

VANESSA WEYER

Beitrag der Mikro-CT zum 3R-Prinzip am Beispiel eines in-vivo und ex-vivo Modells:

Longitudinale Evaluation zerebraler Vasospasmen
nach Subarachnoidalblutung mittels
Mikro-CT-Angiographie im Mausmodell
und Analyse der Schichtdicke dentaler
Glattflächenversiegler in der Mikro-CT



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

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

1. Auflage 2020

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 Authors or the Publisher.

1st Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum für Veterinärmedizin
Klinik für Kleintiere (Chirurgie) der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer
und
der Klinik und Poliklinik für Neuroradiologie
Universitätsmedizin Mainz der Johannes Gutenberg-Universität
Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. M. A. Brockmann, MSc

**Beitrag der Mikro-CT zum 3R-Prinzip am Beispiel eines in-vivo und ex-vivo Modells:
Longitudinale Evaluation zerebraler Vasospasmen nach Subarachnoidalblutung mittels
Mikro-CT-Angiographie im Mausmodell und Analyse der Schichtdicke dentaler
Glattflächenversiegler in der Mikro-CT**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
im Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Vanessa Weyer
Tierärztin aus Mannheim

Mannheim 2020

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

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

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Univ.-Prof. Dr. med. M. A. Brockmann

Tag der Disputation: 05.10.2020

Meinen Eltern und meinem Ehemann in Dankbarkeit

Im Rahmen dieser kumulativen Dissertation entstandene Publikationen

1. Publikation (Erstautorenschaft)

Vanessa Weyer, Máté E. Maros, Stefanie Kirschner Andrea Kronfeld, Christoph Groden, Clemens Sommer, Yasemin Tanyildizi, Martin Kramer, Marc A. Brockmann (2019). **“Longitudinal imaging and evaluation of SAH-associated cerebral large artery vasospasm in mice using micro-CT and angiography.”** *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2019

2. Publikation (Co-Autorenschaft)

Sinan Şen, Ralf Erber, Kevin Kunzmann, Stefanie Kirschner, **Vanessa Weyer**, Lothar Schilling, Marc A. Brockmann, Stefan Rues, Gül Orhan, Christopher J. Lux, Sebastian Zingler (2018). **„Assessing abrasion of orthodontic surface sealants using a modified ophthalmic optical coherence tomography device.“** *Clinical Oral Investigations* (2018) 22:3143–3157

Weitere eigene Publikation, die in dieser Arbeit nicht näher erläutert werden:

3. Publikation (Co-Autorenschaft)

Marianne R. Hahn, Stefanie Kirschner, Barbara Link, **Vanessa Weyer**, Carsten Sticht, Kaga Gomarteli, Marlon R. Veldwijk, Frederik Wenz, Carsten Herskind, Frank A. Giordano (2020). „**Irradiation of healthy brain alters expression of genes involved in cell motility and invasiveness of glioblastoma.**” *Radiation Research*; eingereicht

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Bedeutung von Tieren für die wissenschaftliche Forschung.....	9
2 Literaturübersicht	11
2.1 Maus als Versuchstier.....	11
2.1.1 Subarachnoidalblutung.....	12
2.1.2 Arterielle zerebrale Gefäßversorgung in der Maus.....	13
2.1.3 Methoden zur Induktion einer Subarachnoidalblutung in der Maus.....	14
2.1.4 Zerebrale Vasospasmen	16
2.2 Bedeutung bildgebender Verfahren in der präklinischen Forschung	16
2.2.1 Mikro-Computertomographie	17
2.2.2 Digitale Subtraktionsangiographie.....	21
2.3 Ziel der vorliegenden Arbeit	22
3 Publikationen	24
3.1 Erstautorenschaft	24
3.2 Co-Autorenschaft	26
3.3 Weitere eigene Publikation.....	28
4 Übergreifende Diskussion	30
5 Zusammenfassung	42
6 Summary	44
7 Literaturverzeichnis	46
8 Danksagung	57
9 Erklärung	58

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Δ_{\max}	Maximaler Deltawert
μm	Mikrometer
ACA	Arteria cerebri anterior
BA	Arteria basilaris
BLI	Biolumineszenz
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
bzw.	beziehungsweise
C57BL/6	Mausstamm
CCA	Arteria carotis communis
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
CTA	computertomographische Angiographie
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DRZE	Deutsches Referenzzentrum für Ethik in den Biowissenschaften
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie
ECA	Arteria carotis externa
et al.	et alii
FoV	Field of View
GV-Solas	Gesellschaft für Versuchstierkunde
h	Stunden
ICA	Arteria carotis interna
ICP	intracranial pressure; intrakranieller Druck
i.v.	intravenous, intravenös
KM	Kontrastmittel
LAV	Large artery vasospasm
MCA	Arteria cerebri media
Mikro-CT	Mikro-Computertomographie
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Gruppengröße
NRW	Nordrhein-Westfalen

OCT	optical coherence tomography; optische Kohärenztomographie
OlfA	Arteria olfactorii
p	p-Wert; Signifikanzwert
PCA	Arteria cerebri posterior
PPA	Arteria pterygopalatina
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PTC	professional tooth cleaning; professionelle Zahnreinigung
3R	Replace, Reduce, Refine; Ersetzen, Verringern, Verbessern
r_{pe}	Rangkorrelationskoeffizient
r_{sp}	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
SAB	Subarachnoidalblutung
SAH	subarachnoid hemorrhage
SD-OCT	spectral domain optical coherence tomography
SNR	signal noise ratio
SPECT	single photon emission computed tomography; Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie
T1, T2	Zeitkonstanten der Spin-Spin-Relaxation
TFTs	thin film transistors; dünne Filmtransistoren
VA	Arteria vertebralis

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Tieren für die wissenschaftliche Forschung

Die Verwendung von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken ist nach derzeitigem Stand der Wissenschaft unerlässlich. Obwohl zunehmend an Alternativmethoden zu Tierversuchen geforscht wird und bereits viele in vitro Modelle erfolgreich etabliert wurden, ist ein genereller Verzicht von Tieren in der wissenschaftlichen Forschung zur Klärung bestimmter Fragestellungen nicht möglich [1]. In vitro-Modelle bieten nur eine begrenzte Aussagekraft bezüglich vieler biomedizinischer Fragestellungen, da in diesen Stoffwechselprozesse oder komplexe molekulare Mechanismen nicht realistisch nachgestellt werden können [1]. Aufgrund dessen werden auch zukünftig Tierversuche, vor allem im Bereich der Medikamentenprüfung, nicht ersetzbar sein [2]. Besonders ist hierbei die Komplexität eines intakten Organismus notwendig, um alle Wirkungen eines Stoffes zu überprüfen [2]. Dementsprechend erfolgt der Einsatz von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken auch weiterhin in der Erforschung von physiologischen Prozessen (Grundlagenforschung), in der Entwicklung neuer Therapieansätze, sowie in toxikologischen Sicherheitsprüfungen.

Die Gesamtsumme der in Deutschland verwendeten Versuchstiere ist in der Vergangenheit deutlich angestiegen. Während die Versuchstierzahlen von 2003 zu 2012 kontinuierlich von 2.212.376 auf 3.080.727 angestiegen sind, sank die Anzahl der für wissenschaftliche Zwecke eingesetzten Tiere im Jahr 2013 erstmals um 2,7% auf insgesamt 2.997.152 Tiere [3]. Dieser Rückgang wurde vom BMEL auf einen geringeren Einsatz von Tieren für toxikologische Sicherheitsprüfungen zurückgeführt. Aktuell ist eine sinkende Tendenz der Anzahl an Tieren, die zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden, von 1,7% (2016 zu 2017) feststellbar [4].

Mäuse und Ratten bilden sowohl in Deutschland (2017: 78%), als auch in Europa (2011: 75%) die größte Versuchsgruppe, wobei Mäuse hier den Großteil der Versuchstiere ausmachen, mit 66% der Gesamtheit im Jahr 2017 [2]. Die am dritthäufigsten in Deutschland verwendete Spezies sind Fische (2017: 12%). Neben Nagern und Fischen werden aber auch andere Spezies, wie zum Beispiel Kaninchen, Vögel oder Schweine verwendet [4].

Diese hohen Tierzahlen sind im Vergleich mit der Gesamtzahl von 795 Millionen der im Jahr 2014 in Deutschland getöteten Tieren verschwindend gering. Während die zu wissenschaftlichen Zwecken eingesetzten Versuchstiere nur 0,35% der jährlich in

Deutschland getöteten Tiere ausmachen, wurden 788 Millionen der Tiere, vor allem Rinder, Schweine, Geflügel und Schafe, für die Erzeugung tierischer Lebensmittel geschlachtet. Weitere 4 Millionen Tiere wurden bei der Jagd erlegt [1].

Die Forschungsgebiete, in denen Tiere zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden, sind vielfältig: ungefähr ein Drittel aller Tiere wird in der Grundlagenforschung eingesetzt. Des Weiteren werden sie für die Entwicklung und Qualitätskontrolle von Produkten und Geräten für die Human-, Zahn- und Veterinärmedizin, für toxikologische Untersuchungen und Sicherheitsprüfungen verwendet, sowie zur Diagnose von Krankheiten [5]. Auch die Prüfung der Wirksamkeit von Schädlingsbekämpfungsmitteln und die Aus-, Fort- und Weiterbildung stellen weitere Zwecke dar, in denen Versuchstiere verwendet werden [5].

Um den Einsatz von Tieren zu wissenschaftlichen Zwecken in Zukunft weiterhin zu reduzieren, ist neben der Entwicklung von Alternativmethoden ein weiterer Weg die Verbesserung von aktuell verfügbaren Tiermodellen. Hierbei ist ein wichtiger Ansatz die Umsetzung der 3R-Prinzipien von Russel und Burch. Russel und Burch haben in ihrem Buch „The Principles of Human Experimental Techniques“ (1959) das Prinzip der „3R“ als ein Grundsatz der experimentellen wissenschaftlichen Arbeit veröffentlicht. Das „3R“-Konzept verfolgt das Ziel, Tierversuche vollständig zu vermeiden (Replacement) und sofern dies nicht möglich ist, mindestens die Zahl der eingesetzten Tiere zu reduzieren (Reduction) und die Belastung der Tiere auf ein unerlässliches Maß zu beschränken (Refinement) [6].

Durch den Einsatz spezialisierter, nicht invasiver, bildgebender Verfahren (wie der Mikro-Computertomographie (Mikro-CT)) kann zu diesen Prinzipien beigetragen werden. Neben der Erhebung detaillierter Daten können auch longitudinale Daten *in vivo* erhoben werden [1]. Dies ermöglicht es, physiologische oder pathologische Mechanismen im Verlauf zu detektieren und verbessert die Aussagekraft der Daten.

2 Literaturübersicht

2.1 Maus als Versuchstier

In Deutschland wurden 2017 rund zwei Millionen Wirbeltiere und Kopffüßer in Tierversuchen nach §7 Absatz 2 des Tierschutzgesetzes eingesetzt, von denen etwa 66% der verwendeten Tiere Mäuse waren [4]. Damit ist die Maus das am häufigsten eingesetzte Versuchstier. Die Maus zeichnet sich durch eine Vielzahl von Eigenschaften als interessantes Versuchstier aus: Im Hinblick auf die genetische Grundlage ist das Maus Genom, ebenso wie das menschliche Genom, mittlerweile vollständig bekannt [2]. Mithilfe dieser Kenntnisse lässt die relativ starke genetische Übereinstimmung zwischen Maus und Mensch eine Übertragbarkeit der Ergebnisse aus wissenschaftlichen Studien von der Maus auf den Menschen in hohem Maße zu [7]. Neben der genetischen Komponente, sind auch wirtschaftliche Aspekte zu beachten. Mäuse haben eine außerordentlich geringe Reproduktionszeit bei einer Vielzahl von Nachkommen, wodurch diese in kürzester Zeit in großen Mengen zur Verfügung stehen. Des Weiteren ist ihre Haltung vergleichsweise platzsparend, kostengünstig und unkompliziert. Außerdem werden für die Maus standardisierte Zuchtmethoden und Haltungsbedingungen etabliert, um vergleichbare Versuchsergebnisse zu erhalten [8]. Ein limitierender Faktor kann jedoch bei bestimmten Fragestellungen ihre geringe Körpergröße sein, weshalb eine größere Tierspezies verwendet werden muss. Sofern für spezielle Untersuchungen beispielsweise in regelmäßigen Abständen größere Mengen Blut benötigt werden, kann dies aufgrund des geringen Blutvolumens von rund zwei Millilitern bei der Maus problematisch sein [9].

Die Verwendung von Mäusen umfasst beinahe alle Bereiche und Fragestellungen in der Forschung. Das Unternehmen „The Jackson Laboratory“ [10], ein weltweit agierendes Unternehmen, welches kommerziell mit Mausmodellen handelt, verfügt nach eigenen Angaben über mehr als 8000 unterschiedlichen Mauslinien, welche als Modellorganismen für verschieden Forschungsaspekte verwendet werden können.

Ungefähr 59% der in der Forschung verwendeten Mäuse werden in der Grundlagenforschung eingesetzt [4]. Die Etablierung neuer Mausmodelle ist zur Erforschung physiologischer und molekularer Mechanismen zwingend notwendig, da zum jetzigen Zeitpunkt viele Abläufe und Mechanismen verschiedenster Erkrankungen noch nicht verstanden werden. Grundlegende biologische Mechanismen sind für die Bearbeitung pharmakologischer Fragestellungen oder der Testung neuer Substanzen unabdingbar. Dies gilt auch für die Erforschung des Krankheitsbildes der zerebralen Vasospasmen infolge einer subarachnoidalen Blutung [11]. Es existieren bereits zahlreiche Modelle zur Erforschung zerebraler Vasospasmen in der Maus

[11], jedoch erfolgt die Quantifizierung dieser in nahezu allen Arbeiten erst nach Tötung der Mäuse durch eine Perfusion mit Farbstoffen oder röntgendichten Substanzen und anschließender mikroskopischer oder histologischer Auswertung [12, 13]. Aufgrund dessen sind meist keine longitudinalen Daten verfügbar. In anderen Studien werden die Durchmesser kortikaler Gefäße mithilfe der Intravitalfluoreszenzmikroskopie zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen [14, 15]. Jedoch können mit dieser Methodik nicht alle zerebralen Gefäße ausgewertet werden. Dementsprechend liegen longitudinale Studien zur Evaluation zerebraler Vasospasmen der großen arteriellen Gefäße in der Maus *in vivo* bisher nicht vor.

2.1.1 Subarachnoidalblutung

Die Subarachnoidalblutung (SAB) ist eine potentiell lebensgefährliche, zumeist arterielle Einblutung in den liquorgefüllten Subarachnoidalraum, welcher zwischen Spinnwebhaut (Arachnoidea) und weicher Hirnhaut (Pia mater) lokalisiert ist [16]. Die Ursache für eine ausgeprägte SAB ist in den meisten Fällen die Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas [13]. Die Inzidenz der SAB beträgt in Mitteleuropa ca. 6-9 pro 100.000 Personen pro Jahr. In Deutschland erkranken somit jährlich ca. 6.000-9.000 Patienten an einer SAB [16]. Dementsprechend ist die SAB ein relativ seltenes Krankheitsbild, dafür aber hinsichtlich Morbidität, Mortalität (ca. 50 %) und Lebensqualität der überlebenden Patienten höchst relevant.

Trotz einer erfolgreichen initialen Behandlung, entwickeln 40–70 % der überlebenden Patienten in den ersten zwei Wochen nach aneurysmatischer Blutung Verengungen der gehirnversorgenden Blutgefäße, sogenannte zerebrale Vasospasmen [16].

Diese Vasospasmen können zu einer relevanten Reduktion des zerebralen Blutflusses in den jeweiligen Gehirnarealen führen. So kommt es bei ca. einem Drittel der Patienten mit zerebralen Vasospasmen zu einer Ischämie des abhängigen Territoriums und somit zu vasospasmus-assoziierten Schlaganfällen [15]. Diese wiederum gehen für den Patienten mit bleibenden Schäden einher oder verlaufen im schlimmsten Fall tödlich.

Die aktuellen Ansätze zu Therapiemöglichkeiten der zerebralen Vasospasmen sind vielfältig. Einige derzeit angewendete Therapieverfahren stützen sich auf Fallbeobachtungsstudien oder eigene Erfahrungen, sodass zum jetzigen Zeitpunkt kein für alle Patienten effektives Therapiekonzept existiert [17].

Somit ist ein Modell notwendig, mithilfe dessen longitudinale Beobachtungen der Vasospasmen *in vivo* möglich sind. Denn dies stellt die Grundlage für spätere tierexperimentelle Untersuchungen zur medikamentösen Therapie der Vasospasmen dar.

2.1.2 Arterielle zerebrale Gefäßversorgung in der Maus

Die arterielle zerebrale Gefäßversorgung der Maus ist prinzipiell der menschlichen Gefäßversorgung sehr ähnlich. Der Circulus arteriosus cerebri, welcher nach dem englischen Anatomen Thomas Willis auch Circulus Willisii genannt wird, setzt sich bei der Maus aus der A. basilaris (BA), den A. cerebri posterior (PCA), der A. carotis interna (ICA), der A. cerebri media (MCA) und der A. cerebri anterior (ACA) zusammen (Abbildung 1B) [18]. Im Gegensatz zum humanen Circulus Willisii, welcher sich aus der ACA, A. communicans posterior und PCA zusammensetzt, die die BA mit der ICA verbinden (Abbildung 1A), sind in der Maus die Versorgungsgebiete der BA und ICA eigenständige und unabhängige Einheiten der Blutversorgung [18, 19].

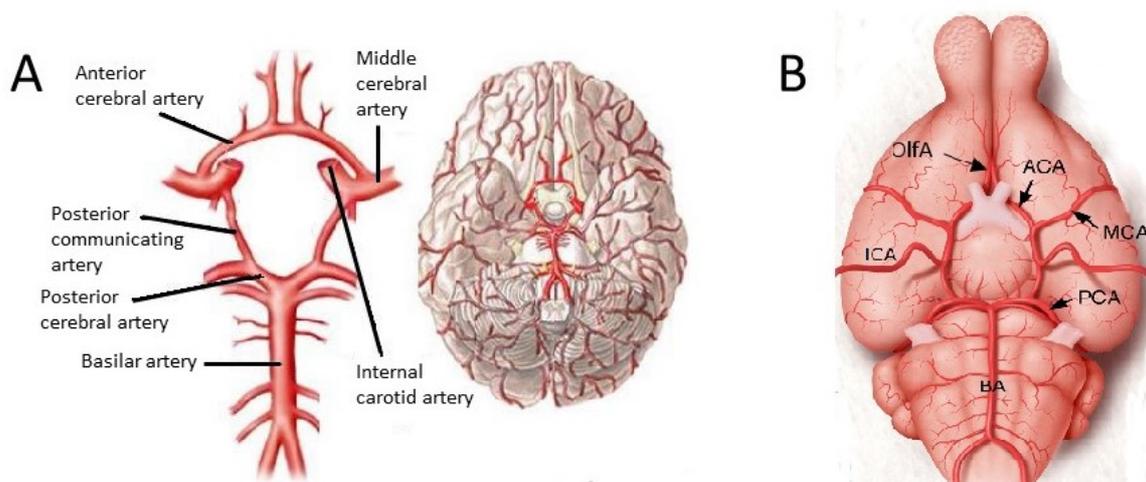


Abbildung 1: Ventrale Ansicht der arteriellen Gefäßversorgung in einem Menschen (A) und in der Maus (B). Während die arteriellen Gefäße im Menschen einen geschlossenen Ring bilden, gibt es in der Maus keine Gefäßverbindung zwischen der Arteria basilaris (BA) und der Arteria carotis interna (ICA), sodass nur ein scheinbarer Gefäßring vorliegt. BA = Arteria basilaris; PCA= Arteria cerebri posterior; ICA= Arteria carotis interna; MCA= Arteria cerebri media; ACA= Arteria cerebri anterior; OlfA= A. olfactorii; Modifiziert nach Giovanna A. Paolo, Brain vasculature imaging with two-photon and light-sheet microscopy, 2016 [19].

Dennoch ist anzumerken, dass etwa ein Drittel der Bevölkerung Abweichungen im zerebralen Gefäßverlauf zeigt. In vielen Fällen sind eine oder mehrere Aa. communicantes hypoplastisch und auch der Stamm der ACA kann hypoplastisch sein [20]. Eine seltene Variation der hinteren zerebralen Blutversorgung ist eine einseitig hypoplastisch oder gar nicht angelegte A.

vertebralis (VA) [21]. Der am meisten variierende Abschnitt des Circulus Willisi ist die A. communicans posterior mit einem häufig asymmetrischen Ursprung, Durchmesser oder Verzweigung [22]. Diese Varianten sind meistens ohne Krankheitswert und werden im gesunden Menschen vollständig kompensiert und stellen nur im Einzelfall ein Risikofaktor für einen Schlaganfall dar [21].

2.1.3 Methoden zur Induktion einer Subarachnoidalblutung in der Maus

Die Methoden zur Induktion einer SAB sind vielfältig. Die am häufigsten verwendete Methode ist das Filament-Perforations-Modell [23]. Hierbei werden die A. carotis externa (ECA), A. carotis interna (ICA) und A. carotis communis (CCA) im Halsbereich der Maus freipräpariert und mithilfe eines Gefäßschnittes in die ECA ein stumpfes Monofilament in diese eingeführt (Abbildung 2A).

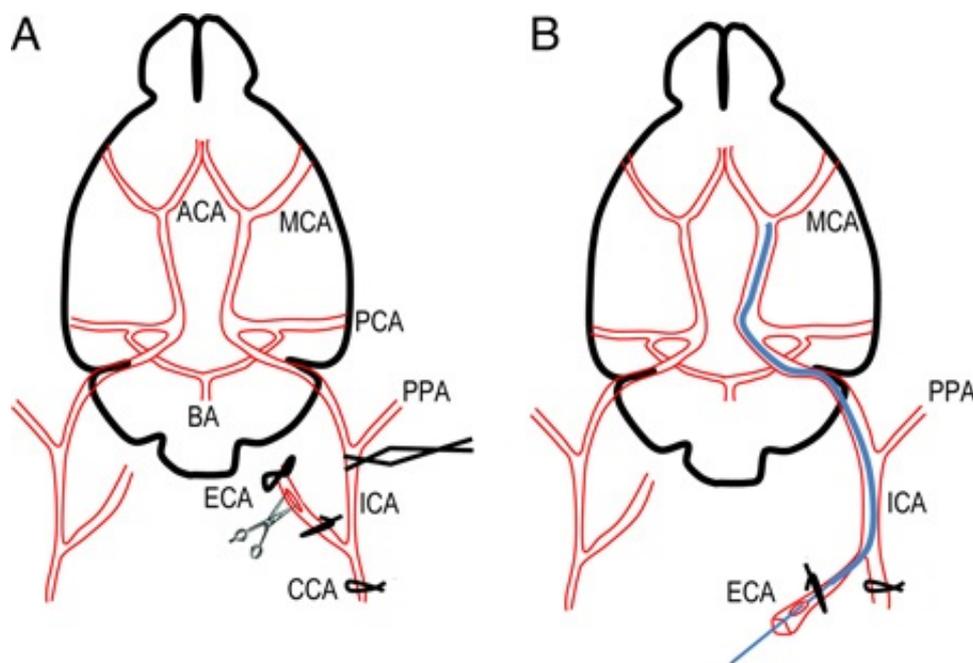


Abbildung 2: Vereinfachtes Schema eines Gehirns der Maus und der zerebralen Arterien. Um ein stumpfes Filament über die A. carotis externa (ECA) in die A. carotis interna (ICA) vorschieben zu können, ist eine Ligatur an der A. carotis communis (CCA) und ECA notwendig, sowie eine vorgelegte Ligatur im proximalen Bereich der ECA. Weiterhin wird ein Clip auf die ICA gesetzt, um den Blutfluss temporär zu unterbrechen (A). Das Filament wird nach Entfernung des temporären Clips bis zur Aufzweigung der ICA in die A. cerebri anterior (ACA) und A. cerebri media (MCA) vorgeschoben, sodass dort eine Gefäßläsion verursacht werden kann (B). CCA= Arteria carotis communis; ECA= Arteria carotis externa; ICA= Arteria carotis interna; PPA= Arteria pterygopalatina; BA = Arteria basilaris; PCA= Arteria cerebri posterior; MCA= Arteria cerebri media; ACA= Arteria cerebri anterior; Modifiziert nach Rousselet et al., Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining, 2012 [24].

Dieser Faden wird vorsichtig in Richtung der ICA vorgeschoben, bis der intrakranielle Bereich der ICA erreicht wird. Im intrakraniellen Bereich wird der Faden so weit vorgeführt, bis ein leichter Widerstand zu spüren ist (Abbildung 2B). Daraufhin wird der Faden abermals einige Millimeter vorgeschoben, wodurch es zur Perforation des Gefäßes kommt.

Durch Zurückziehen des Fadens erfolgt eine Reperfusion der zerebralen Gefäße über die ICA und durch die Perforationsstelle fließt Blut in den Subarachnoidalraum. Im Vergleich zu anderen Methoden repliziert das Filament-Perforations-Modell die humane Pathophysiologie der Ruptur eines zerebralen Aneurysmas zufriedenstellend: neben einem Gefäßschaden kommt es auch zu einem Endothelschaden, beides wichtige Faktoren in Bezug auf die Pathologie der SAB [23, 25].

Jedoch ist das Filament-Perforations-Modell hinsichtlich des chirurgischen und technischen Aufwandes das Modell mit dem höchsten Anspruch. Des Weiteren kann die Blutmenge, welche in den subarachnoidalen Raum austritt, nicht kontrolliert werden, wodurch eine Standardisierbarkeit nicht möglich ist.

Letzteres kann jedoch mithilfe anderer Methoden gesteuert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Induktion einer SAB in der Maus ist die Injektion von Blut in die Cisterna prechiasmatica [26-28] oder die Cisterna magna [29-31]. In diesem Fall wird autologes Blut über ein Bohrloch in der Schädeldecke in einem bestimmten Winkel in die Cisterna prechiasmatica (Abbildung 3A) injiziert oder über eine Punktion der atlanto-okkzipitalen Membran in die Cisterna magna (Abbildung 3B). Dabei handelt es sich um eine definierte Menge Blut, die entweder einmalig oder auf zwei Injektion verteilt injiziert wird [32]. Im Anschluss an die Injektion verbleiben die Tiere noch für einige Minuten in ihrer Position (bei einer Cisterna magna Injektion werden die Tiere in Kopftieflage gebracht [30]), damit sich das injizierte Blut in die basalen Cisternen umverteilt. Neben einer besseren Kontrolle der applizierten Blutmenge, werden dieser Methode stärkere Vasospasmen zugeschrieben [33].

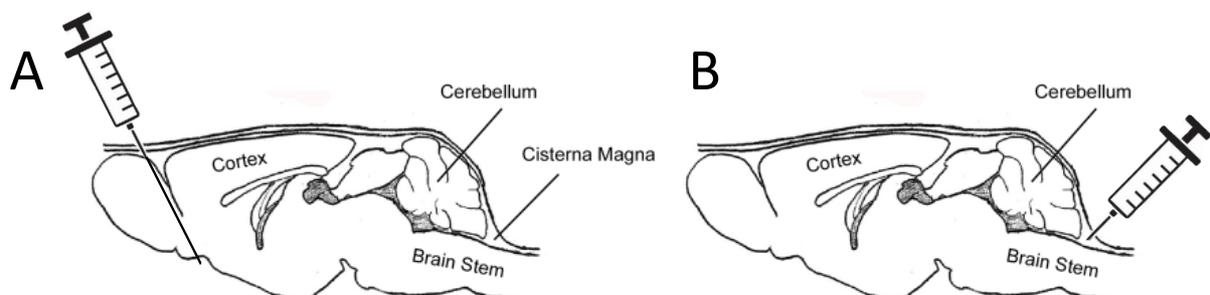


Abbildung 3: Ein sagittaler Schnitt durch das Gehirn einer Maus mit dem Verlauf der Injektionsnadel für eine Injektion in die Cisterna prechiasmatica (A) oder in die Cisterna magna (B). Modifiziert nach Liu et al., A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse, 2008 [34].

Eine dritte Möglichkeit zur Induktion einer SAB in der Maus ist die intracisternale Gefäßdurchtrennung [35-37]. Um die intracisternale Vene sichtbar zu machen, werden die hinteren zervikalen Muskeln nach einem suboccipitalen Hautschnitt durchtrennt und die transparente atlanto-occipitale Membran freigelegt. Die darunter liegende intracisternale Vene wird nach Durchtrennung der atlanto-occipitalen Membran durchgeschnitten und das Blut kann sich bei abwärts gerichteter Kopfhaltung der Maus im subarachnoidalen Raum verteilen. Nachteilig hierbei ist die Tatsache, dass es sich um keine arterielle Blutung handelt.

2.1.4 Zerebrale Vasospasmen

Als Vasospasmus bezeichnet man die funktionell-reflektorische oder durch lokale Einflüsse ausgelöste Vasokonstriktion [38]. Die genauen autoregulatorischen Mechanismen, wie es beispielsweise nach einer subarachnoidalen Blutung zu den Vasokonstriktionen kommt, sind noch unbekannt. Es wird angenommen, dass das in den Subarachnoidalraum eingetretene Blut im Rahmen der Hämolyse Stoffe freisetzt, die eine Kontraktion der Arterien auslöst und die Autoregulierung somit zeitweise außer Kraft setzt [39, 40]. Des Weiteren kommen zahlreiche Interaktionen von Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren und Zytokinen hinzu.

2.2 Bedeutung bildgebender Verfahren in der präklinischen Forschung

In den letzten zehn Jahren wurden weitere Fortschritte in der Kleintierbildgebung erzielt [41-43]. Die zur Verfügung stehenden Techniken zur Bildgebung von Tieren sind vielfältig [42, 44, 45]. Dies beruht auf der Entwicklung spezieller Geräte für die in vivo-Anwendung in kleinen Labortieren. Hierzu zählen optische Verfahren wie zum Beispiel die Biolumineszenz (BLI) und nuklearmedizinische Methoden wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder die Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (SPECT). Des Weiteren werden neben der Sonographie und der Magnetresonanztomographie (MRT) auch Methoden verwendet, welche auf Röntgenstrahlen basieren (konventionelles Röntgen, Computertomographie (CT), digitale Subtraktionsangiographie (DSA)). Insbesondere im Bereich der Computertomographie und MRT wurden speziell für die Untersuchung von kleinen Labortieren geeignete Geräte entwickelt [46].

Die im Rahmen der tierexperimentellen Forschung angewandten Geräte zeichnen sich vor allem durch eine im Vergleich mit humanen Geräten höhere räumliche Auflösung bei kleinerem *Field of View* aus [47].

Besonders für longitudinale Studien ist die Verwendung nicht invasiver Untersuchungstechniken am lebenden Tier ein relevanter Fortschritt im Bereich des Tierschutzes. Wiederholte Untersuchungen von Tieren in einem Versuch *in vivo* ermöglichen eine deutliche Reduktion der im Versuch notwendigen Tiere, da auf Finalversuche oder eine terminierte Tötung multipler Tiere zu definierten Zeitpunkten verzichtet werden kann. Daher trägt die repetitive Anwendung bildgebender Methoden maßgeblich zur Umsetzung der 3R-Prinzipien von Russel und Burch bei.

Aktuell existiert kein geeignetes *in vitro*-Modell zur vollständigen Untersuchung der SAB-induzierten zerebralen Vasospasmen. Aufgrund komplexer autoregulatorischer Mechanismen und der Interaktion verschiedenster Faktoren (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Entzündungsmoleküle) im Subarachnoidalraum und in den arteriellen Gefäßen, ist eine realistisch anwendbare *in vitro* Alternativmethode mit dem derzeitigen Wissensstand nicht umsetzbar. Videomikroskopische *in vitro* Versuche mit extrahierten Hirngefäßen aus Ratten konnten lediglich akute lokale Effekte der Spasmolyse belegen, ohne jedoch eine realistische perivaskuläre Situation zu simulieren [48]. Daher lassen sich die Entstehung und der Verlauf von zerebralen Vasospasmen nach einer SAB nur begrenzt *in vitro* erforschen.

Mithilfe der longitudinalen Anwendung nicht invasiver Untersuchungsmethoden, wie zum Beispiel der Mikro-Computertomographie, kann sowohl eine Verringerung der Versuchstierzahlen (Reduction), als auch eine Minderung der Belastung (Refinement) erzielt werden.

Im weiteren Verlauf soll speziell auf die im Rahmen dieser Dissertation angewendeten Bildgebungsmethoden (Computertomographie und digitale Subtraktionsangiographie) eingegangen werden.

2.2.1 Mikro-Computertomographie

Die Computertomographie beruht auf einer abweichenden Röntgenstrahlenabsorption der unterschiedlichen Gewebe [49]. Hierbei wird das zu untersuchende Objekt von Röntgenstrahlen, welche von einer Röntgenröhre produziert werden, durchdrungen und das Dichteprofil des Objektes wird auf einem Detektor abgebildet. Durch die Akquisition multipler 2D Projektionen aus verschiedenen Winkeln können mithilfe der gefilterten Rückprojektion computergestützt 3D-Datensätze generiert werden [50].

Die ersten Mikro-CTs werden Anfang der 80er Jahre entwickelt. Aufgrund der Modifizierung des Fächerstrahl-Algorithmus durch Feldkamp und Davis zur Kegelstrahlgeometrie [51] vergrößert sich das Interesse an diesen Geräten für den Einsatz in der präklinischen Forschung zunehmend. Die Möglichkeit ein größeres Volumen mit nur einer Rotation zu erfassen (Volumen-Computertomographie), führt zu einer deutlichen Reduktion der Akquisitionszeit, wodurch diese Anwendung an Labortieren bedeutsam ist. Die ersten speziell für die Bildgebung bei kleinen Labortieren einsetzbaren Mikro-CTs werden Anfang der 90er Jahre entwickelt.

Das Funktionsprinzip des in dieser Arbeit verwendeten Mikro-CTs entspricht prinzipiell dem eines klinischen Computertomographen, wobei es aber Unterschiede hinsichtlich Aufbau und Anordnung der einzelnen bildgebenden Einheiten, bestehend aus Röntgenröhre, Objekthalterung und Detektor, gibt. Obwohl klinische Geräte bereits maximale räumliche Auflösungen von ca. 150µm erreichen [52], können mit einem Mikro-CT wesentlich höhere Auflösungen im ein- bis zweistelligen Mikrometerbereich erzielt werden [53].

Röntgenröhre

In klinischen Computertomographen werden vorwiegend Drehtelleranoden zur Erzeugung von Röntgenstrahlen verwendet. Die von einem erhitzten Wolframdraht erzeugten Elektronen werden in einer Vakuumröhre bis zum Aufprall auf eine rotierende Anode beschleunigt. Durch den Aufprall der Elektronen auf die Anode entstehen die Röntgenstrahlen [54]. Im Gegensatz dazu werden in Mikro-CTs sogenannte Transmissionsröntgenröhren verwendet (Abbildung 4). In den Transmissionsröhren wird der Elektronenstrahl zusätzlich von mehreren magnetischen Linsen auf ein Transmissionstarget mit einem möglichst kleinen Brennfleck fokussiert [41]. Durch den Aufprall der Elektronen auf das Target, welches typischerweise aus einem Trägermaterial wie zum Beispiel Beryllium oder Industriediamant mit einer dünnen Schicht Wolfram besteht, werden diese abgebremst und erzeugen durch Wechselwirkungsprozesse zum einen Bremsstrahlung und zum anderen charakteristische Strahlung. Diese beiden Strahlungsarten ergeben zusammen die Röntgenstrahlung. Der Einsatz von Transmissionsröhren ermöglicht besonders kleine Brennfleckgrößen (Mikrofokus-Röntgenröhre), welche besonders bei hohen Vergrößerungseffekten durch Reduktion des Halbschattenbereichs notwendig sind, um scharfe Bilder zu erzeugen [43, 55].

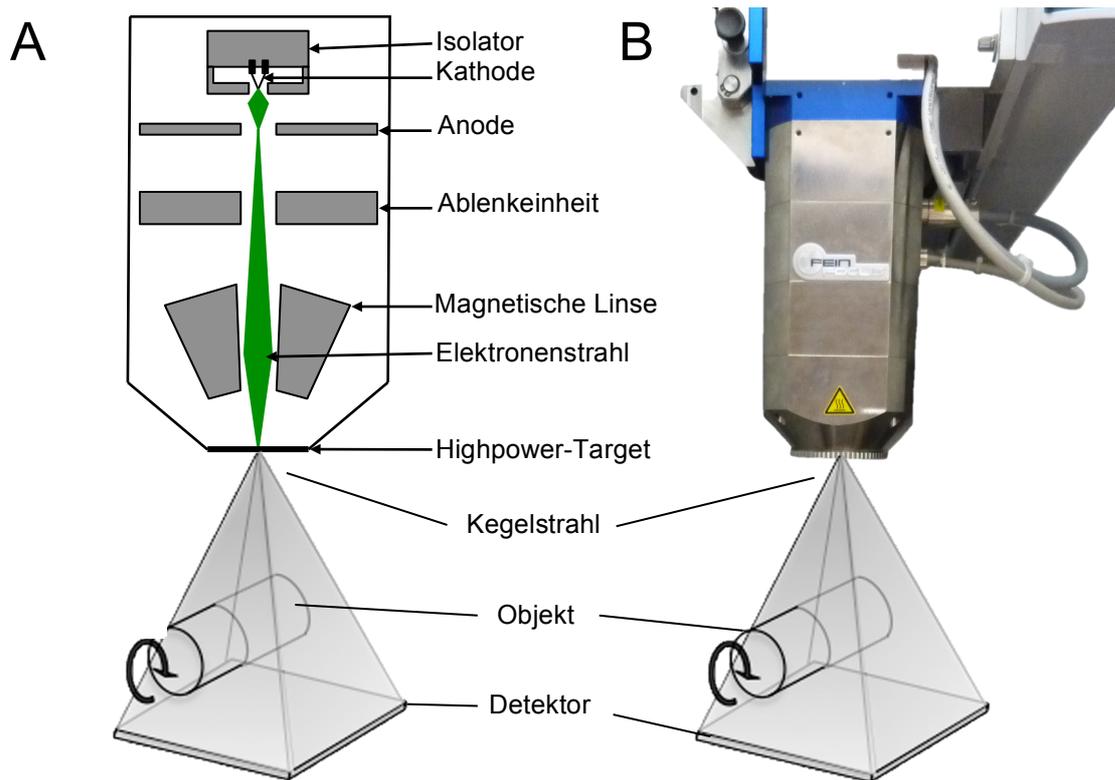


Abbildung 4: Schematischer Aufbau einer Multifokus-Transmissionsröntgenröhre mit Kegelstrahlgeometrie (A). Photographische Abbildung der in diesen Versuchen verwendeten Transmissionsröntgenröhre (B). Modifiziert nach Fiebig, A.T., Entwicklung, Testung und Verwendung eines artefaktfreien Ports für die Maus zur wiederholten intravaskulären Injektion, 2013 [56]

Die von einer Transmissionsröhre emittierten Röntgenstrahlen bestehen sowohl aus weicher, niederenergetischer Strahlung, als auch aus harter, höherenergetischer Strahlung. Beeinflusst wird die Strahlenhärte von der an die Röhre angelegten Spannung (hohe Spannung \rightarrow härtere Strahlung, niedrige Spannung \rightarrow weichere Strahlung). Die weichen Strahlenanteile werden von dem zu untersuchenden Objekt überwiegend gebremst und absorbiert, wodurch diese Strahlenqualität hauptsächlich die Strahlenbelastung erhöht, aber auch zu einem besseren Weichgewebekontrast beiträgt. Die erhöhte Strahlenbelastung kann jedoch durch den Einsatz von in den Strahlengang eingebrachten Filtern (z.B. Kupfer, Aluminium, Molybdän) reduziert werden. Der Filter absorbiert die weiche Strahlung, wodurch es zu einer Veränderung der Strahlenqualität kommt [57]. Im Gegensatz zur weichen Strahlung können die harten Strahlenanteile das Untersuchungsobjekt durchdringen und erreichen den Detektor.

Detektor

In den meisten Mikro-CTs werden hauptsächlich Flachbilddetektoren („*active matrix flat panel imagers*“) verwendet [41, 43, 58]. Diese gehören zu den Szintillationsdetektoren (sog. indirekte Detektoren) und bestehen hauptsächlich aus Kristallen und Photodioden. Die einfallende Röntgenstrahlung wird durch Szintillationskristalle zunächst in sichtbares Licht umgewandelt, welches dann zu den unter der Szintillatorfolie liegenden Photodioden weitergeleitet wird. Die Photodioden detektieren das sichtbare Licht, absorbieren die Lichtphotonen und erzeugen eine elektrische Ladung, welche zu der Intensität der Röntgenstrahlung proportional ist [55, 59]. Ein Vorteil der Flachbilddetektoren ist die hohe Auslesegeschwindigkeit, da die Photodioden mit Dünnschichttransistoren (sog. TFTs) verbunden sind [60]. Dadurch sind wesentlich schnellere Scanprotokolle möglich, die wiederum eine Reduktion der Strahlendosis ermöglichen. Des Weiteren liefern sie Aufnahmen mit sehr hoher Auflösung.

Konstruktionsprinzipien

Die bildgebenden Einheiten eines Computertomographen sind die Röntgenröhre, der Detektor und die Objekthalterung (Manipulator) beziehungsweise der Patiententisch. Hierbei werden zwei Konstruktionsprinzipien im Aufbau und der Anordnung unterschieden. In klinischen CTs sind der Detektor und die Röntgenquelle gegenüberliegend auf einer Gantry montiert und rotieren in einem fest definierten Abstand um den Patienten herum (Abbildung 5A). Dabei wird der Patient mit einer festgelegten Geschwindigkeit (Tischvorschub pro Zeiteinheit) durch den Fächerstrahl gefahren (Translation) [61].

Der Aufbau einiger Mikro-CTs unterscheidet sich insofern, als das in diesem Fall das zu untersuchende Objekt in einem Kegelstrahl um seine eigene Achse rotiert, während Detektor und Röntgenröhre in einer festen Position verbleiben (Abbildung 5B) [53, 62]. Durch die Verwendung des Kegelstrahls ist keine Längsbewegung (Translation) notwendig, um das gesamte Objekt abzubilden. Des Weiteren sind auch Mikro-CTs, die in ihrem Aufbau dem eines klinischen CTs ähnlich sind, verfügbar [46].

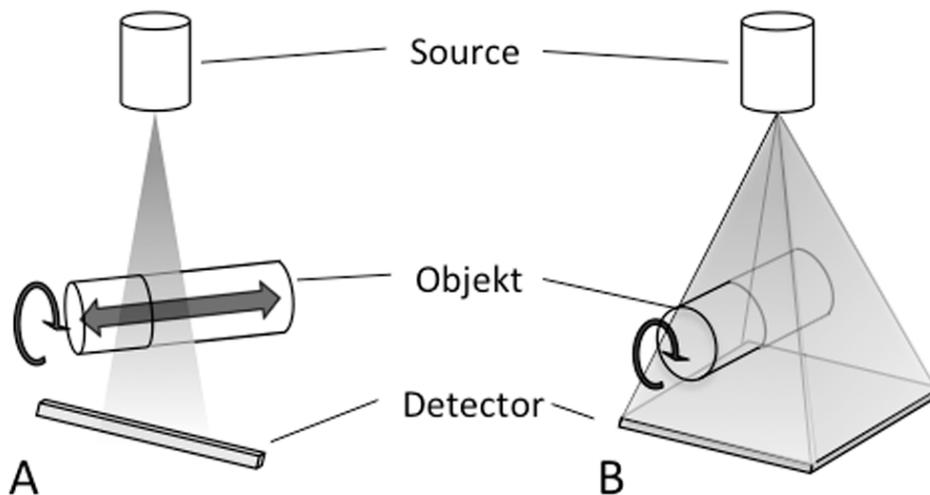


Abbildung 5: Vergleich von Fächerstrahl-Computertomographie (A) und Kegelstrahl-/Volumen-Computertomographie (B). In der Fächerstrahl-CT ist im Gegensatz zur Kegelstrahl-CT eine Translation notwendig, um das gesamte Volumen zu erfassen. Abbildung aus Kirschner, S., In vivo Bildgebung von Gehirntumoren im Glioblastom-Modell bei der Maus und Evaluation der Verteilung von Mikrosphären in einem Aneurysma-Modell beim Schwein mittels Mikro-CT, 2016 [63]

2.2.2 Digitale Subtraktionsangiographie

Die digitale Subtraktionsangiographie (DSA) ist ein diagnostisches Verfahren zur Darstellung von Gefäßen unter Anwendung von Röntgenstrahlen und Kontrastmittel [64]. Da viele Strukturen bei der Durchleuchtung mit Röntgenstrahlen nicht bzw. nicht zufriedenstellend visualisierbar sind, werden Kontrastmittel (KM) zur Optimierung der Darstellbarkeit verwendet. Diese Substanzen haben eine höhere Röntgendichte als die meisten Gewebe im Körper und erscheinen bei Anwendung dichtegehoben [43].

Das Grundprinzip in klinischen Geräten ist die initiale Anfertigung von Bildsequenzen der zu untersuchenden Blutgefäßstrukturen ohne KM (Leeraufnahme), welche als sogenannte Maske dienen. Im Anschluss wird dem Patienten über einen arteriellen oder venösen Katheter KM appliziert. Während der Kontrastmittelanflutung werden weitere Sequenzen akquiriert, von denen im Anschluss die initial erstellte Maske subtrahiert wird, sodass in der Endansicht nur die kontrastmittelgefüllten Gefäße sichtbar sind [65-67]. Auf diese Weise werden unerwünschte Bildelemente, wie zum Beispiel knöcherne Strukturen entfernt. Weiterhin kann in der DSA durch die Aufnahme mehrerer aufeinander folgender Bildsequenzen eine zeitlich aufgelöste Untersuchung der Kontrastmittelanflutung in den Gefäßen erfolgen [68].

Da die Subtraktion einer initial erstellten Maske von den im Anschluss akquirierten Bildern mit Kontrastmittel nicht mit jeder Software möglich ist, besteht noch eine weitere Möglichkeit zur Durchführung einer DSA. Zur Anfertigung dieser DSA-Sequenzen wird der

Detektor vor Injektion des KM auf eine Graustufe kalibriert (*gain and offset calibration*), sodass alle im *Field of View* (FoV) befindlichen Strukturen auf einen Grauwert zurückgesetzt werden. In den darauffolgenden Bildsequenzen ist nur das an- und abflutende KM sichtbar [69, 70].

Zur Darstellung von Gefäßen in der DSA werden hauptsächlich jodhaltige KM verwendet [42, 53, 71], da diese innerhalb kurzer Zeit von der Niere ausgeschieden werden und dadurch die Belastung für die Labortiere reduziert wird. Nachteilig hierbei ist das kurze Zeitfenster, in welchem die Gefäße nach intravaskulärer KM-Applikation dargestellt werden können [55].

Daher werden bei Versuchstieren mitunter auch andere KM eingesetzt. Hierbei sind vor allem das FenestraTM von Medilumine [72] und das ExiTronTM nano von Viscover zu nennen [73, 74]. Letzteres ist ein speziell für die präklinische computertomographische Bildgebung nanopartikuläres KM. Nach intravenöser Injektion zirkuliert das KM im Blutgefäßsystem und wird von Kupferzellen des retikuloendothelialen Systems, inklusive der Makrophagen der Leber (Kupffer'sche Zellen), aufgenommen. Hiervon sind aktuell zwei unterschiedliche Formulierungen kommerziell erhältlich. Das ExiTronTM nano 6000, welches vor allem der Bildgebung der Leber, insbesondere der Detektion von Lebermetastasen, dient und das ExiTronTM nano 12.000, welches für die angiographische Bildgebung feiner vaskulärer Strukturen optimiert wurde.

Im Gegensatz zum Menschen, können in der Versuchstierbildgebung die Tiere nahezu ausschließlich in Anästhesie untersucht werden [49]. Sowohl willkürliche Eigenbewegungen, als auch unwillkürliche Bewegungen wie Atmung, Herzschlag oder Darmperistaltik führen zu Bewegungsartefakten, welche die Bildqualität erheblich beeinträchtigen [56]. Aber auch eine unzureichende Fixaktion der Tiere in einer Halterung kann zur Entstehung von Artefakten beitragen.

2.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

Bisher existierten keine publizierten Arbeiten zur longitudinalen Evaluation zerebraler Vasospasmen der großen Arterien in der Maus. In vorherigen Studien wurden die experimentell induzierten Vasospasmen ausschließlich *ex vivo* untersucht [13] oder es handelte sich bei den untersuchten Gefäßen um die peripheren Stromgebiete, beispielsweise um Anteile der Mikrozirkulation der MCA [14].

Die vorliegende Arbeit belegt, dass die longitudinale Darstellung und Quantifizierung zerebraler Vasospasmen der großen Arterien in der Maus *in vivo* möglich ist. Des Weiteren

wurde die Verwendung der Röntgenstrahlen-basierten Bildgebung erweitert und ein neuer prognostischer Mikro-CT-basierter Score zur Analyse des Schweregrades der SAB in der Maus *in vivo* entwickelt. Zudem ist dies die erste Studie, welche Pseudoaneurysmen in der Maus *in vivo* im Bereich der Faden-Perforation darstellen konnte [75].

Alle Experimente wurden mit Genehmigung der zuständigen Tierschutzkommission (Regierungspräsidium Karlsruhe, Aktenzeichen 35-9185.81/G42/16; Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW) und gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Weiterhin wurde die Mikro-Computertomographie nicht nur für die *in vivo* Bildgebung erfolgreich verwendet, sondern auch für die Darstellung feinsten Strukturen *ex vivo*. Dentale Referenzproben werden für Vergleichsaufnahmen computertomographisch untersucht. Um die Schichtdicke von Glattflächenversiegeln bestimmen zu können werden humane extrahierte Prämolaren und Molaren mit drei verschiedenen Versiegeln behandelt (Light Bond™ Sealant, Pro Seal® und Opal® Seal) und im Anschluss an die Bildaquisition im Mikro-CT mit der optischen Kohärenztomographie verglichen [76]. Aufgrund der hohen Auflösung des Mikro-CT im Millimeterbereich ist die Ausmessung der auf die Zahnproben aufgetragenen Versiegelungen möglich, dennoch überwiegen für diese Fragestellung die Vorteile der optischen Kohärenztomographie.

Das Studienprotokoll, sowie die Verwendung extrahierter humaner Zähne, wurde vom Ethikkomitee der Medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg (Genehmigungsnummer S-301/2011) genehmigt.

3 Publikationen

3.1 Erstautorenschaft

Longitudinal imaging and evaluation of SAH-associated cerebral large artery vasospasm in mice using micro-CT and angiography

Vanessa Weyer^{1,2*}, DVM, Máté E. Maros^{2*}, MD, MSc, Andrea Kronfeld¹, MSc, Stefanie Kirschner^{1,3}, DVM, Christoph Groden², MD, Clemens Sommer⁴, MD, Yasemin Tanyildizi¹, MD, Martin Kramer⁵, DVM, Marc A. Brockmann¹, MD

¹ University Medical Center Mainz, Department of Neuroradiology, Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz

² University of Heidelberg, Medical Faculty Mannheim, Department of Neuroradiology, Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, 68167 Mannheim

³ University of Heidelberg, Medical Faculty Mannheim, Department of Radiation Oncology, Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, 68167 Mannheim

⁴ University Medical Center Mainz, Institute of Neuropathology, Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz

⁵ Justus-Liebig-University Giessen, Department of Veterinary Clinical Sciences, Small Animal Clinic, Frankfurter Straße 108, 35392 Gießen

*These authors contributed equally to this work.

Longitudinal imaging and evaluation of SAH-associated cerebral large artery vasospasm in mice using micro-CT and angiography

Longitudinal in vivo imaging studies characterizing subarachnoid hemorrhage (SAH)-induced large artery vasospasm (LAV) in mice are lacking. We developed a SAH-scoring system to assess SAH severity in mice using micro CT and longitudinally analysed LAV by intravenous digital subtraction angiography (i.v. DSA). Thirty female C57Bl/6J-mice (7 sham, 23 SAH) were implanted a central venous port for repetitive contrast agent administration. SAH was induced by filament perforation. LAV was assessed up to 14 days after induction of SAH by i.v. DSA. SAH-score and neuroscore showed a highly significant positive correlation ($r_{sp}=0.803$, $p<0.001$). SAH-score and survival showed a negative significant correlation ($r_{sp}=-0.71$, $p<0.001$). LAV peaked between days 3-5 and normalized on days 7-15. Most severe LAV was observed in the internal carotid ($\Delta_{max}=30.5\%$, $p<0.001$), ii), anterior cerebral ($\Delta_{max}=21.2\%$, $p=0.014$), middle cerebral ($\Delta_{max}=28.16\%$, $p<0.001$) and basilar artery ($\Delta_{max}=23.49\%$, $p<0.001$). Cerebral perfusion on day 5 correlated negatively with survival time ($r_{pe}=-0.54$, $p=0.04$). Arterial diameter of the left MCA correlated negatively with cerebral perfusion on day 3 ($r_{pe}=-0.72$, $p=0.005$). In addition, pseudoaneurysms arising from the filament perforation site were visualized in 3 mice using i.v. DSA. Thus, micro-CT and DSA are valuable tools to assess SAH severity and to longitudinally monitor LAV in living mice.

Key words: Subarachnoid hemorrhage, Cerebral vasospasm, Longitudinal Digital Subtraction Angiography, micro-CT, in vivo

3.2 Co-Autorenschaft

Assessing abrasion of orthodontic surface sealants using a modified ophthalmic optical coherence tomography device

Sinan Şen¹, Ralf Erber¹, Kevin Kunzmann², Stefanie Kirschner^{3,4}, **Vanessa Weyer**⁴, Lothar Schilling⁵, Marc A. Brockmann³, Stefan Rues⁶, Gül Orhan¹, Christopher J. Lux¹, Sebastian Zingler¹

¹ Department of Orthodontics and Dentofacial Orthopaedics, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

² Institute of Medical Biometry and Informatics, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

³ Department of Neuroradiology, University Medical Center of the Johannes Gutenberg-University Mainz, Germany

⁴ Department of Neuroradiology, University Medical Center Mannheim, Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany

⁵ Division of Neurosurgical Research, Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany

⁶ Department of Prosthodontics, Dental School, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

Assessing abrasion of orthodontic surface sealants using a modified ophthalmic optical coherence tomography device

Objective Optical coherence tomography (OCT) is a clinical standard in ophthalmology. Currently, its application in dentistry is gaining increasing interest. In this study, we tested the possibility to use a modified commercially available spectral domain OCT (SD-OCT) to assess the layer thickness of orthodontic surface sealants.

Materials and methods Reference samples of surface sealants for calibration and repeatability testing were measured using a micrometer screw. SD-OCT measurements were compared with micro-CT and light microscopic analyses. After validating the calibration of the SD-OCT, surface sealant layer thickness after aging (thermo cycling) and simulation of professional tooth cleaning (PTC) was assessed using the SD-OCT on 45 extracted teeth assigned to three test groups (n = 15 each): Light Bond™ Sealant, Pro Seal®, and Opal® Seal.

Results SD-OCT showed excellent repeatability and accuracy for measurements of surface sealant layer thickness. Compared with micro-CT, SD-OCT showed better accordance with the reference measurements. The analysis of surface sealants after thermo cycling and PTC revealed poor resistance of Light Bond after only aging and demonstrated substantial wear of all sealants after aging and PTC.

Conclusion Imaging using commercially available ophthalmic SD-OCT might represent a suitable non-invasive methodology for longitudinal assessments of surface sealant layer thickness in vitro and in vivo.

Clinical relevance SD-OCT might be a suitable non-invasive method for longitudinal assessments of surface sealant durability in clinical trials.

Key words: Optical coherence tomography, Orthodontics, Surface sealants, Abrasion, Prevention of white spot lesions, Prophylaxis

3.3 Weitere eigene Publikation

Irradiation of healthy brain alters expression of genes involved in cell motility and invasiveness of glioblastoma

Marianne R. Hahn¹, Stefanie Kirschner¹, Barbara Link¹, **Vanessa Weyer**^{1,2}, Carsten Sticht³, Kaga Gomarteli¹, Marlon R. Veldwijk¹, Frederik Wenz⁴, Carsten Herskind¹, Frank A. Giordano¹

¹ Department of Radiation Oncology, Universitätsmedizin Mannheim, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

² Department of Neuroradiology, Universitätsmedizin Mannheim, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

³ Medical Research Center, Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany

⁴ Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, Germany

Irradiation of healthy brain alters expression of genes involved in cell motility and invasiveness of glioblastoma

Background: Traumatic brain injury is known to cause proliferation and migration of astrocytic and neuronal cells. To find out whether irradiation may influence migration of intracranial tumors, we performed expression profiling of orthotopically implanted glioblastomas following irradiation to the contralateral (non-diseased) hemisphere.

Methods: We orthotopically implanted 2.5×10^6 of the human glioblastoma cell line U87 MG into immunodeficient NSG mice. After tumor detection in serial imaging, fractionated irradiation with 3 x 5 Gy was applied to the contralateral hemisphere. Non-irradiated tumor-bearing mice served as control group. Following snap-freezing of brains, tumor cores and peripheries were separated using laser-capture microdissection (LCM) and subjected to RNA isolation. Differentially expressed genes (DEG) and associated signaling pathways were identified using array-based expression analysis.

Results: Compared to tumors from unirradiated animals, contralateral irradiation significantly altered n=149 DEG in the tumor core (106 up-, 43 down-regulated) but only n=8 DEG (6 up-, 2 down-regulated) in the tumor periphery. Within the top 20 DEG in the tumor core, we identified seven genes (MECOM, EDIL3, LPAR1, CDK14, CEBP γ , CRNDE, SERPINE1) that are associated with cell motility, glioblastoma invasiveness or cancer stem cell maintenance, whereas all of these genes have a role in ERK1/2-associated signaling cascades.

Conclusions: Irradiation of healthy brain influences expression profiles of non-irradiated intracerebral tumors, potentially influencing cell motility and invasiveness of glioblastoma.

Keywords: Glioblastoma, Irradiation, ERK Signaling

4 Übergreifende Diskussion

Das Ziel der Grundlagenforschung ist es, grundlegende Erkenntnisse zu gewinnen und das menschliche Wissen zu erweitern [77]. Um komplexe Funktionen im menschlichen Körper, sowie komplexe Erkrankungsmechanismen, zu verstehen, wollen Wissenschaftler den aktuellen Wissensstand erhöhen. Darauf aufbauend sollen Ansätze entwickelt werden, die zu neuen Techniken, neuen Therapiemöglichkeiten oder zur Entwicklung von neuen Medikamenten beitragen [77]. Ein kompletter Verzicht auf Tierversuche wird dabei auf absehbare Zeit nicht möglich sein. Viele lebensbedrohliche Krankheiten des Menschen (oder des Tieres), die ebenfalls noch weiterer Forschung bedürfen, können mit alternativen Methoden, wie zum Beispiel der Zellkultur oder mithilfe von Computersimulationen, nicht suffizient nachgeahmt werden, sodass der Einsatz von Versuchstieren notwendig erscheint. Dies gilt auch im Bereich der zerebralen Vasospasmen: Die Zellinteraktionen, sowie der spezifische vasomotorische Mechanismus, die im Zusammenhang mit der Entstehung von zerebralen Vasospasmen stehen, sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt. In einer Arbeit von Deng und Kollegen (2018) werden Versuche zum Entstehungsmechanismus zerebraler Vasospasmen *in vitro* durchgeführt, jedoch sind auch in diesem Fall für die Isolation von Arteriolen und im weiteren Verlauf für die Validierung der Ergebnisse *in vivo* Versuche notwendig [78]. In der erwähnten Studie kann erstmals gezeigt werden, dass der Kontakt von zerebralen Arteriolen mit extravasalem Blut zu einer übermäßigen druckbedingten myogenen Vasokonstriktion führt. Diese Reaktion ist proportional zur Expositionszeit des Gefäßes mit dem extravasalen Blut und trägt signifikant zur Entwicklung von zerebralen Vasospasmen nach einer zerebralen Blutung bei. Des Weiteren ist die myogen bedingte Gefäßverengung reversibel, indem sie mit vaskulären Superoxiden behandelt wird [78].

Dennoch steht die Grundlagenforschung immer wieder in der öffentlichen Kritik. Eine häufig gebrauchte Behauptung dabei ist, dass die Ergebnisse aus diesen Studien keine klinische Relevanz haben. Diese Aussage wird jedoch von Comroe und Dripps bereits in den 1970er Jahren entkräftet [79]. Sie untersuchen den Zusammenhang zwischen der Grundlagenforschung und den zehn relevantesten medizinischen Entwicklungen in den Jahren 1945 bis 1975 zur Behandlung von Herz- und Lungenerkrankungen. Hierzu zählen beispielsweise die Operation am offenen Herzen, der Bypass oder auch die Entdeckung der Elektrizität. Sie kommen zu dem Ergebnis, dass für eine Therapieoption ca. 2500 wissenschaftliche Arbeiten notwendig sind, von denen 61,5% zur Grundlagenforschung gehören. Auch neuere Studien belegen dies: Für die Zulassung von zwei neuartigen

Medikamenten zur Behandlung von Krebs und Mukoviszidose sind im ersten Fall grundlegende Erkenntnisse aus 433 Publikationen über 46 Jahre bzw. im zweiten Fall 355 Publikationen über 47 Jahre notwendig [80]. Dies belegt, dass die Grundlagenforschung die Basis für die Entwicklung neuer Therapieansätze sein muss. Daher sind Studien, wie die hier vorgelegte zur longitudinalen Evaluation zerebraler Vasospasmen, notwendig, um eine Basis für weiterführende und vor allem aufeinander aufbauende Forschungsarbeiten zu bilden.

Aus ethischen und moralischen Gründen muss aber immer nach Alternativmethoden und weniger belastenden Versuchsaufbauten gesucht werden. Aktuell stehen diesbezüglich vor allem drei Methoden zur Verfügung: in-vitro-Modelle, in silico (Computersimulationen) und body-on-a-chip Modelle. Allerdings basieren auch diese Alternativen auf den Erkenntnissen vorheriger Tierversuche. Beispielsweise sind für Vorhersagen aus Computersimulationen Daten notwendig, die aus vorherigen Tierversuchen gewonnen werden [81]. Zudem können Alternativmethoden häufig nur Teilaspekte einer komplexen Erkrankung des menschlichen Körpers simulieren. In einem body-on-a-chip Modell fehlen die Interaktionen mit dem umliegenden Gewebe und es fehlt beispielsweise ein intaktes Immunsystem, welches auf bestimmte Ereignisse im Körper reagieren kann.

Auch rechtlich sind wir Forscher prinzipiell dazu verpflichtet, nach Alternativmethoden zu suchen. Gemäß dem Deutschen Tierschutzgesetz §7a Abs. 2 Nr. 2 müssen Alternativmethoden eingesetzt werden, wann immer dies möglich ist [82].

Ein weiterer Aspekt, welcher sowohl durch europäisches Recht (Artikel 4 RL 2010/63/EU) [83], als auch durch die nationale Gesetzgebung (§7 Tierschutzgesetz und Tierschutz-Versuchstierverordnung) [82, 84] umgesetzt wird, ist das 3R-Prinzip nach William Russel und Rex Burch (1959). Ziel des 3R-Prinzips ist es, Tierversuche zu vermeiden und auf den Einsatz von Tieren in der Forschung zu verzichten (Replacement), die Zahl der verwendeten Tiere zu reduzieren (Reduction) und das Leiden der Tiere im Versuch auf ein unerlässliches Maß zu beschränken (Refinement) [85]. In dem hier vorgestellten Modell zur longitudinalen Evaluation zerebraler Vasospasmen werden Tierversuche durchgeführt, dennoch wird ganz im Sinne des 3R-Prinzips gearbeitet. Besonders im Hinblick auf die Aspekte *Reduction* und *Refinement* trägt dieses Modell zur Verbesserung der wissenschaftlichen Arbeit bei.

Durch den Einsatz von neuen Bildgebungsmodalitäten wie der Mikro-CT, ist eine Reduktion der Tierzahl (*Reduction*) für longitudinale Studien möglich. Bevor diese neuen Technologien zur Verfügung standen, werden für Studien und Untersuchungen beispielsweise Biopsien entnommen [86], wobei diese Untersuchungsmethode nicht für jedes Vorhaben eine geeignete Option ist. Für die Auswertung einer SAB und den daraus resultierenden zerebralen

Vasospasmen ist dies nicht möglich, da es sich bei dem zu untersuchenden Gewebe um lebensnotwendige Anteile handelt. Daher haben frühere Studien für ihre Auswertung die im Versuch befindlichen Tiere zu definierten Zeitpunkten nach Induktion einer Subarachnoidalblutung getötet und die Proben *ex vivo* ausgewertet [13, 25, 32]. Jedoch erhält man hierdurch nur Informationen zu einem bestimmten Zeitpunkt der Erkrankung und für jeden definierten Endzeitpunkt im Krankheitsverlauf muss eine neue Versuchsgruppe eingesetzt werden. Um somit eine statistisch aussagekräftige Datenmenge zu erhalten, sind große Tierzahlen notwendig. Wird jedoch eine longitudinale Beobachtung mithilfe von digitalen Subtraktionsangiographien ermöglicht, kann bereits in einer einzigen Maus die Entwicklung der zerebralen Vasospasmen *in vivo* evaluiert werden. Hierdurch wird der Informationsgewinn erhöht, wodurch die Tierzahl erheblich reduziert werden kann.

Weiterhin trägt die Kleintierbildgebung zum Aspekt des *Refinements* bei: Der Einsatz der nicht invasiven Bildgebung ermöglicht es ohne weitere Schmerzen oder Leiden, Informationen über den Zustand der Tiere zu erhalten. Zudem wird in dieser Arbeit anhand der unmittelbar nach dem endovaskulären Eingriff akquirierten KM-gestützten Mikro-CT-Aufnahme ein neuer prognostischer SAB-Score etabliert werden. Mit diesem ist die Verifizierung einer erfolgreichen Induktion einer SAB mithilfe des Filament-Perforationsmodells möglich. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wird die Induktion einer SAB in den meisten Studien mithilfe einer intrakraniellen Drucksonde (*intracranial pressure* = ICP-Sonde) bestätigt [11, 25, 28]. Jedoch bedarf die Verwendung dieser ICP-Sonde eines vor Induktion der SAB invasiven Eingriffes, bei welchem die epidurale Einführung der Drucksonde durch ein Bohrloch im Schläfenbein erfolgt [11]. Im Gegensatz dazu geht die Anwendung eines Mikro-CTs mit einer wesentlich geringeren Belastung für das Tier einher. Die Tiere werden hierfür in Narkose gelegt und in einer speziellen Halterung fixiert. Diese Fixierung geht ohne Schmerzen einher. Zudem kann die Gesamtdauer der Narkose mit ca. 20 Minuten als kurz bewertet werden, sodass es durch diese lediglich zu einer geringen Belastung kommt. Im Gegensatz dazu ist die Implantation einer ICP-Sonde sowohl mit einer längeren Narkosedauer, als auch einer größeren Invasivität und damit einhergehendem größerem Schmerzempfinden verbunden. Dennoch ist anzumerken, dass für die Darstellung der SAB in dieser Studie eine KM-Applikation nötig ist, da die SAB ansonsten aufgrund des insuffizienten Weichteilkontrastes in der Mikro-CT nicht sichtbar wäre. Ferner muss auch gesagt werden, dass die Mikro-CT mit einer Strahlenbelastung verbunden ist [53, 87]. Diese kann als akut unproblematisch angesehen werden, da im Zuge der wiederholten Anwendung von Röntgenstrahlen in unserer Studie keine strahleninduzierten Schäden detektiert werden

können. Diesbezüglich wird auf einen Gewichtsverlust, welcher in Zusammenhang mit der Röntgenstrahlung gebracht werden kann, Haarverlust, Farbveränderungen des Haarkleides oder Hautveränderungen an den exponierten Stellen geachtet.

Ein weiterer Punkt, der in dieser wissenschaftlichen Arbeit beachtet wird, ist die Verantwortung aller am Versuch beteiligten Personen (*Responsibility*) gegenüber dem Tier. Im Rahmen eines erweiterten 3R-Modells ist die Verantwortung der Wissenschaftler maßgeblich für das Wohlergehen der Tiere und einer sachkundigen Durchführung der Versuche. Dieser Aspekt wird auch im §1 des Tierschutzgesetzes gefordert, in welchem die „Verantwortung des Menschen für das Tier als Mitgeschöpf“ angesprochen wird [82].

Bislang existiert kein longitudinales *in vivo* Modell zur Quantifizierung von Spasmen der Hirnbasisarterien nach SAB in der Maus. Die vorliegende Arbeit belegt erstmalig, dass die longitudinale Darstellung und Quantifizierung zerebraler Vasospasmen der großen Arterien in der Maus *in vivo* möglich ist. Das im Rahmen dieser Promotion etablierte Modell ermöglicht die Testung neuer Substanzen zur Behandlung der SAB mit dem Ziel, neue Therapiekonzepte für den Menschen zu entwickeln.

Die Bedeutsamkeit der SAB-assoziierten Vasospasmen ergibt sich allerdings nicht aus der Häufigkeit ihres Vorkommens, da die Inzidenz in Mitteleuropa lediglich bei ca. 6-9 pro 100.000 Personen pro Jahr liegt [16]. Jedoch ist sie aufgrund ihrer hohen Mortalität (ca. 50%) und Morbidität durch die sich in vielen Patienten entwickelnden zerebralen Vasospasmen und den daraus resultierenden Spätfolgen von Bedeutung. Patienten mit einer aneurysmatischen SAB entwickeln in 20-30% aller Fälle im Krankheitsverlauf lebensbedrohliche vasospasmusassoziierte Schlaganfälle [15], da u. a. die Vasospasmen zu einer Reduktion des zerebralen Blutflusses in den jeweiligen Gehirnarealen führen.

Die aktuellen therapeutischen Ansätze für die Behandlung zerebraler Vasospasmen sind vielfältig [16]. Dementsprechend existiert zum jetzigen Zeitpunkt kein wissenschaftlich belegtes, suffizientes Therapiekonzept. Gegenwärtig werden sowohl rein mechanische gefäßerweiternde Methoden (Ballondilatation) [88], als auch die medikamentöse intraarterielle Spasmolyse durch intraarterielle Mikrokathetereinlage [89] oder eine Kombination aus beidem eingesetzt.

Um die Schwere der Erkrankung im Menschen zu mindern und das Outcome der Patienten zu verbessern, gibt es zahlreiche präklinische Studien [90]. Für diese Studien werden vor allem Nagetiere verwendet [90]. Jedoch gewinnt die Erforschung von Krankheitsverläufen, insbesondere die Darstellbarkeit zerebraler Strukturen und assoziierter Pathologien auch in der Veterinärmedizin zunehmend an Bedeutung, sodass präklinische Studien mit Haussäugetieren, wie zum Beispiel Hunden, ebenfalls durchgeführt werden [90].

Beispielsweise sind digitale Subtraktionsangiographien zur Darstellung von Gefäßen, wie zum Beispiel der Pulmonalarterien [91], aber auch der zerebralen Gefäße [92, 93] in Hunden möglich und finden vor allem in präklinischen Studien Anwendung.

Zusätzlich zur digitalen Subtraktionsangiographie wird auch die Angiographie mit Synchrotronstrahlung zur Darstellung von zerebralen Strukturen eingesetzt. Beispielsweise führt in der Studie von Tanaka und Mitarbeitern (1999) die unzureichende Sensitivität und räumliche Auflösung bei klinischen konventionellen röntgenstrahlenbasierten Angiographien, welche aber notwendig zur Darstellung von kleinsten Gefäßen sind, zum Einsatz von Synchrotronstrahlung. Hiermit werden kleine Abzweigungen des *Circle of Willis* deutlich sichtbar. Ebenso können Gefäßkaliberänderungen nach Inhalation von CO₂ quantitativ bestätigt werden [94].

Die Etablierung der zerebrovaskulären Bildgebung, sowie das gesteigerte veterinärmedizinische Interesse am Schlaganfall in Haustieren, spiegelt sich in verschiedenen Studien wieder. Das erste reproduzierbare zerebrale Vasospasmus-Modell in Hunden wird bereits 1972 von Kuwayama und Kollegen publiziert. Als Ziel dieser Studie wird vorgegeben, dass es weitere Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese zerebraler Vasospasmen für den Menschen ergeben sollte. Durch die einmalige Injektion von autologem Blut in die Cisterna magna des Hundes kann ein biphasisches Verteilungsmuster der Vasospasmen an der A. basilaris beobachtet werden. Mithilfe angiographischer Aufnahmen können in der akuten Phase innerhalb der ersten 30min, sowie in der chronischen Phase 2 bis 7 Tage nach der Injektion zerebrale Vasospasmen detektiert werden [95].

Um jedoch beständigere und stärkere Vasospasmen, welche in der Angiographie darstellbar sind, auszulösen, wird dieses Modell modifiziert, wodurch das doppelte Injektionsmodell, welches aktuell die Standardmethode zur Untersuchung von Vasospasmen im Hund ist [96], etabliert wird. Hierbei handelt es sich um ein kanines Modell für die experimentelle Induktion einer SAB, in welchem autologes Blut zweimal im Abstand weniger Tage in die Cisterna magna injiziert wird. Angiographisch konnten mithilfe der DSA zerebrale Vasospasmen in

den Folgetagen nach der letzten Injektion detektiert werden. Jedoch können in diesem Modell keine ischämischen Veränderungen in der Magnetresonanztomographie gefunden werden. Daraus folgt, dass das endovaskuläre Filament-Perforationsmodell, welches in der Regel in kleinen Labornagern angewandt wird und die Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas ähnlich der SAB eines Menschen besser nachahmt [23, 25], im Gegensatz zum kaninen SAB-Modell, besser geeignet ist für Studien, welche die akuten Folgen einer SAB untersuchen möchten. Dennoch ist anzumerken, dass die histologischen Ergebnisse der spastischen Gefäße des Hundes denen im Menschen sehr ähnlich sind [96]. Zudem gibt es weitere Möglichkeiten, mit welchen zerebrale Vasospasmen in Hunden ausgelöst werden können: Autologe Blutinjektionen in die suprachiasmatische Cisterne [97], arterielle Blutungsmodelle der A. posterior communicans nach Kraniotomie [98] oder eine Kraniotomie gefolgt von der Platzierung einer Blutmenge [99].

Trotz zahlreicher Studien über zerebrale Vasospasmen und verschiedenen Schlaganfall-Modellen im Hund gibt es nur wenige Schilderungen bezüglich natürlich vorkommender Schlaganfälle bei Hunden oder bei der Katze [100, 101]. Die meisten Berichte beziehen sich auf präklinische Arbeiten. Aufgrund dessen kommt die Frage auf, ob der Schlaganfall und damit auch das Vorkommen zerebraler Vasospasmen in unseren Haustieren aktuell unterdiagnostiziert wird oder seltener vorkommt. Ursächlich dafür, dass der Schlaganfall in Haustieren unterdiagnostiziert sein könnte, ist möglicherweise das große Spektrum an klinischen Symptomen und daher das Fehlen eines klinischen Verdachtes, sowie der Mangel an einer adäquaten technischen Ausstattung, wie zum Beispiel eines MRTs oder einer CTs [101]. Aus präklinischen Studien ist bekannt, dass mithilfe fortgeschrittener Bildgebungsmodalitäten das Vorliegen eines Schlaganfalls diagnostiziert werden kann. Bei einem ischämischen Schlaganfall zeigen sich die betroffenen Strukturen im MRT in der T1-gewichteten Sequenz hypointens und in der T2-gewichteten Sequenz hyperintens [100]. Im Zeitalter der MRT- und CT-Diagnostik muss aber auch diskutiert werden, ob der Schlaganfall im Hund auf den gleichen Entstehungsmechanismen beruht bzw. überhaupt in einer höheren Frequenz vorkommt. Es wird vermutet, dass die Häufigkeit des Auftretens im Vergleich zum Menschen deutlich geringer bei Hunden ist [100] und dadurch die Relevanz dieser Erkrankung beim Hund eine geringere Rolle spielen würde. Genaue Daten zur Prävalenz des Schlaganfalls beim Hund sind aber nicht vorhanden [100]. Letztlich führt dies zur Überlegung, ob diese präklinischen Modelle im Hund überhaupt eine geeignete Wahl für die weitere Evaluation des Schlaganfalls sind, sofern die zugrunde liegenden Mechanismen, die zu zerebralen Vasospasmen und ischämischen Veränderungen führen, andere sind. Für die

Untersuchung dieser Aspekte sind klinische Daten aus weiteren Studien notwendig. Um diese Studien zu zerebralen Vasospasmen im Hund zu realisieren, wäre die Teilnahme mehrerer veterinärmedizinischer Kliniken von Nöten. Im Vergleich dazu sind Labortiere wesentlich leichter verfügbar. In präklinischen Studien finden das Auslösen der subarachnoidalen Blutung, sowie die Zeitpunkte der darauffolgenden digitalen Subtraktionsangiographie und der Behandlungsstart in den Versuchsgruppen zu den gleichen Zeitpunkten statt. Im Vergleich dazu werden Haustiere in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung vorgestellt, sodass eine Vergleichbarkeit nicht möglich ist. Dies führt dazu, dass eine evidenzbasierte Studie nicht realisierbar wäre, da die vorliegenden Voraussetzungen der einzelnen Studienpatienten zu verschieden wären. Des Weiteren wären die Fallzahlen zu gering, um eine aussagekräftige statistische Auswertung anfertigen zu können.

Letztlich kann die Veterinärmedizin von neuen Therapieansätzen auf Grundlage neuer Erkenntnisse aus präklinischen Forschungsprojekten profitieren. Beispielsweise sind aktuell keine Behandlungsmöglichkeiten vorhanden, die weder die Folgen eines ischämischen, noch eines hämorrhagischen Schlaganfalls im Hund therapieren [100, 102]. Ohne Therapie reduzieren sich die Symptome innerhalb von vier Wochen bzw. die meisten Hunde erholen sich vom ischämischen Schlaganfall innerhalb weniger Wochen mithilfe einer unterstützenden Therapie [102].

Zusätzlich zu den zahlreichen präklinischen Studien in kleinen Labornagern (Maus, Ratte) und Hunden werden zerebrale Vasospasmen auch in anderen Tierarten untersucht [90]. Beispiele dafür sind Kaninchen [103, 104], Katzen [105], Ziegen [106], Schweine [107] und Primaten [108]. Hierbei variieren die Modelle hinsichtlich der Induktionstechnik der subarachnoidalen Blutung, der Lokalisation und Stärke der Vasospasmen, der Blutmenge (definiert bei Injektionen von autologem Blut bzw. undefiniert im Falle einer Gefäßpunktion), der Mortalität, sowie der Technik zur Detektion und Überwachung der zerebralen Vasospasmen. Insbesondere in Primatenmodellen werden die zerebralen Vasospasmen beinahe ausschließlich durch Platzierung eines Blutkoagels nach vorausgegangener Kraniotomie induziert [108].

Dennoch sinkt die Anzahl an Studien mit großen Labortieren deutlich in den letzten Jahrzehnten [90]. Ein Grund hierfür kann sein, dass viele Modelle, welche über Jahre etabliert wurden, nicht geeignet sind für die Erforschung des jeweiligen Aspekts. Zusätzlich spielen neben ethischen Bedenken sicherlich auch ökonomische Faktoren eine Rolle. Kleine

Labortiere sind wesentlich kostengünstiger und eine genetische Modifikation ist leichter zu erreichen. Jedoch haben kleine Labortiere, wie zum Beispiel Maus und Ratte, ein lissencephales Gehirn und sind daher in Hinblick auf die Anatomie und funktionelle Aspekte ihres Gehirns im Vergleich zum Menschen anders aufgebaut. Im Gegensatz hierzu haben große Labortiere, wie zum Beispiel Katzen, Hunde und auch Primaten ein dem Menschen strukturell und funktionell ähnliches gyrencephales Gehirn [101]. Obwohl Hunde ein dem Menschen strukturell ähnliches Gehirn haben, wird das Krankheitsbild des Schlaganfalls dennoch selten beschrieben [101], sodass in Betracht gezogen werden muss, dass eventuell andere Mechanismen zugrunde liegen. Dies wurde bereits weiter oben diskutiert.

Dieser anatomische Aspekt spielt sicherlich bei der zeitlich unterschiedlichen Entwicklung von zerebralen Vasospasmen im Menschen und in der Maus eine tragende Rolle. Während es im Menschen nach ungefähr 4 bis 14 Tagen nach einer subarachnoidalen Blutung zur Entwicklung zerebraler Vasospasmen kommt [16], so konnten im Rahmen dieser Arbeit bereits 48h nach Induktion einer subarachnoidalen Blutung deutliche Gefäßverengungen an den großen zerebralen Gefäßen der Maus detektiert werden. Eine andere Studie kann in Mäusen bereits wenige Stunden nach einer subarachnoidalen Blutung zerebrale Gefäßverengungen in der Mikrozirkulation nachweisen [14]. Somit sind Mäuse zum jetzigen Zeitpunkt die am meisten verwendeten Tiere für die Untersuchung zerebraler Vasospasmen und deren Folgen [23].

Die Kritik an Mausmodellen, unter anderem auch jene, die im Bereich der Schlaganfallforschung Anwendung finden, sind zahlreich. Insbesondere die Problematik der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen sind immer wieder Gegenstand von Diskussionen [109]. Im Falle der SAB-Modelle beziehen sich die Diskussionspunkte vor allem auf die Nachahmung der natürlich eintretenden Blutung im subarachnoidalen Raum, welche mit keinem der bereits genannten Modelle zu 100% simuliert werden kann, sowie die anschließende Probengewinnung. Letzteres ist beispielsweise im Falle der transkardialen Perfusion bei Versuchsende Gegenstand der Diskussion. Bei der transkardialen Perfusion mit aushärtenden Materialien, welche die Gefäße in ihrem jetzigen Zustand ausfüllen und dementsprechend die Situation *in vivo* darstellen sollen, ist nicht abschließend geklärt, ob es im Zuge der Perfusion zu einer Veränderung der Gefäßkaliber kommt [110]. Ein weiterer Punkt ist die schnellere Entstehung zerebraler Vasospasmen innerhalb weniger Stunden nach SAB in der Maus, im Gegensatz zum langsameren zeitlichen Verlauf im Menschen. Dies wurde schon weiter oben diskutiert.

Neben den bereits beschriebenen Anwendungsmöglichkeiten, kann die Mikro-CT auch für weitere Fragestellungen eingesetzt werden. Beispielsweise kann mithilfe der KM-gestützten Mikro-CT die Bildgebung von Hirntumoren in der Maus erfolgen [111], sowie unter Anwendung von Kollimatoren an der Röntgenröhre ein exaktes Bestrahlungsprotokoll an diesen durchgeführt werden [112]. Des Weiteren können in der computertomographischen Angiographie (CTA) zerebrale Gefäße dargestellt werden [42]. Ebenso ist die Bildgebung von thorakalen, sowie abdominalen Strukturen ein wichtiges Anwendungsgebiet [45, 113]. Aber neben vielen Fragestellungen *in vivo*, kann die Mikro-CT auch bei einigen *ex vivo* Studien hilfreich sein. Hierzu zählen unter anderem die Erforschung von Insekten für biomechanische Fragestellungen [114], sowie die zahnmedizinische Forschung in der Human- und der Veterinärmedizin [115, 116]. Diese vielschichtigen Anwendungsmöglichkeiten der Mikro-CT tragen maßgeblich zum 3R Prinzip nach Russel und Burch bei. Durch die Erweiterung des Einsatzes der Mikro-CT in *ex-vivo*-Modellen wird der Ersatz von Tierversuchen angestrebt. Während die erste hier vorgestellte Arbeit hauptsächlich zu den Aspekten der Tierzahlreduktion (Reduction) und der Verbesserung der Belastung der Tiere im Versuch (Refinement) beigetragen, leistet die zweite hier vorgestellte Arbeit einen wesentlichen Beitrag zum Ersatz (Replacement) von Tierversuchen. Diese zweite im Rahmen dieser kumulativen Dissertation eingereichten Arbeit befasst sich mit der longitudinalen Bewertung von Glattflächenversiegeln unter Verwendung von nicht invasiven Methoden.

Bei der kieferorthopädischen Therapie in Form einer festen Zahnspange steigt das Risiko der Schmelzdemineralisation, welche wiederum zu Karies führen kann [117]. Die natürliche Selbstreinigung des Mundes durch Speichel, Zunge, Wangen und Lippen ist durch die Brackets einer Zahnspange eingeschränkt [118, 119]. An den Prädilektionsstellen um die Brackets herum können halbmondförmige weiße Entmineralisierungsstellen, sogenannte „white spot lesions“, bereits nach vier Wochen Therapie mit einer festsitzenden Apparatur entstehen [120, 121]. Die anfangs nur oberflächlichen Schmelzläsionen können zu kariösen Läsionen führen. Aufgrund dessen muss im Rahmen der kieferorthopädischen Behandlung die individuelle Mundhygiene des Patienten gefördert werden. Dies erfolgt einerseits durch eine individuelle Beratung, sowie durch Anwendung spezieller Fluoridpräparate, beispielsweise fluoridhaltiger Mundspüllösungen [122, 123]. Jedoch ist zu beachten, dass diese Maßnahmen ein gewisses Maß an Mitarbeit des Patienten erfordern. Daher haben sich präventive Maßnahmen, die nicht auf die Compliance des Patienten angewiesen sind, im Gegensatz zu supportiven Maßnahmen durchgesetzt.

Eine Möglichkeit die Entstehung einer Demineralisation im Bracketumfeld zu verhindern, ist die Applikation von Fluoridlacken [124-126]. Jedoch hat sich diese Methode nicht bewährt, da es nur zu einer kurzzeitigen Freisetzung hoher Dosen an Fluoriden kommt. In klinischen Studien wird belegt, dass die regelmäßige niedrig dosierte Gabe von Fluoriden eine höhere kariostatische Wirkung erzielt als eine einzelne einmalig hoch dosierte Applikation [127, 128]. Des Weiteren können sogenannte Glattflächenversiegler angewendet werden, wobei die Zähne mit einer Art Lack versiegelt werden. Bei Glattflächenversiegler handelt es sich um durchsichtige, sehr dünne Materialien, welche auf glatte Zahnflächen aufgetragen werden und dadurch deren Oberflächen vor beispielsweise Demineralisierung schützen. Durch das Auftragen eines Versiegelungslacks rund um die Brackets, weshalb diese auch Bracketumfeldversiegelungen genannt werden, können die vestibulären Zahnflächen geschützt werden [129]. In aufwändigen Verfahren werden die durchsichtigen Glattflächenversiegler flächig aufgetragen, dann werden die Flächen angeätzt, um im Anschluss die Brackets für die feste Zahnspange ankleben zu können. Jedoch konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass mechanische und chemische Einflüsse die protektiven Eigenschaften der Glattflächenversiegler schwächen können. Die dadurch zustande kommenden Unterbrechungen oder Risse können zu Dekalzifikation unter dem Versiegler führen [129].

Das Ziel der Anwendung von Glattflächenversiegler ist eine höhere Haftfestigkeit der Brackets, das Versiegeln des Schmelzes von versehentlich angeätzten Bereichen und der Schutz vor Demineralisation im bracketnahen Bereich [129]. Hierfür stehen sowohl chemisch härtende Versiegler, als auch lighthärtende Versiegler zur Verfügung [130].

Die ersten Anwendungen der Mikrocomputertomographie im Bereich der Zahnmedizin werden Ende der 80er Jahre publiziert [131]. Zum jetzigen Zeitpunkt erfolgt die Anwendung der Mikro-CT hauptsächlich in der *in vitro* Kariesforschung und gilt als Gold Standard für die Detektion von De- und/oder Remineralisationsprozessen [132]. Hierzu erfolgen erste Untersuchungen zu Veränderungen des Mineralisationsverlustes der Zahnhartsubstanz nach De- und Remineralisation bereits 1993 mithilfe mikrocomputertomographischer Techniken [133]. Ein großer Vorteil der Mikro-CT besteht darin, dass die zu untersuchenden Objekte nicht geschnitten oder zerlegt werden müssen und dementsprechend longitudinale Experimente am kompletten Zahn durchgeführt werden können [134]. Nachteile der Mikro-CT ergeben sich beispielsweise aus möglichen Artefakten während der Bildakquisition, jedoch überwiegen die Vorteile hinsichtlich der Möglichkeit intakte Proben ohne invasive Methoden analysieren zu können [131]. Dennoch kann es bei einigen Fragestellungen

notwendig sein alternative Bildgebungstechniken anzuwenden. Um beispielsweise die Dicke des Zahnschmelzes adäquat zu analysieren, ist eine hohe räumliche Auflösung von Nöten, welche zwar im Falle des Mikro-CTs gegeben ist, dennoch in früheren Studien eine große Herausforderung darstellt [115, 135]. Mithilfe der Mikro-CT können Aufnahmen mit einer sehr geringen Schichtdicke angefertigt werden, wodurch dies eine exakte Technik zum Vermessen der Zahnschmelzdicke ist [115]. Zudem besteht die Möglichkeit mit einer Bildgebungssoftware 3D Rekonstruktionen anzufertigen, wodurch wiederum volumetrische Daten von Zahnschmelz und Dentin gewonnen werden können [136]. Jedoch ist die Mikro-CT im Hinblick auf die zuverlässige Unterscheidung dentaler Anteile bei stark mineralisierten Zähnen limitiert [115, 135]. Darüber hinaus sind sehr dünne Zahnschmelzregionen mit einer Schichtdicke von weniger als 100µm nur erschwert darstellbar [135]. Daher müssen für bestimmte Fragestellungen alternative Methoden in Betracht gezogen werden.

Aufgrund dessen wird in der hier vorliegenden zweiten Arbeit sowohl die Mikro-CT, als auch die optische Kohärenztomographie (OCT) für die longitudinale Bewertung der Beständigkeit von Glattflächenversiegeln in Betracht gezogen.

Die OCT ist ein nichtinvasives bildgebendes Verfahren, um 2- und 3-dimensionale Aufnahmen von Geweben mit optischen Eigenschaften im Mikrometerbereich zu erhalten [137]. Hierfür wird Licht verwendet, von welchem ein Teil die Probe durchleuchtet und ein Teil eine Referenzstrecke. Die beiden reflektierenden Lichtanteile werden überlagert und anhand des entstehenden Interferenzsignal können Strukturen entlang der optischen Achse unterschieden werden [137, 138]. Die OCT ist ein bereits etabliertes nicht-invasives bildgebendes Verfahren in der Ophthalmologie [138], welche jedoch in den letzten Jahren auch vermehrt in der Zahnheilkunde eingesetzt wird. Dabei wird die Aussagekraft der OCT bezüglich Schichtdickenmessungen von Zahnschmelz und Dentin im Vergleich mit der Mikro-CT bereits untersucht [139, 140].

Hauptziel dieser Studie ist es die Einsatzmöglichkeit eines kommerziell erhältlichen OCT-Gerätes für longitudinale Messungen der Schichtdicke von Glattflächenversiegeln zu evaluieren. Im ersten Teil der Studie kann gezeigt werden, dass eine wiederholte Schichtdickenmessung der Glattflächenversiegler an extrahierten Zähnen mit der OCT möglich ist. Dies belegen die Varianzen, Standardabweichungen und 95%-Konfidenzintervalle der entsprechenden Streukoeffizienten mehrfacher Messungen. Des Weiteren werden die OCT-Messungen mit Mikro-CT-Messungen verglichen, um die Aussagekraft der OCT zu bestätigen. Jedoch erschweren der geringe Kontrast zwischen Luft und dem Glattflächenversiegler bei den computertomographischen Messungen die

Schichtdickenmessungen, sodass eine gewisse Ungenauigkeit auftritt. Dies spiegelt sich auch in den unterschiedlichen Auflösungen der beiden Bildgebungsmodalitäten wider. Während die Auflösung der Mikro-CT bei 15-20 μm liegt, kann mit der OCT eine Auflösung von annähernd 4-6 μm erreicht werden. Aufgrund dieser mangelhaften Auflösung und dem daraus resultierenden Schwachpunkt, dass die Unterscheidung zweier Schichten unzuverlässig ist, ist die Mikro-CT für diese Fragestellung weniger geeignet. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Anwendung der Mikro-CT für Strukturen mit einer Schichtdicke von weniger als 100 μm nicht eingesetzt werden sollte [115].

Trotz der hohen Auflösung und der Reproduzierbarkeit der OCT-Messungen darf nicht außer Acht gelassen werden, dass mit dem hier verwendeten OCT-Gerät die Beurteilung der Glattflächenversiegler oder der Schmelzintegrität im klinischen Gebrauch auf die Anwendung an den vorderen Zähnen einschließlich der Eckzähne beschränkt ist. Daher stellt sich die Frage, ob für Zähne im buccalen Bereich wiederum die Computertomographie eine Anwendungsmöglichkeit im klinischen Alltag darstellen würde. Darüber hinaus ist die Eindringtiefe bei der OCT auf wenige Millimeter limitiert (ungefähr 2-3mm), wodurch viele Fragestellungen nicht bearbeitet werden können.

Obwohl die Mikro-CT für diese Fragestellung weniger gut geeignet ist, hat sich die Mikro-CT-Analyse für eine Vielzahl von Anwendungen in der zahnmedizinischen Forschung bewährt [115]. Hierzu gehören Schichtdickenmessungen von Zahnschmelz [141], die Analyse von Wurzelkanalmorphologien [115] und die Evaluation von Wurzelkanalaufbereitungen [115]. Außerdem ist die Mikro-CT weiterhin der Gold-Standard für die Detektion von De- und/oder Remineralisationsprozessen [132].

Aufgrund dieser Einsatzmöglichkeiten ist die Mikro-CT nicht nur ein wichtiges Hilfsmittel in der präklinischen Bildgebung, sondern trägt durch seine Anwendungsmöglichkeit *ex vivo* auch maßgeblich zur Reduktion von Tierversuchen bei.

5 Zusammenfassung

Die Etablierung neuer Tiermodelle ermöglicht die Erforschung von Krankheitsverläufen und neuen Therapiemöglichkeiten. Der Einsatz bildgebender Verfahren erlaubt hierbei, die Zahl der notwendigen Versuchstiere zu reduzieren. Daher war es Ziel dieser Dissertation, ein neues Tiermodell für die longitudinale Evaluation zerebraler Vasospasmen nach Subarachnoidalblutung in der Maus zu etablieren. In diesem Tiermodell sollte mithilfe nicht-invasiver Bildgebung (Computertomographie) die Induktion einer subarachnoidalen Blutung verifiziert werden, sowie unter Anwendung der digitalen Subtraktionsangiographie longitudinal die Veränderungen der Durchmesser der großen zerebralen Arterien untersucht werden.

Im Gegensatz zu bereits publizierten Studien zur Erforschung zerebraler Vasospasmen sollte mit diesem Modell die Tierzahl reduziert werden. Um dies zu erreichen wurden die einzelnen OP-Techniken zunächst an Tieren *ex vivo* erlernt und optimiert, da sowohl bei der Implantation eines Vena-Jugularis-Katheters, als auch bei der Induktion einer Subarachnoidalblutung eine hohe Komplikationsrate besteht. Anschließend wurden die erlernten Techniken an 30 C57BL/6 Mäusen angewandt und über einen Zeitraum von zwei Wochen digitale Subtraktionsangiographien durchgeführt. Dies ermöglichte eine longitudinale Evaluation der Durchmesser der großen zerebralen Gefäße.

Mittels kontrastmittelgestützter Computertomographie nach Fadenperforation konnten wir das Ausmaß einer SAB in der Maus bestimmen. Anhand dieser Daten konnte ein Score entwickelt werden, welcher sowohl eine hohe signifikante Korrelation mit dem an Tag 1 ermittelten Neuroscore aufweist ($r_{sp}=0,803$; $p<0,001$), als auch einen prognostischen Faktor in Bezug auf das Überleben der Tiere zeigt ($r_{sp}=-0,71$; $p<0,001$). Die jeden zweiten Tag durchgeführte digitale Subtraktionsangiographie erlaubte eine Quantifizierung der zerebralen arteriellen Vasospasmen in der Maus. Die maximalen Gefäßkontraktionen waren an den Tagen 3 und 5 zu detektieren. Im weiteren Verlauf waren die Spasmen langsam regredient. Zusätzlich wurde eine Perfusionsmessung aus den Daten der digitalen Subtraktionsangiographien versucht. So konnten Perfusionsdefizite ermittelt werden, sowie eine negative Korrelation der cerebralen Perfusion an Tag 5 und dem Überleben festgestellt werden ($r_{sp}=-0,54$; $p=0,004$). Des Weiteren konnten in 3 Mäusen Pseudoaneurysmen an der Perforationsstelle detektiert werden.

Die Etablierung dieses Tiermodells bietet die Möglichkeit, mit einer geringeren Tierzahl zerebrale Vasospasmen in der Maus zu untersuchen. Durch die Erweiterung des Einsatzbereiches der Mikro-CT konnte zusätzlich zur Evaluation der zerebralen Vasospasmen ein prognostischer Score etabliert werden, eine Auswertung von Perfusionsdaten erfolgen, sowie erstmals Pseudoaneurysmen in der Maus *in vivo* detektiert werden. Dies bietet die Grundlage für weiterführende Versuchsvorhaben.

Die zweite im Rahmen dieser Dissertation eingereichten Arbeit befasst sich mit der computertomographischen Untersuchung dentaler Referenzproben für Vergleichsaufnahmen mit der optischen Kohärenztomographie. Hierfür wurden humane extrahierte Prämolaren und Molaren mit drei verschiedenen Glattflächenversiegeln (Light BondTM Sealant, Pro Seal® und Opal® Seal) behandelt und deren Schichtdicke mithilfe der Mikro-CT bestimmt. Aufgrund der mangelhaften Auflösung der Mikro-CT im zweistelligen Millimeterbereich ist die exakte Ausmessung der auf die Zahnproben aufgetragenen Versiegelungen unpräzise. Die Messwerte anhand der computertomographischen Aufnahmen weichen deutlich von den Messwerten anhand der OCT ab (Pro Seal®: OCT =656µm, µCT =710µm; Light BondTM: OCT =645µm, µCT =610µm; Opal® Seal: OCT =722µm, µCT =690µm). Die Messwerte der OCT wurden zusätzlich mittels lichtmikroskopischer Messungen bestätigt.

Dennoch bleibt die Mikro-CT eine wichtige Bildgebungsmodalität für die zahnmedizinische Forschung. Durch diese Anwendungsmöglichkeit *ex vivo* ist ein Verzicht auf Tierversuche für viele Fragestellungen möglich.

Beide hier vorgestellten Arbeiten tragen durch den erfolgreichen Einsatz nicht invasiver bildgebender Verfahren zur langfristigen Senkung der Versuchstierzahlen bei. Zusammenfassend konnte durch die erfolgreiche Etablierung der Mikro-CT in den hier vorgestellten Studien die Anwendungsmöglichkeiten eines industriellen Röntgendurchleuchtungsgerätes in der präklinischen Forschung erweitert werden.

6 Summary

Animal models are required to further investigate various diseases and to for the development of novel therapeutic approaches. Usage of small animal imaging reduces the number of animals needed in preclinical research. Aim of this doctoral thesis thus was to establish a novel animal model for longitudinal evaluation of subarachnoid hemorrhage (SAH) induced cerebral vasospasm in mice. Noninvasive imaging (computed tomography) was used to quantify the amount of subarachnoid hemorrhage in this model, whereas caliber changes of large cerebral arteries were longitudinally examined using digital subtraction angiography (DSA).

Whereas in most studies on cerebral vasospasm animals were sacrificed at predefined time points after the induction of subarachnoid hemorrhage in order to quantify vasospasm post mortem using microscopy and histology, we aimed at reducing the number of required animals by repetitively scanning mice using DSA. Finally, DSA was performed in 30 female C57Bl/6 mice over a period of two weeks, whereby the longitudinal evaluation of large cerebral vessel vasospasm was feasible.

As a result of the application of contrast agent right before induction of SAH, detection and quantification of SAH was feasible in mice. A novel system for scoring the severity of SAH in mice was developed. This score showed a highly significant correlation with the neuroscore on day 1 ($r_{sp}=0,803$; $p<0,001$) and therefore was a prognostic factor for survival time of the animals ($r_{sp}=-0,71$; $p<0,001$). DSA was performed every other day and allowed to detect cerebral arterial vasospasm in mice. Maximum large vessel vasospasm was observed on days 3 and 5 after induction of SAH. Artery diameter normalized between days 7 and 15 after SAH. Additionally, semiquantitative perfusion analyses were attempted. Perfusion deficits were calculated from DSA series, and a negative correlation between perfusion on day 5 and survival was observed ($r_{sp}=-0,54$, $p=0,004$). Furthermore, in three animals cerebral pseudoaneurysm arising from the site of filament perforation were visualized.

Thus we have been able to a.) establish a novel model to longitudinally investigate cerebral vasospasm in living mice using DSA (hereby reducing the number of animals required), b.) establish a method to quantify and score the amount of SAH in mice using micro-CT, c.) successfully performed cerebral perfusion analyses in living mice and d.) for the first time observed growing pseudoaneurysm in living mice. The animal model developed may be

helpful for future studies on SAH-related vasospasm, which still is an unsolved problem in our patients.

We furthermore utilized micro-computed tomography to evaluate dental reference samples from patients for comparison with optical coherence tomography. Therefore human extracted premolar and molar teeth were treated with three different orthodontic surface sealants (Light Bond™ Sealant, Pro Seal® und Opal® Seal) and layer thickness was determined by micro-CT. Due to the deficient spatial resolution of micro-CT, measurement of orthodontic surface sealants on tooth samples is imprecise. Measured values of images by computer tomography differ distinct from measured values of the OCT (Pro Seal®: OCT =656µm, µCT =710µm; Light Bond™: OCT =645µm, µCT=610µm; Opal® Seal: OCT =722µm, µCT=690µm). Values by the OCT were confirmed by light microscopic measurements.

However, micro-CT is an imaging modality of major interest in dental research. This application *ex vivo* facilitates to renounce animal experiments.

Both presented studies contribute to the long-term reduction of animals used in preclinical research. We thus summarize that micro-CT is a versatile tool for imaging a vast range of objects in preclinical research and is helpful to reduce the number of animals required as suggested by the 3R-principle.

7 Literaturverzeichnis

1. DFG, *Tierversuche in der Forschung*. 2016, DFG-Senatskommission für tierexperimentelle Forschung: Bonn. p. 10.
2. DRZE. *Die Bedeutung des Tierversuchs für die Forschung*. 2017; Available from: <http://www.drze.de/im-blickpunkt/tierversuche-in-der-forschung>.
3. BMEL, *Trendwende: Erstmals weniger Tiere für wissenschaftliche Versuche verwendet*. 2014.
4. BMEL, *Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2017*. 2018.
5. BMEL, *Tierschutzbericht der Bundesregierung 2015, Bericht über den Stand der Entwicklung des Tierschutzes*. 2015. p. 59.
6. Russell, W. and R.L. Burch, *The Principles of Humane Experimental Technique*. Vol. Softcover. 1992: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW).
7. *Tierversuche verstehen: Wie viel Maus steckt im Menschen*. 2018; Available from: <https://www.tierversuche-verstehen.de/video-maus-mensch-uebertragbarkeit>.
8. *Tierversuche verstehen: Haltung von Versuchstieren*. 2019; Available from: <https://www.tierversuche-verstehen.de/haltung-von-versuchstieren/>.
9. GV-Solas, *Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren*. 2009, Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-Solas und Arbeitskreis 4 in der TVT.
10. Morgenweck, J. *The Basics of Mouse Nomenclature*. The Jackson Laboratory 2016; Available from: http://jackson.jax.org/rs/444-BUH-304/images/Basics_of_Mouse_Nomenclature_14Jan2016_wbnr.pdf.
11. Muroi, C., et al., *Filament perforation model for mouse subarachnoid hemorrhage: surgical-technical considerations*. Br J Neurosurg, 2014. **28**(6): p. 722-32.
12. Kamii, H., et al., *Amelioration of vasospasm after subarachnoid hemorrhage in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase*. Stroke, 1999. **30**(4): p. 867-71; discussion 872.
13. Pisapia, J.M., et al., *Microthrombosis after experimental subarachnoid hemorrhage: time course and effect of red blood cell-bound thrombin-activated pro-urokinase and clazosentan*. Exp Neurol, 2012. **233**(1): p. 357-63.
14. Friedrich, B., et al., *Experimental subarachnoid hemorrhage causes early and long-lasting microarterial constriction and microthrombosis: an in-vivo microscopy study*. J Cereb Blood Flow Metab, 2012. **32**(3): p. 447-55.

15. Wang, C.X., et al., *Constriction and dysfunction of pial arterioles after regional hemorrhage in the subarachnoid space*. Brain Res, 2015. **1601**: p. 85-91.
16. DGN, *Vaskuläre Erkrankungen: Subarachnoidalblutung (SAB)*. Leitlinien. 2012.
17. Hollingworth, M., et al., *Results of an International Survey on the Investigation and Endovascular Management of Cerebral Vasospasm and Delayed Cerebral Ischemia*. World Neurosurg, 2015. **83**(6): p. 1120-1126 e1.
18. Okuyama, S., et al., *The arterial circle of Willis of the mouse helps to decipher secrets of cerebral vascular accidents in the human*. Med Hypotheses, 2004. **63**(6): p. 997-1009.
19. Paolo, G.A., *Brain vasculature imaging with two-photon and light-sheet microscopy*. Dissertation. 2016, Universität Firenze, Italien.
20. Hillen, B., *The variability of the circulus arteriosus (Willisii): order or anarchy?* Acta Anat (Basel), 1987. **129**(1): p. 74-80.
21. Chuang, Y.M., et al., *Toward a further elucidation: role of vertebral artery hypoplasia in acute ischemic stroke*. Eur Neurol, 2006. **55**(4): p. 193-7.
22. Schünke, M., E. Schulte, and U. Schumacher, *Prometheus. Lernatlas der Anatomie. Kopf, Hals und Neuroanatomie*. Georg Thieme Verlag. Vol. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage. 2009. S. 319.
23. Muroi, C., et al., *Mouse model of subarachnoid hemorrhage: technical note on the filament perforation model*. Acta Neurochir Suppl, 2015. **120**: p. 315-20.
24. Rousselet, E., J. Kriz, and N.G. Seidah, *Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining*. J Vis Exp, 2012(69).
25. Feiler, S., et al., *Standardized induction of subarachnoid hemorrhage in mice by intracranial pressure monitoring*. J Neurosci Methods, 2010. **190**(2): p. 164-70.
26. Sabri, M., et al., *Genetic elimination of eNOS reduces secondary complications of experimental subarachnoid hemorrhage*. J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(7): p. 1008-14.
27. Sabri, M., et al., *Anterior circulation mouse model of subarachnoid hemorrhage*. Brain Res, 2009. **1295**: p. 179-85.
28. Tait, M.J., et al., *Increased brain edema in aqp4-null mice in an experimental model of subarachnoid hemorrhage*. Neuroscience, 2010. **167**(1): p. 60-7.
29. Chaichana, K.L., et al., *Haptoglobin 2-2 genotype determines chronic vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage*. Stroke, 2007. **38**(12): p. 3266-71.

30. Lin, C.L., et al., *A murine model of subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm*. J Neurosci Methods, 2003. **123**(1): p. 89-97.
31. Momin, E.N., et al., *Controlled delivery of nitric oxide inhibits leukocyte migration and prevents vasospasm in haptoglobin 2-2 mice after subarachnoid hemorrhage*. Neurosurgery, 2009. **65**(5): p. 937-45; discussion 945.
32. Guvenc Tuna, B., et al., *Cerebral Artery Remodeling in Rodent Models of Subarachnoid Hemorrhage*. J Vasc Res, 2015. **52**(2): p. 103-15.
33. Chen, Y., et al., *Ultrasound guided double injection of blood into cisterna magna: a rabbit model for treatment of cerebral vasospasm*. Biomed Eng Online, 2016. **15**: p. 19.
34. Liu, L. and K. Duff, *A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse*. J Vis Exp, 2008(21).
35. Altay, T., et al., *A novel method for subarachnoid hemorrhage to induce vasospasm in mice*. J Neurosci Methods, 2009. **183**(2): p. 136-40.
36. Provencio, J.J., et al., *Depletion of Ly6G/C(+) cells ameliorates delayed cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage*. J Neuroimmunol, 2011. **232**(1-2): p. 94-100.
37. Smithason, S., S.K. Moore, and J.J. Provencio, *Systemic administration of LPS worsens delayed deterioration associated with vasospasm after subarachnoid hemorrhage through a myeloid cell-dependent mechanism*. Neurocrit Care, 2012. **16**(2): p. 327-34.
38. Pschyrembel-Online. *Medizinisches Wörterbuch: Vasospasmus*. 2016; Available from: <https://www.pschyrembel.de/Vasospasmus/K0NKB/doc/>.
39. Peterson, J.W., et al., *Evidence of the role of hemolysis in experimental cerebral vasospasm*. J Neurosurg, 1990. **72**(5): p. 775-81.
40. Osaka, K., *Prolonged vasospasm produced by the breakdown products of erythrocytes*. J Neurosurg, 1977. **47**(3): p. 403-11.
41. Bag, S., et al., *[Current concepts for experimental micro-CT in small animals]*. Rofo, 2010. **182**(5): p. 390-403.
42. Schambach, S.J., et al., *Vascular imaging in small rodents using micro-CT*. Methods, 2010. **50**(1): p. 26-35.
43. Schambach, S.J., et al., *Application of micro-CT in small animal imaging*. Methods, 2010. **50**(1): p. 2-13.
44. Fiebig, T., et al., *Three-dimensional in vivo imaging of the murine liver: a micro-computed tomography-based anatomical study*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31179.

45. Boll, H., et al., *High-speed single-breath-hold micro-computed tomography of thoracic and abdominal structures in mice using a simplified method for intubation*. J Comput Assist Tomogr, 2010. **34**(5): p. 783-90.
46. Clark, D.P. and C.T. Badea, *Micro-CT of rodents: state-of-the-art and future perspectives*. Phys Med, 2014. **30**(6): p. 619-34.
47. Ritman, E.L., *Current status of developments and applications of micro-CT*. Annu Rev Biomed Eng, 2011. **13**: p. 531-52.
48. Seker, F., et al., *Dose-response relationship of locally applied nimodipine in an ex vivo model of cerebral vasospasm*. Neuroradiology, 2013. **55**(1): p. 71-6.
49. Balaban, R.S. and V.A. Hampshire, *Challenges in small animal noninvasive imaging*. ILAR J, 2001. **42**(3): p. 248-62.
50. Badea, C.T., E. Schreibmann, and T. Fox, *A registration based approach for 4D cardiac micro-CT using combined prospective and retrospective gating*. Med Phys, 2008. **35**(4): p. 1170-9.
51. Feldkamp, L.A., L. Davis, and J.W. Kress, *Practical cone-beam algorithm*. Journal of the Optical Society of America, 1984. **1**: p. 612-619.
52. Canon. *Medical Systems GMBH: Ultra high resolution CT - Precision in every detail*. 2019; Available from: <https://de.medical.canon/product-solutions/computed-tomography/aquilion-precision/>.
53. Ritman, E.L., *Micro-computed tomography-current status and developments*. Annu Rev Biomed Eng, 2004. **6**: p. 185-208.
54. Flohr, T., *Wie funktioniert CT?* 2011, Springer-Verlag Berlin Heidelberg p. 15-21.
55. Kagadis, G.C., et al., *In vivo small animal imaging: current status and future prospects*. Med Phys, 2010. **37**(12): p. 6421-42.
56. Fiebig, A.T., *Entwicklung, Testung und Verwendung eines artefaktfreien Ports für die Maus zur wiederholten intravaskulären Injektion*. 2013, Veterinärmedizinische Dissertation. Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen.
57. Schlungbaum, W., U. Flesch, and U. Stabell, *Medizinische Strahlenkunde*. Vol. 7., vollständig überarbeitete Auflage. 1993: De Gruyter.
58. Greschus, S., et al., *Potential applications of flat-panel volumetric CT in morphologic and functional small animal imaging*. Neoplasia, 2005. **7**(8): p. 730-40.
59. Kalender, W.A., *Der Einsatz von Flachbilddetektoren für die CT-Bildgebung*. Der Radiologe, 2003. **43**(5): p. 379-387.

60. G. De Geronimo, P.O.C., V. Radeka, B. Yu, *Front-end electronics for imaging detectors*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, 2001. **A(471)**: p. 192–199.
61. Kalender, W.A., *Computertomographie*. Vol. 2. Auflage. 2006, Erlangen: Publicis Erlangen.
62. Kiessling, F., D. Razansky, and F. Alves, *Anatomical and microstructural imaging of angiogenesis*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2010. **37 Suppl 1**: p. S4-19.
63. Kirschner, S., *In vivo Bildgebung von Gehirntumoren im Glioblastom-Modell bei der Maus und Evaluation der Verteilung von Mikrosphären in einem Aneurysma-Modell beim Schwein mittels Mikro-CT*. 2016, Veterinärmedizinische Dissertation. Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen.
64. Wang, J.L. and B.H. Wang, [*An invariant approach for image registration in digital subtraction angiography*]. Zhongguo Yi Liao Qi Xie Za Zhi, 2006. **30(1)**: p. 15-8, 14.
65. Badea, C.T., et al., *In vivo small-animal imaging using micro-CT and digital subtraction angiography*. Phys Med Biol, 2008. **53(19)**: p. R319-50.
66. Harrington, D.P., L.M. Boxt, and P.D. Murray, *Digital subtraction angiography: overview of technical principles*. AJR Am J Roentgenol, 1982. **139(4)**: p. 781-6.
67. Reithoffer and Grillenberger, *Angiographie in Theorie und Praxis*. Vol. 1. 2010, Wien: Facultas Verlags- und Buchhandels AG. 54-56.
68. Dawson, P., *Digital subtraction angiography--a critical analysis*. Clin Radiol, 1988. **39(5)**: p. 474-7.
69. Figueiredo, G., et al., *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, 2012. **22(1)**: p. 21-8.
70. Fiebig, T., et al., *A Low Cost Metal-Free Vascular Access Mini-Port for Artifact Free Imaging and Repeated Injections in Mice*. PLoS One, 2013. **8(6)**: p. e65939.
71. Kidoguchi, K., et al., *In vivo X-ray angiography in the mouse brain using synchrotron radiation*. Stroke, 2006. **37(7)**: p. 1856-61.
72. Boll, H., et al., *Comparison of Fenestra LC, ExiTron nano 6000, and ExiTron nano 12000 for micro-CT imaging of liver and spleen in mice*. Acad Radiol, 2013. **20(9)**: p. 1137-43.
73. Flechsig, P., et al., *A Comparison of microCT and microPET for Evaluating Lymph Node Metastasis in a Rat Model*. Mol Imaging Biol, 2016. **18(2)**: p. 243-8.

74. Das, N.M., et al., *In Vivo Quantitative Microcomputed Tomographic Analysis of Vasculature and Organs in a Normal and Diseased Mouse Model*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0150085.
75. Weyer, V., et al., *Longitudinal imaging and evaluation of SAH-associated cerebral large artery vasospasm in mice using micro-CT and angiography*. J Cereb Blood Flow Metab, 2019: p. 271678X19887052.
76. Sen, S., et al., *Assessing abrasion of orthodontic surface sealants using a modified ophthalmic optical coherence tomography device*. Clin Oral Investig, 2018. **22**(9): p. 3143-3157.
77. *Tierversuche verstehen: Grundlagenforschung*. 2019; Available from: <https://www.tierversuche-verstehen.de/grundlagenforschung/>.
78. Deng, W., et al., *Extravascular Blood Augments Myogenic Constriction of Cerebral Arterioles: Implications for Hemorrhage-Induced Vasospasm*. J Am Heart Assoc, 2018. **7**(8).
79. Comroe, J.H. and R.D. Dripps, *The top ten clinical advances in cardiovascular - pulmonary medicine and surgery 1945 - 1975*. Vol. 1. 1977: U.S. Department of health, education and welfare.
80. Williams, R.S., et al., *From scientific discovery to cures: bright stars within a galaxy*. Cell, 2015. **163**(1): p. 21-3.
81. Ringach, D. *Speaking of Research: The Limits of Computersimulation*. 2009; Available from: <https://speakingofresearch.com/2009/08/03/the-limits-of-computer-simulations/>.
82. *Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 101 des Gesetzes vom 20. November 2019 (BGBl. I S. 1626) geändert worden ist*.
83. *RICHTLINIE 2010/63/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere*. 2010.
84. *Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren (Tierschutz-Versuchstierverordnung - TierSchVersV)*. 2013.
85. DFG, *Tierversuche in der Forschung: Das 3R-Prinzip und die Aussagekraft wissenschaftlicher Forschung*. Handreichung der Ständigen Senatskommission für tier

- experimentelle Forschung der DFG zur Planung und Beschreibung tierexperimenteller Forschungsprojekte. 2019.
86. Bickelhaupt, S., et al., *Radiomics Based on Adapted Diffusion Kurtosis Imaging Helps to Clarify Most Mammographic Findings Suspicious for Cancer*. *Radiology*, 2018. **287**(3): p. 761-770.
 87. Boone, J.M., O. Velazquez, and S.R. Cherry, *Small-animal X-ray dose from micro-CT*. *Mol Imaging*, 2004. **3**(3): p. 149-58.
 88. Patel, A.S., et al., *Safety and Efficacy of Noncompliant Balloon Angioplasty for the Treatment of Subarachnoid Hemorrhage-Induced Vasospasm: A Multicenter Study*. *World Neurosurg*, 2017. **98**: p. 189-197.
 89. Hanggi, D., et al., *Intra-arterial nimodipine for severe cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: influence on clinical course and cerebral perfusion*. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2008. **29**(6): p. 1053-60.
 90. Marbacher, S., J. Fandino, and N.D. Kitchen, *Standard intracranial in vivo animal models of delayed cerebral vasospasm*. *Br J Neurosurg*, 2010. **24**(4): p. 415-34.
 91. Bellofiore, A., et al., *A novel in vivo approach to assess radial and axial distensibility of large and intermediate pulmonary artery branches*. *J Biomech Eng*, 2015. **137**(4): p. 044501.
 92. Brennecka, C.R., et al., *In vivo embolization of lateral wall aneurysms in canines using the liquid-to-solid gelling PPODA-QT polymer system: 6-month pilot study*. *J Neurosurg*, 2013. **119**(1): p. 228-38.
 93. Christoforidis, G.A., et al., *Impact of Pial Collaterals on Infarct Growth Rate in Experimental Acute Ischemic Stroke*. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2017. **38**(2): p. 270-275.
 94. Tanaka, E., et al., *Digitized cerebral synchrotron radiation angiography: quantitative evaluation of the canine circle of Willis and its large and small branches*. *AJNR Am J Neuroradiol*, 1999. **20**(5): p. 801-6.
 95. Kuwayama, A., et al., *A model for experimental cerebral arterial spasm*. *Stroke*, 1972. **3**(1): p. 49-56.
 96. Mori, K., *Double cisterna magna blood injection model of experimental subarachnoid hemorrhage in dogs*. *Transl Stroke Res*, 2014. **5**(6): p. 647-52.
 97. Lougheed, W.M. and M. Tom, *A method of introducing blood into the subarachnoid space in the region of the circle of Willis in dogs*. *Can J Surg*, 1961. **4**: p. 329-37.

98. Nagai, H., et al., *Experimental cerebral vasospasm. 1: Factors contributing to early spasm*. J Neurosurg, 1974. **41**(3): p. 285-92.
99. Letarte, P.B., et al., *Hemin: levels in experimental subarachnoid hematoma and effects on dissociated vascular smooth-muscle cells*. J Neurosurg, 1993. **79**(2): p. 252-5.
100. Wessmann, A., K. Chandler, and L. Garosi, *Ischaemic and haemorrhagic stroke in the dog*. Vet J, 2009. **180**(3): p. 290-303.
101. Kang, B.T., et al., *Canine model of ischemic stroke with permanent middle cerebral artery occlusion: clinical and histopathological findings*. J Vet Sci, 2007. **8**(4): p. 369-76.
102. Garosi, L., et al., *Results of diagnostic investigations and long-term outcome of 33 dogs with brain infarction (2000-2004)*. J Vet Intern Med, 2005. **19**(5): p. 725-31.
103. Foley, P.L., et al., *Reversal of subarachnoid hemorrhage-induced vasoconstriction with an endothelin receptor antagonist*. Neurosurgery, 1994. **34**(1): p. 108-12; discussion 112-3.
104. Nelson, R.J., et al., *Transcranial Doppler ultrasound studies of cerebral autoregulation and subarachnoid hemorrhage in the rabbit*. J Neurosurg, 1990. **73**(4): p. 601-10.
105. Diringer, M.N., et al., *Altered cerebrovascular CO₂ reactivity following subarachnoid hemorrhage in cats*. J Neurosurg, 1993. **78**(6): p. 915-21.
106. Alabadi, J.A., et al., *Changes in the cerebrovascular effects of endothelin-1 and nicardipine after experimental subarachnoid hemorrhage*. Neurosurgery, 1993. **33**(4): p. 707-14; discussion 714-5.
107. Zibly, Z., et al., *A novel swine model of subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm*. Neurol India, 2017. **65**(5): p. 1035-1042.
108. Espinosa, F., et al., *A randomized placebo-controlled double-blind trial of nimodipine after SAH in monkeys. Part 1: Clinical and radiological findings*. J Neurosurg, 1984. **60**(6): p. 1167-75.
109. Muroi, C., et al., *Natural Cerebral Aneurysm and Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage in Mammals Other Than Man: Is There a Scope for Comparative Medicine?* World Neurosurg, 2019. **122**: p. 384-389.
110. Neulen, A., et al., *Large Vessel Vasospasm Is Not Associated with Cerebral Cortical Hypoperfusion in a Murine Model of Subarachnoid Hemorrhage*. Transl Stroke Res, 2018.

111. Kirschner, S., et al., *In vivo micro-CT imaging of untreated and irradiated orthotopic glioblastoma xenografts in mice: capabilities, limitations and a comparison with bioluminescence imaging*. J Neurooncol, 2015. **122**(2): p. 245-54.
112. Felix, M.C., et al., *Image-Guided Radiotherapy Using a Modified Industrial Micro-CT for Preclinical Applications*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126246.
113. Boll, H., et al., *Micro-CT based experimental liver imaging using a nanoparticulate contrast agent: a longitudinal study in mice*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25692.
114. Metscher, B.D., *MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues*. BMC Physiol, 2009. **9**: p. 11.
115. Swain, M.V. and J. Xue, *State of the art of Micro-CT applications in dental research*. Int J Oral Sci, 2009. **1**(4): p. 177-88.
116. Suske, A., et al., *Infundibula of equine maxillary cheek teeth. Part 1: Development, blood supply and infundibular cementogenesis*. Vet J, 2016. **209**: p. 57-65.
117. Lovrov, S., K. Hertrich, and U. Hirschfelder, *Enamel Demineralization during Fixed Orthodontic Treatment - Incidence and Correlation to Various Oral-hygiene Parameters*. J Orofac Orthop, 2007. **68**(5): p. 353-63.
118. Atack, N.E., J.R. Sandy, and M. Addy, *Periodontal and microbiological changes associated with the placement of orthodontic appliances. A review*. J Periodontol, 1996. **67**(2): p. 78-85.
119. Mitchell, L., *Decalcification during orthodontic treatment with fixed appliances--an overview*. Br J Orthod, 1992. **19**(3): p. 199-205.
120. Ogaard, B., G. Rolla, and J. Arends, *Orthodontic appliances and enamel demineralization. Part 1. Lesion development*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1988. **94**(1): p. 68-73.
121. O'Reilly, M.M. and J.D. Featherstone, *Demineralization and remineralization around orthodontic appliances: an in vivo study*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1987. **92**(1): p. 33-40.
122. Benson, P.E., et al., *Fluorides, orthodontics and demineralization: a systematic review*. J Orthod, 2005. **32**(2): p. 102-14.
123. Geiger, A.M., et al., *Reducing white spot lesions in orthodontic populations with fluoride rinsing*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1992. **101**(5): p. 403-7.

124. Demito, C.F., et al., *The efficacy of a fluoride varnish in reducing enamel demineralization adjacent to orthodontic brackets: an in vitro study*. Orthod Craniofac Res, 2004. **7**(4): p. 205-10.
125. Ogaard, B., et al., *Effects of combined application of antimicrobial and fluoride varnishes in orthodontic patients*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2001. **120**(1): p. 28-35.
126. Schmit, J.L., et al., *Effect of fluoride varnish on demineralization adjacent to brackets bonded with RMGI cement*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2002. **122**(2): p. 125-34.
127. Brown, W.E., T.M. Gregory, and L.C. Chow, *Effects of fluoride on enamel solubility and cariostasis*. Caries Res, 1977. **11 Suppl 1**: p. 118-41.
128. Corry, A., et al., *Effect of fluoride exposure on cariostatic potential of orthodontic bonding agents: an in vitro evaluation*. J Orthod, 2003. **30**(4): p. 323-9; discussion 298-9.
129. Hu, W. and J.D. Featherstone, *Prevention of enamel demineralization: an in-vitro study using light-cured filled sealant*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2005. **128**(5): p. 592-600; quiz 670.
130. Wenderoth, C.J., M. Weinstein, and A.J. Borislow, *Effectiveness of a fluoride-releasing sealant in reducing decalcification during orthodontic treatment*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1999. **116**(6): p. 629-34.
131. Luedemann, T.N.R.C., *Micro-Computed Tomography In Caries Research*. 2007, Humanmedizinische Dissertation. Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwig-Maximilian-Universität München.
132. Lo, E.C., Q.H. Zhi, and A. Itthagarun, *Comparing two quantitative methods for studying remineralization of artificial caries*. J Dent, 2010. **38**(4): p. 352-9.
133. Gao, X., et al., *Scanning microradiographic and microtomographic studies of remineralization of subsurface enamel lesions*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 1993. **89**(15): p. 2907-2912.
134. Hahn, S.K., et al., *Microcomputed tomographic assessment of chemomechanical caries removal*. Caries Res, 2004. **38**(1): p. 75-8.
135. Olejniczak, A.J. and F.E. Grine, *Assessment of the accuracy of dental enamel thickness measurements using microfocal X-ray computed tomography*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2006. **288**(3): p. 263-75.

136. Gantt, D.G., et al., *Three-dimensional reconstruction of enamel thickness and volume in humans and hominoids*. Eur J Oral Sci, 2006. **114 Suppl 1**: p. 360-4; discussion 375-6, 382-3.
137. Katkar, R.A., et al., *Optical Coherence Tomography*. Dent Clin North Am, 2018. **62(3)**: p. 421-434.
138. Machoy, M., et al., *The Use of Optical Coherence Tomography in Dental Diagnostics: A State-of-the-Art Review*. J Healthc Eng, 2017. **2017**: p. 7560645.
139. Algarni, A., et al., *Enamel Thickness Determination by Optical Coherence Tomography: In vitro Validation*. Caries Res, 2016. **50(4)**: p. 400-6.
140. Majkut, P., et al., *Validation of Optical Coherence Tomography against Micro-computed Tomography for Evaluation of Remaining Coronal Dentin Thickness*. J Endod, 2015. **41(8)**: p. 1349-52.
141. Korbmacher-Steiner, H.M., et al., *Laboratory evaluation of toothbrush/toothpaste abrasion resistance after smooth enamel surface sealing*. Clin Oral Investig, 2013. **17(3)**: p. 765-74.

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer möchte ich besonders für Annahme als Doktorandin an der Klinik für Kleintiere Chirurgie an der Justus-Liebig-Universität Gießen, sowie für die wertvolle Unterstützung und Korrektur meiner Dissertationsschrift danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Marc Brockmann für die Überlassung meines Themas und für die zahlreichen Stunden, in denen er sich meinen Fragen und Problemen angenommen hat. Seine Geduld und seine Unterstützung bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit sind ein großer Bestandteil dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Christoph Groden danke ich für die herzliche Aufnahme in das Team der Abteilung für Neuroradiologie der Universitätsmedizin Mannheim und für die Unterstützung und Förderung aller Forschungsvorhaben, an denen ich beteiligt sein durfte.

Meiner Kollegin Dr. Stefanie Kirschner danke ich besonders die für ausgezeichnete Einarbeitung am Mikro-CT und das zahlreiche Wissen, welches ich von ihr erhalten durfte.

Ebenfalls herzlich danken möchte ich dem Team der Abteilung für Neuroradiologie der Universitätsmedizin Mannheim für die wertvolle mentale Unterstützung.

Des Weiteren danke ich dem gesamten Team des Zentrum für medizinische Forschung der Universitätsmedizin Mannheim, die mich auf ganz unterschiedliche Weise während dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein allergrößter Dank geht an meine Freunde und Familie, meiner Mutter und meinem Vater, die mir meine Ausbildung überhaupt erst ermöglicht haben und mir in allen Lebenslagen zur Seite stehen, und insbesondere meinem Ehemann, mein Fels in der Brandung. Danke!

Vielen herzlichen Dank!

9 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 guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.“

Vanessa Weyer



édition scientifique



VVB LAUFERSWEILER VERLAG



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6892-9



9 783835 968929