent iso-pressure breath hold technique</i>
keV	Kilo-Elektronenvolt
kg	Kilogramm
kHz	Kilohertz
kV	Kilovolt
LLF	<i>lobar lung fissure</i> ; Lungenlappengrenze
LV	<i>lung vessel</i> ; Lungengefäß
MA	Mesenterialarterie
mg	Milligramm
mGy	Milligray
mHz	Megahertz
Mikro-CT	Mikro-Computertomographie
MIP	Maximum-Intensitäts-Projektion
mm	Millimeter
M-Mode	<i>motion-Mode</i>
MPR	Multiplanare Reformation
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunden
n	Anzahl der Proben

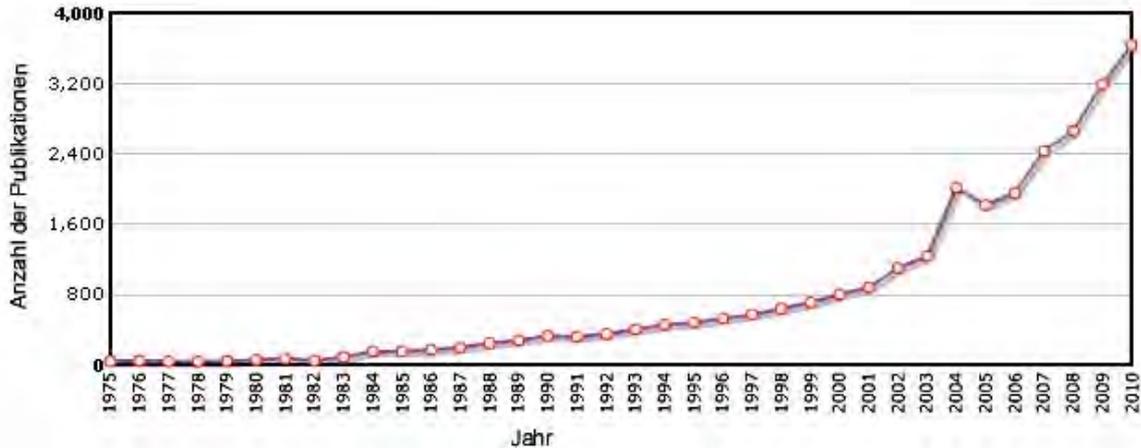
## Abkürzungsverzeichnis

---

NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
ODD	<i>object detector distance</i> ; Objekt-Detektor-Abstand
OP	Operation
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PS	Phosphatidylserin
PV	Portalvene
ROI	<i>region of interest</i>
SD	<i>standard deviation</i> ; Standardabweichung
SDD	<i>source detector distance</i> ; Röntgenquelle-Detektor-Abstand
SNR	<i>signal to noise ratio</i> ; Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SOD	<i>source object distance</i> ; Röntgenquelle-Objekt-Abstand
sog.	sogenannt
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i> ; Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie
T	Tesla
TEE	transösophageale Echokardiographie
TFTs	<i>thin film transistors</i> ; dünne Filmtransistoren
V.	Vena
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

Obwohl zunehmend an Alternativmethoden zu Tierversuchen geforscht wird, ist nach derzeitigem Stand der Wissenschaft ein genereller Verzicht auf Tierversuche zur Klärung bestimmter Fragestellungen nicht möglich. Ursächlich ist die bei *in vitro*-Versuchen begrenzte Aussagekraft vieler biomedizinischer Fragestellungen, da diese Modelle nicht den Stoffwechsel eines Organismus mit seinen komplexen Interaktionen realistisch abbilden. Die am häufigsten als Tiermodelle verwendeten Wirbeltiere sind Mäuse und Ratten (2010: 84,2% der für Tierversuche verwendeten Wirbeltiere), wobei Mäuse mit einem Anteil von ca. 80% überwiegen (Tierschutzberichte der Bundesregierung 2003, 2005, 2007 und 2011). Ursächlich ist die gute Eignung von Mäusen als Tiermodell, da sie bei schnellen Reproduktionsraten, geringen Haltungskosten und umfassend bekannten genetischen Daten hohe anatomische und physiologische Ähnlichkeiten zum menschlichen Organismus aufweisen. Des Weiteren lässt sich der Genotyp dieser Tiere relativ schnell verändern, wodurch sich optimierte Modelle zur Simulation menschlicher Krankheitsbilder generieren lassen. Die Versuchstierzahlen des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz der Jahre 2000 bis 2010 belegen die trotz Ersatz- und Ergänzungsmethoden steigenden Versuchstierzahlen und verdeutlichen die hohe Relevanz von Tierversuchen. Die zunehmende Relevanz der Versuchstierbildung in der präklinischen Forschung spiegelt sich in der steigenden Anzahl an Publikationen zu diesem Thema in den letzten Jahren wieder (Abbildung 1-1).



**Abbildung 1-1:** Zahl der jährlichen Publikationen zur Bildgebung in Versuchstieren von 1975 bis 2010. Die Grafik basiert auf einer Abfrage der Datenbank PubMed mit folgenden Suchbegriffen: „imaging“ AND („mouse“ OR „rat“) und wurde mit Hilfe des Onlineprogramms MEDSUM (MEDLINE summary tool, MJ Galsworthy; *Institute of Biomedical Informatics (IBMI)*, Medizinische Fakultät der Universität Ljubljana, Slowenien) erstellt.

Ein Problem bei der Durchführung von Tierversuchen ist, dass diese trotz optimierter Narkosetechniken und Schmerzmedikationen mit einem Leid für die Tiere verbunden sein können. Daher ist es erstrebenswert nach Möglichkeiten zu suchen um sowohl das Leid, als auch die Zahl der benötigten Versuchstiere insgesamt zu reduzieren. Eine Möglichkeit bietet hier der Einsatz bildgebender Verfahren bei Versuchstieren. Wurde früher beispielsweise für Verlaufsstudien zu jedem Untersuchungszeitpunkt eine Versuchsgruppe getötet, so ermöglicht die Bildgebung die nicht-invasive, longitudinale Untersuchung von Versuchstieren, ohne dass diese hierfür getötet werden müssen. Darüber hinaus können so *in vivo* physiologische Daten erhoben werden, ohne die Tiere töten zu müssen.

Eine Möglichkeit der nicht-invasiven Bildgebung ist die Mikro-Computertomographie (Mikro-CT). Ein Problem bei der *in vivo* Mikro-CT thorakaler und abdomineller Strukturen bei Mäusen stellt die durch die Atmung entstehende Bewegungsunschärfe dar. Bisher wurden zur Lösung dieses Problems verschiedene Gating-Techniken eingesetzt (BADEA et al. 2004; CAVANAUGH et al. 2004; WALTERS et al. 2004; NAMATI et al. 2006; DRANGOVA et al. 2007; FORD et al. 2007b; BADEA et al. 2008b; BARTLING et al. 2008; JOHNSON et al. 2008a; CAO et al. 2009; ERTEL et al. 2009; BARTLING et al. 2010; LEE et al. 2011) welche jedoch oft mit verlängerten Untersuchungszeiten bzw. einer erhöhten Strahlendosis einhergehen. Des Weiteren können Bewegungsunschärfen trotz Gating meist nicht vollständig eliminiert werden (CAVANAUGH et al. 2004). Eine Alternative zum Gating

stellt die Bildgebung während eines Atemstopps, wie es auch beim Menschen durchgeführt wird, dar. Bisher waren die Untersuchungszeiten der meisten Mikro-CTs im Bereich von mehreren Minuten hierfür aber zu lang. Da in den letzten Jahren zunehmend schnellere Mikro-CTs Untersuchungszeiten von unter einer Minute erlauben (SCHAMBACH et al. 2009; BARTLING et al. 2010), könnte dies erstmalig die hochauflösende Darstellung thorakaler und abdomineller Strukturen bei der Maus während eines einzigen Atemstopps ermöglichen.

Aufgrund der Verfügbarkeit eines Mikro-CTs, welches extrem schnelle Scanzeiten zwischen 20 und 40 Sekunden erlaubt, aber über keine Möglichkeit des Gatings verfügt, haben wir die Etablierung einer Methode zur *single breath-stop*-Mikro-CT in der Maus angestrebt. Eine Voraussetzung für die Durchführung der in der Literatur bisher nicht für die Maus beschriebenen *single breath-stop*-Bildgebung ist die Intubation der Tiere, um eine Kontrolle der Atmung zu erreichen. Aufgrund der geringen Größe der Maus stellt die Intubation jedoch eine Herausforderung dar.

So sind bereits verschiedene Methoden zur Intubation der Maus beschrieben worden, wobei diese meist aufwendige Hilfsmittel benötigen (BROWN et al. 1999; VERGARI et al. 2003; RIVERA et al. 2005; SPOELSTRA et al. 2007; HAMACHER et al. 2008; MACDONALD et al. 2009; SINGER et al. 2010). Erstes Teilziel der vorliegenden Arbeit war daher die Etablierung einer einfachen, sicheren und schnellen Methode zur Intubation der Maus. Im Anschluss daran galt es, die Beatmung und Durchführbarkeit des Atemstopps bei der Maus zu etablieren, um somit die Mikro-CT-Untersuchung während eines einzigen Atemstopps zu ermöglichen. Abschließend war die Wiederholbarkeit der *single breath-stop*-Mikro-CT im selben Tier zu demonstrieren, um damit letztlich die Einsetzbarkeit der Methode zur schnellen und hochauflösenden longitudinalen Beurteilung von thorakalen und abdominalen Strukturen in der Maus zu beweisen.

## 2 Literaturübersicht

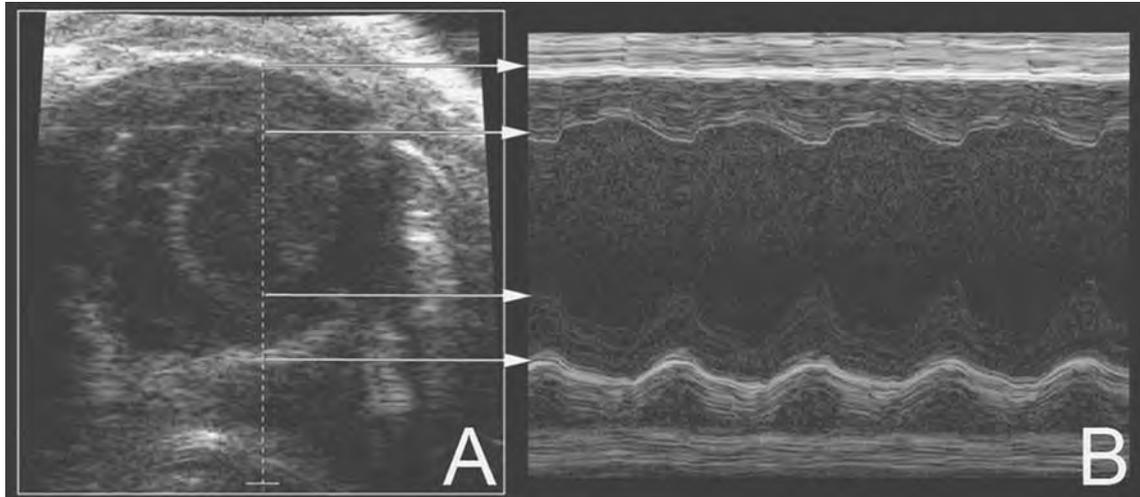
### 2.1 Methoden der Bildgebung bei Versuchstieren

Es existieren verschiedene Möglichkeiten zur Bildgebung von Versuchstieren, wobei der Bildgebung von Maus und Ratte die größte Relevanz zukommt. Aufgrund der geringen Größe und des schnellen Stoffwechsels dieser Labortiere besteht eine der Hauptherausforderungen der experimentellen Bildgebung in der benötigten hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung (BADEA et al. 2008a). In den folgenden Abschnitten wird ein Überblick über die derzeit gängigsten Methoden der Bildgebung gegeben.

#### 2.1.1 Sonographie

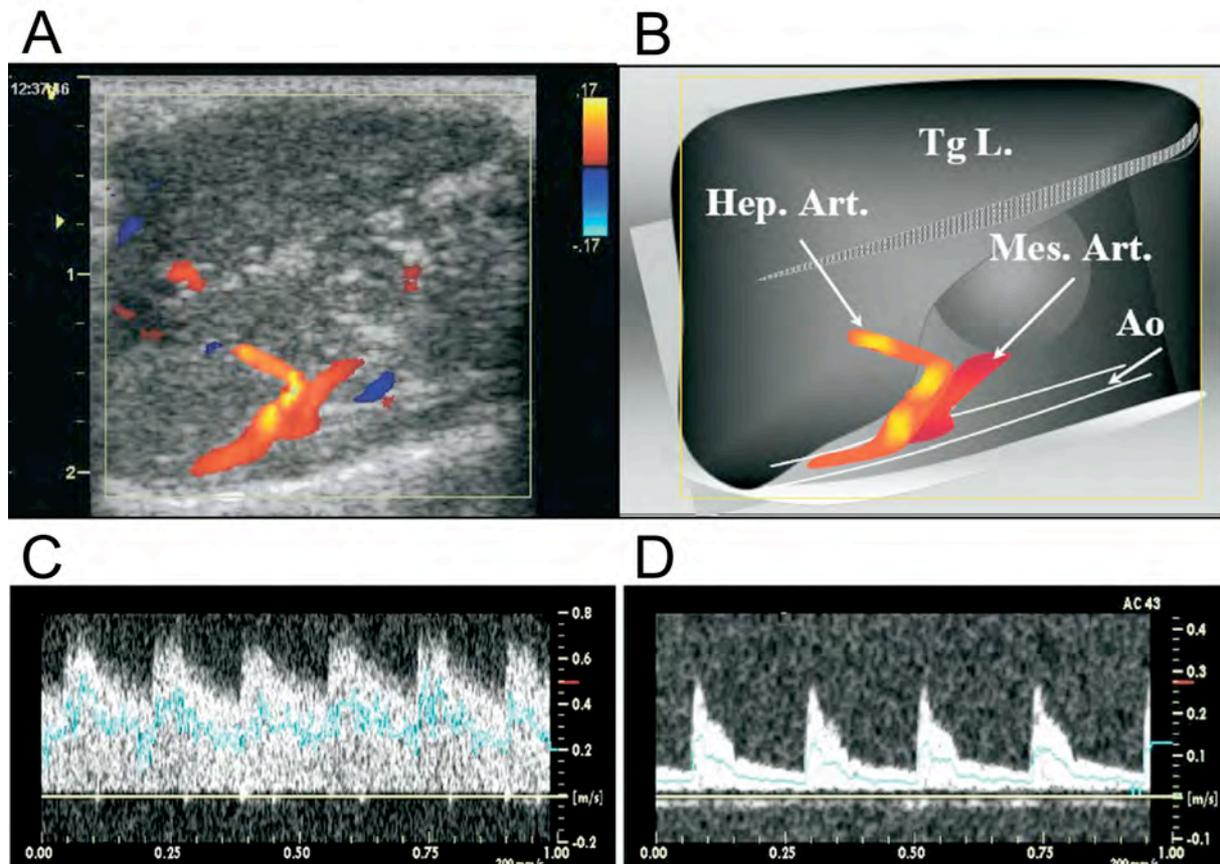
Ultraschall ist Schall mit einer Frequenz oberhalb der menschlichen Hörgrenze (ab 20 kHz). Üblicherweise werden hier Frequenzen zwischen 2 und 15 MHz, zur Bildgebung bei Maus und Ratte auch bis 100 MHz, eingesetzt (COATNEY 2001). Je höher die eingesetzte Frequenz, desto höher ist die räumliche Auflösung, bei jedoch umso geringerer Eindringtiefe (COATNEY 2001). Die verwendete Frequenz stellt also einen Kompromiss aus räumlicher Auflösung und benötigter Eindringtiefe dar. Die Ultraschallbildgebung, auch Sonographie, basiert auf der Ausbreitung von Ultraschallwellen im Gewebe. Mit in der Ultraschallsonde (auch als Schallkopf bezeichnet) angeordneten Kristallen werden durch den piezoelektrischen Effekt Ultraschallwellen erzeugt (COATNEY 2001). Diese von der Sonde gesendeten Schallwellenimpulse werden in den unterschiedlichen Geweben unterschiedlich stark reflektiert, absorbiert und gestreut. Aus der Laufzeit und der Stärke der Reflexionen erfolgt die Bildberechnung. Die Ultraschallsonde dient gleichzeitig als Sender und Empfänger der Ultraschallwellen (BALABAN u. HAMPSHIRE 2001). Dabei existieren verschiedene Methoden zur Echtzeitdarstellung der Messergebnisse: am häufigsten wird der sogenannte B-Mode (*brightness modulation*), eine zweidimensionale Grauwert-Darstellung des Raumes über die Zeit, verwendet. Eine weitere

Darstellungsmöglichkeit ist der M-Mode (*motion*), welcher die eindimensionale Darstellung des Raumes über die Zeit ist und der Darstellung von Bewegungsabläufen von Organen dient. Dementsprechend wird der M-Mode z.B. vor allem in der Echokardiographie angewendet (Abbildung 2-1).



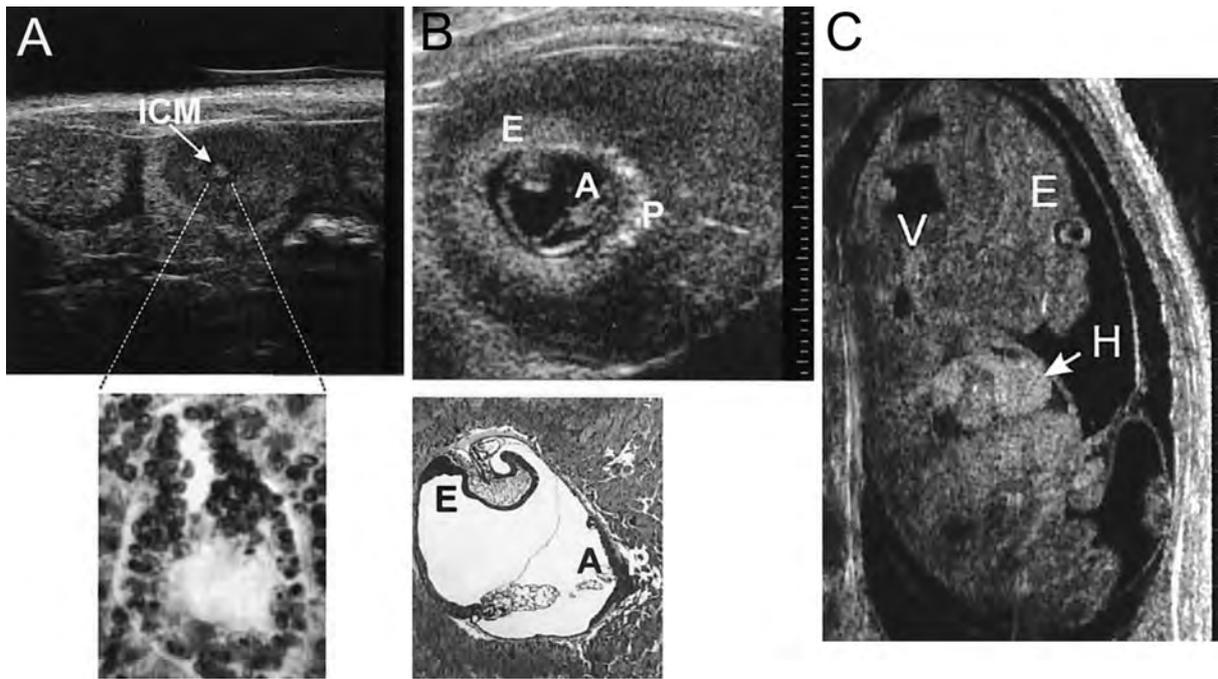
**Abbildung 2-1:** Ultraschallbildgebung des Herzes der Maus. **A)** B-Mode-Darstellung, **B)** M-Mode-Darstellung. Die gestrichelte Linie markiert die Schicht, in der das M-Mode-Bild erstellt wird. Die Pfeile zeigen die korrespondierenden Stellen zwischen B- und M-Mode-Bild. (aus JOHNSON 2008b)

Des Weiteren gibt es dreidimensionale (statische oder dynamische (4D)) Darstellungsmethoden und die (farbkodierte-) Dopplersonographie (Abbildung 2-2), welche hämodynamische Informationen über den Blutfluss in Herz und Gefäßen liefert (KAGADIS et al. 2010).



**Abbildung 2-2:** **A)** zweidimensionale farbkodierte Doppler-Ultraschallbildgebung (12-MHz Linearschallkopf) der Leber- und Mesenterialarterien in einer transgenen Maus; Farbkodierung der Blutflussgeschwindigkeiten (BFV) von niedrig bis hoch in rot nach gelb. **B)** schematische Darstellung: Ao = Aorta descendens; Hep.Art. = Arteria hepatica; Mes.Art. = Arteria mesenterica cranialis; Tg.L. = transgene Leber. Darstellung der Blutflussgeschwindigkeiten in **(C)** Leber- und **(D)** Mesenterialarterie. Die gepulste Doppler-Sonographie mit Spektralanalyse des Doppler-Signals ermöglicht die Messung der systolischen, der enddiastolischen und der zeitlich gemittelten (blaue Linie) Blutflussgeschwindigkeiten. (aus BONNIN et al. 2007)

Die Sonographie ist eine in der Human- und Veterinärmedizin weit verbreitete, diagnostische Methode zur nicht invasiven Bildgebung und eignet sich besonders zur morphologischen und funktionellen Darstellung von Weichteilen, zur Pränataldiagnostik (Abbildung 2-3) und für ultraschallgesteuerte Punktionen, Biopsien und Medikamentenapplikationen.



**Abbildung 2-3:** *In vivo* Ultraschall-Biomikroskopie (40 MHz) eines Mausembryos. **A)** Tag 5,5 der Gestation; zu sehen sind die innere Zellmasse (ICM, helle Region zentral im Uterus) sowie mit dem Embryo assoziierte Zellen. **B)** Tag 8,5 der Gestation; zeigt den nun sichtbaren Embryo (E) sowie die Allantois (A), welche der sich entwickelnden Plazenta (P) anliegt. **C)** Darstellung eines 13,5 Tage alten Maus-Embryos im Längsschnitt; erkennbar sind die sich entwickelnden Augen (E), die lateralen Ventrikel (V) sowie das Herz (H). Kleinster Skalenteil: 100  $\mu\text{m}$ ; **(A)** und **(B)** mit entsprechenden histologischen Schnitten; (aus FOSTER et al. 2002)

Aufgrund des technischen Fortschritts und mittlerweile verfügbarer Hochfrequenzschallköpfe findet die Sonographie zunehmend in der präklinischen Forschung Verwendung (COATNEY 2001). Hochfrequenzschallköpfe bis 100 MHz (auch als Biomikroskopie (Abbildung 2-3) bezeichnet) (COATNEY 2001) ermöglichen die hochauflösende Darstellung der adulten (TAKEISHI et al. 2000; YOKOSAWA et al. 2000; COLLINS et al. 2003) und fetalen (*in utero*) (SRINIVASAN et al. 1998; TURNBULL 1999; PHOON et al. 2004) Herzanatomie und -funktion bei Mäusen sowie die Anwendung der, beim Menschen bereits etablierten, TEE (transösophageale Echokardiographie) bei Mäusen (SCHERRER-CROSBIE et al. 1998; RAMANI et al. 2004). Durch den Einsatz von Ultraschallkontrastmitteln auf der Basis stark reflektierender, gasgefüllter Mikrobläschen (sogenannter *microbubbles*) kann die Sensitivität der Sonographie gesteigert werden (GRIMM u. WUNDER 2005). Perfusionsbildgebung (SCHERRER-CROSBIE et al. 1999; ZHOU et al. 2011a; ZHOU et al. 2011b) sowie die Detektion des sehr langsamen Blutflusses der Mikrozirkulation (KIESSLING et al. 2010) sind so ebenfalls möglich. Die Entwicklung

von *microbubbles*, welche spezifisch an molekulare Zielstrukturen binden, könnte den Einsatz der Sonographie in der molekularen Bildgebung möglich machen (ANDERSON et al. 2011; WU et al. 2011).

Ein wesentlicher Vorteil der Sonographie ist die im Vergleich zur z.B. CT fehlende Strahlenbelastung (COATNEY 2001; GRIMM u. WUNDER 2005). Die Sonographie ist daher ein nicht invasives Bildgebungsverfahren und folglich beliebig oft wiederholbar (COATNEY 2001; GRIMM u. WUNDER 2005), wobei gerade eine wiederholte Strahlenbelastung in der onkologischen Versuchstierbildgebung zu einer Beeinflussung von Ergebnissen führen kann. Ein weiterer Vorteil ist die hohe zeitliche Auflösung, welche Echtzeitdarstellungen des Untersuchungsobjektes erlaubt (KAGADIS et al. 2010).

Limitiert wird die Sonographie durch Knochen und luftgefüllte Strukturen, welche zum Beispiel eine Darstellung des Gehirns oder des Rückenmarks erschweren (COATNEY 2001). Gut untersuchbar sind dagegen wasserhaltige, blutreiche Organe, wie z.B. die Leber (MAI et al. 2004; GRAHAM et al. 2005; BONNIN et al. 2007). Ein weiterer Nachteil ist, dass die Ergebnisse stark untersucherabhängig sind, was ebenfalls zu einer Verfälschung von Ergebnissen führen kann und daher ein geübter Untersucher nötig ist (BALABAN u. HAMPSHIRE 2001; COATNEY 2001). Nachteilig ist zudem die begrenzte Eindringtiefe des Ultraschalls (GRASSI et al. 2009), was vor allem bei der Untersuchung großer Objekte von Bedeutung ist, weniger jedoch kleine Labortiere betrifft.

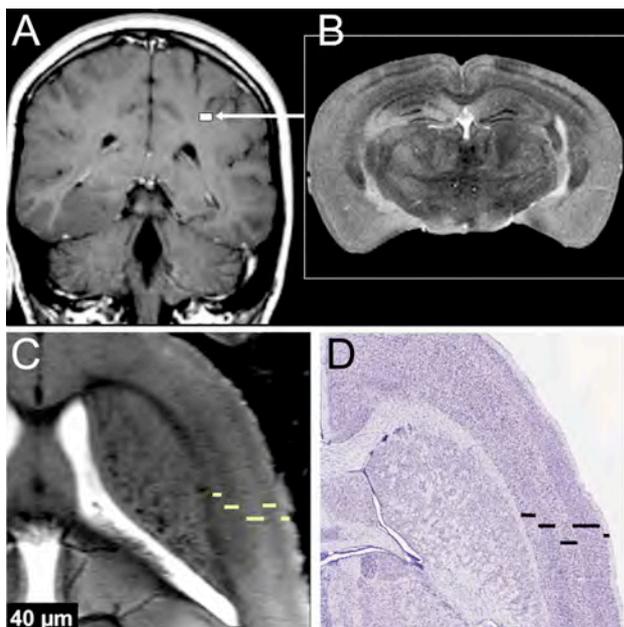
### **2.1.2 MRT**

Die  $^1\text{H}$ -Magnetresonanztomographie (MRT) basiert auf der Manipulation der magnetischen Eigenschaften von Wasserstoffatomen, die in Weichteilgewebe ubiquitär vorkommen (KAGADIS et al. 2010). Im Folgenden wird das Prinzip der MRT stark vereinfacht beschrieben.

Ein starkes statisches Magnetfeld ( $B_0$ ) wird verwendet um die Spins der Kerne auszurichten (Longitudinalmagnetisierung) (DRIEHUYS et al. 2008). Durch Einbringen eines spezifischen Hochfrequenzimpulses (HF-Impuls) mittels einer sogenannten Sende- und Empfangsspule lässt sich diese Magnetisierung aus der

Magnetisierungsebene herauskippen und phasieren (Transversalmagnetisierung). Nach Abschalten des HF-Impulses nimmt die Transversalmagnetisierung ab, die Spins richten sich wieder parallel zum statischen Magnetfeld aus. Für diese sogenannte Relaxation benötigen die verschiedenen Gewebearten unterschiedliche Zeiten was zu einem charakteristischen Signal führt. Zusätzlich wird eine Reihe von Gradienten angelegt um eine Ortsinformation über die angeregten Kerne zu erhalten. Abschließend werden mittels einer Fouriertransformation multiplanare Bilder rekonstruiert. Durch die Auswahl einer geeigneten Kombination von Sequenzparametern lassen sich so vielfältige Informationen über Anatomie, Morphologie, Funktion und Metabolismus erhalten (KAGADIS et al. 2010).

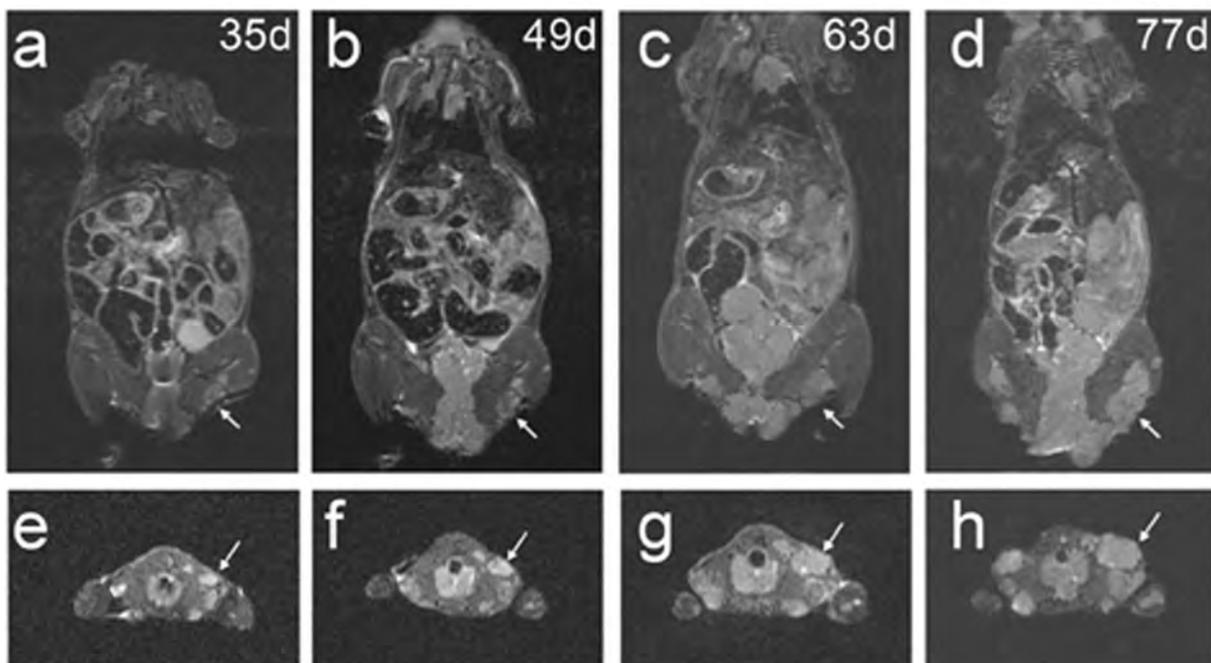
Zur Bildgebung der kleinen Labortierspezies können eingeschränkt auch klinische Geräte, zum Teil mit speziellen Spulen, verwendet werden (BROCKMANN et al. 2007). Um eine adäquate Auflösung und Bildqualität zu erhalten sind jedoch spezielle Hochfeld-MRTs mit hoher Feldstärke und kleiner Bohrung besser geeignet; diese sind allerdings relativ teuer und daher nicht ubiquitär verfügbar. Diese Hochfeldgeräte sind gegenwärtig in Feldstärken bis zu 21 Tesla erhältlich (SHARMA u. SHARMA 2007) und erlauben eine hohe räumliche Auflösung bis ca. 100  $\mu\text{m}$  (SANDHU et al. 2010) sowie einen exzellenten Weichteilkontrast auch bei kleinen Versuchstieren (Abbildung 2-4).



**Abbildung 2-4:** Vergleich eines **A)** klinischen MRT-Bildes des menschlichen Gehirns (Voxelgröße  $1 \times 1 \times 5 \text{ mm}^3$ ) und **B)** einer MRT-Aufnahme des Gehirns der Maus (Voxelgröße  $40 \times 40 \times 40 \mu\text{m}^3$ ). Die Größe des Gehirns der Maus relativ zum menschlichen Gehirn wird durch das weiße Rechteck (Pfeil) dargestellt. Ein Voxel im MRT-Bild des Gehirns der Maus ist 80.000 mal kleiner als ein Voxel im MRT-Bild des menschlichen Gehirns (aus MARONPOT et al. 2004). **C)** hochauflösende axiale T2-gewichtete *in vivo* Darstellung des zerebralen Kortex einer Maus (Voxelgröße  $40 \times 40 \times 300 \mu\text{m}^3$ ; 9,4T-MRT). In der MRT-

Aufnahme erkennbare Schichten (gelbe Linien) können entsprechenden histologisch definierten Schichten einer Nissl-Färbung (**D)** zugeordnet werden und zeigen Bereiche mit unterschiedlicher neuronaler Dichte (aus BORETIUS et al. 2009).

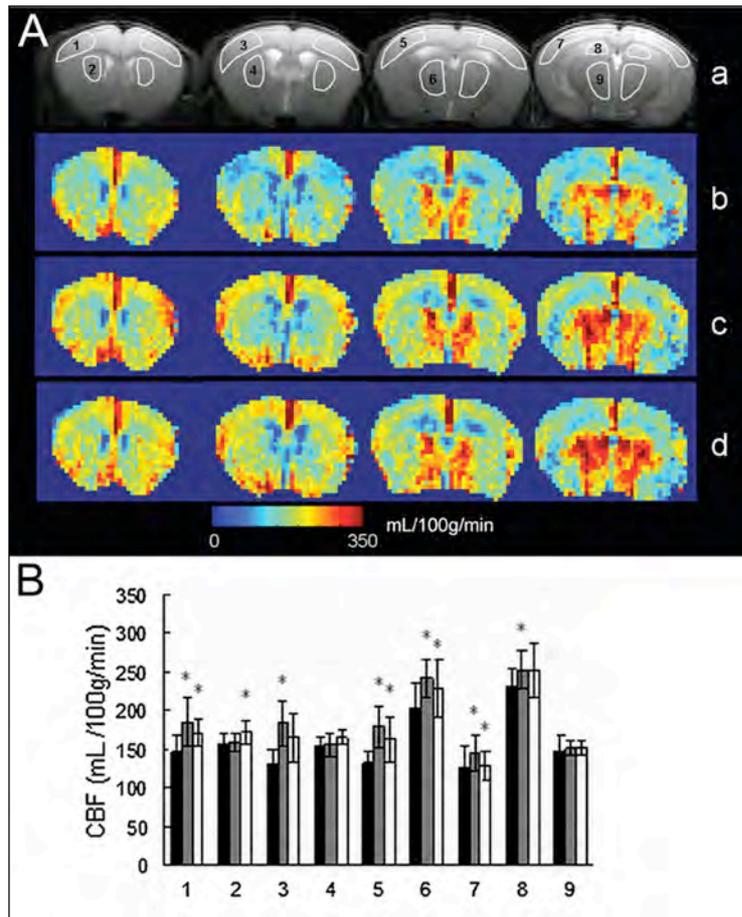
Durch die Vielfalt verfügbarer Sequenzen ist die MRT entsprechend vielseitig einsetzbar. Häufig erhobene Parameter sind Veränderungen in der Organmorphologie und -funktion unter normalen und pathologischen Bedingungen. Der zusätzliche Einsatz von Kontrastmittel hilft pathologische Prozesse, wie zum Beispiel Entzündungen (LARSSON et al. 2006; PROULX et al. 2007; MUSTAFI et al. 2010; WUERFEL et al. 2010) oder Tumorwachstum (Abbildung 2-5) und Tumorphysiologie (FARACE et al. 2011; PARTECKE et al. 2011), zu beschreiben und erlaubt Studien zur Organperfusion (HEILMANN et al. 2007; COOLEN et al. 2010; MAKOWSKI et al. 2010; TOMLINSON et al. 2010; ZHENG et al. 2010) (Abbildung 2-6). Mit der Entwicklung spezifischer Kontrastmittel wird zunehmend die Bildgebung auf molekularer Ebene möglich (KOO et al. 2006; DRIEHUYS et al. 2008; CHO et al. 2011; DHALIWAL et al. 2011).



**Abbildung 2-5:** Longitudinale MRT des Wachstums von Spontanmelanomen in einem Retransgenen Mausmodell. An einem 9,4T-MRT mittels atemgetriggelter T2-gewichteter Turbo-RARE Sequenz im Alter von 35 Tagen (**A, E**), 49 Tagen (**B, F**), 63 Tagen (**C, G**) und 77 Tagen (**D, H**) aufgenommene coronare (**A-D**) und axial rekonstruierte (**E-H**) Schichten zeigen das Tumorwachstum im Verlauf. Exemplarisch ist ein Tumor markiert (Pfeil). RARE = *rapid acquisition with relaxation enhancement*; (eigene noch unpublizierte Daten)

Die Einsatzgebiete der MRT in der präklinischen Bildgebung sind vielfältig, mögliche Beispiele sind die abdominelle Bildgebung (BROCKMANN et al. 2007) sowie die

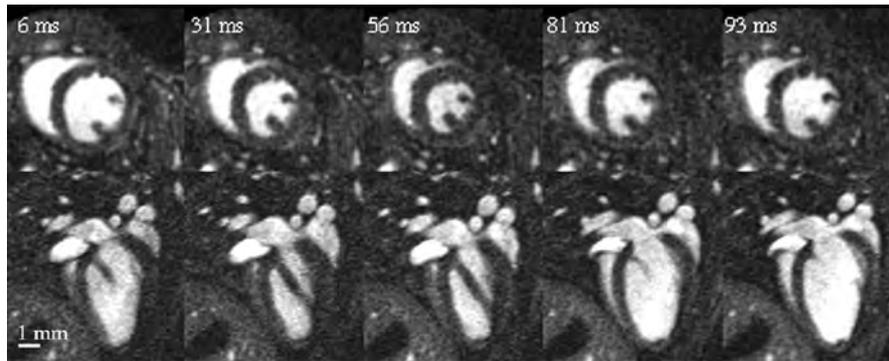
Gehirnbildgebung (BORETIUS et al. 2009), hierbei insbesondere Hirntumorstudien (ULMER et al. 2008) und Schlaganfallmodelle (CHEN et al. 2007; PHAM et al. 2011).



**Abbildung 2-6:** zerebrale Perfusionsbildgebung in der Maus, durchgeführt an einem 9,4T-MRT. **A)** **a)** anatomische T2-gewichtete Bilder zur Festlegung der ROIs: 1 = frontaler Kortex; 2,4 = Putamen caudatus; 3,5,7 = sensorischer Kortex; 6,8 = Thalamus; 9 = Hippocampus; **b-d)** aus einer kbGRASE-FAIR-Sequenz berechnete CBF (zerebraler Blutfluss)-Karten unter 1,2% Isofluran mit 100% Luft **(b)**, 1,2% Isofluran mit einem Gasgemisch bestehend aus 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luft **(c)** und 1,8% Isofluran mit 100% Luft **(d)**. Es zeigt sich, dass sowohl durch Hyperkapnie als auch durch eine höhere Isofluran-Konzentration die gesamte Durchblutung des

Gehirns, insbesondere der kortikalen Bereiche, erhöht wird. **B)** gemittelte CBF-Werte (n=5; \* symbolisiert p<0,05) der unter **Aa** eingezeichneten ROIs unter folgenden Bedingungen: 1,2% Isofluran mit Normoxie (schwarz); 1,2% Isofluran mit Hyperkapnie (grau) und 1,8% Isofluran mit Normoxie (weiß). Die ROIs beider Hemisphären wurden gemittelt. kbGRASE-FAIR = *k-space-banded gradient-and-spin-echo flow-sensitive alternating inversion recovery*; (aus ZHENG et al. 2010)

Eine der größten Herausforderungen bei der *in vivo* MRT von Mäusen und Ratten stellt aufgrund der geringen Größe und der hochfrequenten Bewegung die Herzbildgebung (BUCHOLZ et al. 2008; DRIEHUYS et al. 2008) dar (Abbildung 2-7). Die Lungenbildgebung ist, bedingt durch die ständige Bewegung und die fehlende Signalquelle (Wasserstoffprotonen), ebenfalls schwierig (DRIEHUYS et al. 2008).



**Abbildung 2-7:** Vierdimensionale MRT des Herzens der Maus. Die an einem 7T-MRT unter Verwendung eines liposomalen gadoliniumhaltigen Kontrastmittels akquirierten Bilder zeigen verschiedene Herzphasen. Dargestellt sind 5 repräsentative Herzphasen im Querschnitt (obere Reihe) und im Längsschnitt (untere Reihe). Voxelgröße: isotrop 87  $\mu\text{m}$ ; Untersuchungszeit: 31 Minuten; (aus BUCHOLZ et al. 2008)

Neben dem exzellenten Weichteilkontrast und der Vielfalt an möglichen Informationen ist bei der MRT vorteilhaft, dass keine Strahlenexposition auftritt und dass die MRT kein Tiefenlimit hat (GRIMM u. WUNDER 2005).

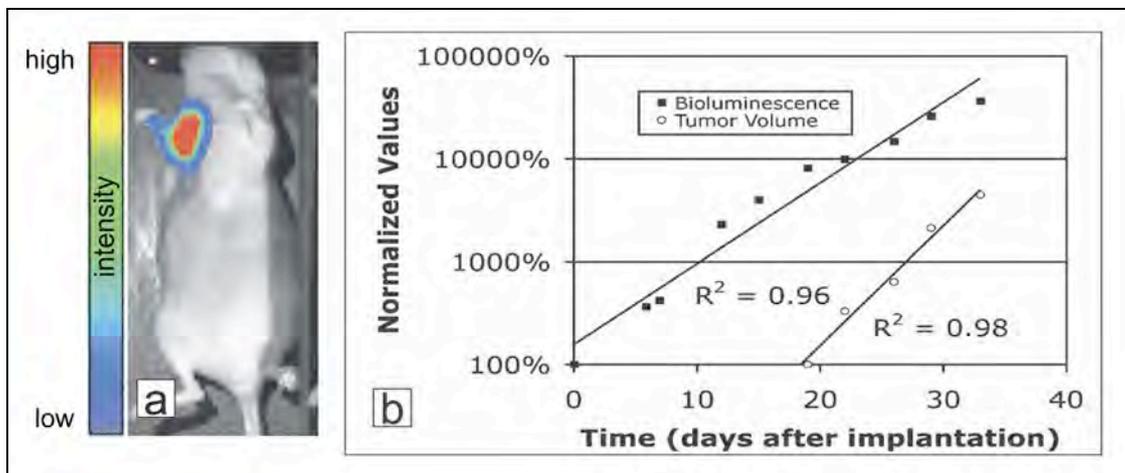
Nachteilig bei der MRT sind die relativ langen Untersuchungszeiten, die hohen Kosten (SANDHU et al. 2010) sowie Artefakte durch Metallobjekte.

### 2.1.3 Optische Bildgebungsverfahren

Das zugrunde liegende Prinzip optischer Bildgebungsverfahren ist die Detektion von einem Untersuchungsobjekt ausgesendeter Photonen mittels hochempfindlicher CCD (*charge coupled device*)-Kameras (KAGADIS et al. 2010). Optische Bildgebungsverfahren lassen sich in fluoreszenzoptische Verfahren und in Verfahren, die auf Biolumineszenz beruhen, unterteilen (GRIMM u. WUNDER 2005).

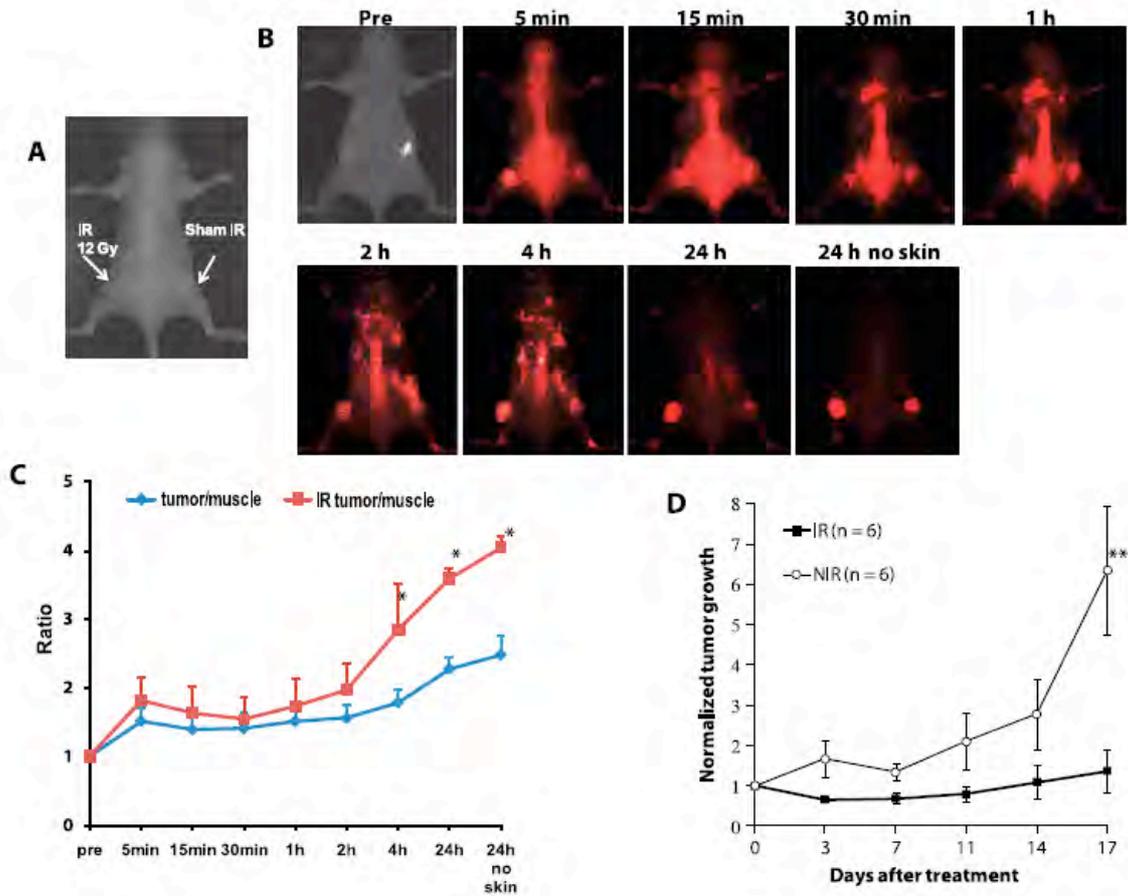
Die **Biolumineszenz- Bildgebung** (BLI, *bioluminescence imaging*) (Abbildung 2-8) nutzt einen z.B. in der Natur bei Glühwürmchen vorkommenden Prozess, bei welchem das Enzym Luciferase sein Substrat Luciferin unter Emission von Licht oxidiert. Um diesen Effekt für die Bildgebung nutzen zu können, müssen die zu untersuchenden Zellen mit dem Luciferase-Gen transfiziert sein und dem Tier vor der Untersuchung Luciferin appliziert werden (GRIMM u. WUNDER 2005). Aufgrund dieser Problematik wird die BLI vorerst auf tierexperimentelle Systeme beschränkt bleiben, ein Einsatz in der Humanmedizin gilt als unwahrscheinlich, zumal auch

tieferliegende Strukturen beim Menschen aufgrund der Absorption der Photonen derzeit nicht darstellbar wären. In der präklinischen Bildgebung ist jedoch eine rapide Zunahme des Einsatzes dieser bildgebenden Methode zu verzeichnen (ZINN et al. 2008).



**Abbildung 2-8: A)** Biolumineszenz-Bildgebung einer Maus 7 Tage nach Implantation von Luciferase-positiven Tumorzellen in das Brustfettpolster. **B)** vergleichende graphische Darstellung (basierend auf den Daten von 5 Mäusen) der Biolumineszenz-Bildgebung und der Tumolvolumen-Messung mit Hilfe eines Messschiebers. Die Daten der Bildgebung und die Volumen-Messungen wurden auf die Anfangswerte für jede Maus normiert und beginnen daher bei 100%. Die Ergebnisse verdeutlichen die hohe Sensitivität der Biolumineszenz-Bildgebung. Die BLI ermöglicht die Detektion der Luciferase-positiven Tumorzellen direkt nach der Implantation, knapp 3 Wochen bevor der Tumor visuell erkannt und vermessen werden kann. (aus ZINN et al. 2008)

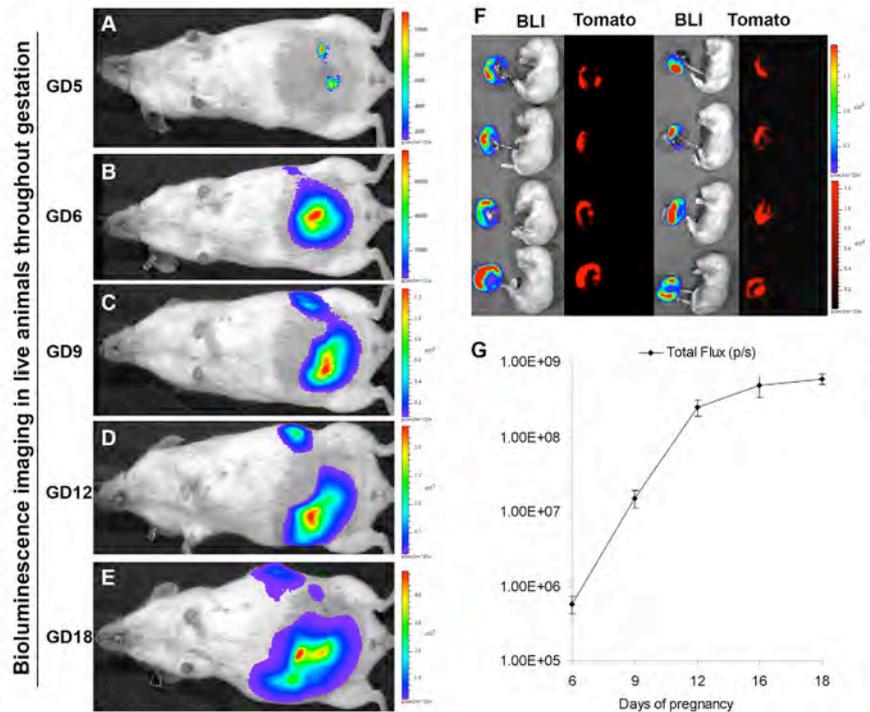
Bei der **fluoreszenzoptischen Bildgebung** (FLI, *fluorescence imaging*) (Abbildung 2-9) wird ein Fluorochrom (Fluoreszenzfarbstoff) durch Absorption eines Photons angeregt und gibt bei der Rückkehr in den Grundzustand ein Photon mit längerer Wellenlänge ab (SANDHU et al. 2010). Vorteilhaft bei der FLI ist, dass der simultane Einsatz mehrerer Fluorochrome möglich ist (GRIMM u. WUNDER 2005).



**Abbildung 2-9:** Fluoreszenzoptische *in vivo* Bildgebung von Phosphatidylserin (PS) in Gliomen vor und nach Bestrahlung. PS kommt normalerweise intrazellulär vor, wird aber auch im Gefäßendothel von Tumorzellen exprimiert. Des Weiteren wird es von Tumorzellen, die auf eine Therapie ansprechen, exprimiert. **A)** Maus mit subkutanen Gliomen gleicher Größe an beiden Oberschenkeln. Der Tumor der linken Seite wird mit 12 Gy bestrahlt. **B)** 24 Stunden nach Bestrahlung wird der Maus ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff im Nahinfrarotbereich (700 bis 900 nm) markierter monoklonaler Antikörper, der an PS bindet, intravenös über die Schwanzvene injiziert. Im Anschluss daran wird eine Reihe von Fluoreszenz-Bildern zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen. Die Bilder zeigen einen gut erkennbaren Kontrast des unbestrahlten Tumors (PS-Expression im Gefäßendothel der Tumorzellen), der 24 Stunden post inj. sein Maximum erreicht. Im bestrahlten Tumor ist der Kontrast jedoch deutlich höher (Therapieantwort des Tumors). **C)** Die graphische Darstellung des Zeitverlaufs zeigt eine maximale TNR (*tumor-to-normal tissue ratio*) für nicht bestrahlte Tumoren von 2,5 nach 24 Stunden (n=4; blaue Linie). Die Bestrahlung erhöht die TNR auf 4,0 nach 24 Stunden (n=4; rote Linie). **D)** Die Tumorwachstumskurven zeigen, dass eine einmalige Bestrahlung mit 12 Gy das Tumorwachstum im Vergleich zu nicht bestrahlten Tumoren (NIR; n=6; \*\* p<0,01) signifikant hemmt (IR; n=6). (aus ZHAO et al. 2011)

Optische Bildgebungsverfahren eignen sich insbesondere für die molekulare Bildgebung (ZINN et al. 2008), da sie vielfältige Möglichkeiten bieten molekulare Zielstrukturen spezifisch zu markieren und diese hoch sensitiv zu detektieren

(Abbildung 2-9) (HASSAN u. KLAUNBERG 2004; LUKER u. LUKER 2008). Anwendungen hierbei sind das *cell tracking* oder die Visualisierung der Genexpression *in vivo* (Abbildung 2-10) (GRIMM u. WUNDER 2005; KAGADIS et al. 2010). Ein weiteres zunehmend relevantes Einsatzgebiet ist die Tumorbildgebung (Abbildungen 2-8 und 2-9) (ZINN et al. 2008; SANDHU et al. 2010).



**Abbildung 2-10:** Nicht-invasives *in vivo* Monitoring plazentaspezifischer Genexpression mittels Biolumineszenzbildgebung. Dargestellt ist die Trophoblasten-spezifische Luciferase-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der Trächtigkeit. Die Blastozysten wurden vor der Implantation mit Luciferase-exprimierendem Lentivirus und Tomato-fluoreszierendem Fusionsprotein transduziert. **A-E)** schwarz-weiß Fotos der Maus und darübergelegte Biolumineszenzbilder (Falschfarben-Kodierung: blau - geringe Intensität; rot - hohe Intensität); von implantierten Blastozysten emittierte Photonen können schon ab Tag 5 der Trächtigkeit detektiert werden (**A**). **F)** Plazentaspezifische Luciferase-Expression (Biolumineszenz-Bildgebung) und Tomato-Expression (fluoreszenzoptische Bildgebung) an Tag 18 der Trächtigkeit. Auffällig ist, dass die zugehörigen Feten sowohl Luciferase- als auch Tomato-negativ sind, was darauf hinweist, dass die virale Transduktion Trophoblasten-spezifisch ist. **G)** Gesamtphotonenfluss über den Bauchbereich in verschiedenen Stadien der Trächtigkeit. Es ist eine exponentielle Zunahme der Signalintensität von Tag 6 bis Tag 12 der Trächtigkeit erkennbar. Die hier gezeigten Ergebnisse sind eine erste *proof-of-principle*-Studie und beweisen die Durchführbarkeit der quantitativen Analyse der Genexpression in der Plazenta während der Trächtigkeit mittels *in vivo* Bildgebung. Die Methode bietet eine Vielzahl weiterer Anwendungsmöglichkeiten bezüglich Trophoblasten-spezifischer Gen-Manipulationen *in utero*, einschließlich der Untersuchung von Protein-Funktionen. (aus FAN et al. 2011)

Ein wesentlicher Vorteil optischer Bildgebungsverfahren ist die hohe Sensitivität, mit welcher Konzentrationen im pico- bis femtomolaren Bereich detektiert werden können (SANDHU et al. 2010). Die BLI ist im Vergleich zur FLI noch sensitiver, da ein Hintergrundsignal fehlt (KOO et al. 2006; GRASSI et al. 2009). Des Weiteren ist die optische Bildgebung effizient, relativ kostengünstig, vielseitig einsetzbar und zudem schnell, was eine Darstellung in Echtzeit ermöglicht (ZINN et al. 2008; GRASSI et al. 2009). Vorteilhaft ist ebenfalls der Verzicht auf ionisierende Strahlung (KOO et al. 2006; GRASSI et al. 2009).

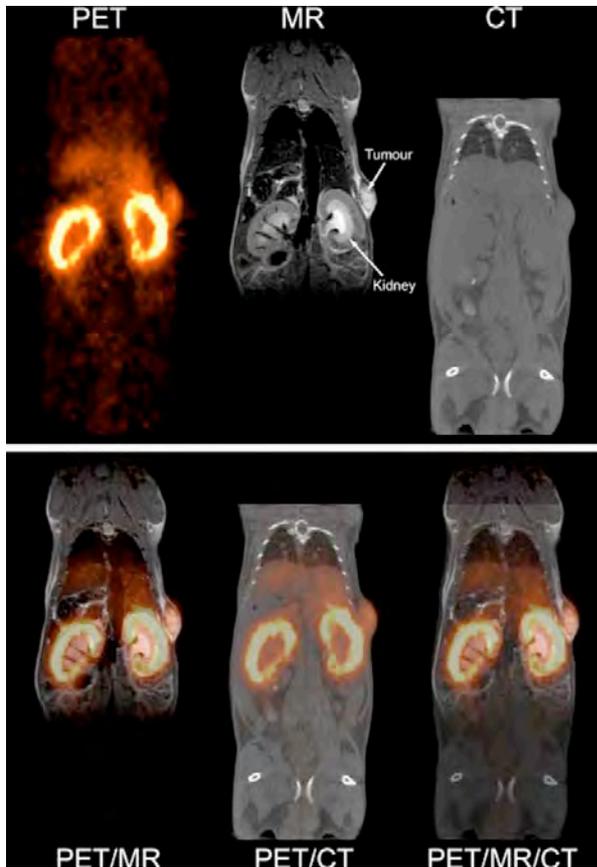
Nachteilig ist jedoch, dass diese Verfahren oberflächengewichtet sind und durch ein Tiefenlimit und die relativ geringe räumliche Auflösung beschränkt sind (GRIMM u. WUNDER 2005). Daher eignen sich BLI und FLI am besten für die Bildgebung kleiner Labortiere. Da optische Bildgebungsverfahren nur beschränkte Informationen auf anatomisch-morphologischer Ebene liefern, ist eine Kombination mit CT, MRT (GRIMM u. WUNDER 2005) oder Röntgen sinnvoll (ZINN et al. 2008; SANDHU et al. 2010). Ein weiterer Nachteil der fluoreszenzoptischen Bildgebung ist die begrenzte Möglichkeit der Anregung, d.h. es ist nur eine begrenzte Anzahl von Anregungs- und Emissionszyklen möglich, bevor die Fluorophor-Moleküle durch das Anregungslicht photochemisch zerstört werden und damit ihre Fähigkeit zur Fluoreszenz verlieren (sog. Photobleichung, *Photobleaching*).

### 2.1.4 Nuklearmedizinische Bildgebungsverfahren

Bei nuklearmedizinischen Bildgebungsverfahren wird dem zu untersuchenden Organismus ein Radionuklid injiziert. Das Radionuklid verteilt sich im Körper und reichert sich in Abhängigkeit vom gewählten Radionuklid und der Kopplung an verschiedene Substanzen in bestimmten Zielgebieten an.

Die **PET** (*Positron Emission Tomography*, Positronen-Emissions-Tomographie) (Abbildung 2-11) verwendet Radionuklide, die unter Emission von Positronen zerfallen. Bei der Wechselwirkung eines Positrons mit einem Elektron im Körper werden 2 Gammaquanten (hochenergetische Photonen) gleicher Energie (immer 511 keV) in genau entgegengesetzter Richtung ausgesandt und von zwei sich gegenüberliegenden Detektoren registriert (KAGADIS et al. 2010; SANDHU et al. 2010). Aus der zeitlichen und räumlichen Verteilung dieser detektierten

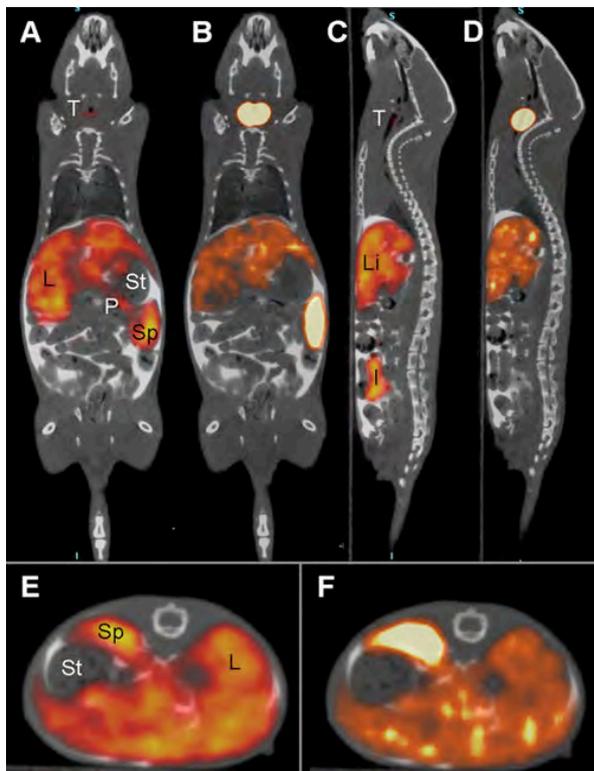
Zerfallsereignisse wird auf die räumliche Verteilung des Radiopharmakons im Körper geschlossen und ein dreidimensionaler Datensatz rekonstruiert. PET-Nuklide haben meist eine sehr kurze Halbwertszeit. Dies hält die Strahlenbelastung gering und ermöglicht wiederholte Experimente in kurzer Zeitfolge (GRIMM u. WUNDER 2005).



**Abbildung 2-11:** Fusion von hochsensitiven funktionellen PET-Bildern mit hochauflösenden morphologischen CT- bzw. MR-Bildern. In der oberen Reihe sind Bilder der einzelnen Modalitäten PET, MR und CT dargestellt. Die hier gezeigten Bilder einer Maus wurden nach Injektion eines  $^{64}\text{Cu}$ -markierten monoklonalen Antikörpers akquiriert. Im PET-Bild sind deutlich die hohe Antikörper-Clearance durch die Nieren und eine geringe Traceraufnahme im Tumor zu erkennen. Die fusionierten Bilder der unteren Reihe verdeutlichen den besseren Weichteilkontrast der PET/MR im Vergleich zur PET/CT. (aus WEHRL et al. 2009)

Bei der **SPECT** (*Single Photon Emission Computed Tomography*, Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie) kommen Radioisotope zur Anwendung, die unter Emission von Gammaquanten mit spezifischer Energie zerfallen. Die emittierten hochenergetischen Photonen werden mittels einer oder mehrerer Gammakameras aus verschiedenen Projektionen detektiert. Diese zweidimensionalen Projektionen werden verwendet, um einen dreidimensionalen Datensatz zu generieren (SANDHU et al. 2010). SPECT-Isotope haben eine relativ lange Halbwertszeit, wodurch sie kostengünstiger und einfacher in der Handhabung sind (GRIMM u. WUNDER 2005). Da sich SPECT-Nuklide anhand ihres Spektrums unterscheiden lassen, können verschiedene Isotope gleichzeitig eingesetzt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Arbeit von Wall et al. (2011), in welcher die Amyloidose bei Mäusen mit Hilfe von zwei verschiedenen, radioaktiv markierten Amyloid Bestandteilen gleichzeitig

dargestellt wird, um einen optimalen Marker zur Amyloid-Darstellung zu finden (Abbildung 2-12).



**Abbildung 2-12:** *Dual-Isotope SPECT/CT.* Mäusen mit AA-Amyloidose werden  $^{125}\text{I}$ -markiertes SAP (Serum-Amyloid P) und  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markiertes Peptid p5 injiziert, anschließend wird die Bioverteilung mittels *dual-isotope SPECT/CT* quantitativ ermittelt. Zusätzlich war den Mäusen zuvor für einen besseren CT-Weichteilkontrast ein CT-Kontrastmittel i.p. injiziert worden. Dargestellt sind die SPECT/CT-Bilder der  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Peptid p5- (**A, C und E**) und der  $^{125}\text{I}$ -SAP-Anreicherung (**B, D und F**). Die Ergebnisse zeigen, dass sich  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Peptid p5 vor allem in Leber (L), Milz (Sp), Pankreas (P) und im Darm (I) anreichert, in Magen und Schilddrüse kann keine Aktivität beobachtet werden.  $^{125}\text{I}$ -SAP reichert sich in der Leber und vor allem in der Milz an. Die starke Anreicherung in der Schilddrüse (T) resultiert aus

freiem  $^{125}\text{I}$  welches durch den  $^{125}\text{I}$ -SAP-Abbau in der Leber freigesetzt wird. (aus WALL et al. 2011)

Die PET wurde in den 60er Jahren entwickelt (HUTCHINS et al. 2008). Das Verfahren der SPECT wurde schon früher entwickelt, im klinischen Einsatz befindet sie sich seit 30 Jahren und ist somit die älteste klinische molekulare Bildgebungsmethode (KAGADIS et al. 2010). In den letzten 10 Jahren ist eine zunehmende Entwicklung spezieller SPECT- und PET-Systeme für die Bildgebung kleiner Labortiere zu verzeichnen (FRANC et al. 2008).

Nuklearmedizinische Bildgebungsmethoden eignen sich besonders für die Bildgebung auf molekularer Ebene. Verschiedenste Liganden, die *in vivo* spezifisch an molekulare Zielstrukturen binden, können mit einer Vielzahl zur Verfügung stehender Radioisotope markiert werden. Ihre Verteilung kann so *in vivo* verfolgt werden (GRIMM u. WUNDER 2005; SANDHU et al. 2010). Sie sind daher für die Entwicklung neuer Pharmaka von Relevanz. Die dynamische Datenerhebung erlaubt die genaue Beschreibung der Pharmakodynamik und -kinetik eines neuen Agens (FRANC et al. 2008; SANDHU et al. 2010). So wurde z.B. von Tsai und Mitarbeitern (2011) in einem Mausmodell mit peritonealen Metastasen die Bioverteilung und die Pharmakokinetik von radioaktiv markierten Nanoliposomen mittels SPECT/CT

bestimmt. Weitere mögliche Anwendungsgebiete nuklearmedizinischer Bildgebungsmethoden sind die Untersuchung von Genexpression und das sogenannte *cell tracking* (GRIMM u. WUNDER 2005; KAGADIS et al. 2010). Ein Beispiel hierfür ist die von Fischer et al. (2011) mittels PET/MR durchgeführte Quantifizierung der striatalen Dopamin-D2-Rezeptor-Expression bei Mäusen. Weitere Einsatzgebiete der PET und SPECT in der präklinischen Bildgebung sind die Onkologie, Kardiologie und die Neurologie (FRANC et al. 2008; SANDHU et al. 2010). Ein mögliches Anwendungsgebiet der PET in der Onkologie ist z.B. die von Lieberman und Mitarbeitern (2011) an einem Mausmodell durchgeführte Tumorbildgebung mittels radioaktiv markiertem Glutamin. Glutamin eignet sich gut zur Tumordarstellung, da es den Tumorzellen als Energiequelle dient und daher von diesen aufgenommen wird. Eine andere Möglichkeit der Tumorbildgebung ist die Darstellung von tumorspezifischem Membran-Antigen. So führen Alt et al. (2010) PET/CTs bzw. PET/MRTs zur Darstellung von Prostatatumoren bei Mäusen durch. Hierfür verwenden sie  $^{64}\text{Cu}$ -markierte Antikörper gegen ein tumorspezifisches Membran-Antigen (*prostate specific membrane antigen*). Die Darstellung von tumorspezifischem Membran-Antigen ist ein besonders vielversprechender Ansatz, da diese ein ideales Ziel für diagnostische und therapeutische Strategien darstellen. Des Weiteren eignen sich nuklearmedizinische Bildgebungsmethoden zum Einsatz in der Kardiologie. So wurden von Büscher und Mitarbeiter (2010) an einem Herzinfarkt-Mausmodell Untersuchungen zum Metabolismus und zur Funktion des Herzens mit Hilfe der PET/MR durchgeführt.

Nuklearmedizinische Bildgebungsmethoden sind vor allem für die Bildgebung auf zellulärer bzw. molekularer Ebene von Vorteil, da eine Vielzahl geeigneter Markierungstechniken und Radioisotope zur Markierung von Liganden oder Zellen zur Verfügung stehen (GRIMM u. WUNDER 2005). Auch hier ist ähnlich wie bei der FLI und BLI eine hohe Sensitivität vorhanden, wobei Tracerkonzentrationen im pico- bis nanomolekularen Bereich detektiert werden können. Die PET ist dabei bis zu hundertfach sensitiver als die SPECT, da bei der PET keine Kollimatoren notwendig sind (KAGADIS et al. 2010). Vorteilhaft ist die Möglichkeit der Quantifizierung, sowie dass die nuklearmedizinischen Verfahren im Vergleich zur optischen Bildgebung kein Tiefenlimit haben und tomographisch darstellbar sind (GRIMM u. WUNDER 2005).

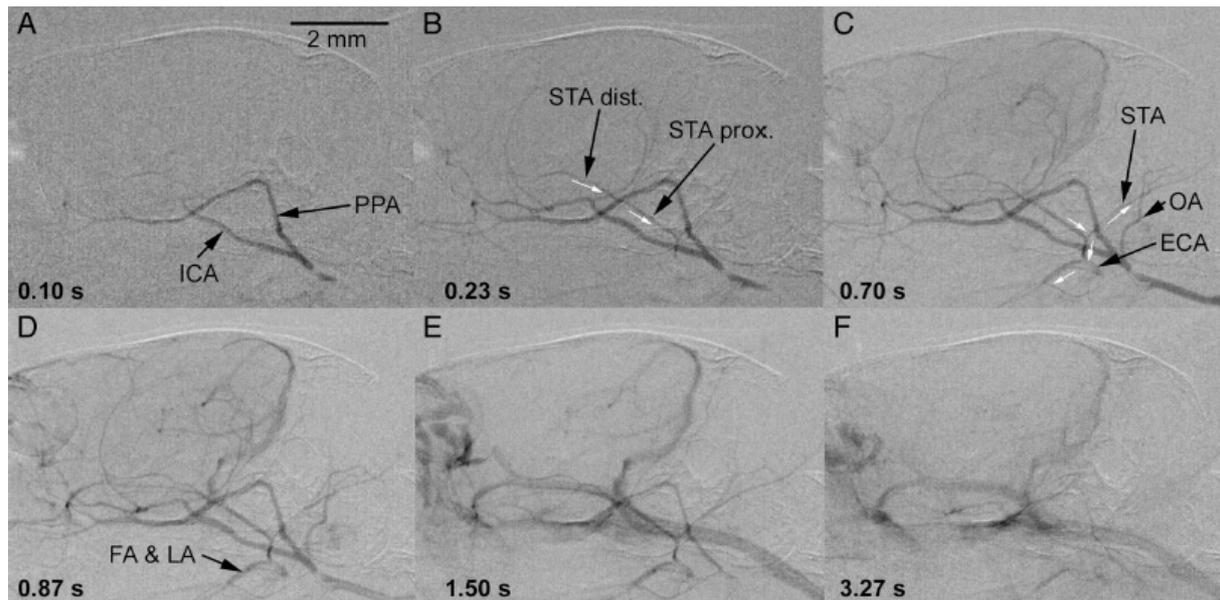
Nachteilig bei nuklearmedizinischen Verfahren sind der hohe Aufwand, die hohen Kosten und die Strahlenbelastung. Der Hauptnachteil der PET und SPECT liegt jedoch in der geringen räumlichen Auflösung (PET: 1-2 mm, SPECT: ca. 0,5 mm) (SANDHU et al. 2010). Daher ist die Kombination mit hochaufgelösten CT- oder MRT-Daten (z.B. PET-CT, PET-MRT etc.) sinnvoll, aber technisch anspruchsvoll und teuer. Auf diese Weise können die Stärken der unterschiedlichen Modalitäten (PET, SPECT: hohe Sensitivität, Vielfalt an funktionellen Informationen; CT, MRT: hohe Auflösung auf anatomisch-morphologischer Ebene) in idealer Weise kombiniert werden. Die in den letzten Jahren zunehmend sich entwickelnde PET- bzw. SPECT-MRT (WEHRL et al. 2009) hat im Vergleich zur PET-CT bzw. SPECT-CT den Vorteil, dass sie nicht nur hochaufgelöste anatomische Bilder, sondern auch eine Menge an funktionellen Parametern und einen guten Weichteilkontrast bietet (Abbildung 2-11). Zum anderen wird bei der MRT im Vergleich zur CT keine ionisierende Strahlung eingesetzt, eine zusätzliche Strahlenbelastung wird daher vermieden.

### **2.1.5 Röntgenstrahlenbasierte Verfahren**

Die einfachste Methode der röntgenstrahlenbasierten Bildgebung ist das konventionelle Röntgen. Hierbei wird das Objekt von einer Röntgenquelle durchleuchtet und auf einem Röntgenfilm abgebildet. Kontrastunterschiede beruhen auf unterschiedlichen Absorptionswerten der unterschiedlich dichten bzw. dicken Gewebe. In der präklinischen Bildgebung wird das Röntgen als bildgebendes Verfahren kaum eingesetzt (FRATZL et al. 1996). Häufiger hingegen wird die Röntgenstrahlung bei Versuchstieren zur experimentellen Strahlentherapie eingesetzt (QI et al. 1991).

Ein weiteres in der Klinik routinemäßig eingesetztes zweidimensionales röntgenstrahlenbasiertes Verfahren zur Gefäßdarstellung ist die digitale Subtraktionsangiographie (DSA) (BADEA et al. 2008a). Diese Methode findet zunehmend auch in der präklinischen Bildgebung Einsatz (KOBAYASHI et al. 2004; BADEA et al. 2006; LIN et al. 2006; SCHAMBACH et al. 2010b; FIGUEIREDO et al. 2011). Die DSA (Abbildung 2-13) basiert auf einer Bildakquisition vor und während Kontrastmittelinjektion, wobei die frühen Bilder ohne Kontrastmittel von den Aufnahmen unter Kontrastmittelperfusion subtrahiert werden. Letztlich werden nur

noch die kontrastierten Strukturen mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung bei gleichzeitig hohem Gefäßkontrast dargestellt (BADEA et al. 2008a). Das Potential dieser Methode liegt in der Einfachheit ihrer Anwendung sowie der hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung. Mittlerweile ist auch die tomographische DSA (TDSA) (BADEA et al. 2007a) sowie die Kombination aus DSA und Mikro-CT, welche die funktionellen Daten der DSA mit den morphologischen Informationen der CT kombiniert (BADEA et al. 2006), bei Versuchstieren möglich.



**Abbildung 2-13:** Zerebrale DSA einer Maus *in vivo* (laterale Projektion). Die Verwendung eines Kegelstrahl-Mikro-CTs ermöglicht die hohe zeitliche und räumliche Auflösung. Die DSA (30 Bilder pro Sekunde) wird während intraarterieller Injektion eines Bolus von 33  $\mu$ l Kontrastmittel (1,980 ml/min) über einen Katheter in der Arteria carotis externa (ECA) durchgeführt. Die Bildfolge zeigt die arterielle Frühphase (**A, B**), die beginnende venöse Phase (**C**) sowie die venöse Phase (**D, E, F**). Trotz Ligatur der ECA ist eine Kontrastierung der distalen ECA und ihrer Äste über einen retrograden Blutfluss (weiße Pfeile) in der STA (A. temporalis superficialis) zu beobachten. Der retrograde Blutfluss wird wahrscheinlich durch extrakranielle Kollaterale zwischen der A. pterygopalatina (PPA) und der STA verursacht. OA - A. occipitals, LA - A. lingualis, FA - A. facialis, ICA - A. carotis interna; (aus FIGUEIREDO et al. 2012)

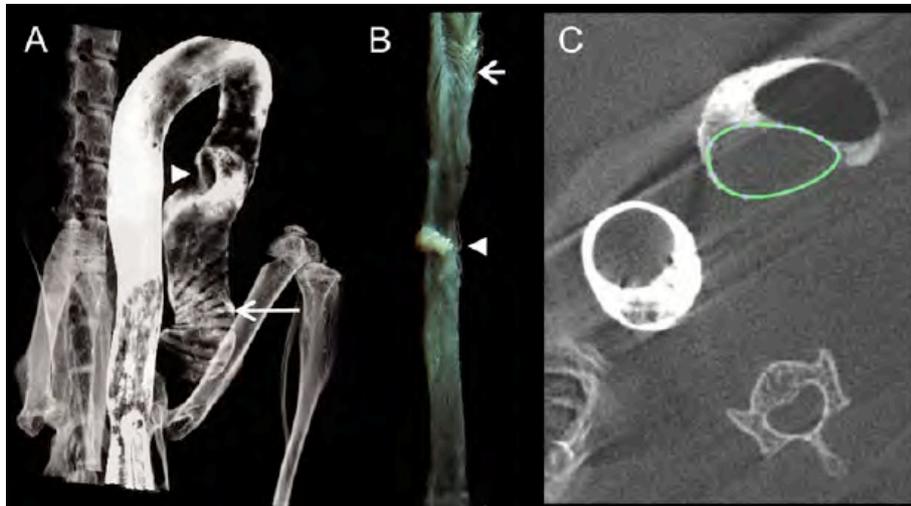
Moderne Hybrid-Verfahren wie PET-CT und SPECT-CT sind ebenfalls zu röntgenstrahlenbasierten Bildgebungsmethoden zu zählen, wurden jedoch schon unter 2.1.4 kurz erläutert und werden daher an dieser Stelle nicht näher behandelt.

## **Computertomographie**

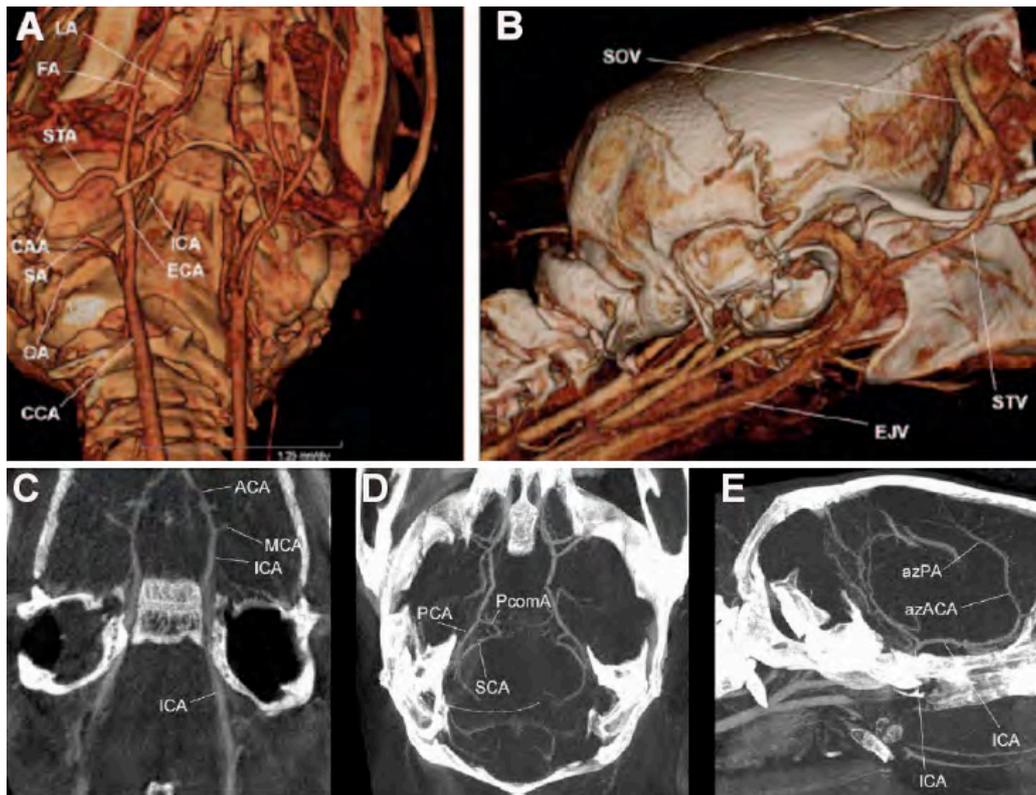
Als dreidimensionale röntgenstrahlenbasierte Technik beruht die Computertomographie auf der unterschiedlichen Röntgenstrahlenabsorption der unterschiedlichen Gewebe (BALABAN u. HAMPSHIRE 2001). Die von einer Röntgenröhre produzierten Röntgenstrahlen durchdringen das zu untersuchende Objekt. Das Dichteprofil des Objektes wird auf einem 2D-Detektor abgebildet. Aus einer Reihe von 2D-Projektionen aus verschiedenen Winkeln wird mit Hilfe der computergestützten Rekonstruktion (meist eine gefilterte Rückprojektion) ein 3D-Datensatz generiert (BADEA et al. 2008a). Die Einführung der Computertomographie in die Klinik erfolgt in den frühen 70er-Jahren. Klinische Geräte erreichen derzeit eine Auflösung von ca. 500  $\mu\text{m}$  (BAG et al. 2010). Da für eine adäquate Bildgebung bei kleinen Labornagern aufgrund der geringen Größe jedoch deutlich höhere Auflösungen benötigt werden, sind hierfür Mikro-CTs besser geeignet. Erste Mikro-CTs werden Anfang der 80er-Jahre entwickelt. Ein zunehmendes Interesse an präklinischer experimenteller Bildgebung führt in den frühen 90er-Jahren zur Entwicklung der ersten speziell für die Bildgebung bei kleinen Labortieren entwickelten Mikro-CTs (BAG et al. 2010). Diese haben das gleiche zugrunde liegende physikalische Prinzip wie klinische Scanner, erreichen jedoch eine höhere Auflösung bis zu theoretisch 1  $\mu\text{m}$  (RITMAN 2004).

Da die Mikro-CT eine hervorragende Auflösung, aber einen relativ schwachen Weichteilkontrast bietet, beziehen sich frühe Publikationen vor allem auf die Darstellung von Hochkontrastobjekten, wie z.B. knöcherne Strukturen (ENGELKE et al. 1993; RUEGSEGGER et al. 1996; BAG et al. 2010). Aufgrund des guten Kontrastunterschiedes zwischen Luft und Gewebe ist die Mikro-CT prinzipiell auch gut für die Lungenbildgebung geeignet (GUERRERO et al. 2007; SHOFER et al. 2007), was jedoch durch die geringe Größe und durch die schnelle Atmung bei Maus und Ratte erschwert wird (BADEA et al. 2008a). Mit der Einführung neuer Kontrastmittel und der technischen Weiterentwicklung der Mikro-CTs kann der Einsatz auch auf die *in vivo* Bildgebung von Weichteilgeweben, z.B. für onkologische Fragestellungen (Abbildung 2-14) (CODY et al. 2005; KINDLMANN et al. 2005; ALMAJDUB et al. 2007; GRAHAM et al. 2008; BOLL et al. 2011a), und auf die kardiale und vaskuläre Bildgebung (Abbildung 2-15) ausgeweitet werden, wobei die Herzbildgebung bei Mäusen und Ratten bedingt durch die schnelle Herzfrequenz den

Einsatz einer Gatingtechnik erfordert (BADEA et al. 2007b; BARTLING et al. 2007; DRANGOVA et al. 2007; BAG et al. 2010). Der zunehmende Einsatz der Mikro-CT in der präklinischen Bildgebung spiegelt sich in den steigenden Publikationszahlen der letzten Jahre wieder (SCHAMBACH et al. 2010b).



**Abbildung 2-14:** Virtuelle *in vivo* Koloskopie in einer C57BL/6-Apc<Min> Maus. Die Mikro-CT-Untersuchung (40 Sekunden Scanzeit, 190° Rotation, 1200 Projektionen) wird während eines Atemstopps und mittels einer Doppelkontrast-Technik (Bariumsulfat, Luft) durchgeführt. **A)** Maximum-Intensitäts-Projektion des Kolons mit guter Abgrenzbarkeit des Kolonpolypen (Pfeilspitze). Die ausgeprägte Fältelung des proximalen Kolons (Pfeil) ist ebenfalls gut erkennbar. **B)** Die Untersuchung des *post mortem* explantierten und aufgeschnittenen Kolons zeigt den bereits in der Bildgebung dargestellten Polypen (Pfeilspitze) sowie die Fältelung des proximalen Kolons (Pfeil). **C)** Die transversale Schichtdarstellung des Kolonpolypen ermöglicht volumetrische Messungen. (aus BOLL et al. 2011a)



**Abbildung 2-15:** *In vivo* Mikro-CT-Angiographie der kraniozervikalen Gefäße der Maus. **A** und **B**) *Volume-Rendering*-Darstellung der zervikalen Arterien (**A**) und Venen (**B**) (caudorostrale Sicht). Die A. carotis communis (CCA) teilt sich in die A. carotis interna (ICA) und die A. carotis externa (ECA). Die A. stapedis (SA) entspringt proximal aus der ICA. Die A. occipitalis (OA) und die A. lingualis (LA) entspringen aus der proximalen ECA. Die ECA teilt sich in die A. temporalis superficialis (STA) und die A. facialis (FA). Die STA gibt die A. auricularis caudalis (CAA) ab. **B**) große drainierende extrakranielle Venen (SOV - V. supraorbitalis; STV - V. temporalis superficialis). **C**) Maximum-Intensitäts-Projektion (MIP) des Circulus Willisii (ACA - A. cerebri anterior; MCA - A. cerebri media; ICA - A. carotis interna). **D**) Darstellung der Gefäße des hinteren Gefäßkreislaufes (PcomA - A. communicans posterior; PCA - A. cerebri posterior; SCA - A. cerebelli superior). **E**) Sagittale MIP der Hirngefäße der Maus (azACA - azygos ACA; azPA - azygos A. pericallosa). Die kleinsten darstellbaren Gefäße gehen aus der azPA nach kranial ab und haben einen Durchmesser von ca. 50  $\mu\text{m}$ . Die Aufnahmen entstanden nach intravenöser Bolusinjektion von 350  $\mu\text{l}$  eines jodhaltigen Kontrastmittels (Imeron 300). Untersuchungsdauer 40 Sekunden; 180° Rotation; 22  $\mu\text{m}$  isotrope Voxelgröße in den rekonstruierten Schichten; (aus SCHAMBACH et al. 2009)

Vorteile der Mikro-CT liegen in der hohen räumlichen Auflösung (bis 1  $\mu\text{m}$ ) (RITMAN 2004), des Weiteren hat die Computertomographie kein Tiefenlimit und erlaubt eine dreidimensionale Rekonstruktion von Objekten (GRIMM u. WUNDER 2005). Im Vergleich zu anderen Modalitäten sind röntgenstrahlenbasierte Methoden meist schneller und kostengünstiger (BADEA et al. 2008a).

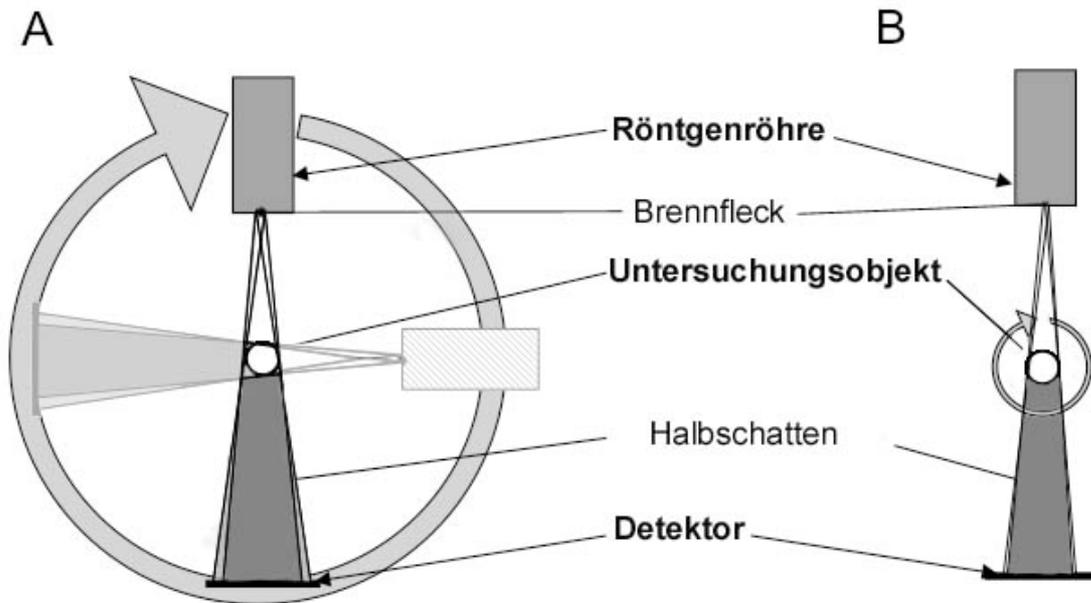
Nachteilig bei der Computertomographie ist die Strahlenbelastung (GRASSI et al. 2009; KAGADIS et al. 2010). Dies ist vor allem bei longitudinalen Studien von Bedeutung. Die höhere Auflösung und daher kleinere Voxelgröße bei der Mikro-CT führt zu einer höheren Röntgenstrahlendosis. Ein durchdachtes Studiendesign und technische Weiterentwicklungen können jedoch helfen, die Strahlendosis zu minimieren (BADEA et al. 2008a). Das Problem des limitierten Weichteilkontrastes bei der CT lässt sich durch den Einsatz neuer Kontrastmittel reduzieren (BADEA et al. 2008a).

### ***Typen und Funktionsweisen der Mikro-CT***

Aufgrund der Relevanz der Mikro-CT für die vorliegende Arbeit wird im Folgenden näher auf die unterschiedlichen Funktionsweisen von Mikro-CT-Anlagen und auf die Möglichkeiten und Limitationen der thorako-abdominalen Bildgebung in der lebenden Maus eingegangen.

Prinzipiell bestehen Mikro-CTs aus einer Röntgenquelle, einer Halterung für ein zu untersuchendes Objekt und einem Detektor (RITMAN 2004). Allerdings gibt es bautechnische Unterschiede in der Gerätekonstruktion und in den verwendeten Röntgenröhren und Detektoren.

Bei den Konstruktionsprinzipien konkurrieren zwei verschiedene Varianten. Entweder die Röntgenröhre und der Detektor sind auf einem um das zu untersuchende Objekt rotierenden Schlitten (sog. *Gantry*) montiert (Abbildung 2-16, A) oder das Untersuchungsobjekt selbst wird im Strahlengang zwischen Röntgenquelle und Detektor rotiert (Abbildung 2-16, B).



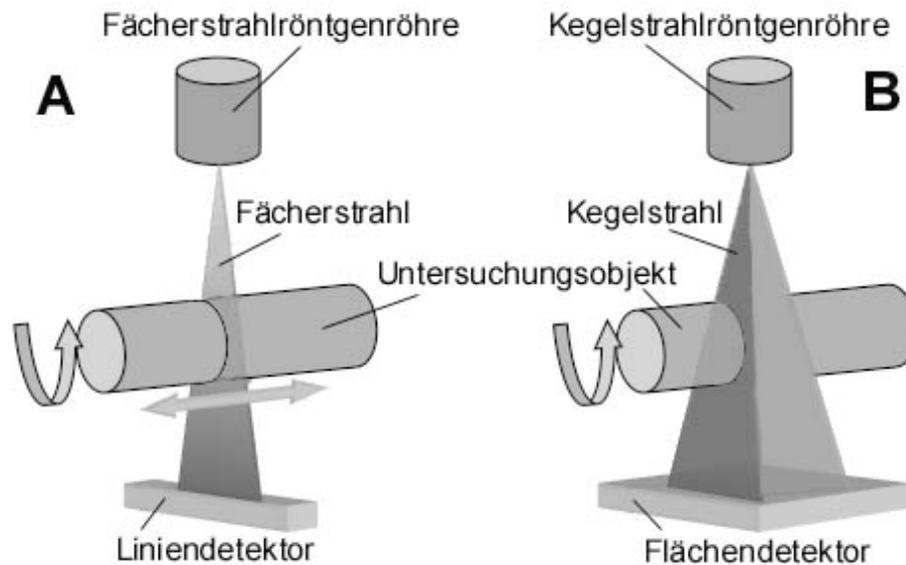
**Abbildung 2-16:** verschiedene Bauweisen von Mikro-CT-Anlagen: **A)** Rotation der Röntgenröhre und des Detektors um das zu untersuchende Objekt. **B)** Rotation des Untersuchungsobjektes im Strahlengang; Röntgenröhre und Detektor sind stationär. (modifiziert nach BAG et al. 2010)

Die Mehrzahl der aktuellen Geräte verwendet in Analogie zur Bauart klinischer CTs das Prinzip der rotierenden Gantry. Bei dieser Bauweise ist der Abstand zwischen Strahlenquelle und Detektor (SDD – *source detector distance*) bis auf wenige Ausnahmen baulich fixiert und damit die geometrische Vergrößerung des sich im Zentrum der Gantry befindlichen Objektes vorgegeben (SCHAMBACH et al. 2010b). Bei diesen Geräten hängt die erreichbare Auflösung somit im Wesentlichen von der Pixelgröße des verwendeten Detektors sowie der Brennfleckgröße der verwendeten Röntgenröhre ab (BAG et al. 2010).

Bei der zweiten, in der Bildgebung kleiner Labortiere seltener eingesetzten, Bauweise rotiert das Untersuchungsobjekt vertikal (BADEA et al. 2004) oder horizontal (SCHAMBACH et al. 2009) im Röntgenstrahl um die eigene Längsachse. Dieser Aufbau erlaubt die freie Modifikation der Abstände zwischen Strahlenquelle und Objekt (SOD – *source object distance*), zwischen Objekt und Detektor (ODD – *object detector distance*) sowie zwischen Röntgenröhre und Detektor (SDD – *source detector distance*). Dies ermöglicht eine starke geometrische Vergrößerung und erlaubt die Optimierung des vor allem von der SDD abhängigen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (SNR – *signal to noise ratio*), welches das Verhältnis von Bildsignal zu Bildrauschen beschreibt und die Bildqualität wesentlich beeinflusst (BAG et al. 2010). Ein Nachteil von Geräten mit rotierendem Untersuchungsobjekt ist die notwendige

suffiziente Fixierung des Tieres, da es sonst während der Rotation zu Bewegungsartefakten kommt (BAG et al. 2010). Dennoch kann es bei einer horizontalen 360°-Rotation um die Längsachse zu einer Verschiebung von Organen durch die Schwerkraft kommen. Dieses Problem kann bei einer vertikalen Lagerung des Tieres umgangen werden, daher wird die Rotation um die vertikale Längsachse in diesem Zusammenhang als vorteilhaft diskutiert (BADEA et al. 2008a). Bei horizontaler Lagerung des Tieres kann eine Reduktion der Rotation auf 180° (plus Öffnungswinkel des Kegelstrahls) (BARTLING et al. 2010) für eine weitere Verminderung von Bewegungsartefakten hilfreich sein. Eine Rotation um 180° ist i.d.R. ausreichend, da eine weitere 180°-Rotation im Wesentlichen redundante Informationen liefert (BAG et al. 2010).

In Abhängigkeit von den verwendeten Röntgenröhren und Detektoren bestehen auch Unterschiede hinsichtlich der Strahlengeometrie. Bei der fächerstrahlbasierten CT wird ein Datensatz entweder Schicht für Schicht (inkrementell) oder unter kontinuierlichem Versatz von Fächerstrahl und Untersuchungsobjekt (sog. Spiral-CT) (KALENDER 2006) als dreidimensionaler Datensatz mit einem Liniendetektor aufgenommen (Abbildung 2-17, A). Die Verwendung von Mehrzeilen-Detektoren ermöglicht die simultane Aufnahme von mehreren Schichten. Das derzeitige Maximum von in der Patientenversorgung eingesetzten CTs liegt bei 640 Zeilen (*Aquilion ONE, Toshiba*).



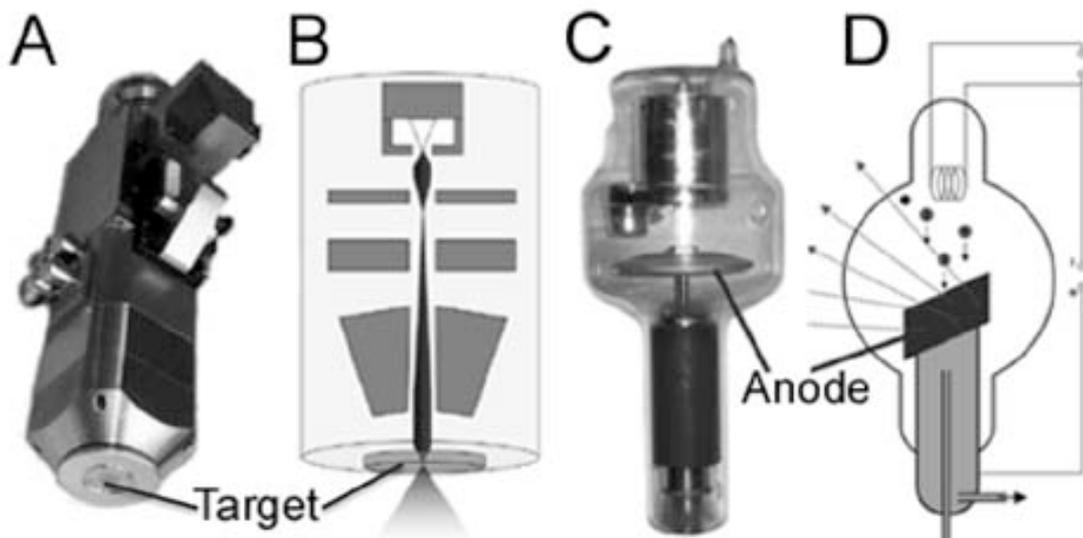
**Abbildung 2-17:** Vergleichende schematische Darstellung der fächerstrahlbasierten (A) und der kegelstrahlbasierten (B) CT. Bei der Fächerstrahl-CT ist im Gegensatz zur Kegelstrahl-CT der Versatz des Untersuchungsobjektes entlang seiner Z-Achse notwendig, um einen Volumendatensatz zu erheben. (modifiziert nach BAG et al. 2010).

Eine Alternative zur Fächerstrahl-CT ist die Kegelstrahl-CT (auch *Conebeam-CT* oder *Volumen-CT* genannt) (Abbildung 2-17, B). Die Voraussetzung hierfür ist die Einführung des Kegelstrahl-Rekonstruktionsalgorithmus durch Feldkamp et al. (1984). Kleine Objekte können hierbei in einer Rotation komplett erfasst und rekonstruiert werden, was wiederum die Untersuchungszeiten deutlich reduziert. Geräte mit Kegelstrahl bieten darüber hinaus die Möglichkeit, Durchleuchtungsaufnahmen oder digitale Subtraktionsangiographien (DSA) durchzuführen (BAG et al. 2010). Im Gegensatz zu klinischen Geräten wird bei neueren Mikro-CTs vor allem die Kegelstrahlgeometrie in Kombination mit Flächendetektoren verwendet.

Des Weiteren gibt es Unterschiede hinsichtlich des Scankonzeptes. Das Scankonzept vieler Mikro-CT-Anlagen basiert auf einer stufenweisen Rotation und Datenakquisition. So ist z.B. auch beim für die Experimente der vorliegenden Dissertation eingesetzten industriellen Materialprüfungsgerät (Modell Y.Fox; Yxlon International GmbH, Hamburg) das ursprüngliche Scankonzept diese sogenannte *step-and-shoot*-Technik gewesen (Abbildung 2-18, A). Hierbei wird das Untersuchungsobjekt zu einem definierten Winkelgrad rotiert, der Winkel überprüft, die Strahlungsquelle aktiviert, eine oder mehrere Aufnahmen des Objektes angefertigt und ggf. gemittelt und anschließend die Strahlungsquelle deaktiviert.



aufgebracht oder aufgedampft wird (BAG et al. 2010). Da im Brennfleck eine hohe thermische Belastung auftritt, ist Wolfram mit einem sehr hohen Schmelzpunkt von 3410°C gut als Targetmaterial geeignet. Beim Aufprall der Elektronen auf das Target wird eine von der Röhrenspannung abhängige Röntgenbremsstrahlung, welche üblicherweise für die Bildgebung genutzt wird, und eine vom Targetmaterial abhängige charakteristische Röntgenstrahlung, freigesetzt (HAAS 1977). Die durch die Transmissionsröntgenröhren ermöglichten kleinen Brennfleckgrößen von unter 5 µm sind besonders bei hohen Vergrößerungsfaktoren notwendig, um den Halbschattenbereich möglichst gering zu halten und so möglichst scharfe Bilder zu generieren (BAG et al. 2010). In Abbildung 2-16 ist der Einfluss der Brennfleckgröße auf den Halbschattenbereich und damit auf die Unschärfe des Bildes exemplarisch dargestellt (BAG et al. 2010).



**Abbildung 2-19:** Röntgenröhren im Vergleich. In **A** und **B** ist eine Transmissionsröntgenröhre, wie sie häufig in der Mikro-CT verwendet wird, dargestellt. Die Röntgenstrahlung wird durch das Auftreffen eines durch Magnetlinsen fokussierten und zentrierten Elektronenstrahls auf einem Transmissionstarget generiert. **C** und **D**: herkömmliche Röntgenröhre mit rotierender Telleranode. (modifiziert nach BAG et al. 2010)

Alternativ ist auch die Verwendung von Röntgenröhren mit Reflektionstarget, wie sie in klinischen Geräten, aber auch in einigen Mikro-CTs (BADEA et al. 2004; BARTLING et al. 2007; DU et al. 2007) eingesetzt werden, möglich (Abbildung 2-19, C und D). Diese Röhren konvertieren die eingestrahelte Elektronenenergie weniger effektiv als Transmissionsröntgenröhren (HAAS 1977). Des Weiteren haben sie einen deutlich größeren Brennfleck von 0,3 bis 1 mm (BADEA et al. 2008a) und

folglich einen deutlich breiteren Halbschattenbereich, weshalb mit diesen Röntgenröhren nur geringere Vergrößerungsfaktoren möglich sind. Allerdings können Reflektionstargets aufgrund der dickeren Wolframanode eine größere Menge an Wärmeenergie absorbieren ohne beschädigt zu werden (BAG et al. 2010). Dies ermöglicht die Erzeugung von Elektronenstrahlen mit höherer Energie, wodurch kürzere Belichtungszeiten möglich werden, was vor allem für die kardiale Bildgebung von Vorteil ist (BADEA et al. 2004).

### **Detektoren**

Für die Datenakquisition werden in Mikro-CTs verschiedene Detektorsysteme verwendet. Ein ausführlicher Vergleich der verschiedenen Detektoren für den Einsatz in der Labortierbildgebung wird von Goertzen et al. (2004) publiziert.

Häufig werden CCD-Fotodetektoren (*charge coupled device*) eingesetzt (CASTELLI 1994). Diese Detektoren haben eine hohe Signalausbeute, da sie keine Ausleseelektronik auf der fotosensitiven Schicht besitzen, was zu einem nahezu 100%-igen Füllfaktor führt. Nachteilig sind jedoch die längeren Auslesezeiten mit niedrigeren Akquisitionsraten, welche durch die Auslesung über ein Schieberegister mit nur einem Signalausgang für den gesamten Detektor begründet sind (BAG et al. 2010).

In den letzten Jahren werden vermehrt Flachbilddetektoren verwendet (SPAHN et al. 2003; KIESSLING et al. 2004; DRANGOVA et al. 2007; SCHAMBACH et al. 2009). Hierbei werden sogenannte *active matrix flat panel imager* (AMFPI) eingesetzt, die aus einer Anordnung von Fotodioden bestehen, welche mit einer Matrix von dünnen Filmtransistoren (TFTs; *thin film transistors*) verbunden sind (SPAHN et al. 2003). Die Röntgenstrahlen werden dabei in Szintillatorplatten in Lichtstrahlen umgewandelt (BAG et al. 2010). Vorteilhaft bei Flachbilddetektoren ist die im Vergleich zu CCD-Detektoren höhere Auslesegeschwindigkeit, da die Pixel direkt über die Filmtransistoren ausgelesen werden können (DE GERONIMO 2001). Nachteilig ist der niedrigere Füllfaktor, da die Filmtransistoren bis zu 50% der fotosensitiven Schicht einnehmen, was zu einer reduzierten Sensitivität führt (SCHAMBACH et al. 2010b).

### ***Möglichkeiten und Limitationen der thorako-abdominellen Bildgebung in der lebenden Maus***

Die hochauflösende Bildgebung thorakaler und abdomineller Strukturen bei kleinen Labornagetieren stellt aufgrund der schnellen Atem- und Herzfrequenz eine technische Herausforderung dar. Bei der Maus beträgt die Atemfrequenz 80-230/Minute, die Herzfrequenz 300-600/Minute (BARTLING et al. 2010), wobei diese in Abhängigkeit von Art und Tiefe der Narkose variieren. So haben Cavanaugh et al. (2004) gezeigt, dass durch eine tiefe Inhalationsnarkose eine Schnappatmung mit deutlich reduzierter Atemfrequenz erreicht werden kann, die eine nahezu bewegungsartefaktfreie Bildgebung erlaubt. Als weitere Möglichkeit durch Atmung entstehende Bewegungsartefakte zu reduzieren beschreiben De Clerck und Mitarbeiter (2004) die Einengung des Thorax durch ein nichtelastisches Klebeband wodurch eine Verringerung der Amplitude der Thoraxbewegung erreicht werden kann. Dennoch führen die Atemexkursionen zu Bewegungsunschärfen, was die hochauflösende Darstellung der Lunge, des Herzens und der dem Zwerchfell anliegenden Organe einschränkt. Daher ist der Einsatz von Strategien zur Verminderung von Atemartefakten unumgänglich. Möglichkeiten hierfür bieten das prospektive und das retrospektive Gating, wobei letzteres in extrinsisches und intrinsisches Gating unterteilt werden kann (BADEA et al. 2004; CAVANAUGH et al. 2004; WALTERS et al. 2004; NAMATI et al. 2006; DRANGOVA et al. 2007; FORD et al. 2007b; BADEA et al. 2008b; BARTLING et al. 2008; JOHNSON et al. 2008a; CAO et al. 2009; ERTEL et al. 2009; BARTLING et al. 2010; LEE et al. 2011).

Beim prospektiven Gating (BADEA et al. 2004; CAVANAUGH et al. 2004; WALTERS et al. 2004; FORD et al. 2005; NAMATI et al. 2006; FORD et al. 2007a; GUERRERO et al. 2007; HORI et al. 2008; JOHNSON et al. 2008a; SERA et al. 2008; CAO et al. 2009; YU et al. 2009; NAMATI et al. 2010; LEE et al. 2011) erfolgt die Bildaufnahme nur während definierter Atem- oder Herzschlagphasen. Dies setzt allerdings eine Synchronisation zwischen Mikro-CT und den physiologischen Parametern des Tieres (Herzschlag und/oder Atmung) voraus. Die Aufzeichnung des Herzschlags erfolgt mittels EKG (Elektrokardiogramm). Die Ableitung eines Gatingsignals der Atmung kann z.B. mittels eines kleinen pneumatischen Kissens (FORD et al. 2005; FORD et al. 2007a) oder mittels Intubation und kontrollierter Beatmung (BADEA et al. 2004;

CAVANAUGH et al. 2004; WALTERS et al. 2004; NAMATI et al. 2006; GUERRERO et al. 2007; BADEA et al. 2008b; JOHNSON et al. 2008a; SERA et al. 2008; NAMATI et al. 2010) erfolgen. Nachteilig beim prospektiven Gating sind die verlängerten Untersuchungszeiten (CAVANAUGH et al. 2004; FORD et al. 2005; NAMATI et al. 2006) und die Notwendigkeit der Implementierung der prospektiv gesteuerten Aufnahmetechnik, was bisher nicht bei allen Mikro-CTs ohne Weiteres möglich ist.

Beim retrospektiven Gating erfolgt die Datenaufnahme kontinuierlich, die Zuordnung der einzelnen Projektionen zu den Atem- oder Herzphasen geschieht erst nach der Datenakquisition. Beim extrinsischen retrospektiven Gating werden die notwendigen physiologischen Parameter (Herzschlag bzw. Atmung) parallel zur Bildaufnahme aufgezeichnet und ermöglichen so eine spätere Zuordnung der Projektionen (BARTLING et al. 2007; DRANGOVA et al. 2007; FORD et al. 2007b; ERTEL et al. 2009; FORD et al. 2009). Im Gegensatz zum extrinsischen Gating ist beim intrinsischen retrospektiven Gating keine zusätzliche Hardware erforderlich, da die für die Zuordnung nötigen Informationen wie Herzschlag oder Zwerchfellbewegung aus dem Datensatz selbst isoliert werden (BARTLING et al. 2008; DINKEL et al. 2008; FARNCOMBE 2008; SAWALL et al. 2011). Somit ist dieses Verfahren ohne gerätetechnische Modifikationen am Mikro-CT möglich, erfordert jedoch meist aufwendigere Algorithmen zur Nachbearbeitung der Datensätze. Beim retrospektiven Gating gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten der Datenaufnahme: Zum einen kann eine Serie von Bildern aus einer Winkelposition aufgenommen werden, sodass alle Atem- bzw. Herzschlagphasen enthalten sind, bevor zur nächsten Winkelposition gewechselt wird. Dies wird für beliebig viele Winkelgrade wiederholt. Anschließend muss jedes Bild seiner entsprechenden Atem- bzw. Herzschlagphase zugeordnet werden, ehe die Bilder jeder Phase zu einem neuen Datensatz kombiniert und rekonstruiert werden. Nachteilig bei dieser *step-and-shoot*-Technik sind allerdings die langen Untersuchungszeiten (BARTLING et al. 2010). Eine zweite Möglichkeit ist die Bildaufnahme bei kontinuierlicher Rotation mit einer hohen Bildaufnahmezeit. In der Regel werden mehrere Rotationen nacheinander durchgeführt um sicherzustellen, dass in jeder Atem- bzw. Herzschlagphase genügend Projektionen akquiriert werden. Retrospektiv werden die einzelnen Bilder dann den Atem- bzw. Herzschlagphasen zugeordnet und neue Datensätze aus Projektionen mit identischer Atem- bzw. Herzschlagphase rekonstruiert (DRANGOVA et al. 2007; FORD et al. 2007b; BARTLING et al. 2008; DINKEL et al. 2008; FORD et al. 2009). Ein Vorteil beim

retrospektiven Gating ist die Möglichkeit der Aufnahme von 4D-Datensätzen (BARTLING et al. 2007; DRANGOVA et al. 2007; BADEA et al. 2008b; BARTLING et al. 2008; DINKEL et al. 2008). Nachteilig beim retrospektiven Gating sind die verlängerten Untersuchungszeiten sowie die erhöhte Strahlenbelastung (BARTLING et al. 2007; FARNCOMBE 2008; FORD et al. 2009).

Aufgrund von Schwankungen in der Atemtiefe (MAI et al. 2005) können Bewegungsunschärfen jedoch trotz verschiedenster Gating-Techniken meist nicht vollständig eliminiert werden (CAVANAUGH et al. 2004; BARTLING et al. 2008). Eine Datenaufnahme während eines kontrollierten Atemstillstandes kann daher zu einer weiteren Verminderung von atemabhängigen Bewegungsartefakten beitragen. So beschreiben Namati und Mitarbeiter (2006) eine Technik zur Datenaufnahme während intermittierender Atemstopps (IIBH – *intermittent iso-pressure breath hold*). Eine Methode zur Untersuchung während eines einzigen Atemstopps ist in der Literatur bisher lediglich von Guerrero et al. (2007) beschrieben, allerdings mit einer sehr kurzen Scanzeit von 8 Sekunden. Der Schwerpunkt der genannten Arbeit liegt jedoch in der Bestimmung der Lungencompliance und nicht in der hochauflösenden Bildgebung von Thorax und Abdomen.

Für einige Methoden des prospektiven Gatings (BADEA et al. 2004; CAVANAUGH et al. 2004; WALTERS et al. 2004; NAMATI et al. 2006; GUERRERO et al. 2007; BADEA et al. 2008b; JOHNSON et al. 2008a; SERA et al. 2008; NAMATI et al. 2010) wie auch für die in der vorliegenden Arbeit entwickelte *single breath-stop*-Mikro-CT ist die Intubation der Maus eine nötige Voraussetzung. Dies stellt jedoch aufgrund der geringen Größe des Tieres eine gewisse Herausforderung dar. Es sind einige Methoden zur Intubation der Maus beschrieben (BROWN et al. 1999; VERGARI et al. 2003; RIVERA et al. 2005; SPOELSTRA et al. 2007; HAMACHER et al. 2008; MACDONALD et al. 2009; SINGER et al. 2010). Diese benötigen allerdings oft aufwendige Hilfsmittel wie ein OP-Mikroskop (HAMACHER et al. 2008), maßgefertigte Laryngoskope (BROWN et al. 1999; SPOELSTRA et al. 2007), ein kleinkalibriges starres Arthroskop (VERGARI et al. 2003) oder ein Glasfaserkabel (RIVERA et al. 2005; MACDONALD et al. 2009), welches zugleich als Lichtquelle und als Führungsdraht dient. Des Weiteren verwenden die meisten der beschriebenen Methoden speziell angefertigte Plexiglastische um die Maus während der Intubation in einer bestimmten Position zu fixieren (BROWN et al. 1999; RIVERA

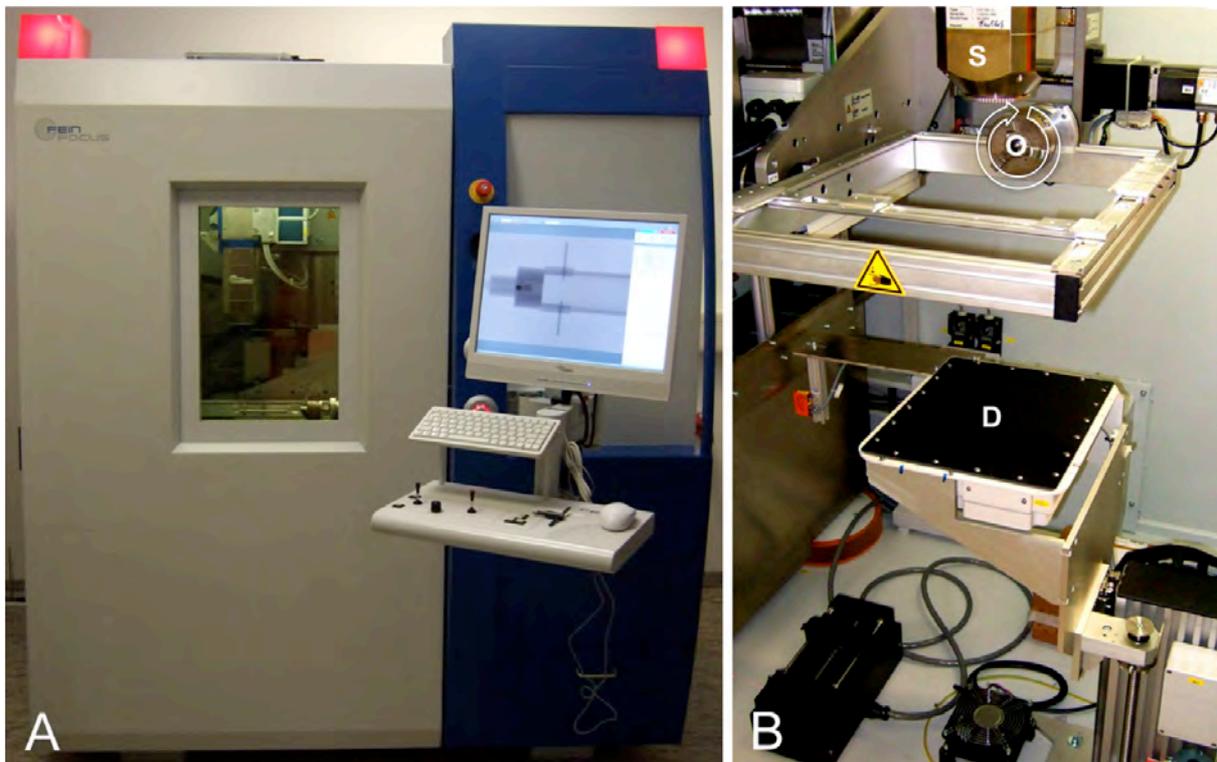
et al. 2005; SPOELSTRA et al. 2007; HAMACHER et al. 2008; MACDONALD et al. 2009). Als Tubus dient häufig ein Venenkatheter mit einem Durchmesser zwischen 20-G (RIVERA et al. 2005; MACDONALD et al. 2009) und 24-G (SPOELSTRA et al. 2007). Lediglich Brown et al. (1999) und Vergari und Mitarbeiter (2003) verwenden als Tubus einen Polyethylenschlauch. Prinzipiell wird eine Intubation in Seldinger-Technik unter Sicht empfohlen (VERGARI et al. 2003; RIVERA et al. 2005; HAMACHER et al. 2008; MACDONALD et al. 2009).

Neben den durch die schnelle Atem- und Herzfrequenz verursachten Bewegungsartefakten stellt der relativ schwache Weichteilkontrast eine weitere Schwierigkeit der Bildgebung abdomineller Strukturen dar. Für eine optimale Beurteilbarkeit der CT-Aufnahmen ist daher die Verwendung von Kontrastmitteln notwendig, um z.B. Lebermetastasen oder Gefäße darstellen zu können. Reguläre, auch in der klinischen Routine eingesetzte jodhaltige Kontrastmittel sind aufgrund ihrer sehr kurzen Bluteliminationszeit nur bedingt für die *in vivo* Mikro-CT geeignet, da diese oft mit relativ langen Untersuchungszeiten (CAVANAUGH et al. 2004; NAMATI et al. 2006; FORD et al. 2007a) einhergeht. Besser geeignet sind daher sogenannte *blood-pool*-Kontrastmittel mit längerer intravaskulärer Verweildauer (MUKUNDAN et al. 2006; SCHAMBACH et al. 2010b). Für die Leberbildgebung stehen Kontrastmittel mit spezifischer Anreicherung im gesunden Lebergewebe zur Verfügung (MONTET et al. 2007; WILLEKENS et al. 2009). Ein in den letzten Jahren häufig eingesetztes, speziell für die präklinische Leberbildgebung entwickeltes, liposomenbasiertes jodhaltiges Kontrastmittel ist Fenestra LC (OHTA et al. 2006; ALMAJDUB et al. 2007; SUCKOW u. STOUT 2008; WILLEKENS et al. 2009; MARTINIOVA et al. 2010). Nachteilig hierbei sind allerdings das vom Hersteller empfohlene relativ hohe Injektionsvolumen von 400 µl und die für longitudinale Studien nötige wiederholte Injektion. Das erst kürzlich auf den Markt gekommene und von uns in einer Studie für den präklinischen Einsatz in der Leberbildgebung evaluierte, nanopartikuläre Viscover<sup>®</sup> ExiTron<sup>®</sup> nano (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) bietet den Vorteil eines geringen Injektionsvolumens (100 µl) und ermöglicht eine longitudinale Bildgebung über Monate nach einmaliger Injektion (BOLL et al. 2011b).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Mikro-CT

Für die computertomographischen Untersuchungen wurde ein für die Materialprüfung entwickeltes industrielles hochauflösendes Röntgensystem mit CT-Funktion verwendet (Modell Y.Fox; Yxlon International GmbH, Hamburg) (Abbildung 3-1).



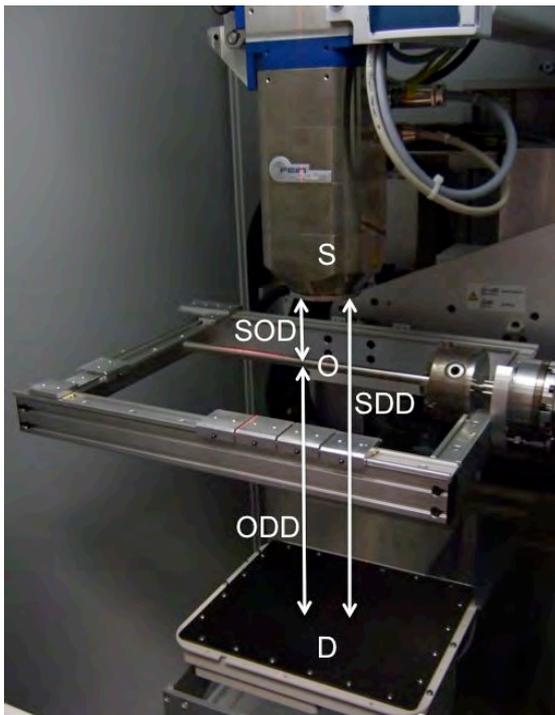
**Abbildung 3-1:** Yxlon Y.Fox Mikro-CT. **A)** Außenansicht mit Kabine, Strahlenschutzfenster und Bedieneinheit. Dimensionen: 1,7 m x 1,5 m x 2,1 m bei 2,6 Tonnen Gesamtgewicht. **B)** Innenansicht mit Röntgenröhre (S), rotierendem Objekt (O) und Detektor (D).

Die einzelnen Komponenten (Röntgenröhre, Detektor, Manipulator) befinden sich in einer Strahlenschutzkabine, welche mit einem 6 mm dicken Bleimantel abgeschirmt ist. Der Zugang erfolgt über ein Strahlenschutzfenster aus bleioxidhaltigem Glas. Als Sonderanfertigung befinden sich an der Geräteoberseite spezielle Kabelkanäle, welche die Durchführung von Schläuchen, z.B. für Narkosegas, erlauben, ohne die Strahlendichtigkeit der Kabine zu beeinträchtigen. Durch die Anordnung von Detektor und Röntgenröhre kann aufgrund der Kegelstrahlgeometrie des Röntgenstrahls das

Gerät als Voumen-CT eingesetzt werden. Röntgenröhre und Detektor sind beim verwendeten Gerät stationär, stattdessen wird das Objekt horizontal um die eigene Längsachse im Strahlengang rotiert. Dies ermöglicht durch Reduktion der SOD eine bis zu 250-fache geometrische Vergrößerung mit einer theoretischen maximalen Auflösung von 500 nm, wobei diese durch die Objekthalterung und Objektgröße limitiert wird.

### 3.1.1 Manipulator und Objekthalterung

Das verwendete Mikro-CT verfügt über einen Manipulator, welcher die mikrometeregenaue Positionierung von Objekten im Strahlengang erlaubt (Abbildung 3-2). Die Objekte können in einer Ebene parallel zum Detektor (X- und Y- Achse) sowie orthogonal dazu in Z-Richtung bewegt werden. Die Verschiebung in Z-Richtung ermöglicht die Anpassung der Abstände zwischen Röntgenröhre und Objekt (SOD) sowie zwischen Objekt und Detektor (ODD). Zudem ist der Detektor höhenverstellbar, wodurch der Abstand zwischen Objekt und Detektor (ODD) sowie zwischen Röntgenquelle und Detektor (SDD) adaptiert werden kann. Des Weiteren verfügt das Gerät über ein Dreibackenbohrfutter, in welches eine speziell angefertigte Objekthalterung eingespannt und in definierter Geschwindigkeit um die eigene Achse rotiert werden kann.



**Abbildung 3-2:** Aufbau des verwendeten Mikro-CTs. Der zwischen Röntgenquelle (S) und Detektor (D) lokalisierte bewegliche Manipulator (hier mit eingespanntem Metallstab (O)) erlaubt die freie Einstellung der Abstände zwischen Röntgenquelle und Objekt (SOD) sowie zwischen Objekt und Detektor (ODD). Der höhenverstellbare Detektor erlaubt zudem die Modifikation des Abstandes zwischen Röntgenquelle und Detektor (SDD). Dieser Aufbau ermöglicht die Optimierung des geometrischen Vergrößerungsfaktors des untersuchten Objektes.

### 3.1.2 Röntgenröhre und Detektor

Verwendet wurde eine bis zu 160 kV ausgelegte Transmissions-Röntgenröhre (FXE-160.51; Yxlon International GmbH) mit einem Röntgenstrahl-Öffnungswinkel von 10°. Die Röntgenröhre verfügt über verschiedene Betriebsmodi (Mikrofokus, Nanofokus, Highpower) und ermöglicht Brennfleckgrößen bis 1  $\mu\text{m}$ . Zur Erzeugung der Röntgenstrahlung werden ein Haarnadel-Heizfilament mit einem Durchmesser von 200  $\mu\text{m}$  und ein High Power Target aus Wolfram mit Diamantbeschichtung eingesetzt. Für unsere Untersuchungen wurden eine Röhrenspannung von 80 kV und eine Stromstärke von 75  $\mu\text{A}$  bei einer Brennfleckgröße von 5  $\mu\text{m}$  gewählt.

Die Bildaufnahme erfolgte über einen direkt-digitalen AMFPI Szintillationsdetektor (Varian PaxScan 2520; Varian, Palo Alto, Kalifornien) mit einem Pixelabstand von 127  $\mu\text{m}$ . Die zeitliche Auflösung des Detektors ist abhängig von der gewählten zweidimensionalen Auflösung: sie variiert zwischen 1 fps (*frame per second*) im hochauflösenden Modus (Pixel Matrix 1408 x 1888) und maximal 30 fps bei verdoppeltem Pixelabstand (Pixel Matrix 704 x 944; *2x2 binning*). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden mit einer Bildaufnahmezeit von 30 fps und einer Pixel Matrix von 704 x 944 durchgeführt.

### 3.1.3 Scanverfahren

Um das verwendete Mikro-CT für die *in vivo* Bildgebung nutzen zu können wurde in Kooperation mit dem Gerätehersteller ein schnelles Scanverfahren (Abbildung 2-18, B) implementiert. Dieses modifizierte Scanverfahren beruht auf einer kontinuierlichen Rotation des Untersuchungsobjektes unter kontinuierlicher Durchleuchtung bei einer Akquisitionsrate von 30 Bildern pro Sekunde. Um diese hohe Bildrate zu erreichen, ist eine Viertelung der Detektorauflösung nötig (Pixel Matrix 704 x 944; *2x2 binning*). Des Weiteren wurden die Daten wegen der hohen Aufnahmezeit zunächst im Arbeitsspeicher des Computers gespeichert und erst nach Abschluss des Scans auf die Festplatte übertragen. Aufgrund einer Limitation der Arbeitsspeicherverwaltung des 32-bit Betriebssystems können maximal 1200 Projektionen gespeichert werden. Dies führt bei einer Aufnahmezeit von 30 fps zu einer Scanzeit von 40 Sekunden.

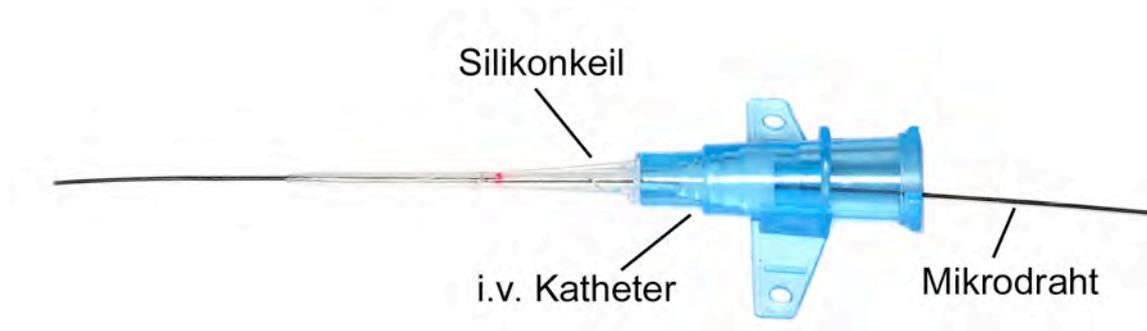
Bei einer Scanzeit von 20 Sekunden wurden entsprechend 600 Projektionen akquiriert.

### **3.2 *Single breath-stop*-Mikro-CT der lebenden Maus**

Die Tierexperimente wurden vor Versuchsbeginn durch ein Votum der Ethikkommission genehmigt. Die Vorschriften zum Tierschutz wurden beachtet.

#### **3.2.1 Zur Intubation verwendete Materialien**

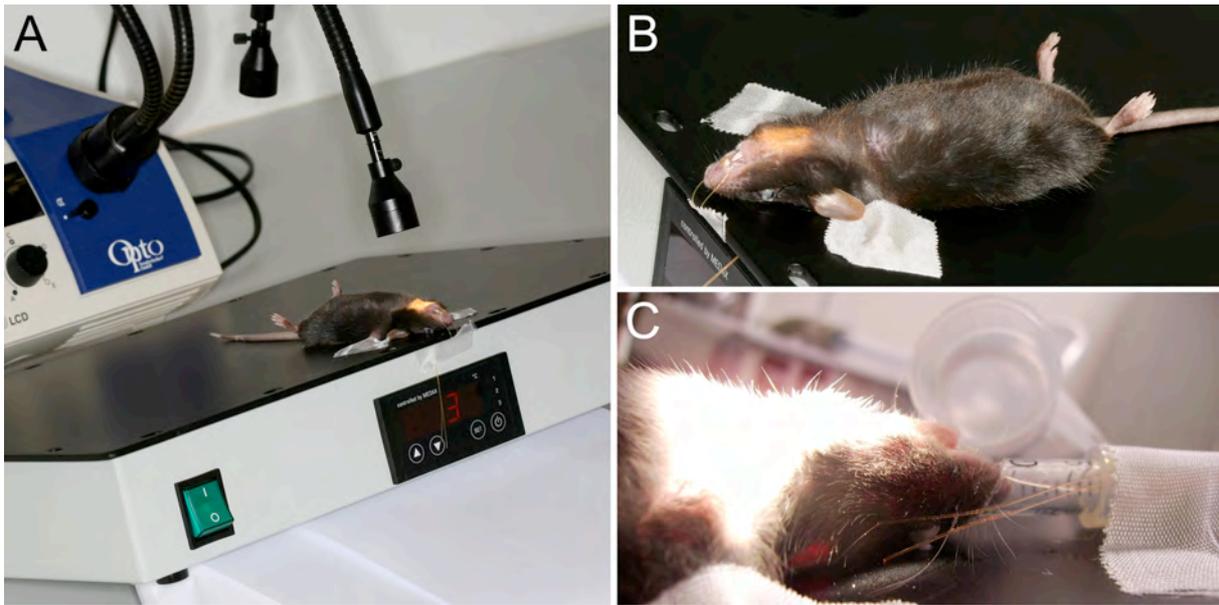
Zur Intubation der Maus (Abbildungen 3-4, 3-5, 3-6) wurden ein beheizbarer OP-Tisch für kleine Labortiere (MEDAX GmbH, Neumünster) und eine starke Lichtquelle (KL1500 LCD; Opto Sonderbedarf GmbH, Gräfelfing) verwendet. Die Spitzen einer Pinzette wurden mit kleinen Plastikhülsen abgepolstert um eine Verletzung der Maus während der Intubation zu verhindern. Als Tubus diente ein 22-Gauge i.v. Katheter (Klinika Medical GmbH, Usingen), der mit einem Silikonkonus, wie von MacDonald et al. (2009) beschrieben, modifiziert wurde. Hierzu wurden von der Spitze des Katheters 15 mm abgemessen und mit einem wasserfesten Stift markiert. Im nächsten Schritt wurde die Spitze einer 1000 µl Pipette an ihrem dünnem Ende so abgeschnitten, dass der i.v. Katheter bis zur 15 mm-Markierung durchgeschoben werden konnte. Das breitere Ende der Pipettenspitze wurde auf Höhe des Konusbeginns des i.v. Katheters abgeschnitten. Um später die Pipettenspitze leichter entfernen zu können, wurde sie der Länge nach aufgeschnitten und mit Klebeband wieder adaptiert. Im Anschluss daran wurde die Pipettenspitze mit Silikondichtstoff (Silikon-Dicht Fugendichtung; Bindulin, Fürth) gefüllt und der i.v. Katheter inklusiv Kanüle (um ein Verstopfen des Katheters mit Silikon zu verhindern) durchgeschoben. Nach ca. einer Woche war das Silikon getrocknet und die Pipettenspitze konnte entfernt werden. Als Führungsdraht diente ein auf 30 cm gekürzter neuroradiologischer Mikrodraht (Mirage 0.008 inch; Micro Therapeutics, Grenoble Cedex, Frankreich) mit weicher Spitze, welcher sich vom Außendurchmesser durch den 22-G i.v. Katheter vorführen lies. Abbildung 3-3 zeigt den fertigen Tubus mit Silikonkonus und Führungsdraht.



**Abbildung 3-3:** Tubus mit Führungsdraht. Ein 22-Gauge i.v. Katheter wurde zur optimalen Abdichtung der Trachea mit einem Silikonkeil modifiziert. Als Führungsdraht diente ein gekürzter interventioneller Mikrodraht mit sehr weicher Spitze.

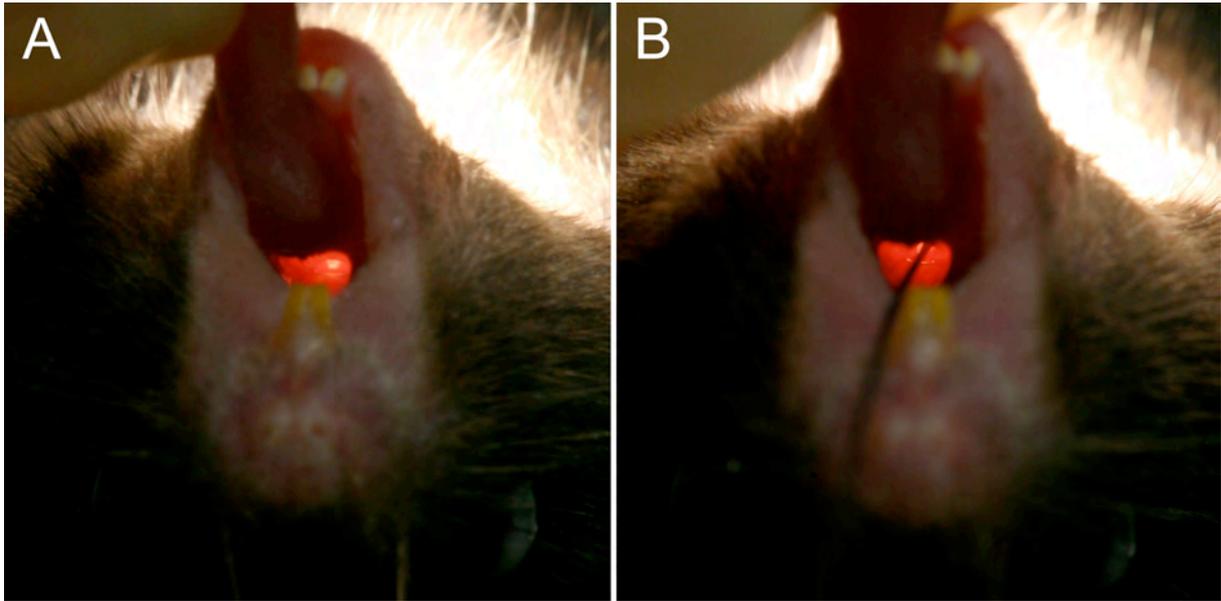
### 3.2.2 Intubation der Maus

Zehn C57/BL6 Mäuse mit einem Körpergewicht zwischen 20 und 35 g wurden vor der Untersuchung gewogen und anschließend mittels Isofluran (Forene; Servopharma GmbH, Oberhausen) Inhalation (3% zur Einleitung und 1-2% zur Erhaltung) narkotisiert. In der Anfangsphase unserer Versuche wurde eine Injektionsnarkose (*intraperitoneal*) mit Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht; Ketavet 10%; Essex Tierarzney, München) und Xylazin (16 mg/kg Körpergewicht; Rompun 2%; Bayer HealthCare, Leverkusen) verwendet. Sobald die Maus die volle Narkosetiefe erreicht hatte, wurde sie auf den beheizbaren OP-Tisch (35°C) überführt und ihre Augen zum Schutz vor Austrocknung mit Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe; Bayer, Leverkusen) benetzt. Die Maus wurde in Rückenlage mittels Klebeband (Leukosilk; BSN Medical GmbH, Hamburg) an den Vorderbeinen auf der Wärmeplatte fixiert (Abbildung 3-4, B). Die oberen Schneidezähne wurden mittels einer Angelschnur fixiert und die Schnauze der Maus in eine zur Atemmaske umfunktionierte 1 ml Spritze (zur Aufrechterhaltung der Inhalationsnarkose) gezogen (Abbildung 3-4, C). Im nächsten Schritt wurde die Wärmeplatte wie in Abbildung 3-4, A gezeigt mittels eines kleinen untergestellten Kartons gekippt. Einer der flexiblen Arme der Lichtquelle wurde auf die ventrale Halspartie der Maus fokussiert und ermöglichte dadurch wie von Brown et al. (1999) empfohlen die Durchleuchtung der Trachea direkt unterhalb der Stimmritze.



**Abbildung 3-4:** Lagerung der Maus zur Intubation. Die Maus wurde in Rückenlage auf der Wärmeplatte fixiert. Für eine optimale Sichtbarkeit der Stimmritze wurde die Wärmeplatte mittels eines kleinen untergestellten Kartons gekippt und die Lichtquelle auf die ventrale Halspartie fokussiert (A). Die oberen Schneidezähne der Maus wurden mittels einer Angelschnur fixiert (B). Die Inhalationsnarkose konnte mit Hilfe einer zur Atemmaske umfunktionierten 1 ml Spritze aufrechterhalten werden (C).

Die Zunge wurde vorsichtig mit Hilfe der mit Plastikhülsen versehenen Pinzette vorgelagert und mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand fixiert. Anschließend wurde durch leichten Zug an der Zunge das Maul geöffnet, sodass die Stimmritze als leuchtendes „V“ oder als heller Punkt sichtbar wurde (Abbildung 3-5, A). Der Tubus mit Führungsdraht (ca. 5 mm an der Spitze des Tubus überstehend) wurde in der rechten Hand zwischen den Fingerspitzen von Daumen und Zeigefinger gehalten. Der Führungsdraht wurde unter Sicht zwischen die Stimmbänder geschoben (Abbildung 3-5, B), wobei eine Perforation oder anderweitige Verletzung während der Intubation durch die weiche Spitze des normalerweise in der interventionellen Neuroradiologie verwendeten Führungsdrahtes verhindert wurde. Der zuvor mit einer sehr dünnen Schicht Lokalanästhetikum (Xylocain Gel 2%; Astra Zeneca GmbH, Wedel) benetzte Tubus wurde in Seldinger-Technik über den Führungsdraht in die Trachea geschoben.



**Abbildung 3-5:** Visualisierung der Stimmritze. Bei indirekter Beleuchtung der Trachea von außen mit einer kräftigen Lichtquelle ist die Stimmritze deutlich als helles „V“ oder als heller Punkt sichtbar **(A)**. **(B)** zeigt den in die Stimmritze eingebrachten Führungsdraht. Der Führungsdraht wurde unter Sichtkontrolle ca. 5 mm in die Trachea vorgeschoben. Im nächsten Schritt konnte der Tubus in Seldinger-Technik über den Führungsdraht geschoben werden, wobei der Silikonkeil gleichzeitig als Begrenzer für die optimale Intubationstiefe diente.

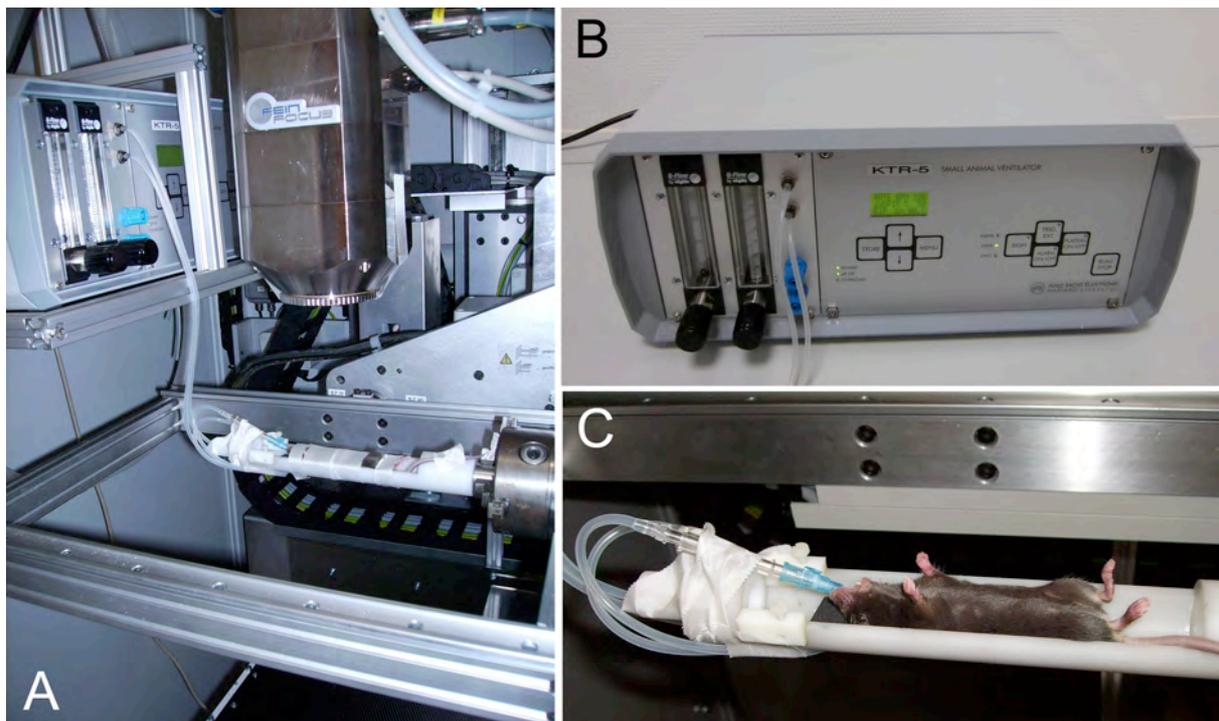
Eine adäquate Intubationstiefe war erreicht, wenn der Silikonkeil dicht mit dem Laryngopharynx abschloss und der Tubus sich daher nicht mehr weiter vorführen lies (Abbildung 3-6). Zur Überprüfung der intratrachealen Tubuslage wurde ein kleines Stück Watte vor die Öffnung des Tubus gehalten, welches sich bei korrekter Lage des Tubus atemsynchron bewegte.



**Abbildung 3-6:** intubierte Maus.

### 3.2.3 Beatmung

Nach erfolgreicher Intubation wurde die Maus in die speziell angefertigte Objekthalterung überführt und mit Klebeband um Thorax und Abdomen fixiert. Die Objekthalterung wurde in das Dreibackenbohrfutter in der Rotationsachse des Mikro-CTs eingespannt (Abbildung 3-7, A und C). Danach wurde die intubierte Maus an das Kleintier-Beatmungsgerät (Small Animal Ventilator KTR-5 (Abbildung 3-7, B); Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, March-Hugstetten), welches innerhalb der Strahlenschutzkabine positioniert wurde, angeschlossen. Die Mäuse wurden mit einer Frequenz von 100 Atemzügen pro Minute und einem Atemhubvolumen von 0,2 ml beatmet. Um ein Überblähen der Lungen zu verhindern, wurde der endinspiratorische Druck (EIP) auf 16 cm H<sub>2</sub>O limitiert.



**Abbildung 3-7:** Lagerung der Maus im Mikro-CT. **A)** Die intubierte Maus wurde in der speziell angefertigten Objekthalterung mit Klebeband fixiert und in das Dreibackenbohrfutter in der Rotationsachse des Mikro-CTs eingespannt; der Tubus wurde an das (neben der Röntgenröhre positionierte) Beatmungsgerät angeschlossen. Die Schläuche wurden mit Klebeband an der Objekthalterung fixiert, um Zug auf den Tubus während der Rotation zu vermeiden **(C)**. **B)** zeigt das verwendete Kleintier-Beatmungsgerät KTR-5 (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus).

### 3.2.4 Relaxation und Scanparameter

Aus Vorversuchen wissen wir, dass die Mäuse einen Atemstopp über 40 Sekunden nur in ca. 10% tolerieren. Daher wurden die Mäuse vor dem Atemstopp mittels *intraperitonealer* (i.p.) Injektion von 1,5 mg/kg Körpergewicht Rocuronium (Esmeron; EssexPharma, München) relaxiert. Eine adäquate Relaxation war nach ca. 5 Minuten erreicht.

Die Abstände zwischen Röntgenquelle und Objekt (SOD) sowie zwischen Objekt und Detektor (ODD) wurden so eingestellt, dass Thorax und oberes Abdomen das *Field of View* (FoV) ausfüllten. Die Spannung der Röntgenröhre wurde auf 80 kV bei einer Stromstärke von 75  $\mu$ A und einer Brennfleckgröße von 5  $\mu$ m (Highpower-Mode) eingestellt. Um den „weichen“ Anteil der Röntgenstrahlung zu reduzieren wurde ein 0,5 mm Aluminiumfilter verwendet. Die computertomographische Untersuchung wurde mittels kontinuierlicher Rotation der Maus um 190° (180° plus 10° Öffnungswinkel des Kegelstrahls) innerhalb von 20 bzw. 40 Sekunden bei einer Bildrate von 30 fps durchgeführt. Daraus resultierten 600 bzw. 1200 Projektionen pro Scan. Unmittelbar vor Scanstart wurde die Beatmung mittels zum Beatmungsgerät gehöriger Fernbedienung (*Remote control box*; Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus) in Endinspiration gestoppt. Im Anschluss an die Bildaufnahme wurden die Mäuse wieder mit 100 Atemzügen pro Minute beatmet und die Relaxation wurde mittels i.p. Injektion von 20 mg/kg Körpergewicht Sugammadex (Bridion; EssexPharma) antagonisiert. Sobald eine regelmäßige Spontanatmung eingesetzt hatte (innerhalb von ca. 5 Minuten nach Antagonisierung) wurden die Mäuse aus der Halterung genommen und zum Aufwachen auf die Wärmeplatte (35°C) gelegt. Bei ersten Anzeichen des Erwachens wurden die Mäuse extubiert und bis zum vollständigen Erwachen auf der Wärmeplatte belassen. Anschließend wurden die Tiere für 3 Wochen beobachtet, wobei Ernährungszustand und Verhalten täglich kontrolliert wurden. Zweimal pro Woche wurden die Mäuse gewogen.

Um die Qualität der *single breath-stop*-Mikro-CT beurteilen zu können, wurden als Vergleichswert bei 5 Mäusen auch Datensätze ohne Atemstopp akquiriert.

### 3.2.5 Rekonstruktion der CT-Daten

Im Anschluss an die CT-Untersuchung erfolgte die Rekonstruktion der Rohdaten mit der Software *Reconstruction Studio* (Yxlon International GmbH). Aus den einzelnen Projektionen wurde mittels gefilterter Rückprojektion ein 3D-Datensatz im DICOM-Format rekonstruiert. Die Rekonstruktion erfolgte mit einer Matrix von 512 x 512 x 512 Voxel. Pixelgröße und Schichtdicke des rekonstruierten Datensatzes waren abhängig vom zuvor bei der CT-Untersuchung gewählten FoV.

### 3.2.6 Auswertung

Die Auswertung der DICOM-Daten erfolgte mittels der *public domain software* OsiriX (v3.5.1; [www.osirix-viewer.com](http://www.osirix-viewer.com)). In *single breath-stop*-Technik aufgenommene CT-Datensätze wurden mit Datensätzen, die ohne Atemstopp aufgenommen wurden, verglichen und hinsichtlich Bildqualität und Detailerkennbarkeit beurteilt. Zur Bildbeurteilung wurden MIP (Maximum-Intensitäts-Projektion) und MPR (Multiplanare Reformation) verwendet. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) wurde bestimmt indem jeweils eine *region of interest* (ROI) in die Leber der Maus (= Bildsignal) und in die Luft (= Bildrauschen) manuell eingezeichnet wurden. Die SNR ergibt sich aus der Formel  $\text{Mean}_{\text{signal}} / \text{SD}_{\text{noise}}$ , wobei  $\text{Mean}_{\text{signal}}$  der Mittelwert des CT-Signalwertes der ROI in der Leber der Maus ist und  $\text{SD}_{\text{noise}}$  die Standardabweichung des CT-Wertes der ROI in der Luft darstellt.

Da anatomisch betrachtet an der Lungen-Abdomen-Grenze die Atemexkursion am stärksten ist, haben wir, um die Zwerchfellbewegung zu quantifizieren, aus Datensätzen mit und ohne Atemstopp eine entsprechende coronare Schicht ausgewählt. Mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware ImageJ (v1.44i; Wayne Rasband; National Institutes of Health, USA) wurden Linienprofile über die Zwerchfellregion gelegt. Die Daten dieser Linien, d.h. die relativen Dichtewerte jedes Voxels entlang der Linie, wurden in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft® Excel® 2008) übertragen. Anschließend wurde aus den Werten ein Diagramm generiert. Die Steigungen der einzelnen Linienprofile (in relativen HU/mm) wurden berechnet. Die Steigung gibt die Änderungsrate der Dichtewerte entlang der Linie an und ist daher ein Maß zur Bestimmung der Unschärfe. Eine größere Steigung

bedeutet eine schnellere Änderung der Dichtewerte, d.h. weniger Bewegungsunschärfe.

### **3.3 Einsatz der *single breath-stop*-Mikro-CT für die Verlaufsbildgebung von Lebermetastasen in der Maus**

Die Evaluierung der Wiederholbarkeit der *single breath-stop*-Mikro-CT im selben Tier wurde im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der AG Prof. Dr. M. Neumaier, Institut für Klinische Chemie Mannheim, durchgeführt. Hierzu wurde ein Mausmodell mit Lebermetastasen verwendet. Die Tiere wurden longitudinal, wie unten beschrieben, mittels Mikro-CT in Atemstopp-Technik untersucht, um den Verlauf des Metastasenwachstums zu beurteilen.

#### **3.3.1 Mausmodell**

CEA (Carcinoembryonales Antigen)-transgenen C57BL/6 Han TgN (CEA-gen) HvdP-Mäusen (n=13) wurden in Narkose MC38 (n=8) bzw. C15-A.3 (n=5) Kolonkarzinomzellen *intrasplenisch* injiziert. MC38 ist eine murine Methyl-Cholanthren-induzierte Kolonkarzinomzelllinie, C15-A.3 ist deren CEA-transfizierte Tochterzelllinie. Bei einigen der Mäuse war eine Splenektomie am Tag 5 nach der Tumorzellinjektion nötig, um dem Risiko einer Milzruptur infolge des Primärtumorwachstums vor Auftreten von Lebermetastasen entgegenzuwirken. Da die Zeit bis zur Entwicklung von Lebermetastasen stark variierte, waren wiederholte CT-Untersuchungen nötig, um die Lebermetastasen zu detektieren und um das Metastasenwachstum zu beurteilen.

#### **3.3.2 Kontrastmittelinjektion**

Da Lebermetastasen aufgrund des schlechten Weichteilkontrastes in der CT nicht abgrenzbar sind, ist die Verwendung eines leberspezifischen Kontrastmittels notwendig. Für das Legen der Venenverweilkanüle und die anschließende Kontrastmittelinjektion erhielten die Tiere eine kurze Inhalationsnarkose (3% Isofluran zur Einleitung und 1-2% zur Erhaltung). Nachdem die Maus die volle

Narkosetiefe erreicht hatte, wurde sie auf eine Wärmeplatte (35°C) überführt. Dort wurden ihre Augen zum Schutz vor Austrocknung mit Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe; Bayer, Leverkusen) benetzt. Das Legen des Schwanzvenenkatheters zur Kontrastmittelinjektion erfolgte wie von Schambach et al. (2010a) beschrieben. Zusammenfassend wurde, damit sich die seitliche Schwanzvene besser füllte und so leichter punktierbar war, ein Stauschlauch an der Schwanzbasis angelegt. Der 27-G i.v. Katheter (vorgefüllt mit heparinisierter (5 I.U. pro ml NaCl) 0,9% NaCl-Lösung) konnte so leichter gelegt werden. Anschließend wurde den Mäusen über die Venenverweilkanüle über 3 bis 5 Minuten ein leberspezifisches Kontrastmittel (n=8: 100 µl Viscover<sup>®</sup> ExiTron<sup>®</sup> nano; Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach und n=5: 400 µl Fenestra LC; ART Advanced Research Technologies Inc., Montreal, Canada) injiziert. ExiTron nano wird von den Kupffer Zellen (Makrophagen der Leber) aufgenommen, Fenestra LC reichert sich in den Hepatozyten an.

### **3.3.3 *Single breath-stop*-Mikro-CT**

Nachdem das Kontrastmittel nach ca. 2,5 Stunden von den Leberzellen aufgenommen worden war, wurde eine erste CT-Untersuchung mit 40 Sekunden Untersuchungszeit in Atemstopp-Technik wie unter 3.2 beschrieben durchgeführt. SOD und ODD wurden so gewählt, dass das obere Abdomen das FoV ausfüllte. Die Mäuse wurden während der Aufwachphase überwacht und anschließend täglich kontrolliert (Gewicht, Verhalten). Im Abstand von jeweils einigen Tagen (siehe Ergebnisse) wurden weitere CT-Untersuchungen in Atemstopp-Technik durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Intubation

Die hier beschriebene Methode der orotrachealen Intubation ist sicher und einfach durchzuführen. Sogar Anfänger konnten mit dieser vereinfachten Methode Mäuse erfolgreich im ersten Versuch intubieren. Im Vergleich zu anderen Publikationen sind keine zusätzlichen Hilfsmittel außer einer starken Lichtquelle und eines weichen Führungsdrahtes erforderlich. Letzterer wird in allen Kliniken mit Abteilungen für interventionelle Neuroradiologie regelmäßig gebraucht. Bei geübten Personen beträgt die Intubationszeit weniger als eine Minute. Messungen der für die Intubation benötigten Zeit bei 5 Mäusen ergaben eine Intubationszeit von  $39 \pm 12$  Sekunden. Durch die Verwendung eines Mikrokatheters mit extrem weicher Spitze als Führungsdraht wurde das Verletzungsrisiko minimiert, sodass bei keiner (im Gegensatz zu unseren ersten Vorversuchen mit direkter Intubation der Maus mit Tubus) der intubierten Mäuse insbesondere während, aber auch nach der Intubation verletzungsbedingte Komplikationen auftraten.

### 4.2 Beatmung und Relaxation

Ohne Relaxation begannen ca. 90% der intubierten Mäuse ( $n=10$ ) nach ca. 20 bis 25 Sekunden Atemstopp mit Spontanatmung mit einer Frequenz von ca. 30 Atemzügen pro Minute, was zu einer reduzierten Bildqualität führte. Nur ca. 10% der Mäuse tolerierten einen Atemstopp über 40 Sekunden ohne Relaxation.

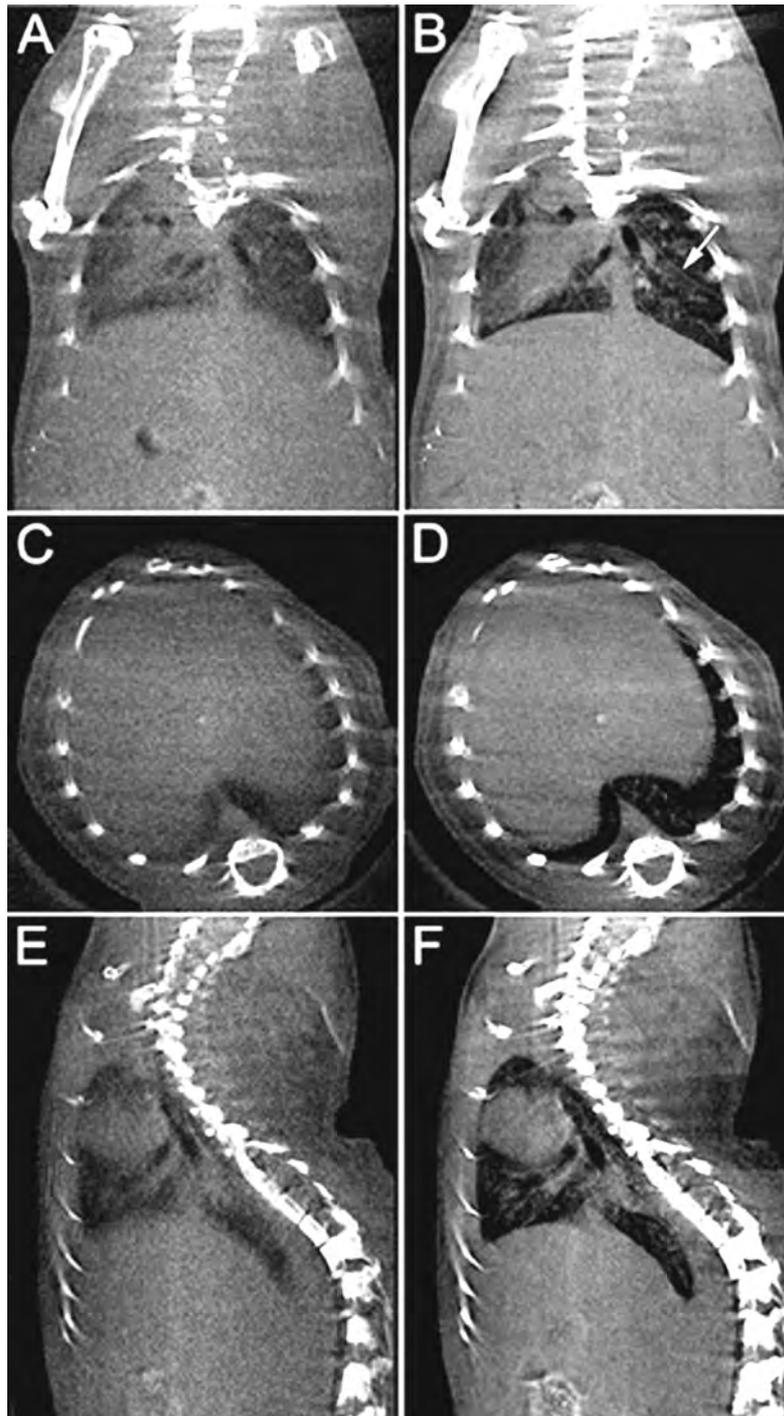
Eine erfolgreiche Relaxation konnte mittels i.p. Injektion des nicht-depolarisierenden Muskelrelaxans (Esmeron; EssexPharma) bei allen Tieren erreicht werden. Eine Dosis von 1,5 mg Rocuronium/kg Körpergewicht führte nach ca. 5 Minuten zu einer suffizienten Relaxation, sodass bei keiner der untersuchten Mäuse Spontanatmung während der 40 Sekunden dauernden Scanzeit auftrat. Die Relaxation wurde mittels i.p. Injektion von 20 mg/kg Körpergewicht Sugammadex (Bridion; EssexPharma) antagonisiert. Alle untersuchten Mäuse zeigten innerhalb von 5 Minuten nach

Injektion wieder eine Spontanatmung. Somit tolerierten alle untersuchten Mäuse diesen Versuchsaufbau mit 40 Sekunden dauerndem Atemstopp gut und erholten sich ohne Probleme. Verhalten und Körpergewicht waren während der folgenden Wochen ebenfalls bei allen Tieren unauffällig, auch nach wiederholter Relaxation.

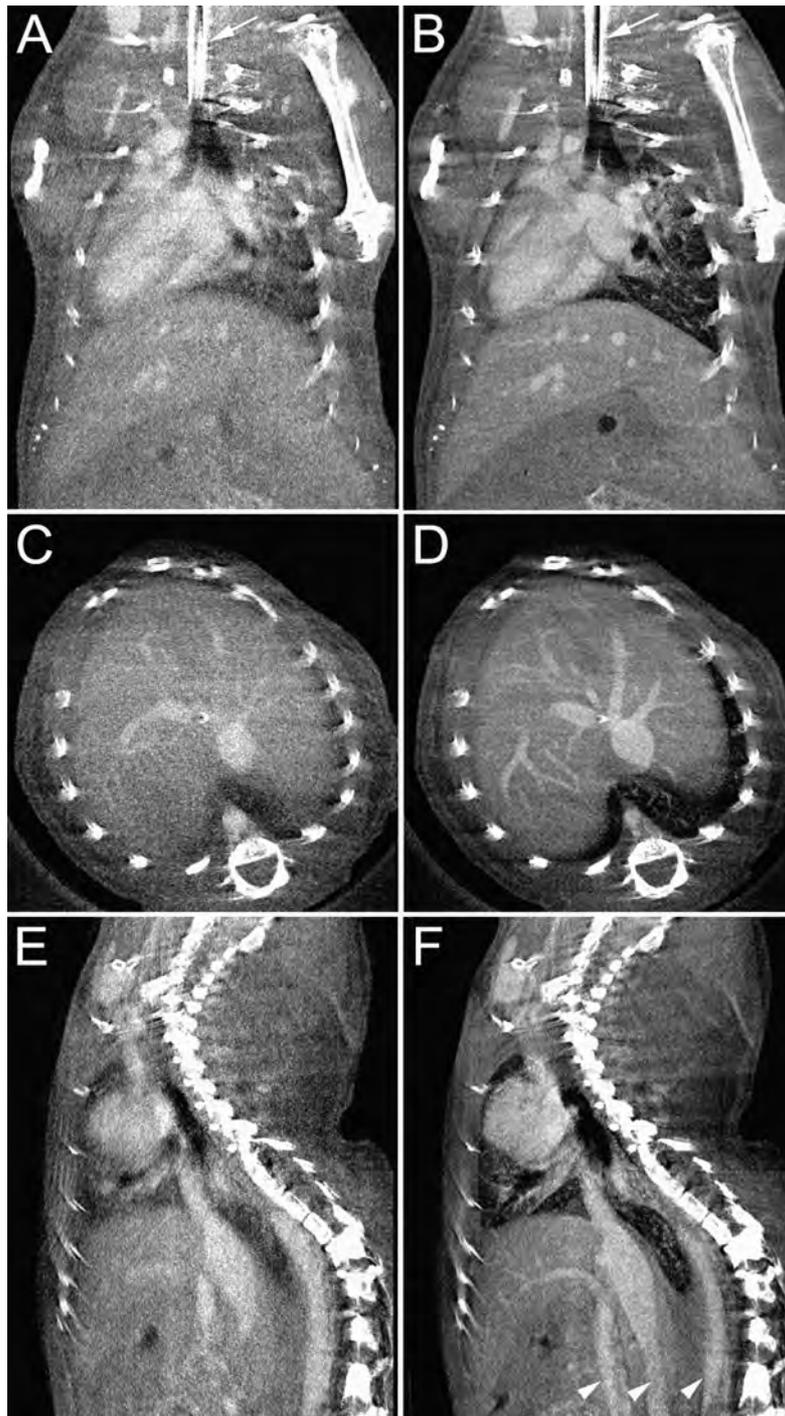
### 4.3 Bildgebung

Die maximal erreichbare Auflösung bei einem *Field of View* von 2,0 x 2,0 x 2,56 cm<sup>3</sup>, welches den gesamten Thorax und das obere Abdomen ausfüllte, lag bei einer Voxelgröße von 39 x 39 x 50 µm<sup>3</sup>.

In den ohne Atemstopp aufgenommenen Datensätzen waren Bildqualität und Detailerkennbarkeit durch Bewegungsartefakte deutlich reduziert (Abbildung 4-1, A, C, E und Abbildung 4-2, A, C, E). Der Einsatz der *single breath-stop*-Technik verbesserte die Bildqualität in Bezug auf Schärfe (Abbildung 4-1, B, D, F und Abbildung 4-2, B, D, F) im Vergleich zu Datensätzen, die bei Mäusen mit einer Atemfrequenz von 100/Minute aufgenommen wurden (Abbildung 4-1, A, C, E und Abbildung 4-2, A, C, E).

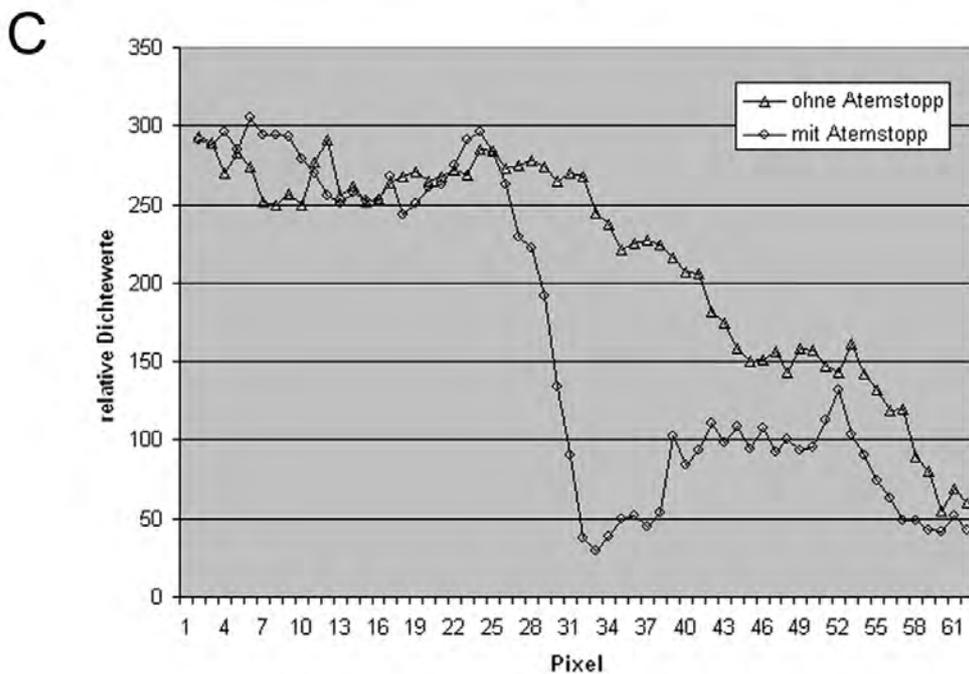
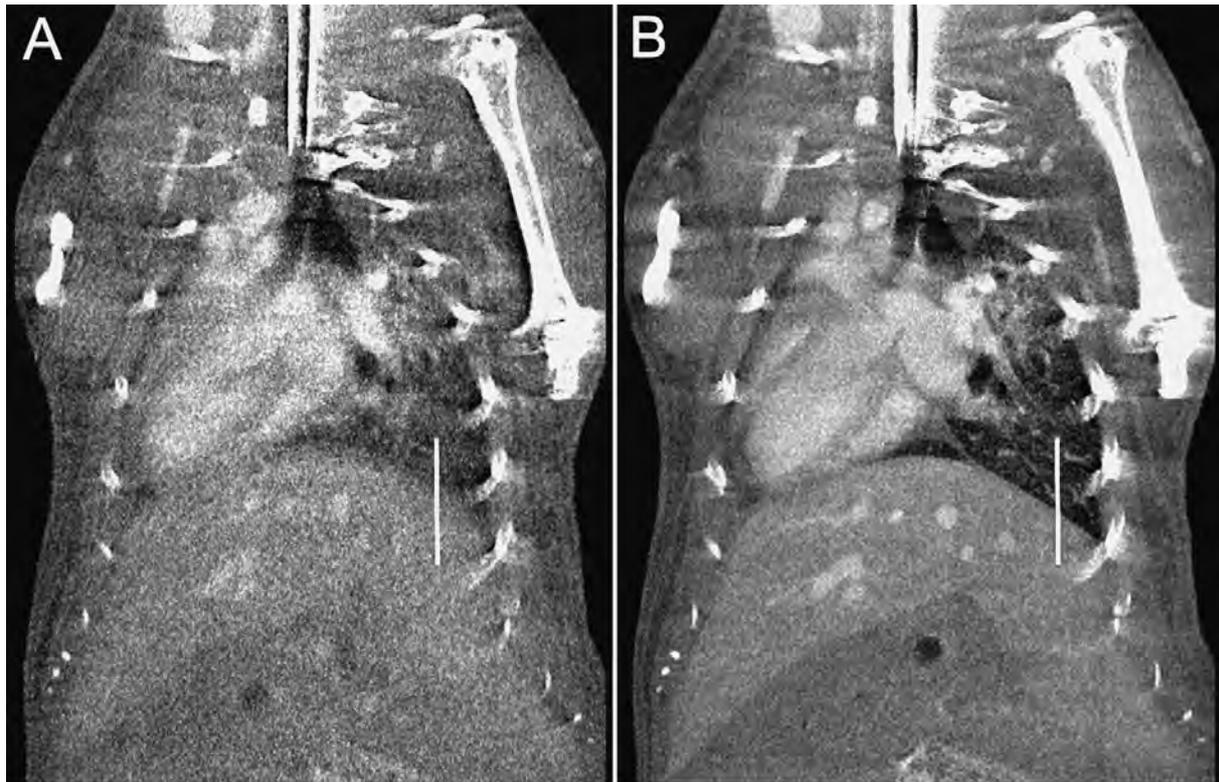


**Abbildung 4-1:** Vergleichende Darstellung eines Datensatzes, der ohne Atemstopp aufgenommen wurde (**A**, **C** und **E**), mit Aufnahmen in *single breath-stop*-Technik (**B**, **D** und **F**). Dargestellt sind Thorax und oberes Abdomen. Die Mikro-CT der intubierten, aber frei atmenden Maus (**A**, **C** und **E**; 20 Sekunden Scanzeit; Atemfrequenz 100/Minute) führte zu unscharfen Bildern mit herabgesetzter Detailerkennbarkeit. *Single breath-stop*-Mikro-CT (**B**, **D** und **F**; Scanzeit 40 Sekunden) verbesserte die Bildqualität und Detailerkennbarkeit deutlich; kleine Strukturen wie z.B. eine Lungenlappengrenze (**B**, Pfeil) sind deutlich zu erkennen.



**Abbildung 4-2:** Vergleich eines Mikro-CT Datensatzes, der ohne Atemstopp aufgenommen wurde (**A, C und E**), mit Aufnahmen in *single breath-stop*-Technik (**B, D und F**). Dargestellt sind Thorax und oberes Abdomen 20 Minuten nach i.v.-Gabe eines intravaskulären Kontrastmittels (500  $\mu$ l Fenestra VC). In den coronaren Aufnahmen (**A und B**) ist die korrekte Lage des endotrachealen Tubus zu erkennen (Pfeil). Die Mikro-CT der intubierten, aber frei atmenden Maus (**A, C und E**; 20 Sekunden Scanzeit; Atemfrequenz 100/Minute) führte zu unscharfen Bildern mit herabgesetzter Detailerkennbarkeit. Die *single breath-stop*-Mikro-CT (**B, D und F**; Scanzeit 40 Sekunden) verbesserte die Bildqualität und Detailerkennbarkeit deutlich; Gefäße wie z.B. Vena portae, Vena cava caudalis oder die Aorta abdominalis (**F**, Pfeilspitzen von links nach rechts) sind deutlicher zu erkennen als in **E**.

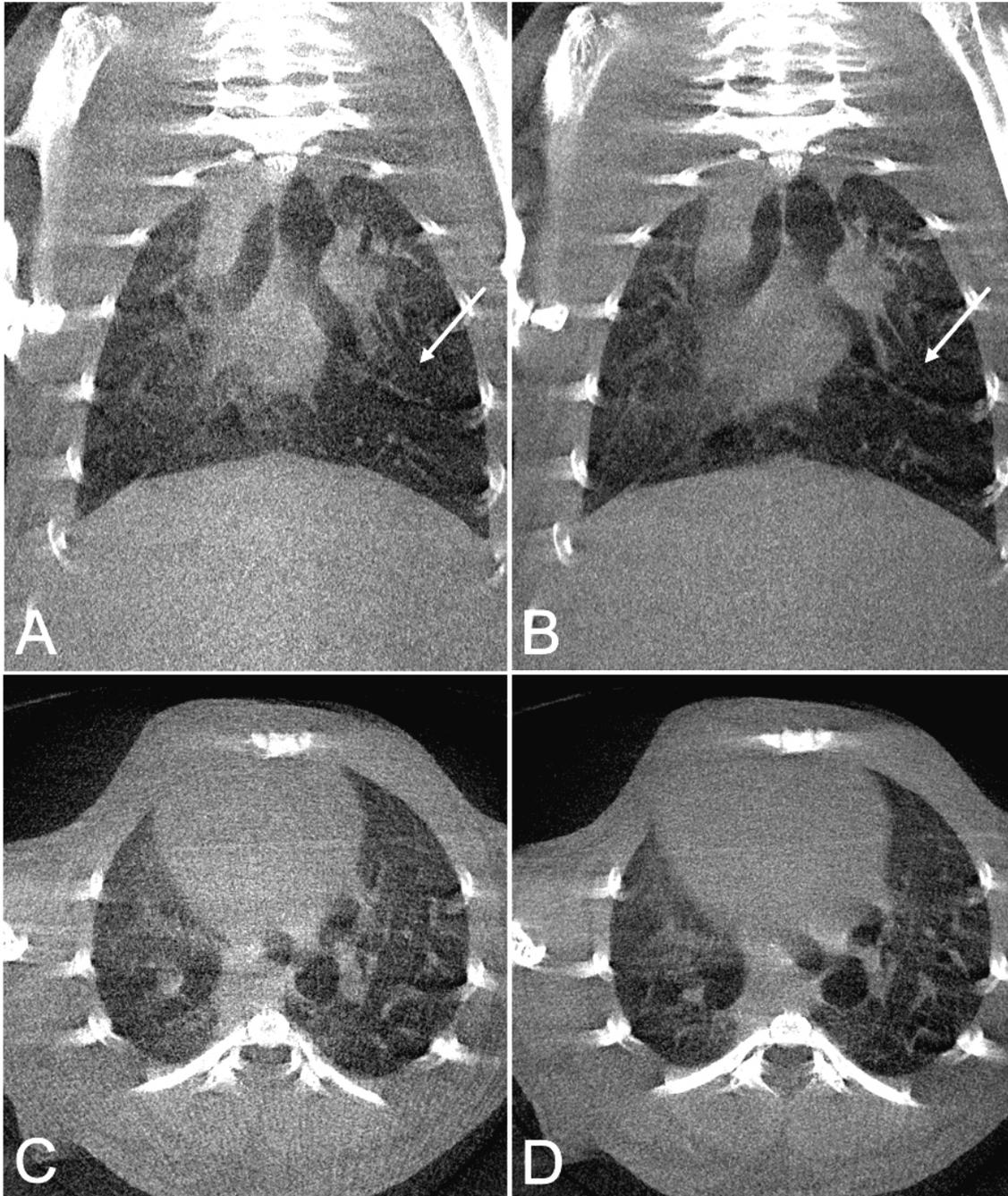
Um die Bewegungsunschärfe zu quantifizieren, wurden Dichteprofile der Lungen-Abdomen-Grenze erstellt. In Abbildung 4-3, C sind die Linienprofile graphisch dargestellt. Je steiler die Steigung desto schärfer der Übergang zwischen Thorax und Abdomen, das bedeutet weniger Unschärfe. Aus Abbildung 4-3, C wird ersichtlich, dass die Atemstopp-Technik zu einer wesentlich steileren Steigung (-38,6) im Vergleich zu Aufnahmen ohne Atemstopp (-6,1) führt.



**Abbildung 4-3:** Linienprofile der Zwerchfellregion. **A** und **B**) coronare Schichten derselben Maus, die ohne (**A**) und mit Atemstopp (**B**) untersucht wurde. Die eingezeichneten Linien zeigen die Stellen an denen die relativen Dichteprofile über die Lungen-Zwerchfellregion erstellt wurden. **C**) graphische Darstellung der Dichteprofile der Lungen-Abdomen-Grenze (in caudo-cranialer Richtung).

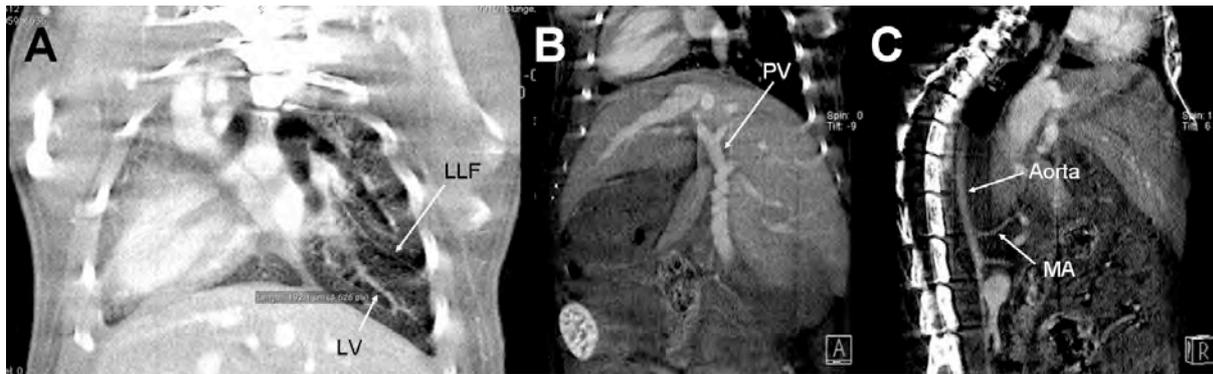
Des Weiteren erlaubte die Relaxation die Ausdehnung der Scanzeit ohne Spontanatmung von 20 (Abbildung 4-4, A und C) auf 40 Sekunden (Abbildung 4-4, B und D), was zu einer Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (SNR)

fürhte. Die SNR verbesserte sich von  $7,01 \pm 0,73$  für Bilder, die mit 20 Sekunden Scanzeit aufgenommen wurden, auf  $9,4 \pm 0,74$  für Datensätze, die mittels eines 40 Sekunden Scans aufgenommen wurden.



**Abbildung 4-4:** Vergleichende Darstellung eines 20 Sekunden- (A und C) und eines 40 Sekunden- (B und D) Scans in *single breath-stop*-Technik. Die Relaxation der Mäuse mittels Rocuronium erlaubte die Ausdehnung der Scanzeit von 20 (A und C; 600 Projektionen) auf 40 Sekunden (B und D; 1200 Projektionen), was zu einer Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses führte. So ist z.B. eine Lungenlappengrenze (Pfeil) im 40 Sekunden-Scan deutlich besser zu erkennen.

Nach Gabe eines intravaskulären Kontrastmittels (Fenestra VC; ART Advanced Research Technologies Inc.) waren die kleinsten erkennbaren Strukturen periphere Gefäße der Lunge und der Leber mit einem Durchmesser von ca. 100 µm. Kleine Strukturen wie z.B. eine Lungenlappengrenze waren deutlich zu erkennen (Abbildung 4-5, A). Des Weiteren war die hochauflösende Bildgebung abdomineller Gefäße möglich (Abbildung 4-5, B und C).



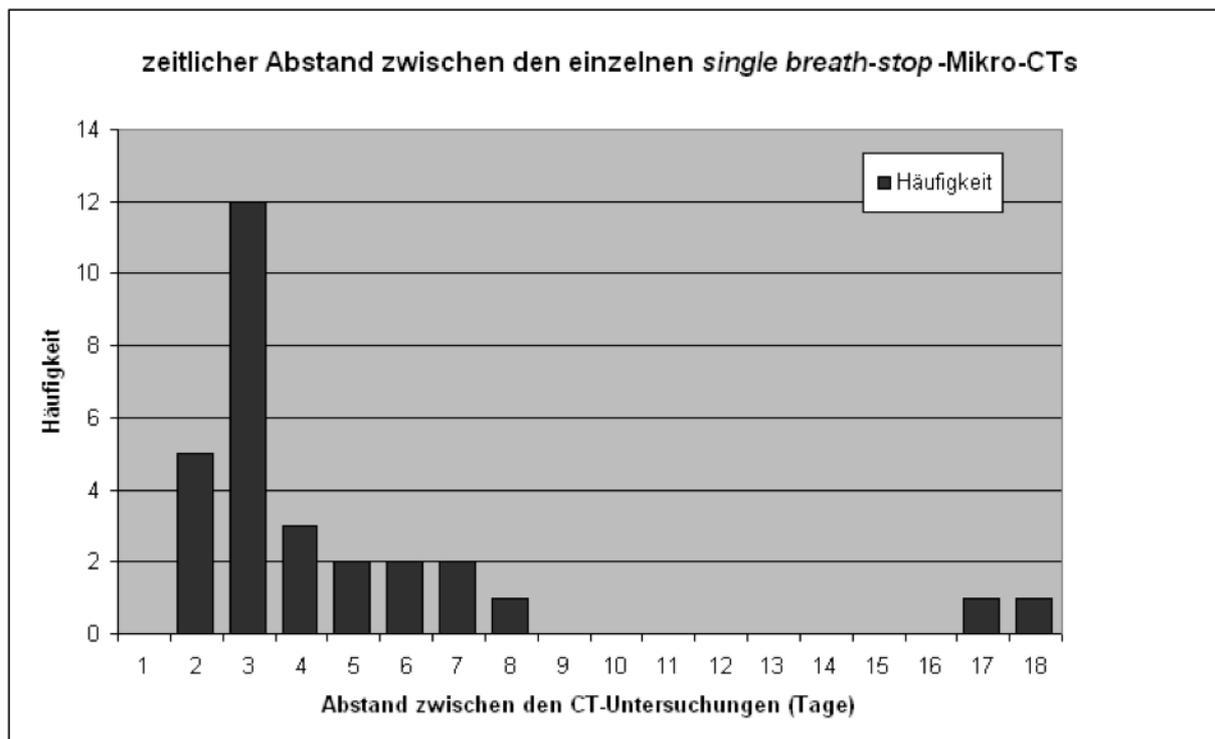
**Abbildung 4-5:** Die *single breath-stop*-Mikro-CT mit 40 Sekunden Untersuchungszeit (nach i.v.-Gabe von 500 µl Fenestra VC) erlaubt die hochauflösende Bildgebung von thorakalen und abdominellen Strukturen. **A)** Eine Lungenlappengrenze (LLF, *lobar lung fissure*) ist deutlich zu erkennen. Um die Qualität der hochauflösenden *single breath-stop*-Mikro-CT zu veranschaulichen wurde exemplarisch ein größeres Lungengefäß (LV, *lung vessel*) vermessen (190 µm); die kleinsten sicher identifizierbaren Lungengefäße hatten einen Durchmesser von ca. 100 µm und waren in der Peripherie der Lunge lokalisiert. **B** und **C)** Abdominale Gefäße wie z.B. die Portalvene (PV) oder die aus der abdominalen Aorta abgehenden Mesenterialarterien (MA) sind deutlich zu erkennen.

#### 4.4 Verlaufs bildgebung von Lebermetastasen

Von den 13 mehrfach mittels Mikro-CT in Atemstopp-Technik untersuchten Mäusen mit Lebermetastasen wurden insgesamt 43 Scans angefertigt, wobei die Tiere zwischen zwei und acht mal (Mittelwert  $3,31 \pm 1,75$ ) mittels CT untersucht wurden (Tabelle 4-1). Drei Mäuse mussten im Anschluss an einen Scan aufgrund der hohen Tumorlast getötet werden. Fünf Mäuse starben aufgrund der hohen Tumorlast noch in Narkose. Lediglich eine Maus (2,3%) starb in der Aufwachphase mit unbekannter Todesursache. Die *single breath-stop*-Mikro-CT wurde im Abstand von 2 bis maximal 18 Tagen durchgeführt, wobei in 58,6% der Fälle der Abstand zwischen den einzelnen CT-Untersuchungen 3 oder weniger Tage betrug (Abbildung 4-6).

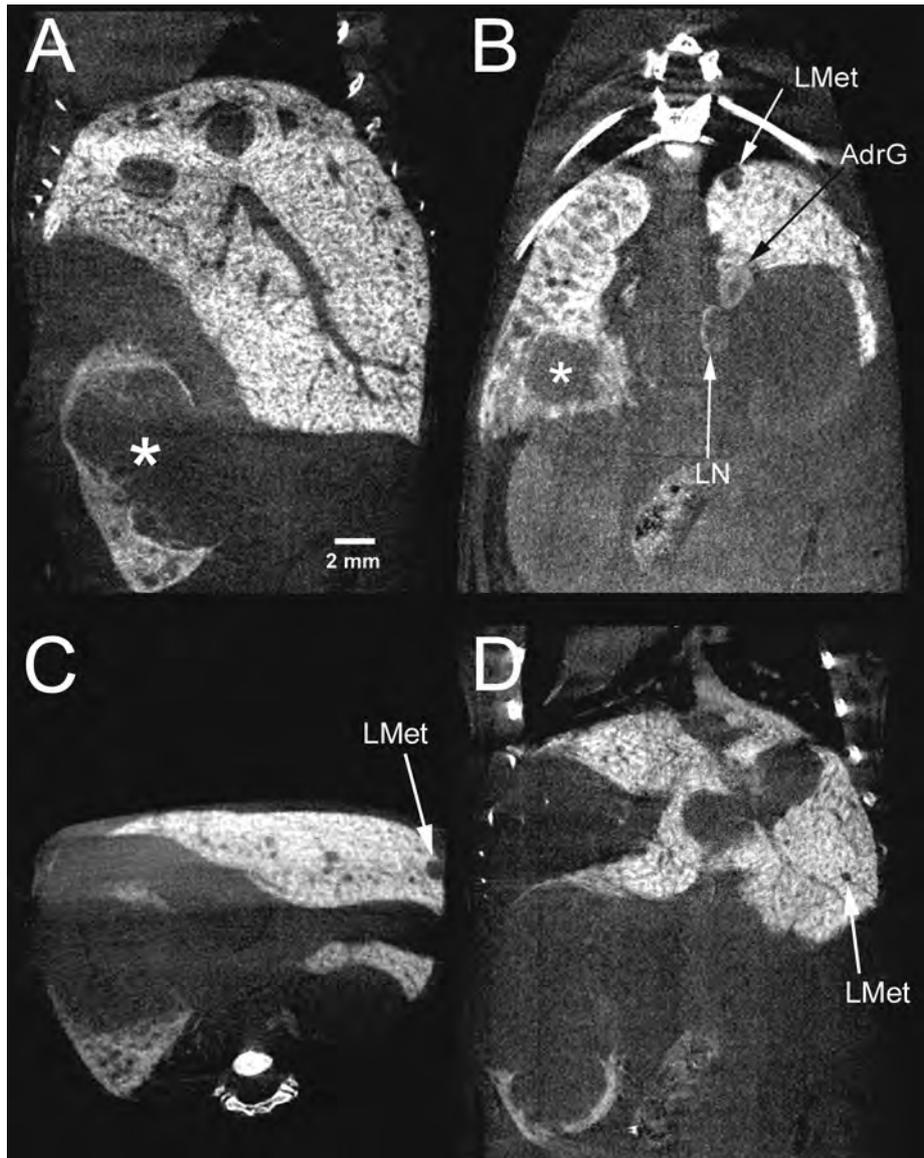
**Tabelle 4-1:** Anzahl der durchgeführten CT-Untersuchungen pro Lebermetastasenmodell-Maus

	<i>single breath-stop-Mikro-CT (Anzahl)</i>	<b>Mäuse (Anzahl)</b>
	2	6
	3	2
	4	3
	5	1
	8	1
<b>gesamt</b>	<b>43</b>	<b>13</b>
Mittelwert	3,31	
SD	1,75	



**Abbildung 4-6:** zeitlicher Abstand zwischen den einzelnen *single breath-stop-Mikro-CTs*

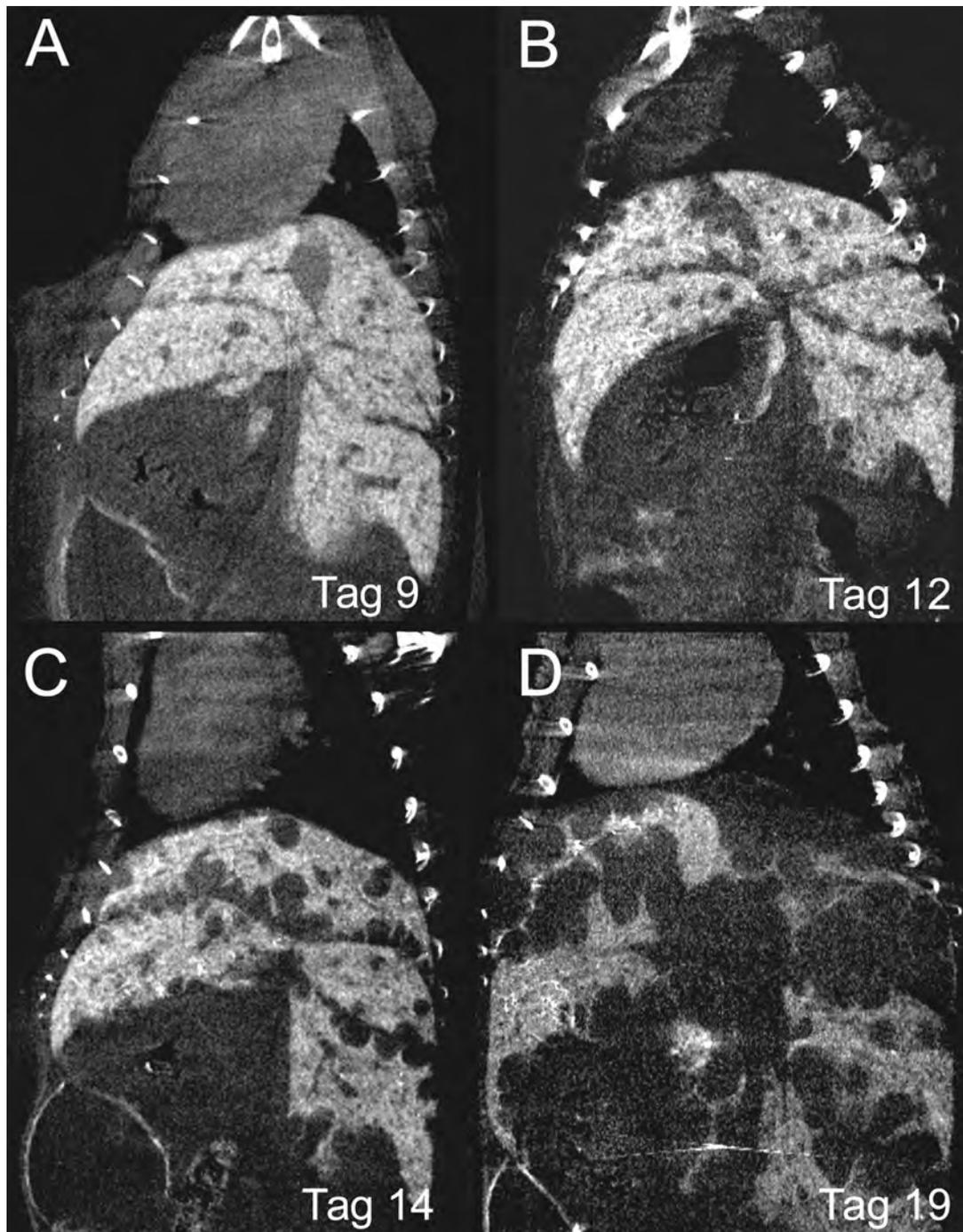
Die Ergebnisse zeigen, dass longitudinale hochauflösende Untersuchungen des Wachstums von Lebermetastasen in *single breath-stop*-Technik erfolgreich möglich sind, das heißt die Methode ist wiederholt (im Abstand von wenigen Tagen) im selben Tier einsetzbar. Selbst bei Untersuchungen im Abstand von nur zwei Tagen zeigten die Tiere keine auf die *single breath-stop*-Mikro-CT zurückzuführenden Beeinträchtigungen. Abhängig vom gewählten *Field of View* konnte bei einer Matrix von 512 x 512 x 512 Voxel eine mittlere Auflösung von 52,25 x 52,25 x 69,61  $\mu\text{m}^3$  erreicht werden. Die minimal erreichte Voxelgröße lag bei 38,8 x 38,8 x 52,1  $\mu\text{m}^3$ , die maximale Voxelgröße war 70,0 x 70,0 x 93,8  $\mu\text{m}^3$ . Die kleinsten sicher identifizierbaren Lebermetastasen hatten einen Durchmesser von ca. 300  $\mu\text{m}$  (Abbildungen 4-7). Beide eingesetzten leberspezifischen Kontrastmittel reichern sich im gesunden Lebergewebe an, Lebermetastasen nehmen kein Kontrastmittel auf und sind daher als „dunkle Löcher“ im hyperdensen gesunden Lebergewebe erkennbar.



**Abbildung 4-7:** Intrasplenisch (\*) und intrahepatisch (LMet) wachsende Tumoren 26 Tage nach intrasplenischer Injektion von C15-A.3-Kolonkarzinomzellen. Die Bilder wurden 4 Stunden nach intravenöser Injektion von 100  $\mu$ l Viscover<sup>®</sup> ExiTron<sup>®</sup> nano 12000 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) in *single breath-stop*-Technik aufgenommen. Die kleinsten sicher identifizierbaren Lebermetastasen (**D**, LMet) hatten einen Durchmesser von ca. 300  $\mu$ m. (**B**) zeigt die Kontrastmittelanreicherung in abdominalen Lymphknoten (LN) und in der Nebenniere (AdrG).

ExiTron nano erwies sich im Vergleich zu Fenestra LC als vorteilhaft: zum einen betrug das Injektionsvolumen mit 100  $\mu$ l nur 25% von Fenestra LC (400  $\mu$ l) und zum anderen war eine einmalige Injektion für eine longitudinale Bildgebung ausreichend, da es einen über Monate anhaltenden Leberkontrast bietet. Fenestra LC dagegen musste vor jeder CT-Untersuchung erneut injiziert werden, da es innerhalb weniger Tage über das hepatobiliäre System eliminiert wird. Abbildung 4-8 zeigt beispielhaft den Verlauf des Metastasenwachstums: 9 Tage nach intrasplenischer

0Tumorzellinjektion waren nur sehr wenige, kleine Lebermetastasen erkennbar. Die Aufnahmen 12 und 14 Tage nach Tumorzellinjektion zeigen eine zunehmende Größe und Zahl der Metastasen. Nach weiteren 7 Tagen (19 Tage nach Tumorzellinjektion) war die Leber diffus von unzähligen Lebermetastasen infiltriert.



**Abbildung 4-8:** Wiederholte CT-Untersuchungen der Maus in *single breath-stop*-Technik veranschaulichen das Wachstum von Lebermetastasen 9, 12, 14 und 19 Tage nach intrasplenischer Injektion von MC38- Kolonkarzinomzellen. Die Untersuchungen wurden nach einmaliger intravenöser Injektion von 100  $\mu$ l Viscover<sup>®</sup> ExiTron<sup>®</sup> nano 6000 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) durchgeführt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Intubationsmethode

Aufgrund der bereits beschriebenen Problematik der Artefakte durch Atmung in der *in vivo* Bildgebung wurde von uns die Mikro-CT in Atemstopp-Technik etabliert. Eine Voraussetzung hierfür war die Intubation der Mäuse, um so eine Kontrolle der Atmung zu erreichen. Während verschiedene Vorgehensweisen zur Intubation von Mäusen beschrieben werden (BROWN et al. 1999; VERGARI et al. 2003; RIVERA et al. 2005; SPOELSTRA et al. 2007; HAMACHER et al. 2008; MACDONALD et al. 2009; SINGER et al. 2010), bietet die in der vorliegenden Arbeit erarbeitete Intubationsmethode im Vergleich zu den anderen Methoden einige Vorteile. Der von uns beschriebene Versuchsaufbau ist einfach und kostengünstig. Während in anderen Arbeiten aufwendige Hilfsmittel wie zum Beispiel eine Lichtquelle mit Glasfaserkabel (RIVERA et al. 2005; MACDONALD et al. 2009), ein OP-Mikroskop (HAMACHER et al. 2008), speziell angefertigte Laryngoskope (BROWN et al. 1999; SPOELSTRA et al. 2007) oder ein kleinkalibriges starres Arthroskop (VERGARI et al. 2003) verwendet werden, werden für unsere Intubationsmethode keine speziellen Hilfsmittel benötigt. Eine Wärmeplatte für kleine Labortiere und eine starke Lichtquelle sind in den meisten Laboren normalerweise vorhanden. Auf eine speziell angefertigte Plexiglas-Maus-Halterung, wie sie in vielen anderen Publikationen (BROWN et al. 1999; RIVERA et al. 2005; SPOELSTRA et al. 2007; HAMACHER et al. 2008; MACDONALD et al. 2009; SINGER et al. 2010) verwendet wird, kann bei der in dieser Arbeit erarbeiteten Intubationsmethode ebenfalls verzichtet werden. Für eine optimale Arbeitsposition und Sichtbarkeit der Stimmritze genügt es die Wärmeplatte durch unterstellen einer kleinen Box (wie in Abbildung 3-4, A gezeigt) in Schräglage zu bringen. Da die Stimmritze in dieser Position sehr leicht zu identifizieren ist, wird weder ein speziell angefertigtes Laryngoskop, wie es von Brown et al. (1999) und Spoelstra et. al. (2007) verwendet wird, benötigt, noch ist es notwendig, Druck auf den Nacken der Maus auszuüben (HAMACHER et al. 2008; MACDONALD et al. 2009).

Ein weiterer Vorteil der von uns etablierten Methode ist die Verwendung eines Führungsdrahtes in Seldinger-Technik. Der Führungsdraht kann unter ständiger visueller Kontrolle zwischen die Stimmbänder geschoben werden, wohingegen die direkte Intubation mit dem kürzeren und dickeren Tubus (BROWN et al. 1999; SPOELSTRA et al. 2007) zu einer „finalen Blindheit“ im entscheidenden Moment führt und zudem die Verletzungsgefahr erhöht, da der Tubus steifer ist als der hier verwendete feine Führungsdraht. Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass die von Brown et al. (1999) beschriebene Methode (ohne Führungsdraht, ohne OP-Mikroskop, Durchleuchtung der Trachea, speziell angefertigtes Laryngoskop) im direkten Vergleich mit der von Hamacher et al. (2008) favorisierten Methode (Führungsdraht, OP-Mikroskop, keine Durchleuchtung der Trachea, kein Laryngoskop) als „weniger sicher“ beurteilt wird. Da der in dieser Arbeit verwendete Führungsdraht sehr dünn ist, wird die Sicht auf die Stimmritze zu keinem Zeitpunkt während der gesamten Intubation behindert. Wie in Abbildung 3-5, B gezeigt, ist der durch die helle Öffnung der Trachea ziehende dunkle Führungsdraht sehr gut zu erkennen. Daher gelingt die hier beschriebene Intubationsmethode sehr sicher - keine der hier durchgeführten Intubationen ist falsch. Als besonders positiv hat sich gezeigt, dass die extrem weiche und daher atraumatische Spitze des Führungsdrahtes auch Anfängern eine sichere Intubation ohne Verletzung der Maus ermöglicht.

Zur Visualisierung der Stimmritze wird von einigen Arbeitsgruppen ein Glasfaserkabel, welches gleichzeitig als Führungsdraht dient, verwendet (RIVERA et al. 2005; MACDONALD et al. 2009). Des Weiteren ist die Verwendung eines OP-Mikroskopes (HAMACHER et al. 2008; SINGER et al. 2010) oder eines kleinkalibrigen starren Arthroskops (VERGARI et al. 2003) beschrieben. Obwohl möglich, sind diese Ansätze nach Meinung der Autorin zu aufwendig, da die Durchleuchtung der Trachea einfacher durchzuführen ist und da ein Mikrodraht mit einem Durchmesser von ca. 0,2 mm als Führungsdraht aufgrund der weichen Spitze weniger traumatisierend ist. Lediglich Brown et al. (1999) und Spoelstra et al. (2007) wenden die auch in der vorliegenden Arbeit verwendete Durchleuchtung der Trachea an. Allerdings verzichten diese beiden Arbeitsgruppen auf einen Führungsdraht, wodurch die Methode weniger sicher wird und schwieriger durchzuführen ist. Hamacher und Mitarbeiter (HAMACHER et al. 2008) dagegen sind der Meinung, dass die Durchleuchtung der Trachea zeitaufwendiger sei, da sowohl die Sichtachse

als auch die Maus und die Lichtquelle optimal in ihrer dreidimensionalen Anordnung aufeinander abgestimmt werden müssen. Dieses Problem kann in der vorliegenden Arbeit allerdings mit einer mittleren Intubationszeit von deutlich weniger als einer Minute bei geübten Personen nicht bestätigt werden.

### **5.2 Strategien zur Verminderung von Bewegungsartefakten in der thorako-abdominellen Bildgebung der lebenden Maus**

Für eine Vielzahl von Fragestellungen ist es von Relevanz, Bilder zu akquirieren, die weitgehend frei von Bewegungsartefakten sind. Während Bewegungsartefakte die Detailerkennbarkeit in Bildern reduzieren, ermöglichen Gating-Techniken oder die Bildaufnahme in Atemstopp-Technik nahezu bewegungsartefaktfreie Bilder, wodurch die Detailerkennbarkeit für sowohl physiologische als auch pathologische Strukturen verbessert wird. So ist es zum Beispiel sehr viel einfacher kleine Lebermetastasen in bewegungsartefaktfreien Bildern zu erkennen als in Bildern, die durch Bewegungsartefakte unscharf sind.

Für die Mikro-CT von kardio-thorakalen Strukturen der Maus sind verschiedene Methoden des prospektiven und retrospektiven respiratorischen Gatings beschrieben (BADEA et al. 2004; CAVANAUGH et al. 2004; WALTERS et al. 2004; NAMATI et al. 2006; DRANGOVA et al. 2007; FORD et al. 2007a; FORD et al. 2007b; GUERRERO et al. 2007; BARTLING et al. 2008; FARNCOMBE 2008; HORI et al. 2008; JOHNSON et al. 2008a; SERA et al. 2008; CAO et al. 2009; ERTEL et al. 2009; FORD et al. 2009; YU et al. 2009; BARTLING et al. 2010; NAMATI et al. 2010; LEE et al. 2011; SAWALL et al. 2011). Für einige dieser Methoden ist es nötig die Mäuse zu intubieren, um die Bildaufnahme mit den Atembewegungen zu synchronisieren (BADEA et al. 2004; CAVANAUGH et al. 2004; WALTERS et al. 2004; NAMATI et al. 2006; GUERRERO et al. 2007; BADEA et al. 2008b; JOHNSON et al. 2008a; SERA et al. 2008; NAMATI et al. 2010). Andere Autoren dagegen bevorzugen Gating-Techniken, die ohne Intubation auskommen (FORD et al. 2007a; FORD et al. 2007b; CAO et al. 2009; LEE et al. 2011), da die Intubation und Beatmung unnatürliche Effekte auf die Dynamik der Atmung des Tieres haben kann, da Atemvolumen, endinspiratorischer Druck und Atemfrequenz durch den Untersucher vorgegeben werden. Die Erhebung von physiologischen Lungenfunktionsparametern sei bei

intubierten Mäusen nur begrenzt möglich (FORD et al. 2007a; LEE et al. 2011). Daher sind Techniken mit selbstständig atmenden Tieren für longitudinale Studien und für Krankheitsmodelle, bei denen die mechanische Beatmung zu systematischen Fehlern bei der Messung physiologisch relevanter Parameter führen würde, zu bevorzugen (FORD et al. 2007b; CAO et al. 2009). Da das Ziel der vorliegenden Arbeit jedoch nicht die Bestimmung von Lungenfunktionsparametern sondern die bewegungsartefaktfreie hochauflösende Darstellung von thorakalen und abdominellen Strukturen war, war diese Einschränkung für unsere Untersuchungen unerheblich. Weitere Nachteile der Intubation sind laut Cao et al. (2009) die benötigten speziellen Hilfsmittel und die nötigen besonderen Fertigkeiten um eine Verletzung der oberen Atemwege zu vermeiden. Die in der vorliegenden Dissertation entwickelte Intubationsmethode zeigt, dass die Intubation ohne aufwendige Hilfsmittel erfolgreich möglich ist und auch von Anfängern sicher durchgeführt werden kann. Lee et al. (2011) bezeichnen Gating-Techniken, die eine Intubation erfordern als „invasiv“. Zum einen sei die Intubation aufgrund des Verletzungsrisikos der Trachea invasiv und zum anderen habe die Intubation die mechanische Beatmung mittels eines Beatmungsgerätes und die Notwendigkeit einer Relaxation zur Folge, wobei die mechanische Beatmung immer mit gewissen Verletzungen einhergehe. Unsere Atemstopp-Methode mit Intubation und mechanischer Beatmung ist zwar invasiv, relevante Verletzungen können wir jedoch nicht beobachten. Auch wiederholt in *single breath-stop*-Technik untersuchte Mäuse zeigen keine auf die Atemstopp-Technik zurückzuführenden Beeinträchtigungen, lediglich bei einer von insgesamt 43 durchgeführten CT-Untersuchungen verstirbt die Maus im Anschluss an den Scan mit unbekannter Todesursache. Diese Ausfallrate liegt im Rahmen des normalen Narkoserisikos.

Aufgrund von Schwankungen in der Atemtiefe (MAI et al. 2005) können Bewegungsunschärfen jedoch trotz verschiedenster Gating-Techniken meist nicht vollständig eliminiert werden (CAVANAUGH et al. 2004; BARTLING et al. 2008). Die Bildgebung während eines einzigen kontrollierten Atemstillstandes wie von uns durchgeführt ist daher vorteilhaft. Es gibt keine Publikation, in der die *single breath-stop*-Bildgebung wie von uns beschrieben schon einmal durchgeführt wurde. Lediglich Guerrero et al. (2007) beschreiben eine Methode zur Bestimmung der Lungencompliance bei Mäusen und Ratten und verwenden hierzu die Datenaufnahme während eines Atemstopps, wobei mehrere Scans bei

verschiedenen endinspiratorischen Drücken durchgeführt werden. Allerdings ist die Untersuchungszeit in dieser Arbeit mit 8 Sekunden sehr kurz, sodass eine Relaxation nicht nötig ist. Des Weiteren liegt die räumliche Auflösung mit 100  $\mu\text{m}$  deutlich über der von uns erreichten Auflösung (39 x 39 x 50  $\mu\text{m}$ ).

Die Untersuchungszeiten der meisten Mikro-CTs sind jedoch mit bis zu 16 Minuten deutlich länger und erlauben daher keine Bildaufnahme während eines einzigen Atemstopps. Bei diesen Geräten bietet sich als Alternative die Bildaufnahme während zyklischer Atemstopps an. So synchronisierten Johnson et al. (2008a) die Bildaufnahme mit 500 ms dauernden zyklischen Atemstopps, um die *in vivo* Darstellbarkeit von Lungentumoren bei der Maus zu verbessern. Die von Namati et al. (2006) durchgeführte Technik zur Datenaufnahme während intermittierenden Atemstopps (IIBH – *intermittent iso-pressure breath hold technique*) liefert qualitativ hochwertige Bilder, benötigt aber wiederum die Synchronisation von Mikro-CT und Beatmungsgerät um Gating mit verlängerten Atemstopp-Intervallen durchführen zu können. Während des 5 Sekunden dauernden Atemstopps werden mehrere Projektionen mit einer Belichtungszeit von 500 ms, die verglichen mit 33 ms Belichtungszeit bei unseren Untersuchungen mehr als 15 mal so lang ist, akquiriert. Mit einer Scanzeit von 35 Minuten ist diese Methode zeitaufwendig, des Weiteren ist die Strahlendosis mit 845 mGy relativ hoch. Von uns durchgeführte Dosismessungen (BOLL et al. 2011a) mit vergleichbaren Scanparametern, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet werden, ergeben dagegen eine Dosis von  $241 \pm 2$  mGy.

Sera et al. (2008) führen ebenfalls die Bildaufnahme während zyklischer Atemstopps durch. Sie erreichen eine qualitativ hochwertige Darstellung von sowohl Lunge als auch Herz bei einer Auflösung von 12  $\mu\text{m}$ , allerdings unter Verwendung eines Synchrotrons. Vorteile des Synchrotrons sind der im Vergleich zu konventionellen Röntgenröhren sehr viel höhere Photonenfluss und die monochromatische Strahlung. Dies ermöglicht kurze Belichtungszeiten, einen hohen Kontrast und ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Andererseits ist ein Synchrotron technisch sehr aufwendig, daher extrem teuer und deshalb nur begrenzt verfügbar. Sera et al. (2008) synchronisieren die Datenaufnahme mit dem Beatmungsdruck und akquirieren 820 Projektionen mit einer Belichtungszeit von 20 ms für Lungenaufnahmen bzw. 10 ms für Herzbildgebung während eines 300 ms dauernden zyklischen Atemstopps. Die Untersuchungszeit ist mit 7,5 Minuten

allerdings relativ lang und die Strahlendosis mit 1,9 Gy pro Scan bei Mäusen relativ hoch. Ein Nachteil des prospektiven Gatings, wozu auch die Bildaufnahme während zyklischer Atemstopps zählt, ist die damit einhergehende Verlängerung der Untersuchungszeit. So beträgt z.B. die Untersuchungszeit bei Ford und Mitarbeitern (2005) ohne Gating 11 Minuten, mit prospektivem Gating dagegen 20 bis 25 Minuten. In der Arbeit von Cavanaugh (2004) verlängert sich die Untersuchungszeit von 16 Minuten ohne Gating auf 25 Minuten mit prospektivem Gating. Cavanaugh und Koautoren (2004) verfolgen zwei unterschiedliche Ansätze: zum einen narkotisieren sie die Mäuse sehr tief, sodass sich das typische Atemmuster aus Schnappatmung gefolgt von relativ langen Atempausen entwickelt. Die Bildaufnahme erfolgt ohne Gating. Dies führt zu nahezu bewegungsartefaktfreien Bildern mit jedoch relativ schlechtem Lungenkontrast, da die Daten überwiegend in Endexpiration akquiriert werden. Um das Problem des insuffizienten Lungenkontrastes zu verhindern, intubieren und beatmen sie die Tiere in ihrer zweiten Methode. In Vorversuchen finden diese Autoren heraus, dass bei einem EIP von 16 cm H<sub>2</sub>O ein optimaler Gewebekontrast erreicht werden kann ohne die Lunge zu überblähen. Dieser Wert wird daher auch als endinspiratorischer Druck in der in dieser Arbeit entwickelten Methode der *single breath-stop*-Mikro-CT eingesetzt. Obwohl ein 22-Gauge Tubus in den meisten Fällen dicht mit der Trachea abschließt, ist der von uns eingesetzte zusätzliche Silikonkonus hilfreich, um den EIP während des Atemstopps konstant zu halten, was für eine Vermeidung von Bewegungsartefakten unerlässlich ist. In der Arbeit von Cavanaugh et al. (2004) wird nach einer Modifizierung des Mikro-CTs die Blendenöffnungszeit der Röntgenröhre durch das Beatmungsgerät gesteuert. Die Projektionen werden ab dem Maximum der Inspirationsphase mit einer Belichtungszeit von 100 ms aufgenommen. Mit dieser Technik erreichen diese Autoren einen deutlich besseren Lungenkontrast. Bewegungsartefakte können mit dieser Methode jedoch nicht eliminiert werden, da die Datenaufnahme während der Bewegungsphase der Lunge stattfindet. Daher entwickeln Walters et al. (2004) eine Verzögerungsschaltung, die das Zeitfenster der Datenaufnahme in eine Phase des Atemzyklus mit weniger Bewegung verschiebt. Hiermit werden die Bewegungsartefakte um ca. zwei Drittel reduziert. Diese Autoren berichten jedoch über Probleme mit insuffizient anästhesierten Mäusen, die versuchen selbstständig zu atmen wodurch uneinheitliche Atemmuster entstehen. Dies wiederum mindert die Effektivität des Gatings, da die Verzögerung für das Zeitfenster der Datenaufnahme

zuvor festgelegt wird. Ein weiterer Nachteil ist, dass das Ein- und Ausgangssignal der Verzögerungsschaltung mittels eines Oszilloskops überwacht werden muss, um ein ordnungsgemäßes Arbeiten des Systems zu gewährleisten.

Anstatt verlängerter Untersuchungszeiten nutzen Badea und Mitarbeiter (2004 und 2008b) eine Röntgenröhre mit größerem Brennfleck (3000 bis 1000  $\mu\text{m}$ ). Der Vorteil hierbei ist der höhere Photonenfluss wodurch kürzere Belichtungszeiten (10 Millisekunden) möglich werden, was wiederum zu einer Reduktion der Bewegungsunschärfe durch Herz und Atmung beiträgt. Nachteilig an diesem Versuchsaufbau ist die limitierte räumliche Auflösung (100  $\mu\text{m}$ ). Bei den meisten der beschriebenen Gating-Strategien liegt die erreichte räumliche Auflösung bei ca. 100  $\mu\text{m}$  (BADEA et al. 2004; CAVANAUGH et al. 2004; WALTERS et al. 2004; CODY et al. 2005; BARTLING et al. 2007; DRANGOVA et al. 2007; FORD et al. 2007a; FORD et al. 2007b; GUERRERO et al. 2007; BADEA et al. 2008b; BARTLING et al. 2008; FARNCOMBE 2008; JOHNSON et al. 2008a; ERTEL et al. 2009; FORD et al. 2009; SAWALL et al. 2011). Die von uns erreichte Voxelgröße von 39 x 39 x 50  $\mu\text{m}$  bei einem *Field of view* von Thorax und oberem Abdomen ist damit deutlich höher, wobei durch eine weitere Reduktion des FoV die Möglichkeit besteht, Datensätze mit noch kleinerer Voxelgröße zu akquirieren. Eine ähnlich kleine Voxelgröße (28  $\mu\text{m}$  bei 2 x 2 *binning*) wird auch von Namati et al. (2006), die einen Detektor mit höherer Auflösung in Kombination mit respiratorischem Gating und einer Belichtungszeit von 500 ms bei einer Untersuchungszeit von über 30 Minuten verwenden, erreicht.

Eine weitere Möglichkeit die Belichtungszeit zu verkürzen bietet die relativ neue Technologie sogenannter Kohlenstoff-Nanoröhren (*carbon nanotube* - CNT) basierter Feldemitter-Röntgenquellen, wie sie von Cao et al. (2009), Yu und Mitarbeitern (2009) und von Lee et al. (2011) verwendet wird. Die Vorteile dieser Röntgenröhren sind u.a. der kleine Brennfleck und der höhere Photonenfluss, welcher kürzere Belichtungszeiten ermöglicht. Hiermit sollen die räumliche und zeitliche Auflösung verbessert werden. Die CNT-basierte Röntgenquelle erlaubt die atemsynchrone Bildaufnahme auch bei nicht intubierten Mäusen mit physiologischer aperiodischer Atmung (CAO et al. 2009), die Methode ist daher zur Bestimmung von Lungenfunktionsparametern geeignet (LEE et al. 2011). Yu und Mitarbeiter (2009) entwickeln diese Gating-Methode weiter und etablieren kardiales Gating sowie eine Rekonstruktionsmethode, die weniger Projektionen benötigt und daher die

Strahlenbelastung für das Tier reduziert. Die Technologie CNT-basierter Röntgenröhren befindet sich jedoch noch in der Anfangsphase und bietet weiteres Entwicklungspotential. Die eingesetzte Belichtungszeit von 20 (YU et al. 2009) bis 50 ms (CAO et al. 2009) liegt im Bereich der Belichtungszeit dieser Arbeit (33 ms). Die erreichte räumliche Auflösung zwischen 62 und 77  $\mu\text{m}$  liegt etwas unter der von uns erreichten Auflösung von 39 x 39 x 50  $\mu\text{m}$ . Die Brennfleckgröße ist mit ca. 100  $\mu\text{m}$  deutlich größer als die Brennfleckgröße der von uns verwendeten Röntgenröhre (1 bis 5  $\mu\text{m}$ ). Ebenso ist die Untersuchungszeit mit 5 bis 30 Minuten deutlich länger als die Untersuchungszeit der von uns verwendeten Methode (40 Sekunden).

Alternativ zum prospektiven Gating kann auch retrospektives Gating angewandt werden. Hierbei erfolgt die Datenaufnahme kontinuierlich, die Zuordnung der einzelnen Projektionen zu den Atemphasen geschieht erst nach der Datenaufnahme. Extrinsisches retrospektives Gating erfordert die Aufzeichnung des Atemsignals parallel zur Bildaufnahme, wodurch eine spätere Zuordnung der Projektionen ermöglicht wird. Diese Gating-Methode wird z.B. von Ford et al. (2007b und 2009) und Drangova et al. (2007) eingesetzt. In diesen drei Arbeiten wird jedoch aus den oben genannten Gründen auf eine Intubation der Tiere verzichtet. Die Atembewegungen werden stattdessen mittels eines kleinen luftgefüllten Kissens (sog. *Atempad*) detektiert und retrospektiv mit den aufgenommenen Projektionen synchronisiert, um dreidimensionale Datensätze aus Projektionen einer bestimmten Atemphase zu rekonstruieren, wobei durch Rekonstruktion von in Endexpiration während eines Zeitfensters von 170 ms aufgenommenen Projektionen die beste Bildqualität (d.h. am wenigsten Bewegungsartefakte) erreicht wird (FORD et al. 2007b). Um sicher zu gehen, dass in jeder Atemphase genügend Bilder aufgenommen werden, werden 10 Gantry-Rotationen (4160 Projektionen) durchgeführt; für eine ausreichende Bildqualität sind mindestens 6 Gantry-Rotationen nötig (FORD et al. 2007b). Dies bedeutet, dass durch die eingesetzte retrospektive extrinsische Gating-Technik die Untersuchungszeit (und somit auch die Strahlendosis) verzehnfacht (bei 10 Rotationen) wird. Hierin liegt ein weiterer Vorteil der in der vorliegenden Dissertation entwickelten Atemstopp-Technik: diese Methode geht weder mit einer verlängerten Untersuchungszeit noch mit einer erhöhten Strahlenbelastung einher.

Im Gegensatz zum extrinsischen Gating erfordert intrinsisches retrospektives Gating, wie es von Bartling und Mitarbeitern (2008) für respiratorisches Gating etabliert wird, keine zusätzliche Hardware, da die für die Zuordnung nötigen Informationen aus dem Datensatz selbst isoliert werden. Hierfür wird in jeder Projektion eine *Region of interest* (ROI) über die Zwerchfellregion gelegt. Anhand der Grauwerte erfolgt die Zuordnung zu den einzelnen Atemphasen. Diese Methode des Gatings geht allerdings mit einer erhöhten Strahlenbelastung einher, da mehrere Gantry-Rotationen durchgeführt werden müssen um sicher zu stellen, dass in jeder Atemphase genügend Projektionen akquiriert wurden. So werden von den Autoren 16 Gantry-Rotationen durchgeführt (anstatt einer Gantry-Rotation bei Datensätzen ohne Gating). Dies bedeutet eine 16fach erhöhte Strahlenexposition im Vergleich zu Datensätzen ohne Gating. Ein weiterer Nachteil des retrospektiven intrinsischen Gatings sind die benötigten, meist aufwendigen Algorithmen zur Nachbearbeitung der Datensätze. Hier bietet die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methode der *single breath-stop*-Mikro-CT einige Vorteile: die Methode geht weder mit einer verlängerten Scanzeit (daher auch keine erhöhte Strahlenbelastung) einher, noch sind aufwendige Algorithmen zur Nachbearbeitung der Datensätze nötig. Die Mikro-computertomographische Untersuchung in Atemstopp-Technik hat aber auch Nachteile: so muss zunächst vom Untersucher eine Intubationsmethode sicher beherrscht werden. Dies ist zumeist jedoch relativ schnell zu bewerkstelligen. Des Weiteren wird für die Methode ein Beatmungsgerät für Mäuse benötigt. Im Vergleich zum retrospektiven intrinsischen Gating ist die *single breath-stop*-Mikro-CT (abgesehen von der Strahlendosis) invasiver, da die Mäuse intubiert und relaxiert werden müssen. Beides wird jedoch von den Mäusen gut toleriert. Zuletzt lässt sich sagen, dass bei unserem Mikro-CT keine einfache Implementierung von extrinsischen Gatingstechniken möglich ist, womit die Bildgebung in Atemstopp-Technik für uns daher eine gute Alternative zum Gating war und ist.

### 5.3 Verlaufsbildgebung

Musste früher für Verlaufsstudien zu jedem Untersuchungszeitpunkt eine Versuchsgruppe getötet werden, so ermöglicht die longitudinale nicht-invasive Bildgebung die mehrfache Untersuchung von Versuchstieren, ohne dass diese hierfür getötet werden müssen. Sie trägt somit dazu bei, die Zahl der benötigten

Versuchstiere insgesamt zu reduzieren und verbessert darüber hinaus die Versuchsergebnisse, da Verlaufsstudien am selben Tier durchgeführt werden können. Für verschiedene Untersuchungszeitpunkte müssen so nicht mehr unterschiedliche Tiere miteinander verglichen werden, damit können interindividuelle Einflüsse auf die Versuchsergebnisse reduziert werden.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Methode der *single breath-stop*-Bildgebung für Verlaufsstudien sehr gut geeignet ist. Bei Mäusen mit gutem Allgemeinbefinden ist die *single breath-stop*-Mikro-CT problemlos wiederholt einsetzbar (nur eine von 13 Mäusen starb mit unbekannter Todesursache). Selbst bei Untersuchungen im Abstand von nur zwei Tagen zeigen die Tiere keine auf die Atemstopp-Technik zurückzuführenden Beeinträchtigungen. Die initiale Befürchtung, dass ein Atemstopp über 40 Sekunden für Mäuse, die eine physiologische Atemfrequenz von bis zu 230 pro Minute (BARTLING et al. 2010) haben, zu lang sei, bestätigte sich nicht. Der Atemstopp wird von den Tieren gut toleriert und die Mäuse erholen sich sehr schnell. Es werden keine durch eine eventuelle Hypoxie bedingten Ausfallserscheinungen beobachtet. Sind die Tiere jedoch schon vor der Mikro-CT-Untersuchung z.B. durch die Tumorlast geschwächt, kann die Belastung durch Narkose in Kombination mit Relaxation und mechanischer Beatmung unter Umständen zu einem Versterben in Narkose oder im Anschluss an die Untersuchung führen. Diese Mäuse hätten (aus Sicht der Autorin) jedoch aus tierschutzrechtlichen Gründen ohnehin aufgrund der hohen Tumorlast im Anschluss an die Untersuchung getötet werden müssen.

In den meisten Publikationen wird eine Evaluierung zur Einsetzbarkeit der verschiedenen Gating-Methoden für die longitudinale Bildgebung nicht beschrieben. Für einige prospektive Gating-Methoden werden jedoch Experimente zur Wiederholbarkeit der Gating-Technik durchgeführt. So führen Cody et al. (2005) bei Mäusen mit Lungentumoren einen initialen Scan und einen erneuten Scan nach 5 Wochen erfolgreich durch. Hori und Mitarbeiter (2008) untersuchen Mäuse mit Lungentumoren im Abstand von jeweils zwei Wochen (ab Woche 10 bis Woche 30 nach Tumorinduktion). Namati et al. (2006) beziffern mit der von ihnen entwickelten IIBH-Methode eine Sterblichkeit von ca. 30%. Durch Verbesserung der Methode (modifizierte Anästhesie, Aufrechterhaltung der Körpertemperatur, verbesserte Intubationsmethode) kann diese jedoch auf unter 10% gesenkt werden (NAMATI et al. 2010). Die Abstände zwischen den einzelnen mikro-computertomographischen

Untersuchungen sind in dieser Arbeit jedoch mit einem Monat, verglichen mit wenigen Tagen bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, relativ lang. Des Weiteren kann mit der von uns entwickelten *single breath-stop*-Mikro-CT eine niedrigere Sterblichkeit (2,3%) erreicht werden.

### 5.4 Relaxation

Ein Hauptvorteil der hier vorgestellten Methode ist die relativ kurze Untersuchungszeit von 20 bzw. 40 Sekunden pro Scan. Dies bietet uns die Möglichkeit die Mikro-CT Untersuchung während eines einzigen Atemstopps durchzuführen, eine Gating-Methode ist daher nicht nötig. Der Einsatz eines nicht-depolarisierenden Muskelrelaxans (SCHWARTE et al. 2000) ermöglicht die Ausdehnung des Atemstopps von 20 auf 40 Sekunden, womit sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis etwas, jedoch nicht linear, verbessert. Der Vorteil nicht-depolarisierender Muskelrelaxanzien ist, dass sie antagonisiert werden können, während depolarisierende Muskelrelaxanzien dagegen nicht antagonisierbar sind. In der vorliegenden Arbeit wird als nicht-depolarisierendes Muskelrelaxans Rocuronium eingesetzt. Da die klinische Wirkdauer der Relaxation in der Humanmedizin ungefähr 30 - 40 Minuten beträgt, was für unseren Zweck zu lange ist, haben wir uns aus zweierlei Gründen für eine Antagonisierung des Muskelrelaxans entschieden: zum einen sollte die Dauer der Relaxation die Narkosedauer nicht überschreiten und zum anderen sollte die Dauer der Beatmung möglichst kurz gehalten werden. Daher wird das Muskelrelaxans unmittelbar im Anschluss an die CT-Untersuchung mittels Sugammadex antagonisiert. Der Hauptvorteil von Sugammadex ist die Aufhebung der neuromuskulären Blockade ohne Hemmung der Acetylcholinesterase. Sugammadex besitzt eine hohe Affinität gegenüber Rocuronium; es bindet direkt an Rocuronium und enkapsuliert es. Dies bedeutet, dass Sugammadex im Gegensatz zu anderen Antagonisten wie z.B. Neostigmin keinen Effekt auf die neuromuskuläre Endplatte hat. Daher treten keine cholin-ähnlichen Nebenwirkungen wie Bradykardie, Bronchokonstriktion oder Speichelfluss auf (MILLER 2007). Von Namati und Mitarbeitern (2006) wird zunächst das ebenfalls nicht-depolarisierende Muskelrelaxans Pancuronium eingesetzt, im Zuge der Optimierung der Gating-Methode wechseln die genannten Autoren zu Rocuronium, welches jedoch i.m. verabreicht wird. Dies führt evtl. zu einem langsameren Wirkungseintritt (in der

Publikation nicht beschrieben), wodurch die Narkosedauer verlängert wird. Für einen schnelleren Wirkungseintritt wird Rocuronium von uns daher i.p. verabreicht. Des Weiteren wird bei Namati et al. (2010) auf eine Antagonisierung verzichtet. Dies führt zu einer deutlich längeren Rekonvalensenzphase der Tiere (über 60 Minuten), womit evtl. auch die höhere Sterblichkeit begründet werden könnte. Mit der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten i.p. Applikation von Sugammadex dagegen setzt innerhalb von 5 Minuten wieder Spontanatmung ein und die Mäuse können kurze Zeit später extubiert werden. Sowohl die Narkosedauer als auch die Dauer der mechanischen Beatmung können somit auf ein Mindestmaß reduziert werden.

### **5.5 Leberspezifische Kontrastmittel**

Die Mikro-CT-Bildgebung kleiner Lebermetastasen in Mäusen erfordert effiziente Kontrastmittel, um den ungenügenden Weichteilkontrast zwischen Metastase und Lebergewebe zu kompensieren. Normalerweise werden Kontrastmittel eingesetzt um den pathologischen Prozess selbst zu kontrastieren, für die Leberbildgebung dagegen werden häufig Kontrastmittel benutzt, um den Kontrast von Zellen des gesunden Lebergewebes anzuheben, sodass pathologische Prozesse als nicht-kontrastierte Regionen im kontrastierten Lebergewebe sichtbar werden (KRAUSE et al. 2002; WEBER et al. 2004; OHTA et al. 2006; ALMAJDUB et al. 2007; MONTET et al. 2007; GRAHAM et al. 2008; MARTINIOVA et al. 2009; MARTINIOVA et al. 2010). Um sehr kleine Lebermetastasen identifizieren zu können, ist neben hochauflösendem Bildmaterial auch ein starker und spezifischer Kontrast des Lebergewebes notwendig. Für longitudinale Studien ist ein Kontrastmittel mit lang anhaltendem Kontrast bei einmaliger Injektion ideal, da hiermit zeitaufwendige und für das Tier belastende wiederholte Schwanzveneninjektionen vermieden werden können. Des Weiteren ist es vor allem bei Mäusen mit Blutvolumina von 1200 bis 1500 µl wichtig, die injizierte Kontrastmittelmenge möglichst gering zu halten. Daher ist das von uns in einer Studie für den Einsatz zur Leberbildgebung bei Mäusen evaluierte ExiTron nano (BOLL et al. 2011b) besonders gut für die longitudinale Bildgebung von Lebermetastasen geeignet, da die Injektionsmenge von 100 µl sehr gering ist und da zum anderen mit einmaliger Injektion eine Bildgebung über Monate möglich ist. Die nanopartikuläre Formulierung des Kontrastmittels ermöglicht eine hohe Konzentration des kontrastgebenden alkalischen Erdmetalls, wodurch wiederum

das geringe Injektionsvolumen möglich wird. Das in der vorliegenden Arbeit ebenfalls zur longitudinalen Bildgebung von Lebermetastasen eingesetzte Fenestra LC hingegen hat mit 400 µl ein deutlich höheres Injektionsvolumen. Des Weiteren muss Fenestra LC vor jeder Mikro-CT-Untersuchung erneut injiziert werden.

### **5.6 Ausblick**

Die Untersuchungen in dieser Arbeit haben gezeigt, dass die *single breath-stop*-Mikro-CT die schnelle und hochauflösende longitudinale Beurteilung von thorakalen und abdominalen Strukturen der lebenden Maus erlaubt. Sie bietet somit eine Alternative zum respiratorischen Gating. Die neu etablierte Methode bietet eine Vielzahl von weiteren Einsatzmöglichkeiten für *in vivo* Studien bei der Maus.

## 6 Zusammenfassung

Die Tierversuchsbildgebung ist in der präklinischen Forschung von zunehmender Relevanz, da sie die nicht-invasive, longitudinale Untersuchung von Versuchstieren ermöglicht, ohne dass diese hierfür getötet werden müssen. Eine Möglichkeit der nicht-invasiven Bildgebung ist die Mikro-CT. Ein Problem der *in vivo* Mikro-CT thorakaler und abdomineller Strukturen resultiert aus Bewegungsunschärfe verursachenden Atemartefakten. Bisher wurden zur Lösung dieses Problems verschiedene Gating-Techniken eingesetzt, welche jedoch oft mit verlängerten Untersuchungszeiten bzw. einer erhöhten Strahlendosis einhergehen und nicht ubiquitär implementierbar sind. Eine Alternative zum Atemgating stellt die Bildgebung während eines einzigen Atemstopps dar. Eine Voraussetzung hierfür ist die Intubation der Tiere, um eine Kontrolle der Atmung zu erreichen. Ziel der vorliegenden Dissertation war daher zunächst die Etablierung einer vereinfachten, sicheren und schnellen Methode zur Intubation der Maus. Anschließend wurde ein Versuchsprotokoll zur Bildgebung während eines einzigen Atemstopps erarbeitet. Abschließend wurde der Einsatz der Atemstopptechnik für die longitudinale ultraschnelle Mikro-CT von Thorax und Abdomen bei der Maus evaluiert.

Zur Bildgebung wurde ein Materialprüfungs-CT, welches extrem schnelle Untersuchungszeiten zwischen 20 und 40 Sekunden erlaubt, verwendet. Es wurden zehn C57BL/6-Mäuse in Inhalationsnarkose unter Verwendung eines neuroradiologischen Mikrodrahtes in Seldinger-Technik intubiert, beatmet und mittels intraperitonealer Gabe von Rocuronium relaxiert. Nach i.v. Kontrastmittelgabe (Fenestra VC) wurde die Mikro-CT des Thorax und der Oberbauchorgane (80 kV; 75  $\mu$ A; 190° Rotation; 600 Projektionen/20 Sekunden oder 1200 Projektionen/40 Sekunden; Voxelgröße 39 x 39 x 50  $\mu$ m) während einer einzelnen Atemstopp-Phase und zum Vergleich ohne Atemstopp durchgeführt. Die Evaluierungsexperimente zur Wiederholbarkeit der *single breath-stop*-Mikro-CT im selben Tier wurden anhand eines Mausmodells mit Lebermetastasen durchgeführt (n=13; C57BL/6 Han TgN (CEA-gen) HvdP-Mäusen, *intrasplenische* Injektion von MC38 bzw. C15-A.3 Kolonkarzinomzellen). Um Lebermetastasen im Mikro-CT darstellen zu können,

wurde ein leberspezifisches Kontrastmittel (Viscover<sup>®</sup> ExiTron<sup>®</sup> nano oder Fenestra LC) injiziert.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die von uns etablierte vereinfachte Intubationsmethode ohne zusätzliche Hilfsmittel wie ein Mauslaryngoskop, eine Maushalterung oder ein Glasfaserkabel möglich ist und die einfache, sichere und schnelle (< 1 Minute) Intubation bei allen Tieren erlaubt. Die Bildgebung in Atemstopp-Technik wurde von allen Mäusen gut toleriert und verbesserte die Bildqualität in Bezug auf Bildschärfe und Detailerkennbarkeit. Der Durchmesser der kleinsten in der Mikro-CT identifizierbaren Lungengefäße lag bei ca. 100 µm. Longitudinale hochauflösende Untersuchungen des Wachstums von Lebermetastasen waren mittels *single breath-stop*-Technik ebenfalls möglich. Die kleinsten sicher identifizierbaren Lebermetastasen hatten einen Durchmesser von ca. 300 µm. Als leberspezifisches Kontrastmittel erwies sich ExiTron nano im Vergleich zu Fenestra LC als vorteilhaft, da zum einen die Injektionsmenge mit 100 µl um 75% geringer und zum anderen eine einmalige Injektion für eine longitudinale Bildgebung ausreichend war.

Somit lässt sich zusammenfassen, dass die von uns etablierte Intubationsmethode sicher, schnell und einfach durchzuführen ist, von den Mäusen gut toleriert wird und wiederholt im selben Tier einsetzbar ist. Die *single breath-stop*-Mikro-CT erlaubt somit die schnelle und hochauflösende longitudinale Beurteilung von thorakalen und abdominalen Strukturen in der lebenden Maus. Damit bietet die in dieser Arbeit etablierte Methode eine Vielzahl von weiteren Einsatzmöglichkeiten für *in vivo* Studien in der Maus. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode trägt somit zu einer Reduktion der Anzahl benötigter Versuchstiere bei, da sie die nicht-invasive longitudinale Untersuchung von Versuchstieren ermöglicht, ohne dass diese hierfür getötet werden müssen.

## 7 Summary

Imaging in laboratory animals is of increased importance in preclinical research, as it enables non-invasive, longitudinal monitoring of laboratory animals without the need to kill them. One of the methods used for non-invasive imaging is micro-CT. *In vivo* micro-CT of thoracic and abdominal structures in small rodents is problematic due to artifacts arising from the respiratory motion of the animal. While mainly gating techniques were used to circumvent this problem, they suffer from increased scan times, higher radiation doses and can not be implemented ubiquitarily. Imaging during a single breath-stop period provides an alternative to gating techniques, but requires intubation of the animal to obtain control of respiration. The purpose of this thesis was therefore 1.) to establish a simplified, reliable and fast method for intubation of mice, 2.) to establish an experimental protocol for imaging during a single breath-stop, and 3.) to evaluate the use of the breath-stop technique for longitudinal ultra-fast micro-CT of the thorax and abdomen in mice.

For micro-CT imaging, an industrial x-ray inspection volume CT offering scanning times between 20 and 40 seconds was used. Ten C57BL/6-mice were anesthetized by isofluran inhalation, intubated by Seldingers technique using a neuroradiological wire guide, ventilated and relaxed by intraperitoneal administration of rocuronium. After i.v. administration of a contrast agent (Fenestra VC), micro-CT of the thorax and the upper abdominal organs (80 kV; 75  $\mu$ A; 190-degree rotation; 600 projections/20 seconds or 1200 projections/40 seconds; voxelsize 39 x 39 x 50  $\mu$ m) was performed with and without the single breath-stop technique. Longitudinal experiments using the single breath-stop technique were carried out using a mouse model of liver metastasis (n=13; C57BL/6 Han TgN (CEA-gen) HvdP-mice; intrasplenic injection of MC38 or C15-A.3 colon carcinoma cells). For micro-CT imaging of liver metastases a liver-specific contrast agent (Viscover<sup>®</sup>ExiTron<sup>®</sup> nano or Fenestra LC) was injected. To monitor tumor growth mice underwent repeated micro-CT imaging over several days using the single breath-stop technique.

## Summary

---

Our results showed that the simplified method of intubation required no specific hardware tools (e.g. purpose-made laryngoscopes, mouse holders etc.) and allowed simple, safe and fast (< 1 minute) intubation of all mice. Relaxation of mice allowed prolonged single breath-stop imaging of up to 40 seconds. Breath-stop imaging was tolerated well by all mice and improved image quality in terms of sharpness and detail discrimination compared to images acquired in breathing mice. Diameter of smallest identifiable lung vessels was 100  $\mu\text{m}$ . Longitudinal high resolution imaging of liver tumor growth was also successfully feasible using the single breath-stop technique. The smallest detectable liver metastases measured approximately 300  $\mu\text{m}$  in diameter. ExiTron nano is preferable to Fenestra LC as injection volume is significantly lower (100 vs. 400  $\mu\text{l}$ ) and as a single injection was sufficient for longitudinal imaging.

To conclude, the modified method of intubation is safe, fast and simple. Single breath-stop imaging was tolerated well by all mice and allowed longitudinal imaging. Thus, single breath-stop-micro-CT allows fast and high-resolution longitudinal imaging of thoracic and abdominal structures in living mice. The method established in this study offers a variety of other applications for in vivo studies in mice.

## 8 Literaturverzeichnis

ALMAJDUB, M., M. NEJJARI, G. PONCET, L. MAGNIER, E. CHEREUL, C. ROCHE  
u. M. JANIER (2007):

In-vivo high-resolution X-ray microtomography for liver and spleen tumor assessment  
in mice.

Contrast Media Mol Imaging 2, 88-93

ALT, K., S. WIEHR, W. EHRLICHMANN, G. REISCHL, P. WOLF, B. J. PICHLER, U.  
ELSASSER-BEILE u. P. BUHLER (2010):

High-resolution animal PET imaging of prostate cancer xenografts with three different  
64Cu-labeled antibodies against native cell-adherent PSMA.

Prostate 70, 1413-1421

ANDERSON, C. R., X. HU, H. ZHANG, J. TLAXCA, A. E. DECLEVES, R.  
HOUGHTALING, K. SHARMA, M. LAWRENCE, K. W. FERRARA u. J. J. RYCHAK  
(2011):

Ultrasound molecular imaging of tumor angiogenesis with an integrin targeted  
microbubble contrast agent.

Invest Radiol 46, 215-224

BADEA, C., L. W. HEDLUND u. G. A. JOHNSON (2004):

Micro-CT with respiratory and cardiac gating.

Med Phys 31, 3324-3329

BADEA, C. T., M. DRANGOVA, D. W. HOLDSWORTH u. G. A. JOHNSON (2008a):

In vivo small-animal imaging using micro-CT and digital subtraction angiography.

Phys Med Biol 53, R319-350

BADEA, C. T., L. W. HEDLUND, M. DE LIN, J. F. BOSLEGO MACKEL u. G. A. JOHNSON (2006):

Tumor imaging in small animals with a combined micro-CT/micro-DSA system using iodinated conventional and blood pool contrast agents.

Contrast Media Mol Imaging 1, 153-164

BADEA, C. T., L. W. HEDLUND, M. DE LIN, J. S. MACKEL, E. SAMEI u. G. A. JOHNSON (2007a):

Tomographic digital subtraction angiography for lung perfusion estimation in rodents.

Med Phys 34, 1546-1555

BADEA, C. T., L. W. HEDLUND, J. F. MACKEL, L. MAO, H. A. ROCKMAN u. G. A. JOHNSON (2007b):

Cardiac micro-computed tomography for morphological and functional phenotyping of muscle LIM protein null mice.

Mol Imaging 6, 261-268

BADEA, C. T., E. SCHREIBMANN u. T. FOX (2008b):

A registration based approach for 4D cardiac micro-CT using combined prospective and retrospective gating.

Med Phys 35, 1170-1179

BAG, S., S. J. SCHAMBACH, H. BOLL, L. SCHILLING, C. GRODEN u. M. A. BROCKMANN (2010):

[Current concepts for experimental micro-CT in small animals].

Rofo 182, 390-403

BALABAN, R. S. u. V. A. HAMPSHIRE (2001):

Challenges in small animal noninvasive imaging.

ILAR J 42, 248-262

BARTLING, S. H., J. DINKEL, W. STILLER, M. GRASRUCK, I. MADISCH, H. U. KAUCZOR, W. SEMMLER, R. GUPTA u. F. KIESSLING (2008):

Intrinsic respiratory gating in small-animal CT.

Eur Radiol 18, 1375-1384

BARTLING, S. H., J. KUNTZ u. W. SEMMLER (2010):

Gating in small-animal cardio-thoracic CT.

Methods 50, 42-49

BARTLING, S. H., W. STILLER, M. GRASRUCK, B. SCHMIDT, P. PESCHKE, W. SEMMLER u. F. KIESSLING (2007):

Retrospective motion gating in small animal CT of mice and rats.

Invest Radiol 42, 704-714

BOLL, H., S. BAG, I. S. NOLTE, T. WILHELM, M. KRAMER, C. GRODEN, U. BOCKER u. M. A. BROCKMANN (2011a):

Double-contrast micro-CT colonoscopy in live mice.

Int J Colorectal Dis 26, 721-727

BOLL, H., S. NITTKA, F. DOYON, M. NEUMAIER, A. MARX, M. KRAMER, C. GRODEN u. M. A. BROCKMANN (2011b):

Micro-CT Based Experimental Liver Imaging Using a Nanoparticulate Contrast Agent: A Longitudinal Study in Mice.

PLoS One 6, e25692

BONNIN, P., A. VILLEMAIN, F. VINCENT, H. DEBBABI, J. S. SILVESTRE, J. O. CONTRERES, B. I. LEVY, G. TOBELEM u. E. DUPUY (2007):

Ultrasonic assessment of hepatic blood flow as a marker of mouse hepatocarcinoma.

Ultrasound Med Biol 33, 561-570

BORETIUS, S., L. KASPER, R. TAMMER, T. MICHAELIS u. J. FRAHM (2009):

MRI of cellular layers in mouse brain in vivo.

Neuroimage 47, 1252-1260

BROCKMANN, M. A., A. KEMMLING u. C. GRODEN (2007):

Current issues and perspectives in small rodent magnetic resonance imaging using clinical MRI scanners.

Methods 43, 79-87

BROWN, R. H., D. M. WALTERS, R. S. GREENBERG u. W. MITZNER (1999):

A method of endotracheal intubation and pulmonary functional assessment for repeated studies in mice.

J Appl Physiol 87, 2362-2365

BUCHOLZ, E., K. GHAGHADA, Y. QI, S. MUKUNDAN u. G. A. JOHNSON (2008):

Four-dimensional MR microscopy of the mouse heart using radial acquisition and liposomal gadolinium contrast agent.

Magn Reson Med 60, 111-118

BUSCHER, K., M. S. JUDENHOFER, M. T. KUHLMANN, S. HERMANN, H. F.

WEHRL, K. P. SCHAFERS, M. SCHAFERS, B. J. PICHLER u. L. STEGGER (2010):

Isochronous assessment of cardiac metabolism and function in mice using hybrid PET/MRI.

J Nucl Med 51, 1277-1284

CAO, G., Y. Z. LEE, R. PENG, Z. LIU, R. RAJARAM, X. CALDERON-COLON, L. AN,

P. WANG, T. PHAN, S. SULTANA, D. S. LALUSH, J. P. LU u. O. ZHOU (2009):

A dynamic micro-CT scanner based on a carbon nanotube field emission x-ray source.

Phys Med Biol 54, 2323-2340

CASTELLI, C. M., ALLISON, N.M., MOON, K.J., WATSON, D.L. (1994):

High spatial resolution scintillator screens coupled to CCD detectors for X-ray imaging applications.

Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 649-653

CAVANAUGH, D., E. JOHNSON, R. E. PRICE, J. KURIE, E. L. TRAVIS u. D. D. CODY (2004):

In vivo respiratory-gated micro-CT imaging in small-animal oncology models.  
Mol Imaging 3, 55-62

CHEN, F., Y. SUZUKI, N. NAGAI, L. JIN, J. YU, H. WANG, G. MARCHAL u. Y. NI (2007):

Rodent stroke induced by photochemical occlusion of proximal middle cerebral artery: evolution monitored with MR imaging and histopathology.  
Eur J Radiol 63, 68-75

CHO, E. J., J. YANG, K. A. MOHAMEDALI, E. K. LIM, E. J. KIM, C. J. FARHANGFAR, J. S. SUH, S. HAAM, M. G. ROSENBLUM u. Y. M. HUH (2011):

Sensitive angiogenesis imaging of orthotopic bladder tumors in mice using a selective magnetic resonance imaging contrast agent containing VEGF121/rGel.  
Invest Radiol 46, 441-449

COATNEY, R. W. (2001):

Ultrasound imaging: principles and applications in rodent research.  
ILAR J 42, 233-247

CODY, D. D., C. L. NELSON, W. M. BRADLEY, M. WISLEZ, D. JUROSKE, R. E. PRICE, X. ZHOU, B. N. BEKELE u. J. M. KURIE (2005):

Murine lung tumor measurement using respiratory-gated micro-computed tomography.  
Invest Radiol 40, 263-269

COLLINS, K. A., C. E. KORCARZ u. R. M. LANG (2003):

Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice.  
Physiol Genomics 13, 227-239

COOLEN, B. F., R. P. MOONEN, L. E. PAULIS, T. GEELEN, K. NICOLAY u. G. J. STRIJKERS (2010):

Mouse myocardial first-pass perfusion MR imaging.

Magn Reson Med 64, 1658-1663

DE CLERCK, N. M., K. MEURRENS, H. WEILER, D. VAN DYCK, G. VAN HOUTTE, P. TERPSTRA u. A. A. POSTNOV (2004):

High-resolution X-ray microtomography for the detection of lung tumors in living mice.

Neoplasia 6, 374-379

DHALIWAL, K., L. ALEXANDER, G. ESCHER, A. UNCITI-BROCETA, M. JANSEN, N. MCDONALD, J. M. CARDENAS-MAESTRE, R. SANCHEZ-MARTIN, J. SIMPSON, C. HASLETT u. M. BRADLEY (2011):

Multi-modal molecular imaging approaches to detect primary cells in preclinical models.

Faraday Discuss 149, 107-114; discussion 137-157

DINKEL, J., S. H. BARTLING, J. KUNTZ, M. GRASRUCK, A. KOPP-SCHNEIDER, M. IWASAKI, S. DIMMELER, R. GUPTA, W. SEMMLER, H. U. KAUCZOR u. F. KIESSLING (2008):

Intrinsic gating for small-animal computed tomography: a robust ECG-less paradigm for deriving cardiac phase information and functional imaging.

Circ Cardiovasc Imaging 1, 235-243

DRANGOVA, M., N. L. FORD, S. A. DETOMBE, A. R. WHEATLEY u. D. W. HOLDSWORTH (2007):

Fast retrospectively gated quantitative four-dimensional (4D) cardiac micro computed tomography imaging of free-breathing mice.

Invest Radiol 42, 85-94

DRIEHUYS, B., J. NOULS, A. BADEA, E. BUCHOLZ, K. GHAGHADA, A. PETIET u. L. W. HEDLUND (2008):

Small animal imaging with magnetic resonance microscopy.

ILAR J 49, 35-53

DU, L. Y., J. UMOH, H. N. NIKOLOV, S. I. POLLMANN, T. Y. LEE u. D. W. HOLDSWORTH (2007):

A quality assurance phantom for the performance evaluation of volumetric micro-CT systems.

Phys Med Biol 52, 7087-7108

ENGELKE, K., W. GRAEFF, L. MEISS, M. HAHN u. G. DELLING (1993):

High spatial resolution imaging of bone mineral using computed microtomography. Comparison with microradiography and undecalcified histologic sections.

Invest Radiol 28, 341-349

ERTEL, D., Y. KYRIAKOU, R. M. LAPP u. W. A. KALENDER (2009):

Respiratory phase-correlated micro-CT imaging of free-breathing rodents.

Phys Med Biol 54, 3837-3846

FAN, X., P. REN, S. DHAL, G. BEJERANO, S. B. GOODMAN, M. L. DRUZIN, S. S. GAMBHIR u. N. R. NAYAK (2011):

Noninvasive monitoring of placenta-specific transgene expression by bioluminescence imaging.

PLoS One 6, e16348

FARACE, P., S. TAMBALO, S. FIORINI, F. MERIGO, A. DADUCCI, E. NICOLATO, G. CONTI, A. DEGRASSI, A. SBARBATI u. P. MARZOLA (2011):

Early versus late GD-DTPA MRI enhancement in experimental glioblastomas.

J Magn Reson Imaging 33, 550-556

FARNCOMBE, T. H. (2008):

Software-based respiratory gating for small animal conebeam CT.

Med Phys 35, 1785-1792

FELDKAMP, L. A., L. C. DAVIS u. J. W. KRESS (1984):

Practical cone-beam algorithm.

J. Opt. Soc. Am. 1, 612-619

FIGUEIREDO, G., H. BOLL, M. KRAMER, C. GRODEN u. M. A. BROCKMANN (2012):

In Vivo X-Ray Digital Subtraction and Computed Tomography Angiography of the Murine Cerebrovasculature Using an Intra-Arterial Route of Contrast Injection.  
AJNR Am J Neuroradiol

FIGUEIREDO, G., C. BROCKMANN, H. BOLL, M. HEILMANN, S. J. SCHAMBACH, T. FIEBIG, M. KRAMER, C. GRODEN u. M. A. BROCKMANN (2011):

Comparison of Digital Subtraction Angiography, Micro-Computed Tomography Angiography and Magnetic Resonance Angiography in the Assessment of the Cerebrovascular System in Live Mice.  
Clin Neuroradiol 22, 21-28

FISCHER, K., V. SOSSI, A. SCHMID, M. THUNEMANN, F. C. MAIER, M. S. JUDENHOFER, J. G. MANNHEIM, G. REISCHL u. B. J. PICHLER (2011):

Noninvasive nuclear imaging enables the in vivo quantification of striatal dopamine receptor expression and raclopride affinity in mice.  
J Nucl Med 52, 1133-1141

FORD, N. L., E. L. MARTIN, J. F. LEWIS, R. A. VELDHUIZEN, M. DRANGOVA u. D. W. HOLDSWORTH (2007a):

In vivo characterization of lung morphology and function in anesthetized free-breathing mice using micro-computed tomography.  
J Appl Physiol 102, 2046-2055

FORD, N. L., E. L. MARTIN, J. F. LEWIS, R. A. VELDHUIZEN, D. W. HOLDSWORTH u. M. DRANGOVA (2009):

Quantifying lung morphology with respiratory-gated micro-CT in a murine model of emphysema.  
Phys Med Biol 54, 2121-2130

FORD, N. L., H. N. NIKOLOV, C. J. NORLEY, M. M. THORNTON, P. J. FOSTER, M. DRANGOVA u. D. W. HOLDSWORTH (2005):

Prospective respiratory-gated micro-CT of free breathing rodents.

Med Phys 32, 2888-2898

FORD, N. L., A. R. WHEATLEY, D. W. HOLDSWORTH u. M. DRANGOVA (2007b):

Optimization of a retrospective technique for respiratory-gated high speed micro-CT of free-breathing rodents.

Phys Med Biol 52, 5749-5769

FOSTER, F. S., M. Y. ZHANG, Y. Q. ZHOU, G. LIU, J. MEHI, E. CHERIN, K. A. HARASIEWICZ, B. G. STARKOSKI, L. ZAN, D. A. KNAPIK u. S. L. ADAMSON (2002):

A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice.

Ultrasound Med Biol 28, 1165-1172

FRANC, B. L., P. D. ACTON, C. MARI u. B. H. HASEGAWA (2008):

Small-animal SPECT and SPECT/CT: important tools for preclinical investigation.

J Nucl Med 49, 1651-1663

FRATZL, P., S. SCHREIBER u. K. KLAUSHOFER (1996):

Bone mineralization as studied by small-angle x-ray scattering.

Connect Tissue Res 34, 247-254

G. DE GERONIMO, P. O. C., V. RADEKA, B. YU (2001):

Front-end electronics for imaging detectors.

Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 192–199

GOERTZEN, A. L., V. NAGARKAR, R. A. STREET, M. J. PAULUS, J. M. BOONE u. S. R. CHERRY (2004):

A comparison of x-ray detectors for mouse CT imaging.

Phys Med Biol 49, 5251-5265

GRAHAM, K. C., S. A. DETOMBE, L. T. MACKENZIE, D. W. HOLDSWORTH, I. C. MACDONALD, A. F. CHAMBERS u. M. DRANGOVA (2008):

Contrast-enhanced microcomputed tomography using intraperitoneal contrast injection for the assessment of tumor-burden in liver metastasis models.

Invest Radiol 43, 488-495

GRAHAM, K. C., L. A. WIRTZFELD, L. T. MACKENZIE, C. O. POSTENKA, A. C. GROOM, I. C. MACDONALD, A. FENSTER, J. C. LACEFIELD u. A. F. CHAMBERS (2005):

Three-dimensional high-frequency ultrasound imaging for longitudinal evaluation of liver metastases in preclinical models.

Cancer Res 65, 5231-5237

GRASSI, R., C. CAVALIERE, S. COZZOLINO, L. MANSI, S. CIRILLO, G. TEDESCHI, R. FRANCHI, P. RUSSO, S. CORNACCHIA u. A. ROTONDO (2009):

Small animal imaging facility: new perspectives for the radiologist.

Radiol Med 114, 152-167

GRIMM, J. u. A. WUNDER (2005):

[Current state of molecular imaging research].

Rofo 177, 326-337

GUERRERO, T., R. CASTILLO, J. NOYOLA-MARTINEZ, M. TORRES, X. ZHOU, R. GUERRA, D. CODY, R. KOMAKI u. E. TRAVIS (2007):

Reduction of pulmonary compliance found with high-resolution computed tomography in irradiated mice.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 67, 879-887

HAAS, D. J. (1977), North American Philips Corporation (New York, NY):

Transmission x-ray tube.

U. S. PATENT

HAMACHER, J., M. ARRAS, F. BOOTZ, M. WEISS, R. SCHRAMM u. U. MOEHRLIN (2008):

Microscopic wire guide-based orotracheal mouse intubation: description, evaluation and comparison with transillumination.

Lab Anim 42, 222-230

HASSAN, M. u. B. A. KLAUNBERG (2004):

Biomedical applications of fluorescence imaging in vivo.

Comp Med 54, 635-644

HEILMANN, M., C. WALCZAK, J. VAUTIER, J. L. DIMICOLI, C. D. THOMAS, M. LUPU, J. MISPELTER u. A. VOLK (2007):

Simultaneous dynamic T1 and T2\* measurement for AIF assessment combined with DCE MRI in a mouse tumor model.

MAGMA 20, 193-203

HORI, Y., N. TAKASUKA, M. MUTOH, T. KITAHASHI, S. KOJIMA, K. IMAIDA, M. SUZUKI, K. KOHARA, S. YAMAMOTO, N. MORIYAMA, T. SUGIMURA u. K. WAKABAYASHI (2008):

Periodic analysis of urethane-induced pulmonary tumors in living A/J mice by respiration-gated X-ray microcomputed tomography.

Cancer Sci 99, 1774-1777

HUTCHINS, G. D., M. A. MILLER, V. C. SOON u. T. RECEVEUR (2008):

Small animal PET imaging.

ILAR J 49, 54-65

JOHNSON, E. M., R. E. PRICE, J. M. KURIE, B. S. RIVERA u. D. D. CODY (2008a):

A new method for respiratory gating during microcomputed tomography of lung in mice.

J Am Assoc Lab Anim Sci 47, 46-56

JOHNSON, K. (2008b):

Introduction to rodent cardiac imaging.

ILAR J 49, 27-34

KAGADIS, G. C., G. LOUDOS, K. KATSANOS, S. G. LANGER u. G. C. NIKIFORIDIS (2010):

In vivo small animal imaging: current status and future prospects.

Med Phys 37, 6421-6442

KALENDER, W. (2006):

Computertomographie.

Publicis Corporate Publishing, Erlangen

KERL, H. U., C. T. ISAZA, H. BOLL, S. J. SCHAMBACH, I. S. NOLTE, C. GRODEN u. M. A. BROCKMANN (2011):

Evaluation of a continuous-rotation, high-speed scanning protocol for micro-computed tomography.

J Comput Assist Tomogr 35, 517-523

KIESSLING, F., S. GRESCHUS, M. P. LICHY, M. BOCK, C. FINK, S. VOSSELER, J. MOLL, M. M. MUELLER, N. E. FUSENIG, H. TRAUPE u. W. SEMMLER (2004):

Volumetric computed tomography (VCT): a new technology for noninvasive, high-resolution monitoring of tumor angiogenesis.

Nat Med 10, 1133-1138

KIESSLING, F., D. RAZANSKY u. F. ALVES (2010):

Anatomical and microstructural imaging of angiogenesis.

Eur J Nucl Med Mol Imaging 37 Suppl 1, S4-19

KINDLMANN, G. L., D. M. WEINSTEIN, G. M. JONES, C. R. JOHNSON, M. R. CAPECCHI u. C. KELLER (2005):

Practical vessel imaging by computed tomography in live transgenic mouse models for human tumors.

Mol Imaging 4, 417-424

KOBAYASHI, S., M. HORI, K. DONO, H. NAGANO, K. UMESHITA, S. NAKAMORI, M. SAKON, K. OSUGA, K. UMETANI, T. MURAKAMI, H. NAKAMURA u. M. MONDEN (2004):

In vivo real-time microangiography of the liver in mice using synchrotron radiation.  
J Hepatol 40, 405-408

KOO, V., P. W. HAMILTON u. K. WILLIAMSON (2006):

Non-invasive in vivo imaging in small animal research.  
Cell Oncol 28, 127-139

KRAUSE, W., K. HANDREKE, G. SCHUHMANN-GIAMPIERI u. K. RUPP (2002):

Efficacy of the iodine-free computed tomography liver contrast agent, Dy-EOB-DTPA, in comparison with a conventional iodinated agent in normal and in tumor-bearing rabbits.

Invest Radiol 37, 241-247

LARSSON, A. E., S. MELGAR, E. REHNSTROM, E. MICHAELSSON, L. SVENSSON, P. HOCKINGS u. L. E. OLSSON (2006):

Magnetic resonance imaging of experimental mouse colitis and association with inflammatory activity.

Inflamm Bowel Dis 12, 478-485

LEE, Y. Z., L. M. BURK, K. H. WANG, G. CAO, J. VOLMER, J. LU u. O. ZHOU (2011):

Prospective respiratory gated carbon nanotube micro computed tomography.

Acad Radiol 18, 588-593

LIEBERMAN, B. P., K. PLOESSL, L. WANG, W. QU, Z. ZHA, D. R. WISE, L. A. CHODOSH, G. BELKA, C. B. THOMPSON u. H. F. KUNG (2011):

PET Imaging of Glutaminolysis in Tumors by <sup>18</sup>F-(2S,4R)4-Fluoroglutamine.

J Nucl Med 52, 1947-1955

LIN, M. D., E. SAMEI, C. T. BADEA, T. T. YOSHIKAWA u. G. A. JOHNSON (2006):  
Optimized radiographic spectra for small animal digital subtraction angiography.  
Med Phys 33, 4249-4257

LUKER, G. D. u. K. E. LUKER (2008):  
Optical imaging: current applications and future directions.  
J Nucl Med 49, 1-4

MACDONALD, K. D., H. Y. CHANG u. W. MITZNER (2009):  
An improved simple method of mouse lung intubation.  
J Appl Physiol 106, 984-987

MAI, W., C. T. BADEA, C. T. WHEELER, L. W. HEDLUND u. G. A. JOHNSON  
(2005):  
Effects of breathing and cardiac motion on spatial resolution in the microscopic  
imaging of rodents.  
Magn Reson Med 53, 858-865

MAI, W., L. BARRAUD, L. LEFRANCOIS, J. Y. SCOAZEC, S. GUERRET, D. VRAY,  
P. MERLE, L. VITVITSKI-TREPO, C. TREPO u. M. F. JANIER (2004):  
Ultrasound detection of spontaneous hepato-cellular carcinomas in X/myc  
bitransgenic mice.  
Liver Int 24, 651-657

MAKOWSKI, M., C. JANSEN, I. WEBB, A. CHIRIBIRI, E. NAGEL, R. BOTNAR, S.  
KOZERKE u. S. PLEIN (2010):  
First-pass contrast-enhanced myocardial perfusion MRI in mice on a 3-T clinical MR  
scanner.  
Magn Reson Med 64, 1592-1598

MARONPOT, R. R., R. C. SILLS u. G. A. JOHNSON (2004):  
Applications of magnetic resonance microscopy.  
Toxicol Pathol 32 Suppl 2, 42-48

MARTINIOVA, L., M. S. KOTYS, D. THOMASSON, D. SCHIMEL, E. W. LAI, M. BERNARDO, M. J. MERINO, J. F. POWERS, J. RUZICKA, R. KVETNANSKY, P. L. CHOYKE u. K. PACAK (2009):

Noninvasive monitoring of a murine model of metastatic pheochromocytoma: a comparison of contrast-enhanced microCT and nonenhanced MRI.

J Magn Reson Imaging 29, 685-691

MARTINIOVA, L., D. SCHIMEL, E. W. LAI, A. LIMPUANGTHIP, R. KVETNANSKY u. K. PACAK (2010):

In vivo micro-CT imaging of liver lesions in small animal models.

Methods 50, 20-25

MILLER, R. D. (2007):

Sugammadex: an opportunity to change the practice of anesthesiology?

Anesth Analg 104, 477-478

MONTET, X., C. M. PASTOR, J. P. VALLEE, C. D. BECKER, A. GEISSBUHLER, D. R. MOREL u. P. MEDA (2007):

Improved visualization of vessels and hepatic tumors by micro-computed tomography (CT) using iodinated liposomes.

Invest Radiol 42, 652-658

MUKUNDAN, S., JR., K. B. GHAGHADA, C. T. BADEA, C. Y. KAO, L. W. HEDLUND, J. M. PROVENZALE, G. A. JOHNSON, E. CHEN, R. V. BELLAMKONDA u. A. ANNAPRAGADA (2006):

A liposomal nanoscale contrast agent for preclinical CT in mice.

AJR Am J Roentgenol 186, 300-307

MUSTAFI, D., X. FAN, U. DOUGHERTY, M. BISSONNETTE, G. S. KARZMAR, A. OTO, J. HART, E. MARKIEWICZ u. M. ZAMORA (2010):

High-resolution magnetic resonance colonography and dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in a murine model of colitis.

Magn Reson Med 63, 922-929

NAMATI, E., D. CHON, J. THIESSE, E. A. HOFFMAN, J. DE RYK, A. ROSS u. G. MCLENNAN (2006):

In vivo micro-CT lung imaging via a computer-controlled intermittent iso-pressure breath hold (IIBH) technique.

Phys Med Biol 51, 6061-6075

NAMATI, E., J. THIESSE, J. C. SIEREN, A. ROSS, E. A. HOFFMAN u. G. MCLENNAN (2010):

Longitudinal assessment of lung cancer progression in the mouse using in vivo micro-CT imaging.

Med Phys 37, 4793-4805

OHTA, S., E. W. LAI, J. C. MORRIS, D. A. BAKAN, B. KLAUNBERG, S. CLEARY, J. F. POWERS, A. S. TISCHLER, M. ABU-ASAB, D. SCHIMEL u. K. PACAK (2006):

MicroCT for high-resolution imaging of ectopic pheochromocytoma tumors in the liver of nude mice.

Int J Cancer 119, 2236-2241

PARTECKE, I. L., A. KAEDING, M. SENDLER, N. ALBERS, J. P. KUHN, S. SPEERFORCK, S. ROESE, F. SEUBERT, S. DIEDRICH, S. KUEHN, U. F. WEISS, J. MAYERLE, M. M. LERCH, S. HADLICH, N. HOSTEN, C. D. HEIDECKE, R. PULS u. W. VON BERNSTORFF (2011):

In vivo imaging of pancreatic tumours and liver metastases using 7 Tesla MRI in a murine orthotopic pancreatic cancer model and a liver metastases model.

BMC Cancer 11, 40

PHAM, M., X. HELLUY, C. KLEINSCHNITZ, P. KRAFT, A. J. BARTSCH, P. JAKOB, B. NIESWANDT, M. BENDSZUS u. G. STOLL (2011):

Sustained reperfusion after blockade of glycoprotein-receptor-Ib in focal cerebral ischemia: an MRI study at 17.6 Tesla.

PLoS One 6, e18386

PHOON, C. K., R. P. JI, O. ARISTIZABAL, D. M. WORRAD, B. ZHOU, H. S. BALDWIN u. D. H. TURNBULL (2004):

Embryonic heart failure in NFATc1<sup>-/-</sup> mice: novel mechanistic insights from in utero ultrasound biomicroscopy.

Circ Res 95, 92-99

PROULX, S. T., E. KWOK, Z. YOU, M. O. PAPUGA, C. A. BECK, D. J. SHEALY, C. T. RITCHLIN, H. A. AWAD, B. F. BOYCE, L. XING u. E. M. SCHWARZ (2007):

Longitudinal assessment of synovial, lymph node, and bone volumes in inflammatory arthritis in mice by in vivo magnetic resonance imaging and microfocal computed tomography.

Arthritis Rheum 56, 4024-4037

QI, D. Y., J. H. HENDRY u. N. G. TESTA (1991):

Interactions in recovery and in residual injury from sequential treatments of mouse haemopoietic and stromal marrow cell populations, using X-rays, cyclophosphamide and busulphan.

Radiother Oncol 20, 46-52

RAMANI, R., M. MATHIER, J. DAWSON, C. F. MCTIERNAN u. A. M. FELDMAN (2004):

Assessment of infarct size and myocardial function in mice using transesophageal echocardiography.

J Am Soc Echocardiogr 17, 649-653

RITMAN, E. L. (2004):

Micro-computed tomography-current status and developments.

Annu Rev Biomed Eng 6, 185-208

RIVERA, B., S. MILLER, E. BROWN u. R. PRICE (2005):

A novel method for endotracheal intubation of mice and rats used in imaging studies.

Contemp Top Lab Anim Sci 44, 52-55

RUEGSEGGER, P., B. KOLLER u. R. MULLER (1996):

A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture.

Calcif Tissue Int 58, 24-29

SANDHU, G. S., L. SOLORIO, A. M. BROOME, N. SALEM, J. KOLTHAMMER, T. SHAH, C. FLASK u. J. L. DUERK (2010):

Whole animal imaging.

Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med 2, 398-421

SAWALL, S., F. BERGNER, R. LAPP, M. MRONZ, M. KAROLCZAK, A. HESS u. M. KACHELRIESS (2011):

Low-dose cardio-respiratory phase-correlated cone-beam micro-CT of small animals.

Med Phys 38, 1416-1424

SCHAMBACH, S. J., S. BAG, C. GRODEN, L. SCHILLING u. M. A. BROCKMANN (2010a):

Vascular imaging in small rodents using micro-CT.

Methods 50, 26-35

SCHAMBACH, S. J., S. BAG, L. SCHILLING, C. GRODEN u. M. A. BROCKMANN (2010b):

Application of micro-CT in small animal imaging.

Methods 50, 2-13

SCHAMBACH, S. J., S. BAG, V. STEIL, C. ISAZA, L. SCHILLING, C. GRODEN u. M. A. BROCKMANN (2009):

Ultrafast high-resolution in vivo volume-CTA of mice cerebral vessels.

Stroke 40, 1444-1450

SCHERRER-CROSBIE, M., W. STEUDEL, P. R. HUNZIKER, G. P. FOSTER, L. GARRIDO, N. LIEL-COHEN, W. M. ZAPOL u. M. H. PICARD (1998):

Determination of right ventricular structure and function in normoxic and hypoxic mice: a transesophageal echocardiographic study.

Circulation 98, 1015-1021

SCHERRER-CROSBIE, M., W. STEUDEL, R. ULLRICH, P. R. HUNZIKER, N. LIEL-COHEN, J. NEWELL, J. ZAROFF, W. M. ZAPOL u. M. H. PICARD (1999):

Echocardiographic determination of risk area size in a murine model of myocardial ischemia.

Am J Physiol 277, H986-992

SCHWARTE, L. A., C. J. ZUURBIER u. C. INCE (2000):

Mechanical ventilation of mice.

Basic Res Cardiol 95, 510-520

SERA, T., H. YOKOTA, K. FUJISAKI, K. FUKASAKU, H. TACHIBANA, K. UESUGI, N. YAGI u. R. HIMENO (2008):

Development of high-resolution 4D in vivo-CT for visualization of cardiac and respiratory deformations of small animals.

Phys Med Biol 53, 4285-4301

SHARMA, K. u. R. SHARMA (2007):

21 Tesla MRI Microscopy of Mice Kidney, Heart and Skin: Quantitation of MRI Visible Features.

In: ISMRM, Berlin

SHOFER, S., C. BADEA, S. AUERBACH, D. A. SCHWARTZ u. G. A. JOHNSON (2007):

A micro-computed tomography-based method for the measurement of pulmonary compliance in healthy and bleomycin-exposed mice.

Exp Lung Res 33, 169-183

SINGER, T., V. BRAND, U. MOEHRLEN, H. FEHRENBACH, K. PURKABIRI, S. R. OTT, U. STAMMBERGER, M. OCHS u. J. HAMACHER (2010):

Left-sided mouse intubation: description and evaluation.

Exp Lung Res 36, 25-30

SPAHN, M., V. HEER u. R. FREYTAG (2003):

[Flat-panel detectors in X-ray systems].

Radiologe 43, 340-350

SPOELSTRA, E. N., C. INCE, A. KOEMAN, V. M. EMONS, L. A. BROUWER, M. J. VAN LUYN, B. H. WESTERINK u. R. REMIE (2007):

A novel and simple method for endotracheal intubation of mice.

Lab Anim 41, 128-135

SRINIVASAN, S., H. S. BALDWIN, O. ARISTIZABAL, L. KWEE, M. LABOW, M. ARTMAN u. D. H. TURNBULL (1998):

Noninvasive, in utero imaging of mouse embryonic heart development with 40-MHz echocardiography.

Circulation 98, 912-918

SUCKOW, C. E. u. D. B. STOUT (2008):

MicroCT liver contrast agent enhancement over time, dose, and mouse strain.

Mol Imaging Biol 10, 114-120

TAKEISHI, Y., P. PING, R. BOLLI, D. L. KIRKPATRICK, B. D. HOIT u. R. A. WALSH (2000):

Transgenic overexpression of constitutively active protein kinase C epsilon causes concentric cardiac hypertrophy.

Circ Res 86, 1218-1223

TOMLINSON, T. M., J. R. GARBOW, J. R. ANDERSON, J. A. ENGELBACH, D. M. NELSON u. Y. SADOVSKY (2010):

Magnetic resonance imaging of hypoxic injury to the murine placenta.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 298, R312-319

TSAI, C. C., C. H. CHANG, L. C. CHEN, Y. J. CHANG, K. L. LAN, Y. H. WU, C. W. HSU, I. H. LIU, C. L. HO, W. C. LEE, H. C. NI, T. J. CHANG, G. TING u. T. W. LEE (2011):

Biodistribution and pharmacokinetics of Re-liposomes and their comparative therapeutic efficacy with 5-fluorouracil in C26 colonic peritoneal carcinomatosis mice. *Int J Nanomedicine* 6, 2607-2619

TURNBULL, D. H. (1999):

In utero ultrasound backscatter microscopy of early stage mouse embryos. *Comput Med Imaging Graph* 23, 25-31

ULMER, S., M. REEH, J. KRAUSE, T. HERDEGEN, J. HELDT-FEINDT, O. JANSEN u. A. ROHR (2008):

Dynamic contrast-enhanced susceptibility-weighted perfusion MRI (DSC-MRI) in a glioma model of the rat brain using a conventional receive-only surface coil with a inner diameter of 47 mm at a clinical 1.5 T scanner. *J Neurosci Methods* 172, 168-172

VERGARI, A., A. POLITO, M. MUSUMECI, S. PALAZZESI u. G. MARANO (2003):

Video-assisted orotracheal intubation in mice. *Lab Anim* 37, 204-206

WALL, J. S., T. RICHEY, A. WILLIAMS, A. STUCKEY, D. OSBORNE, E. MARTIN u. S. J. KENNEL (2011):

Comparative Analysis of Peptide p5 and Serum Amyloid P Component for Imaging AA Amyloid in Mice Using Dual-Isotope SPECT. *Mol Imaging Biol* ,Online First, 31 Oktober 2011

WALTERS, E. B., K. PANDA, J. A. BANKSON, E. BROWN u. D. D. CODY (2004):

Improved method of in vivo respiratory-gated micro-CT imaging. *Phys Med Biol* 49, 4163-4172

WEBER, S. M., K. A. PETERSON, B. DURKEE, C. QI, M. LONGINO, T. WARNER, F. T. LEE, JR. u. J. P. WEICHERT (2004):

Imaging of murine liver tumor using microCT with a hepatocyte-selective contrast agent: accuracy is dependent on adequate contrast enhancement.

J Surg Res 119, 41-45

WEHRL, H. F., M. S. JUDENHOFER, S. WIEHR u. B. J. PICHLER (2009):

Pre-clinical PET/MR: technological advances and new perspectives in biomedical research.

Eur J Nucl Med Mol Imaging 36 Suppl 1, S56-68

WILLEKENS, I., T. LAHOUTTE, N. BULS, C. VANHOVE, R. DEKLERCK, A. BOSSUYT u. J. DE MEY (2009):

Time-course of contrast enhancement in spleen and liver with Exia 160, Fenestra LC, and VC.

Mol Imaging Biol 11, 128-135

WU, J., H. LEONG-POI, J. BIN, L. YANG, Y. LIAO, Y. LIU, J. CAI u. J. XIE (2011):

Efficacy of Contrast-enhanced US and Magnetic Microbubbles Targeted to Vascular Cell Adhesion Molecule-1 for Molecular Imaging of Atherosclerosis.

Radiology 260, 463-471

WUERFEL, E., C. INFANTE-DUARTE, R. GLUMM u. J. T. WUERFEL (2010):

Gadofluorine M-enhanced MRI shows involvement of circumventricular organs in neuroinflammation.

J Neuroinflammation 7, 70

YOKOSAWA, K., K. SASAKI, S. UMEMURA, R. SHINOMURA, S. ISHIKAWA, S. SANO u. Y. ITO (2000):

Intracorporeal imaging and differentiation of living tissue with an ultra-high-frequency ultrasound probe.

Ultrasound Med Biol 26, 503-507

YU, H., G. CAO, L. BURK, Y. LEE, J. LU, P. SANTAGO, O. ZHOU u. G. WANG (2009):

Compressive sampling based interior reconstruction for dynamic carbon nanotube micro-CT.

J Xray Sci Technol 17, 295-303

ZHAO, D., J. H. STAFFORD, H. ZHOU u. P. E. THORPE (2011):

Near-infrared Optical Imaging of Exposed Phosphatidylserine in a Mouse Glioma Model.

Transl Oncol 4, 355-364

ZHENG, B., P. T. LEE u. X. GOLAY (2010):

High-sensitivity cerebral perfusion mapping in mice by kbGRASE-FAIR at 9.4 T.

NMR Biomed 23, 1061-1070

ZHOU, J. H., L. H. CAO, J. B. LIU, W. ZHENG, M. LIU, R. Z. LUO, F. HAN u. A. H. LI (2011a):

Quantitative assessment of tumor blood flow in mice after treatment with different doses of an antiangiogenic agent with contrast-enhanced destruction-replenishment US.

Radiology 259, 406-413

ZHOU, J. H., L. H. CAO, W. ZHENG, M. LIU, F. HAN u. A. H. LI (2011b):

Contrast-enhanced gray-scale ultrasound for quantitative evaluation of tumor response to chemotherapy: preliminary results with a mouse hepatoma model.

AJR Am J Roentgenol 196, W13-17

ZINN, K. R., T. R. CHAUDHURI, A. A. SZAFRAN, D. O'QUINN, C. WEAVER, K. DUGGER, D. LAMAR, R. A. KESTERSON, X. WANG u. S. J. FRANK (2008):

Noninvasive bioluminescence imaging in small animals.

ILAR J 49, 103-115

## Eigene Publikationen

1. High-Speed Single-Breath-Hold Micro-Computed Tomography of Thoracic and Abdominal Structures in Mice Using a Simplified Method for Intubation.  
**H. Boll**, S. Bag, S.J. Schambach, F. Doyon, S. Nittka, M. Kramer, C. Groden, M.A. Brockmann.  
*J Comput Assist Tomogr* 2010; 34(5): 783-90
2. Double-contrast Micro-CT colonoscopy in live mice.  
**H. Boll**, S. Bag, I.S. Nölte, T. Wilhelm, M. Kramer, C. Groden, U. Böcker, M.A. Brockmann.  
*Int J Colorectal Dis* 2011; 26(6): 721-7
3. Micro-CT Based Experimental Liver Imaging Using a Nanoparticulate Contrast Agent: A Longitudinal Study in Mice.  
**H. Boll**, S. Nittka, F. Doyon, M. Neumaier, A. Marx, M. Kramer, C. Groden, M.A. Brockmann.  
*PLoS One* 2011; 6(9): e25692
4. [Current concepts for experimental micro-CT in small animals].  
S. Bag, S.J. Schambach, **H. Boll**, L. Schilling, C. Groden, M.A. Brockmann.  
*Röfo* 2010, 182(5); 390-403
5. Evaluation of a continuous-rotation, high-speed scanning protocol for micro-computed tomography.  
H.U. Kerl, C.T. Isaza, **H. Boll**, S.J. Schambach, I.S. Nölte, C. Groden, M.A. Brockmann.  
*J Comput Assist Tomogr* 2011; 35(4): 517-23
6. Maintained functionality of an implantable radiotelemetric blood pressure and heart rate sensor after magnetic resonance imaging in rats.  
I. Nölte, S. Gorbey, **H. Boll**, G. Figueiredo, C. Groden, B. Lemmer, M.A. Brockmann.  
*Physiol Meas* 2011; 32(12): 1941-1951

7. Three-dimensional *in vivo* imaging of the murine liver: a micro-CT based anatomical study.  
T. Fiebig, **H. Boll**, G. Figueiredo, C. Groden, M. Kramer, M.A. Brockmann.  
*PLoSone* 2012; 7(2):e31179
8. Comparison of digital subtraction angiography, micro-computed tomography angiography and magnetic resonance angiography in the assessment of the cerebrovascular system of live mice.  
G. Figueiredo, C. Brockmann, **H. Boll**, M. Heilmann, S.J. Schambach, T. Fiebig, M. Kramer, C. Groden, M.A. Brockmann.  
*Clinical Neuroradiology* 2012; 22(1): 21-28
9. *In vivo* X-ray digital subtraction and computed tomography angiography of the murine cerebrovasculature using an intra-arterial route of contrast injection.  
G. Figueiredo, **H. Boll**, M. Kramer, C. Groden, M.A. Brockmann.  
*American Journal of Neuroradiology* 2012; zur Publikation akzeptiert
10. Characterisation and monitoring of melanoma growth in Ret-transgenic mice using a fast whole body high-field MRI protocol.  
H.U. Kerl, **H. Boll**, V. Umansky, M. Ramacher, M. Heilmann, C. Groden, M. Kramer, M.A. Brockmann.  
*Journal of Investigative Dermatology*; eingereicht

Poster:

1. Blood contrast agent concentration measured by Dynamic MRI in intra- and extracranial mouse vessels at 9.4 Tesla using a novel cryogenetic probe.  
M. Heilmann, **H. Boll**, S.J. Schambach, C. Groden, M.A. Brockmann, L. Schad.  
*Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB 2010, Stockholm*
2. Tierexperimentelle Anwendung eines neuen selbstexpandierenden closed-cell Stents zur endovaskulären Therapie von side-wall-Aneurysmen.  
A. Keuler, C. Deniffel, K. Förster, F. Nagl, **H. Boll**, M. Schumacher.  
*45. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neuroradiologie (DGNR) 2010, Köln*

Vorträge:

1. Einsatz der „single breath-stop“ Technik für die hochauflösende ultra-schnelle Mikro-CT der thorakalen und abdominellen Organe der lebenden Maus.  
**H. Boll**, S. Bag, S.J. Schambach, F. Doyon, S. Nittka, M. Kramer, C. Groden, M.A. Brockmann.  
*Experimentelle Radiologie 2010, Kiel*
2. Mikro-CT-basierte Doppelkontrast-Kolonographie zur Detektion von Kolonpolypen in einem in vivo-Mausmodell.  
**H. Boll**, S. Bag, I.S. Nölte, T. Wilhelm, M. Kramer, C. Groden, U. Böcker, M.A. Brockmann.  
*Experimentelle Radiologie 2010, Kiel*

## Danksagung

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Marc Brockmann für die Überlassung des sehr interessanten Themas und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Vielen Dank für die ausgezeichnete Betreuung und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung und Ausarbeitung dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer für die spontane Zusage und die gute Betreuung dieser externen Doktorarbeit sowie für die Korrektur meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Christoph Groden danke ich für die großzügige Förderung aller Forschungsvorhaben, an denen ich beteiligt sein durfte.

Des Weiteren danke ich der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Michael Neumaier für die kooperative Zusammenarbeit und für die zur Verfügung Stellung des Maus-Tumormodells im Rahmen des gemeinsamen Forschungsprojektes.

Dr. Nicole Gehrke möchte ich herzlich für die gute Zusammenarbeit sowie für die zahlreichen konstruktiven Diskussionen bezüglich leberspezifischer Kontrastmittel danken.

Vielen Dank auch an Dr. Sebastian Schambach für seine Hilfsbereitschaft bei der Einarbeitung am Mikro-CT. Ein großes Dankeschön auch an meine Kollegin Teresa Fiebig für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit am Mikro-CT.

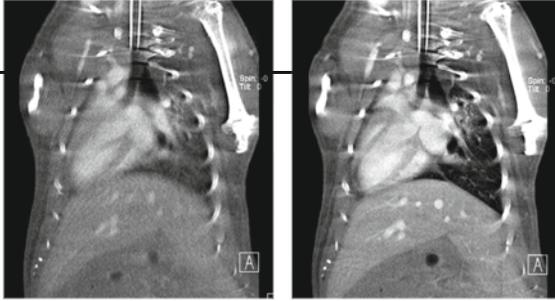
Finanzielle Unterstützung erhielt ich durch ein Stipendium des Forschungsschwerpunktes Onkologie der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg, was diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützt und ermutigt haben und die mir mein Studium und diese Arbeit erst ermöglicht haben. Ein großes Dankeschön auch an meine Geschwister und meinen Freund Marco, der mir stets den nötigen Rückhalt gegeben hat und mich immer unterstützt hat.

## Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Hanne Boll



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5896-8



9 17 8 3 8 3 5 19 5 8 9 6 8