

Aus dem  
CharitéCentrum für diagnostische und interventionelle Radiologie und  
Nuklearmedizin  
Klinik und Hochschulambulanz für Radiologie  
Direktor: Prof. Dr. med. B. Hamm

## **Habilitationsschrift**

### **Einsatz computertomographischer Volumendatensätze und 2D- sowie 3D-Rekonstruktionen bei tierexperimentellen Untersuchungen im Sinne des 3R-Konzeptes**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Radiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Stefan Markus Niehues, MHBA

geboren am 21.09.1976 in Köln

Eingereicht: 07/2013

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. R. H. Tolba

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. F. Wacker

# Inhalt

<b>1. Einleitung und Fragestellungen .....</b>	<b>4</b>
1.1 Das 3R-Konzept von Russel und Burch und dessen Entwicklung.....	6
1.2 Einsatzgebiete der Computertomographie .....	7
1.3 Vorteile der 2D-Nachverarbeitung von Datensätzen .....	8
1.4 Vorteile der 3D-Nachverarbeitung von Datensätzen .....	11
1.5 Fragestellungen.....	12
<b>2. Eigene Arbeiten.....</b>	<b>13</b>
2.1 Pulmonale Bildgebung .....	13
2.1.1 CT-morphologische Veränderungen der Lunge des Göttingen® Minipigs in Bauch- und Rückenlage (Originalarbeit 1) .....	13
2.2 Vaskuläre Bildgebung .....	23
2.2.1 CT zur Visualisierung der Probleme bei der venösen Haemofiltration (Originalarbeit 2).....	23
2.2.2 Makro- und mikromorphometrische Studien der Gefäße des Göttingen® Minipigs in der CT (Originalarbeit 3) .....	35
2.2.3 Computertomographische Evaluation einer Nitinol-basierten Venenmanschette in vivo (Originalarbeit 4).....	40
2.3 Bildgebung von Physiologie und Pathophysiologie.....	51
2.3.1 CT-morphologische Untersuchung von Kompensationsmechanismen eines aortalen Verschlusses beim Tiermodell Schwein (Originalarbeit 5).....	51
2.3.2 CT-volumetrische Messungen der Knochenneubildung am Minipig (Originalarbeit 6) .....	65
<b>3. Diskussion.....</b>	<b>75</b>
3.1 Vermeidung .....	76
3.2 Verfeinerung.....	77
3.3 Verringerung.....	78
3.4 Zwei- und dreidimensionale Reformatierungen.....	79
3.5 Kritik am Modell von Russel und Burch.....	80
<b>4. Zusammenfassung .....</b>	<b>82</b>
<b>5. Publikationen, die dieser Arbeit zugrunde liegen.....</b>	<b>84</b>
<b>6. Literatur .....</b>	<b>85</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>92</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>93</b>

## Abkürzungen

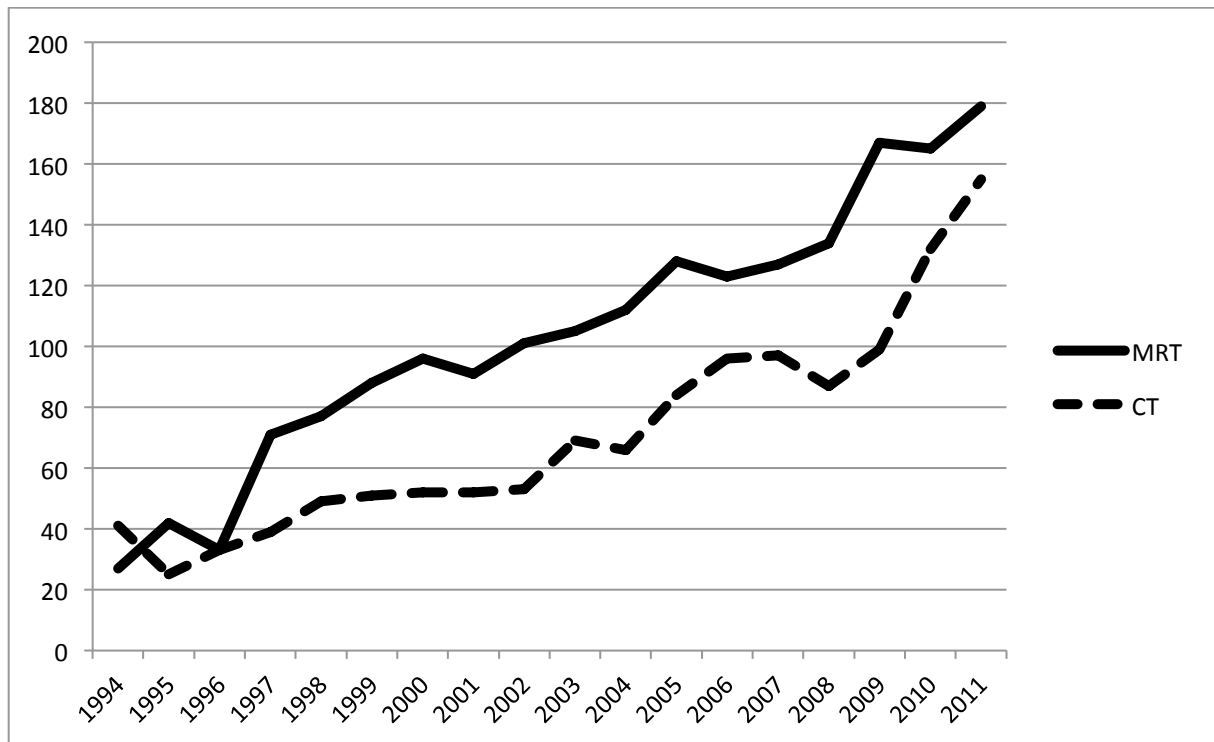
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AMG	Arzneimittelgesetz
CPR	curved planar reformation (gekrümmte Reformatierung)
CSD	critical size defect(s) (kritische Defektgröße)
CT	Computertomographie
EGA	Arteria epigastrica (epigastric artery)
HU	Hounsfield Units
i.v.	intravenös(em)
KM	Kontrastmittel
MESH	Medical Subject Headings
MPG	Medizinproduktegesetz
MPR	multiplanare Reformatierung
MRT	Magnetresonanztomographie
OP	Operation
PET	Positronenemissionstomographie
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
US	Ultraschall
VCS	Vena cava superior
VIC	Vena iliaca communis
VIE	Vena iliaca externa

# 1. Einleitung und Fragestellungen

Die Entwicklung von Medizinprodukten für den Einsatz im Menschen muss hohen Anforderungen genügen. Produkte unterliegen vor ihrem Einsatz in der Humanmedizin strengen Kontrollen und Prüfungen auch auf deren Biokompatibilität. Deren rechtliche Regelung findet sich im Medizinproduktegesetz (MPG), §3 Absatz Nummer 25, §19 und §25 Absatz 1. In vielen Fällen führt dies zu Prüfung und Einsatz des entsprechenden Materials in Tiermodellen, im Rahmen dessen die Interaktion zwischen Organismus und Fremdkörper beobachtet und evaluiert wird.

Parallel dazu gewinnt aber das Prinzip der 3R (Replacement, Refinement, Reduction, [1]) in jedem biowissenschaftlichen Forschungsvorhaben Bedeutung. Dieser wichtige Gedanke findet sich auch in der Novelle der Richtlinie 2010/63/EU, die 2013 in Kraft trat, wieder. Diese Richtlinie hebt die Bedeutung von Alternativverfahren zu tierexperimentellen Untersuchungen besonders hervor. Derzeit werden für alle drei Ansätze (Vermeidung, Verfeinerung und Verringerung) Methoden geprüft. In mindestens zwei Bereichen kann die Radiologie einen wichtigen Beitrag leisten.

Zunehmend unterstützen Sonographie (US), Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) eine Vielzahl präklinischer Versuchsvorhaben zur in-vivo-Evaluierung von Medizinprodukten. Das Potential einer begleitenden Bildgebung mit CT und MRT konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden [2-7]) und findet daher zunehmende Verbreitung (Abb. 1):



**Abb. 1:** Anzahl der Publikationen über den Einsatz von CT oder MRT im Tierexperiment am Schwein. Quelle: Pubmed (MESH: ((pig) OR swine) AND CT bzw. ((pig) OR swine) AND MRI)

Die Mehrheit tierexperimenteller Untersuchungen orientiert sich an Kleintiermodellen mit Mäusen oder Ratten. Bei der vorklinischen Erprobung von Material und Verfahren muss jedoch regelhaft auf größere Tiere, vor allem auf das Modell von Haus- und Minischweinen, zurückgegriffen werden [8-10]. Gerade diese haben in Hinblick auf Anatomie und Physiologie Parallelen zum Menschen und sind in Bezug auf Haltung und Führung anderen Tiermodellen (Hund/Affe) überlegen [11,12]. Ein Nachteil bei Versuchen, die auf große Säugetiere zurückgreifen, ist der Kostenaspekt, der gerade bei Anschaffung und Haltung deutlich über dem bei Kleintieren liegt. Losgelöst von der ethischen Einschätzung erscheint es daher konsequent, die Anzahl verwendeter Tiere bei Versuchsvorhaben mit größeren Tieren auf ein Minimum zu reduzieren.

Hier kann der Einsatz bildgebender Verfahren mit multiplanarer Nachverarbeitung zielführend sein. Als Routineverfahren wird häufig die Computertomographie genutzt. Im Folgenden dieser Arbeit greifen daher alle Betrachtungen auf die Möglichkeiten der Computertomographie zurück.

## **1.1 Das 3R-Konzept von Russel und Burch und dessen Entwicklung**

Im Rahmen eines Symposiums über humane Techniken im Labor im Jahr 1957 erfuhr das Konzept der drei R (Reduktion, Refinement und Replacement) erstmalig große Aufmerksamkeit. Ziel der Diskussion war die Beseitigung von Grausamkeit in Tierversuchen. Federführend waren zu dem Zeitpunkt Charles Hume und William Russell. 1959 erschien das Buch „The Principles of Humane Experimental Technique“ [1], welches 1992 wiederaufgelegt wurde. Russel und Burch definierten als oberstes Ziel, Tierexperimente durch Einsatz „nicht-fühlenden Materiales“ anstelle von „bewusst lebenden“ Wirbeltieren zu ersetzen. Der Weg dorthin war zum Zeitpunkt der Erstveröffentlichung nicht so klar und verständlich wie er heute empfunden wird, da der Umgang mit Zellkulturen noch in den Anfängen stand. Daher definierten die Autoren ein Zwischenstadium: Der relative Ersatz, bei dem die Tiere zwar noch eingesetzt werden, allerdings ohne leiden zu müssen. Dies kann durch den Einsatz spezieller Narkosemethoden erreicht werden.

Durch den Einsatz geeigneter Ersatzverfahren sahen die Autoren nicht nur eine bessere Menschlichkeit, sondern auch eine Verbesserung der Wissenschaft. Als Folge wurde die Suche nach Ersatzverfahren als eigene und vollständige wissenschaftliche Tätigkeit definiert.

Der Publikation selbst wurde in den nächsten Jahren wenig Effekt zugesprochen. Da in den 60er Jahren der Schutz der Gesundheit des Menschen vor Toxizität besondere Bedeutung beigemessen wurde (§22 Absatz 2 Arzneimittelgesetz (AMG)), erfolgte vielmehr ein zunehmender Einsatz von Tierversuchen im Bereich der Medikamenten- und Kosmetikentwicklung. 2003 wurde das EU-weite Vermarktungsverbot kosmetischer Mittel, die entweder als Fertigerzeugnisse, als deren Bestandteile oder einer Kombination daraus an Tieren getestet worden sind, beschlossen und greift seit März 2013 ohne Ausnahme (7. Änderung der Kosmetik-Richtlinie, 76/768/EWG vom 11.03.2003). Parallel suchte man allerdings auch nach Wegen, die verbleibenden Tierversuche zu reduzieren. Wegweisende Arbeiten auf dem Weg dorthin war der Überblick von Smyth über Alternativen zu Tierversuchen sowie die Publikation von Balls et al. 1983 über Toxizitätstestung an Zell- und Organkulturen [13,14]. Hier werden Alternativen zu Tierexperimenten als Prozeduren definiert, die a) Tierversuche komplett ersetzen, aber auch b) die Anzahl benötigter Tiere vermindern und c) Schmerzen und Elend der Tiere verringern.

1981 wurde in Baltimore an der Johns Hopkins School of Public Health das „Center for Alternatives to Animal Testing“ gegründet, 1983 das Department of Laboratory Animal Science an der Universität von Utrecht in den Niederlanden. Hier entwickelte sich der Gedanke, vor allem die Wissenschaftler, die an Tierversuchen beteiligt waren, zu schulen. Im Oktober 1991 folgte die Gründung des European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Daraus hervor ging die europäische Richtlinie, aktiv die Validierung und Akzeptanz von Ersatzmethoden zu Tierversuchen zu fördern. Hier (Directive 86/609/EWG) findet sich auch die Formulierung von Russel und Burch wieder: „[...] actively support the development, validation and acceptance of methods which could reduce, refine or replace the use of laboratory animals[...]“.

Im Laufe der Zeit wurde der Weg weiterverfolgt: Tierversuche sind in Deutschland durch Aufsichtsbehörden genehmigungspflichtig (zum Beispiel Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo)) und unterliegen gesetzlichen Regulierungen (Tierschutzgesetz (AVV TierSchG)). In Einrichtungen, in denen Tierversuche durchgeführt werden, müssen regelmäßige Kontrollen nach DIN EN ISO 9001:2008 erfolgen.

2013 trat die Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere in Kraft. Hier wurde unter anderem der Geltungsbereich auf die Grundlagenforschung und Ausbildung ausgeweitet. Eine weitere Stärke der Richtlinie wird darin gesehen, die strengen Vorgaben auf alle EU-Staaten auszuweiten. In Ländern wie Deutschland, Schweden und Dänemark werden schon jetzt viele Vorgaben der Richtlinie erfüllt.

Da das ursprüngliche Ziel, Tierversuche komplett zu ersetzen, bislang nicht erreicht wurde, wird weiterhin nach Verfahren gesucht, die Tierversuche verringern, verfeinern oder zumindest partiell ersetzen können. Ein Ansatz liegt im Einsatz bildgebender Verfahren.

## **1.2 Einsatzgebiete der Computertomographie**

Der Vorteil der Computertomographie liegt in der raschen Bildakquise und der hohen Auflösung von mindestens  $512 \times 512$  Bildpunkten. Diese Bilddaten werden standardisiert in axialer Schichtrichtung akquiriert und sind daher einfach mit den Bilddaten anderer Messungen vergleichbar. Aufgrund der hohen Standardisierung von computertomographischen Bilddatensätzen sind die Bilder sowie deren Analyse auch

zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig von der eingesetzten Hardware vergleichbar.

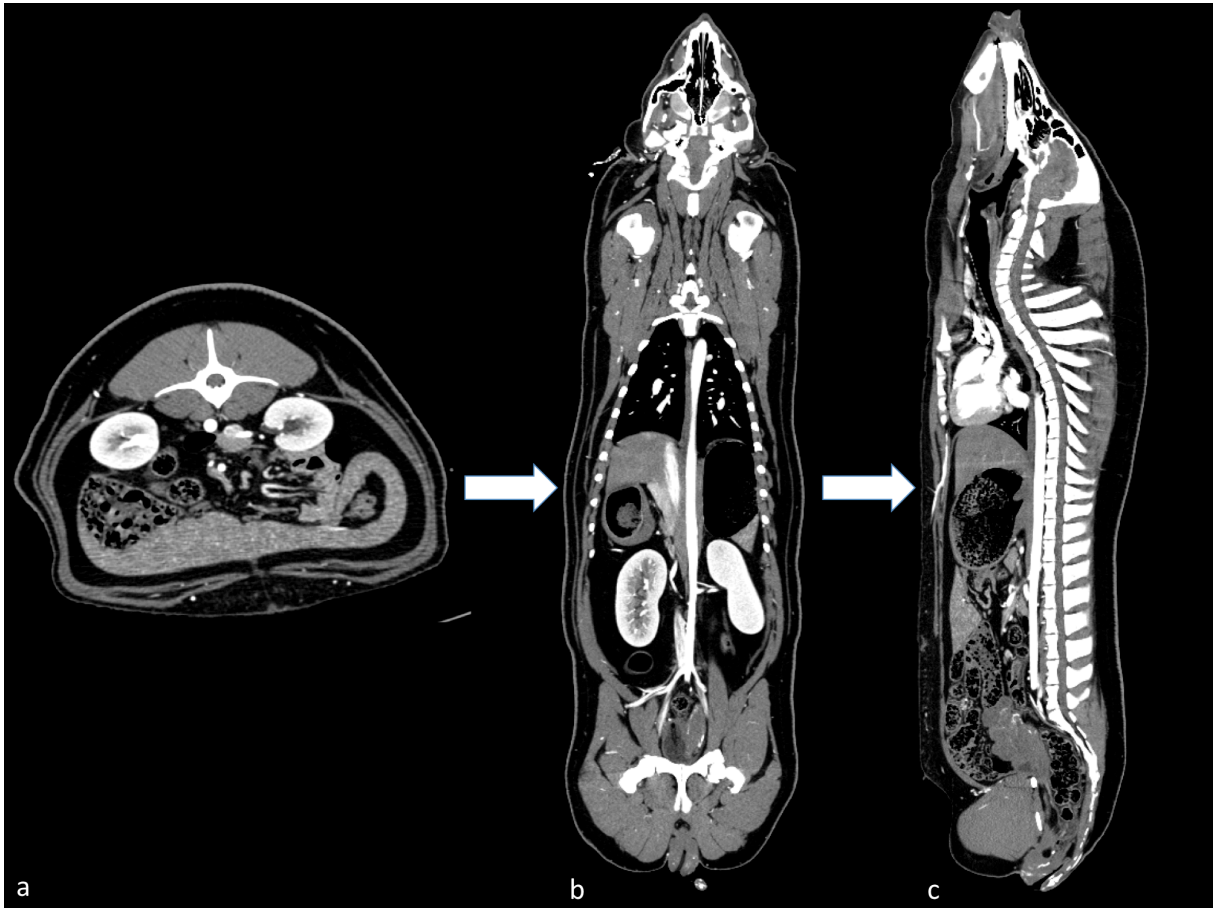
Die kontrastmittelgestützte CT dokumentiert neben der Anatomie auch physiologische Gegebenheiten zum Zeitpunkt der Untersuchung. Durch die Anpassung des Untersuchungsprotokolles gelingt die selektive Visualisierung von Arterien und die Darstellung der frühen Perfusion von Organen. In späteren Kontrastmittelphasen erfolgt die Darstellung der Organdurchblutung, der Venen und in der Spätphase die des ableitenden Harnsystemes. Hierbei kommen seit Mitte der 80er Jahre nicht-ionische Kontrastmittel zur Anwendung, da bei diesen die Nebenwirkungsrate deutlich unter der ionischer Kontrastmittel liegt [15,16].

Die geeignete Wahl des Untersuchungsprotokolles und der geeigneten Kontrastmittelphase oder einer Kombination verschiedener Phasen erlaubt auch die Beantwortung sehr komplexer Fragestellungen. Mittlerweile gehört die Analyse der Kontrastmitteldynamik zur Routine und ermöglicht eine präzise Darstellung von Morphologie und Funktion innerhalb kürzester Zeit. Daher stellt auch zu Zeiten weit verbreiteter MR-Diagnostik die CT das Verfahren der Wahl nicht nur bei Notfällen und Akutsituationen dar [17-21].

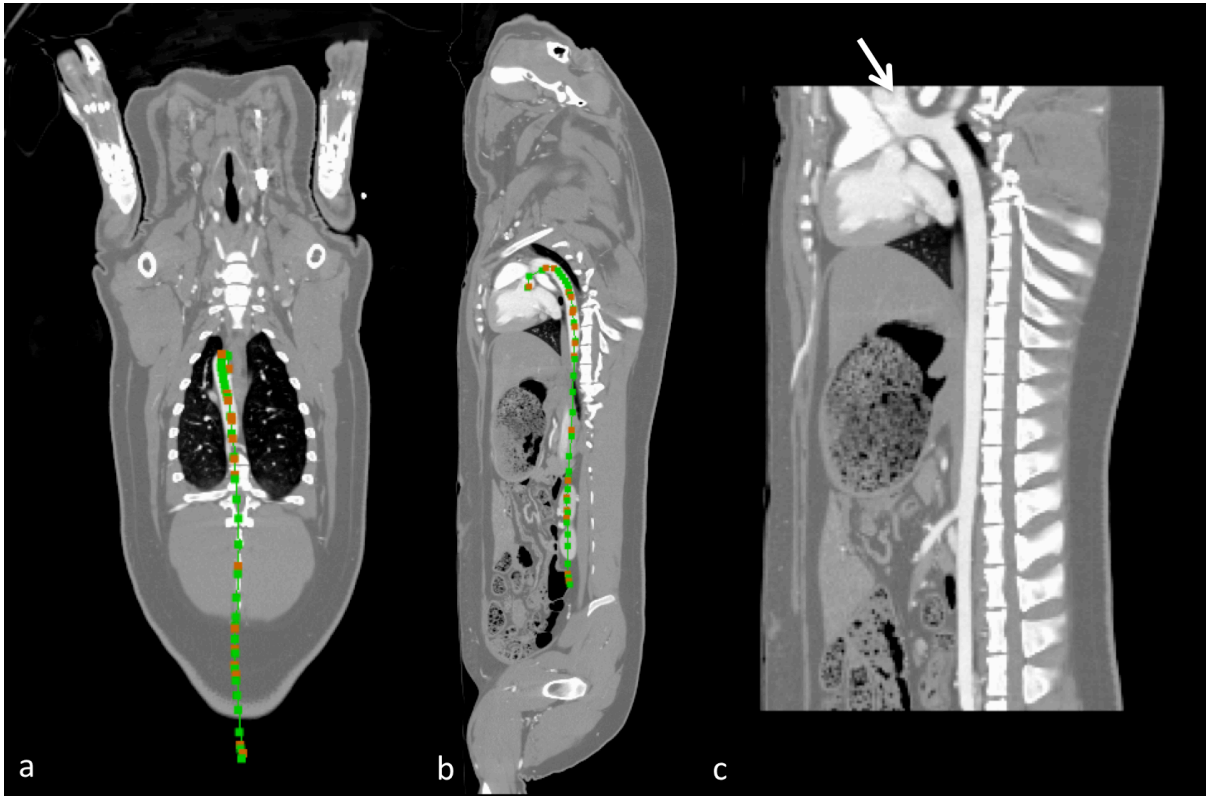
### **1.3 Vorteile der 2D-Nachverarbeitung von Datensätzen**

Werden Bilddaten mit isotroper Auflösung akquiriert, können verlustfreie zweidimensionale Rekonstruktionen angefertigt werden. Diese orientieren sich in der Regel an den klassischen anatomischen Ansichten (koronar oder sagittal, Abb. 2), können aber auch einer beliebigen Struktur folgen und damit beliebig durch das Datenvolumen ziehen (gekrümmte Reformatierung, curved planar reformation, CPR oder multiplanare Reformatierung, MPR, Abb. 3 und 4). So gelingt eine Darstellung von komplexen Objekten als Ganzes, die sich dem Betrachter auf einen Blick erschließt [22]. Weiterhin sind auf diesem Wege präzise Messungen von schräg oder unregelmäßig verlaufenden Strukturen möglich [23-25]. Die kontrastmittelgestützte CT stellt zudem eine zuverlässige und stabile Methode dar, Gefäße über einen Zentimeter Durchmesser in vivo darzustellen [26-29].

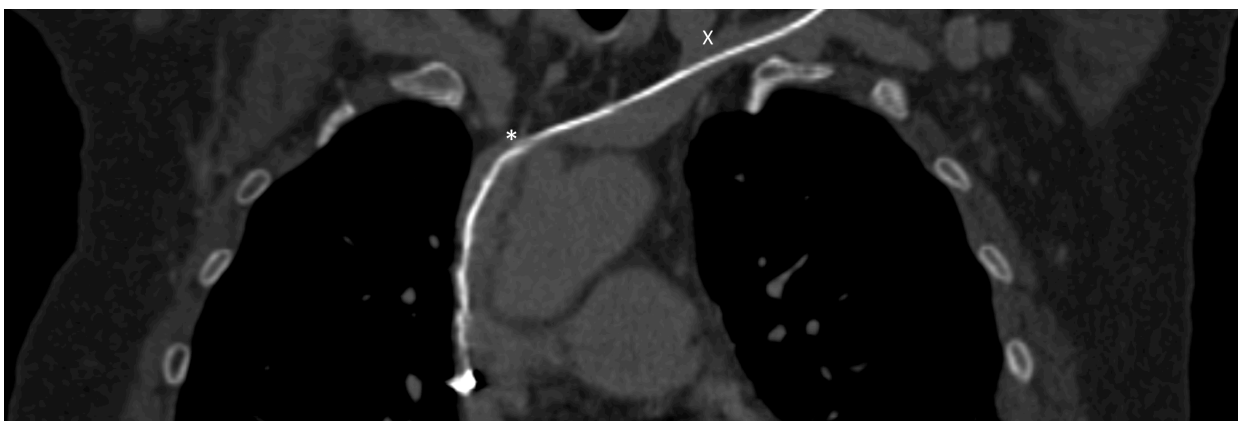




*Abb. 2: Zweidimensionale verlustfreie Reformatierung eines Datensatzes aus axialen Schichten (a) zu einer coronaren Darstellung (b) oder sagittalen Darstellung (c) am Beispiel eines Hausschweines*



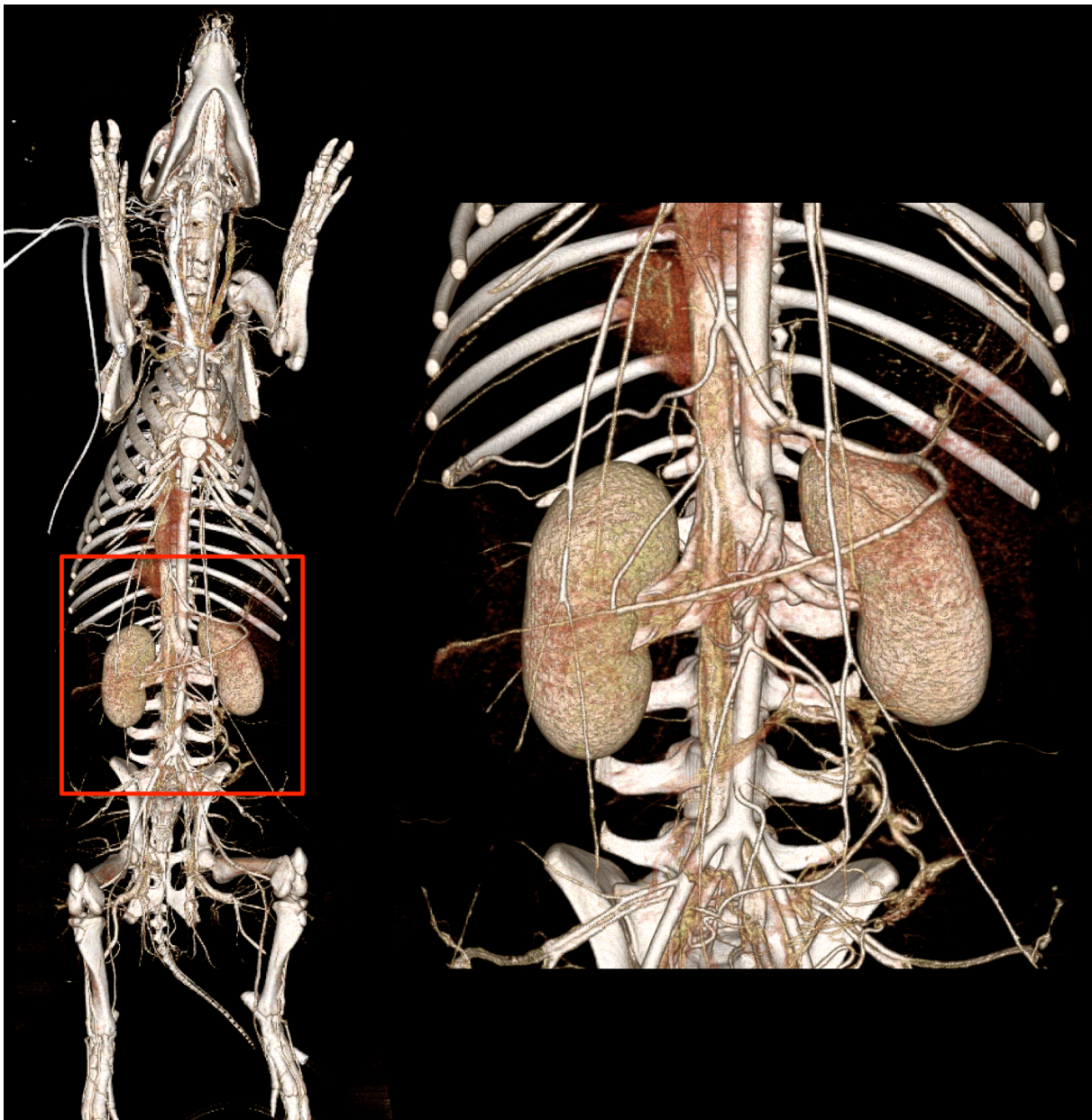
**Abb. 3:** Planung einer gekrümmten Reformatierung an einem coronaren (a) und sagittalen Bild (b). Ergebnisbild (c) mit der Aortenwurzel (weißer Pfeil) und einer vollständigen Darstellung der gesamten thorakalen und abdominalen Aorta des Minipigs.



**Abb. 4:** Gekrümmte Reformatierung entlang eines Kathetersystems in vivo. Das X markiert die Stelle des Eintritts in den Truncus brachiocephalicus, der Stern (\*) markiert den Übergang in die Vena cava superior (VCS). Durch die gekrümmte Reformatierung sind exakte Längenmessungen (Verlauf im Truncus über 6,1 cm und 6,8 cm in der VCS) möglich.

## 1.4 Vorteile der 3D-Nachverarbeitung von Datensätzen

Die dreidimensionale Nachbearbeitung von Bilddatensätzen erlaubt die Darstellung von Anatomie, Topographie und Strukturen in einem Bild. Meist wird dafür das Volume-Rendering benutzt, eine Technik, die den gesamten Datensatz komplett zur Erstellung des 3D-Volumens heranzieht (Abb. 5).



*Abb. 5: Dreidimensionale Visualisierung eines CT-Datensatzes aus 1240 axialen Einzelschichten zur Darstellung der Knochen und Gefäße eines Hausschweines. Links die Übersicht, rechts eine Vergrößerung der Anatomie der Bauchaorta.*

Komplexe Lageverhältnisse sind auf diese Weise gut zu verdeutlichen und operative Planungen werden so vereinfacht [30,31]. Über die dreidimensionale Darstellung wird oft eine Informationsverdichtung erreicht, da alle wesentlichen Informationen aus verschiedenen Schichten und Bereichen in einem einzelnen Bild dargestellt werden können (s.a. [6]).

Durch 2D- und 3D-Nachverarbeitungen begegnet man der großen Anzahl der Bilder, die eine Akquisition im Submillimeterbereich mit sich bringt. Die Möglichkeit, gezielt Informationen aus einem Datensatz von Thorax und Abdomen, bestehend aus über 1000 Bildern, in zwei bis drei Rekonstruktionen zusammenzufassen, stellt sich in der täglichen Praxis als unvorstellbar wertvoll dar [24,32].

## **1.5 Fragestellungen**

Ziel der Auseinandersetzung mit dem Thema war die Evaluation, in welchen Bereichen die Computertomographie und nachfolgendes Postprocessing einen Beitrag zu tierexperimentellen Vorhaben an Großtieren in den Bereichen der pulmonalen, vaskulären sowie der Bildgebung physiologischer und pathophysiologischer Aspekte leisten kann. Im Rahmen dieser Habilitationsarbeit soll weiterhin geprüft werden, ob der Einsatz der Bildgebung einen Beitrag zur Verringerung, Verfeinerung oder Vermeidung von Tierexperimenten im Sinne des 3R-Konzeptes leisten kann. Zudem sollte der Frage nachgegangen werden, inwiefern die CT und die Schaffung einer Bilddatenbank zu einem Zusatznutzen führt.

## **2. Eigene Arbeiten**

### **2.1 Pulmonale Bildgebung**

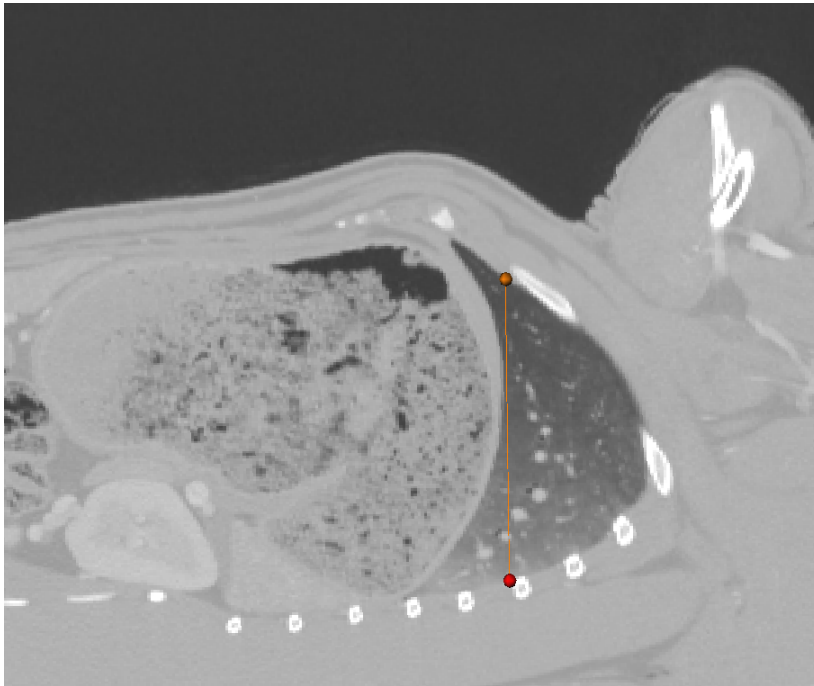
#### **2.1.1 CT-morphologische Veränderungen der Lunge des Göttingen® Minipigs in Bauch- und Rückenlage (Originalarbeit 1)**

Die Lunge des Schweines gilt als exzellentes Modell für die menschliche Lunge [33-39]. Um bei operativen Eingriffen Zugang zum Thorax, aber auch zum Abdomen zu erhalten, wird das Schwein regulär in die unphysiologische Rückenlage gebracht. Die Auswirkungen einer solch unphysiologischen Lagerung auf die Lunge beim sedierten Tier wurden bislang nicht systematisch untersucht. Diese Studie greift diese Wissenslücke auf und untersucht die CT-morphologisch erfassbaren Änderungen der Lungentextur und -dichte an 12 Minipigs. Dazu wurden Lungendichte, Lungenvolumen und Gefäßanatomie der Minipigs in Bauch- und Rückenlage im CT multiplanar erfasst.

Sowohl in Bauchlage als auch in Rückenlage erfolgte die Messung der Dichte als Histogramm entlang einer Linie im Lungenparenchym (Abb. 6, aus [2]). Das Lungenvolumen wurde anhand der einzelnen CT-Schichten und einer etablierten Auswertsoftware (AMIRA) gemessen. Anhand der axialen Bilder, aber auch gekrümmter Reformatierungen entlang der Gefäße konnten Größen- und Lageveränderungen der Gefäße erfasst werden. Dies war ein wichtiger tierspezifischer Ansatz, da die Adaptation der Herzfrequenz bei Schweinen limitiert ist [40-42].

Während in Bauchlage eine gleichmäßige Dichte der Lunge gemessen wurde ( $-665 \pm 53$  Hounsfield Units, HU), fällt in Rückenlage bereits nach 296 Sekunden ein signifikanter ( $p < 0,001$ ) schwerkraftabhängiger Gradient auf. Gleichzeitig verändert sich das Lungenvolumen nicht signifikant ( $p = 0,666$ ). Gekrümmte Reformatierungen entlang der Vena cava caudalis (beim Menschen VCI) konnten zudem eine weitere Problematik aufzeigen: Während der physiologische Verlauf der V. cava in Bauchlage das Blut passiv zum Herzen transportiert, muss in der Rückenlage ein deutlicher Gradient überwunden werden. Gleiches gilt für die großen Lungenvenen. Gleichzeitig ist aber die Adaptation der Herzfrequenz bei Schweinen limitiert, so dass es zu einer Stauung des venösen Blutes im großen und kleinen

Kreislauf kommen kann. Daher muss bei Versuchen in Rückenlage der Beatmung und der Herzfunktion besondere Beachtung geschenkt werden, um sowohl eine Verfälschung von Untersuchungsergebnissen aber auch das Risiko eines intraoperativen Todes der Versuchstiere zu verhindern.



**Abb. 6:** *Sagittale Reformatierung durch den Thorax eines auf dem Rücken positionierten Minipigs. Die Lungendichte nimmt gleichmäßig zur Wirbelsäule hin zu, die Dichtemessungen erfolgten entlang der eingezeichneten Linie (Abbildung aus [2], S. 88 der Originalarbeit).*

Niehues, S. M., C. Muller, J. Plendl, K. C. Richardson, O. Gemeinhardt, H. Hunigen, J. K. Unger, F. Jung, B. Hamm and B. Hiebl (2012). "The effect of prone versus supine positioning of Goettingen minipigs on lung density as viewed by computed tomography." Clin Hemorheol Microcirc **52**(2-4): 85-92.

DOI: 10.3233/CH-2012-1586.

## **2.2 Vaskuläre Bildgebung**

### **2.2.1 CT zur Visualisierung der Probleme bei der venovenösen Haemofiltration (Originalarbeit 2)**

Ein wiederkehrendes Problem bei der venovenösen Haemofiltration mit zweilumigen Kathetersystemen ist eine unzureichende Flussgeschwindigkeit, aus der eine Verschlechterung der Haemorheologie oder unzureichende Dialyse resultiert [43]. Als Einflussfaktoren werden die Katheterposition, das Blutvolumen, das Herzminutenvolumen sowie haemorheologische Eigenschaften verstanden [44-47]. In einer tierexperimentellen Studie wurden Flussraten und deren Abhängigkeit von den Faktoren Herzzeitvolumen, zentralvenöser Druck, Katheterposition und Haemorheologie (Blutzusammensetzung und Volumenersatz) sowie die Katheterposition im CT gemessen. Dabei wurden 2 Gruppen betrachtet, Gruppe 1 mit einem 11F-zweilumigen Kathetersystem in der Vena cava inferior und Gruppe 2 mit einem 8,5F einlumigen Kathetersystem in der Vena iliaca communis. Als Tiermodell dienten noch nicht ausgereifte Hausschweine, da diese eine ungünstige Haemorheologie vergleichbar zu kritisch erkrankten Patienten aufweisen [48-50].

Überraschend konnte keine signifikante Anhängigkeit der erreichbaren Flussraten von verwendetem Volumenersatz, der Blutzusammensetzung, dem Herzzeitvolumen und zentralvenösen Druck gefunden werden. Ebenso nehmen Gefäßgröße und Gefäßtyp keinen Einfluss auf die Flussraten im arteriellen Schenkel. Wohl aber wurden signifikant höhere Flussraten im kleineren, peripheren Kathetersystem gemessen ( $p < 0,001$ ). Limitierend ist in beiden Systemen der Blutfluss durch den zuführenden Schenkel. Durch Einsatz der CT konnte nachgewiesen werden, dass sich die zweilumigen Systeme stets an die Gefäßwand angelegt haben, was den verringerten Blutfluss durch Obstruktion der Seitlöcher erklärt. Bei schlechten Flussraten bei einer Haemofiltration mit zentralen großlumigen Kathetersystemen sollte daher die Option eines venovenösen Zuganges auch mit kleinlumigen Kathetern in peripheren Gefäßen evaluiert werden, da hier bessere Flussraten gemessen werden konnten.



Unger, J. K., K. Pietzner, R. C. Francis, J. Birnbaum, M. M. Theisen, A. J. Lemke and S. M. Niehues (2007). "Dual-lumen catheters for continuous venovenous hemofiltration: limits for blood delivery via femoral vein access and a potential alternative in an experimental setting in anesthetized pigs." Crit Care **11**(1): R18.

DOI: 10.1186/cc5693

### **2.2.2 Makro- und mikromorphometrische Studien der Gefäße des Göttingen® Minipigs in der CT (Originalarbeit 3)**

Aufgrund anatomischer Vergleichbarkeit und ihrer weitestgehenden Größen- und Gewichtskonstanz werden erwachsene Minipigs häufig als Tiermodell eingesetzt [51-53]. Trotz zunehmender Akzeptanz liegen nur wenig systematische Daten über die vaskuläre Anatomie in vivo vor [54]. Unklar war, ob sich verbleibende Größen- und Gewichtsveränderungen auf Gefäßlängen und –durchmesser auswirken. Auch eine systematische Analyse des Gefäßsystemes ausgereifter Minipigs mit Angaben über Länge, Durchmesser und Wandaufbau ist in der Literatur nicht zugänglich. Daher erfasst diese Studie systematisch die Größen- und Längendaten zentraler und für Versuchsvorhaben wichtiger Gefäße des Minipigs. Als Datengrundlage dient ein Kollektiv von 18 Tieren aus einem Datenpool, die zu verschiedenen Zeitpunkten mittels CT mit i.v.-Kontrastmittel untersucht wurden. Zusätzlich wurden die Daten mit histologischen Proben, die ebenfalls aus dem Kollektiv gewonnen wurden, korreliert. Aus dem hier generierten Datenpool entstand zusätzlich zu der Publikation eine von mir begleitete Promotionsschrift [55].

Die Daten dokumentieren, dass eine signifikante Gewichtszunahme ( $p < 0,05$ ) innerhalb von 4 Monaten keinen Einfluss auf die Gefäßlängen und –durchmesser zeigte. Dies betrifft gerade das Alter der Tiere, welche häufig für Versuchsvorhaben eingesetzt werden. Das gewonnene Datenmaterial und die histologischen Informationen bilden eine Grundlage zur Planung und Optimierung von Versuchen am Gefäßsystem, beispielsweise bei der Entwicklung von Stents, Prothesen und Klappenersatz.

Hiebl B, Müller C, Jung F, Hünigen H, Hamm B, Plendl J, **Niehues SM**. Macro- and micromorphometric studies of the vascular structures from the Göttingen® minipig. *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology*. 2009;13:318-21.

Keine DOI verfügbar.

### **2.2.3 Computertomographische Evaluation einer Nitinol-basierten Venenmanschette in vivo (Originalarbeit 4)**

Diese Studie setzt die Möglichkeiten der CT zur Analyse eines neuartigen Cuffs zur Venenkompression auf Klappenebene in vivo am Schweinmodell ein. Damit greift sie das Thema der venösen Insuffizienz und deren Behandlungsoptionen auf. Eine Insuffizienz der Venenklappe stellt den Ansatzpunkt dar [56]. Eine Kompression von außen kann durch einen Cuff erreicht werden und wird als mögliche Alternative zum Stripping gesehen [57-60].

Bei 12 Minipigs wurde ein individuell größenadaptierter Cuff an die Vena jugularis externa angelegt und das Cuff-Verhalten nach 3, 14, 28 und 42 Tagen anhand von CT-Messungen analysiert. Um die Reaktionen auf Volumen- und Druckschwankungen zu erfassen erfolgte die Bildgebung sowohl in Bauch- als auch in Rückenlage. Parallel wurde die Ortsständigkeit des Cuffs und das Verhalten des Verschlussmechanismus durch Messungen entlang gekrümmter Reformatierungen bewertet. Die hier dokumentierten Veränderungen an der Manschette wurden am Ende der Studie histologisch korreliert.

Der Durchmesser der Vena jugularis externa konnte durch den Cuff signifikant verringert werden (Tag 28  $p < 0,02$ , Tag 42  $p < 0,01$ ). Histologisch ging dies auch mit einer Zunahme der Wandstärke der Vene einher. Hinsichtlich der Biokompatibilität zeigte sich keine Entzündungsreaktion, die Zunahme der Wandstärke erfolgte durch eine Fremdkörperreaktion in Form einer fibrösen Kapsel un

ter der Manschette. Der Gefäßdurchmesser, gemessen auf der Gegenseite, wurde durch das Lagerungsmanöver signifikant ( $p < 0,05$ ) beeinflusst. Dies hatte keinen Einfluss auf den Durchmesser des Cuffs auf der operierten Seite, das maximale Lumen wurde durch den Cuffdurchmesser vorgegeben. Auch die Cuffposition, gemessen an der relativen Position des Gesamtgefäßes, zeigte keine signifikanten Bewegungen. Der Verschlussmechanismus arbeitete bei allen Tieren zu allen gemessenen Zeitpunkten zuverlässig. Der fibrotische Umbau durch eine Fremdkörperreaktion mit Verringerung des durchflossenen Lumens stellt die einzige Limitation beim Einsatz einer Venenmanschette dieses Typs dar.

Aufgrund des Einsatzes der CT konnte auf die primär geplante serielle Tötung verzichtet werden.

Hiebl, B., C. Muller, J. Gors, F. Jung, A. Lendlein, M. Junger, B. Hamm and S. M. Niehues (2012). "A NiTi alloy-based cuff for external banding valvuloplasty: a six-week follow-up study in pigs." Phlebology **27**(7): 337-346.

DOI: 10.1258/phleb.2011.011035

## **2.3 Bildgebung von Physiologie und Pathophysiologie**

### **2.3.1 CT-morphologische Untersuchung von Kompensationsmechanismen eines aortalen Verschlusses beim Tiermodell Schwein (Originalarbeit 5)**

Beobachtungen an weiblichen Hausschweinen, die im Rahmen einer Aortengraft-Operation unbemerkt einen kompletten Verschluss der abdominalen Aorta erlitten haben, führten zu der Frage, welche Mechanismen zur offensichtlich guten Kompensation eines solchen Gefäßverschlusses vorliegen. Eine CT-Untersuchung von 15 Tieren der Versuchsreihe zu vier verschiedenen Zeitpunkten ermöglichte die Untersuchung und Auswertung der vaskulären Anatomie und genutzter, teils physiologischer Umgehungskreisläufe. Es erfolgte ein Vergleich der Informationen mit dem humanen Gefäßsystem bei gefäßgesunden Patienten sowie Patienten mit einem Leriche-Syndrom. Zur Analyse wurden CT-Volumendatensätze herangezogen, die speziell auf die Gefäßdarstellung optimiert waren.

Als Ergebnis zeigte sich, dass Hausschweine über eine stark ausgebildete Gefäßkollateralisierung über die Arteria epigastrica (EGA) und Arteria thoracica verfügen, welche sich durch den Blutbedarf der 14 Glandulae mamariae erklären lässt. Das Verhältnis zwischen Aorta und EGA beträgt im betrachteten Patientenkollektiv 1:0,15, bei den untersuchten Tieren 1:0,43, später bis 1:0,58. Eine Gefäßerweiterung um bis zu 210% erlaubt den symptomarmen bis –freien Verschluss der infrarenalen Aorta am Schwein bei klinisch unspezifischen Symptomen.

Die erhobenen Daten sollten bei Gefäßinterventionsstudien am Modell „Hausschwein“ beachtet und bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, obwohl das Modell als erprobt angesehen wird [61]. Beim Auftreten unspezifischer Symptome nach Gefäßinterventionen am Schwein sollte an dieses Krankheitsbild denken lassen, welches beim Menschen zudem oft letal verläuft [62-64].

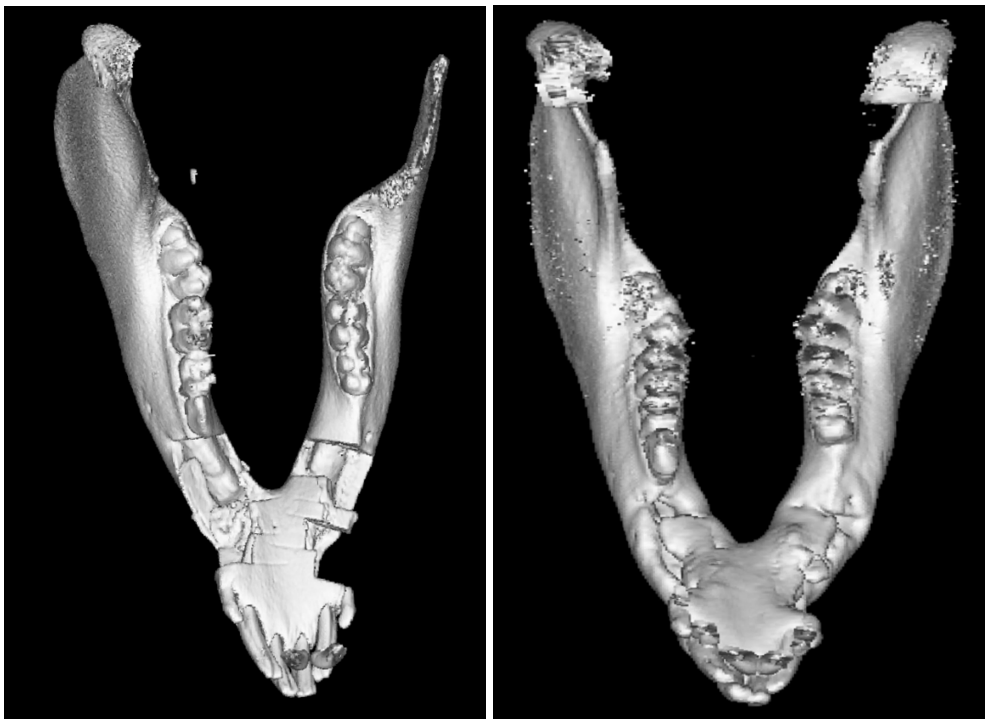
Haacke, N., J. K. Unger, C. Haidenhein, M. Russ, B. Hiebl and S. M. Niehues (2011). "Pig specific vascular anatomy allows acute infrarenal aortic occlusion without hind limb ischemia and stepwise occlusion without clinical signs." Clin Hemorheol Microcirc **48**(1): 173-185.

DOI: 10.3233/CH-2011-1401

### 2.3.2 CT-volumetrische Messungen der Knochenneubildung am Minipig (Originalarbeit 6)

Als „critical size defect“ (CSD) versteht man einen Knochendefekt bei abgeschlossenem Knochenwachstum, dessen Größe eine Spontanheilung durch Knochenneubildung nicht zulässt. Das Defektareal wird in dem Fall durch fibröses Gewebe gefüllt. Bei experimentellen Arbeiten am Kieferknochen wird aufgrund der vergleichbaren lamellären Knochenstruktur und Knochendichte häufig das Minipig als Tiermodell eingesetzt [65,66].

Für die Knochenregeneration des Kiefers vermutet man eine kritische Defektgröße bei  $5\text{cm}^3$  [67]. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden am Tiermodell des Minipigs Defekte von  $1,9\text{ cm}^3$ ,  $4,2\text{ cm}^3$  und  $10,1\text{ cm}^3$  in die Mandibula gesetzt und deren Heilung nach 6 Wochen mittels CT evaluiert. Durch eine CT-Volumetrie der Kieferknochen und der Defektareale nach Resektion und nach weiteren 6 Wochen konnte das Volumen der Knochenneubildung bestimmt werden. Der kleinste Defekt zeigte eine Knochenneubildung von 57,4% der initialen Defektgröße, der mittlere von 87,2% sowie der größte Defekt von 75,5% (Abb. 7, aus [6]).



*Abb. 7: Dreidimensionale Darstellung des Unterkiefers eines Minipigs unmittelbar nach der Osteotomie (links) und nach 6 Wochen (rechts). Noch unvollständige Heilung der*



*Defektfläche, jedoch Auffüllung aller Defektzonen mit Gewebe einer Dichte identisch mit der des nativen Unterkiefers (Abbildung aus [6], Originalarbeit Seite 703) .*

Verglichen mit anderen Studien, die eine Knochenbildung von 59% der Defektgröße nach 5 Wochen in CSD nachweisen konnten, wurde im untersuchten Kollektiv eine deutlich höhere Rate der Knochenneubildung gemessen. Durch den verlängerten Untersuchungszeitraum von 6 Wochen wird eine fortschreitende Knochenneubildung vermutet, die dem Konzept eines CSD widerspricht. Die Neubildung im größten Defektareal war zudem derart hoch, dass eine Defektgröße von 5 cm<sup>3</sup> als CSD in Frage gestellt wird.

Ruehe, B., S. Niehues, S. Heberer and K. Nelson (2009). "Miniature pigs as an animal model for implant research: bone regeneration in critical-size defects." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **108**(5): 699-706.

DOI: 10.1016/j.tripleo.2009.06.037

### **3. Diskussion**

In der biomedizinischen Forschung werden nach wie vor tierexperimentelle Untersuchungen eingesetzt. Dies betrifft die Bereiche Arzneimittelentwicklung, Entwicklung von Medizinprodukten, Forschung zu Krankheitsentstehung und –progression, Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie sowie zur Evaluation von operativen Verfahren. Die hier vorgelegten Arbeiten greifen die Bereiche der Anatomie und Physiologie [2,68,69], Pathophysiologie [5,6] und Medizinprodukteentwicklung [4] auf. In allen vorgelegten Studien konnte die CT die wesentliche Information zur Beantwortung der gestellten Fragestellungen beisteuern.

Die Vorstellung, dass der Einsatz der kontrastmittelgestützten CT einen Beitrag zur Verringerung, Verfeinerung oder Vermeidung von Tieruntersuchungen und damit zur Umsetzung des 3R-Konzeptes leisten kann, wurde in den vorliegenden Arbeiten ebenfalls bestätigt. Über die Fragestellung hinaus konnte in einigen Vorhaben eine zusätzliche Optimierung erreicht werden. Den größten Nutzen konnte die CT mit der Reduktion der benötigten Versuchstiere erzielen ([4]). Die hohe zeitliche und räumliche Auflösung führt zu erweitertem Erkenntnisgewinn, ohne dass die Tiere gefährdet werden. Zwischen- oder Todesfälle von Tieren in Zusammenhang mit den Untersuchungen am CT wurden bei allen durchgeführten Studien nicht beobachtet. Die einzige Komplikation, die im Laufe aller Studien aufgetreten ist, entstand durch ein Paravasat des Kontrastmittels bei der Injektion. Der venöse Zugang bei Hausschweinen und Minipigs erfolgt über die Ohrvenen, hier wurde aufgrund des Paravasates ein erhöhter Pflegeaufwand mit Verbänden notwendig. Im Verlauf der Studie erholte sich das Tier vollständig ohne Residuen.

Der Einsatz der CT führt zu einer Visualisierung des gesamten Studienobjektes, also auch der Bereiche, die nicht direkt im Fokus einer aktuellen Studie stehen. Infolge dessen ist es dieser gesamten Betrachtung geschuldet, dass sich oftmals ein Erkenntnisgewinn außerhalb der eigentlichen Fragestellung entwickelt. Die Analyse der arteriellen Kollateralkreisläufe bei Schweinen nach aortalem Teilersatz entwickelte sich aus der überraschenden Beobachtung der Toleranz dieser Tiere auf einen infrarenalen Aortenverschluss. Die Arbeit über das Gefäßsystem am Minipig greift auf Tiere zurück, die im Rahmen eines anderen Vorhabens untersucht und in einer Bilddatenbank archiviert wurden. Weitere Beobachtungen außerhalb

des eigentlichen Versuchszieles erfolgten in vielen weiteren Teilbereichen und konnten auch publiziert werden [70,71].

Weiterhin wurde durch die Menge an Untersuchungen ein Datenpool generiert, der für weitere Forschungsvorhaben zur Verfügung steht. Die Auswertung der Bilder mit weiteren Fragestellungen ist so jederzeit möglich und angestrebt. Die Beschreibung von Tieren dieses Datenpools werden in einigen Bereichen Einzelfallergebnisse sein, da das untersuchte Kollektiv derzeit nicht dem Anspruch repräsentativer Größe genügen kann.

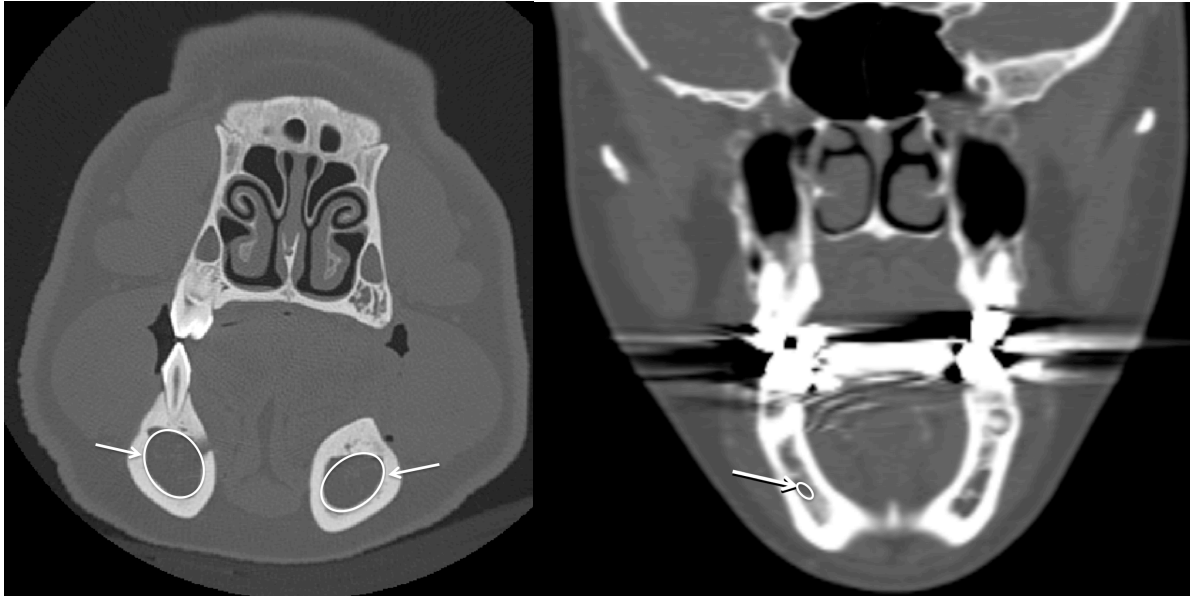
### **3.1 Vermeidung**

Der Einsatz bildgebender Verfahren stellt eine Ergänzung und Bereicherung tiermedizinischer Studien dar. Da ein Untersuchungsobjekt benötigt wird, kann Bildgebung allein nicht direkt zu einer Vermeidung von Tierversuchen führen.

Indirekt kann aber der Informationsgewinn, den Studien mit Bildgebung oder eine Bilddatenbank beinhalten, zur Vermeidung von Tierversuchen führen: Das Redefinieren von Tiermodellen stellt eine Hilfe für Forschungsgruppen dar, die sich Modell und Ablauf überlegen müssen:

In der vorgelegten Studie über Knochenneubildung bei verschiedenen Defektgrößen muss sowohl das Tiermodell selbst als auch die Translation auf den Kiefer des Menschen kritisch gesehen werden. Der Unterkiefer beim Minipig weicht erheblich von dem des Menschen ab, bedingt durch den Canalis mandibularis (s. Abb. 8).

Ein Defekt am Unterkiefer des Minipigs erzeugt eine kleine residuelle Knochenrestfläche, während beim Menschen ein Defekt gleicher Größe wesentlich mehr Knochenoberfläche als Ausgangspunkt für Knochenneubildung bietet. Mit dieser Erkenntnis muss das Modell Minipig zur Implantologieforschung kritisch betrachtet werden. Allerdings fanden Stadlinger et al. in einem Review immerhin 28 in-vivo-Studien zu Zahnimplantationen, die zwischen 1990 und 2011 das Tiermodell „Schwein“ eingesetzt haben [72]. Kenntnisse über die Limitation dieses Modells und deren Verbreitung können zur Vermeidung solcher Studien führen. Dieses Wissen erreicht man über die Verfeinerung, hier sind die Übergänge aufgrund des Zusammenhanges fließend. Kritisch muss angemerkt werden, dass eine Messbarkeit des gewünschten Effektes nur schwierig möglich ist.



**Abb. 8:** Coronare Darstellung des Kiefers eines Minipigs (links). Der Canalis mandibularis (Kreis mit Pfeil) nimmt beim Minipig ca. 60% des Unterkiefervolumens ein. Die coronare Darstellung beim Menschen (rechts) zeigt den Canalis mandibularis als winzige Struktur (Kreis mit Pfeil).

### 3.2 Verfeinerung

Das größte Potential bildgebender Verfahren liegt in der Verfeinerung der Tiermodelle. Die Modelle Hausschwein und Minipig weisen in vielen Bereichen Ähnlichkeiten mit dem Menschen auf und werden daher gern und zunehmend eingesetzt. Die Übertragbarkeit der aus solchen Versuchsvorhaben gewonnenen Information auf den Menschen ist allerdings nicht immer gewährleistet. Oftmals wird auch im Laufe einer Untersuchung eine Limitation des Modells offensichtlich, wie die vorgelegten Studien an Kieferknochen und Gefäßinterpositionen beispielhaft gezeigt haben [5,6].

Viele anatomische Informationen zu Hausschweinen und Minipigs sind nur über anatomische Lehrbücher zugänglich. Diese wiederum beschreiben den Status an toten und meist fixierten Tieren. Hierbei tritt das Problem auf, dass Unschärfen durch fixierungsbedingte Schrumpfung entstehen, zudem werden physiologische Schwankungen nicht berücksichtigt. In der Studie über die Venenmanschetten konnten Größenschwankungen cervikaler Venen von 44% dokumentiert werden [4]. Angaben über Gefäßlängen und -durchmesser konnten für die

Studie an der Aorta von Hausschweinen im Vorfeld nicht gefunden werden [5]. Infolge dessen entstand die Arbeit über Mikro- und Markomorphometrie an den Gefäßen der Göttinger Minipigs [68].

### **3.3 Verringerung**

Durch Anpassung des Studiendesigns kann der Einsatz von bildgebenden Verfahren zu einer Verringerung der Tierzahl innerhalb einer Studie führen: Während der klassische Versuchsablauf eine regelmäßige Tötung einzelner Tiere zur Analyse und Dokumentation vorsieht (Abb. 9a), kann diese Analyse und Dokumentation alternativ durch die CT erfolgen (Abb. 9b). Dadurch verringert sich die Anzahl der Tiere, die initial eingesetzt werden muss.



**Abb. 9a, b:** Exemplarische Darstellung eines klassischen Versuchsablaufes (a) bei einer *in-vivo*-Studie an Großtieren. Verringerung der eingesetzten Tiere durch den Einsatz bildgebender Verfahren (b).

### 3.4 Zwei- und dreidimensionale Reformatierungen

Der Nutzen zwei- und dreidimensionaler Reformatierungen liegt in der Informationskompression durch Bilder, die komplexe Zusammenhänge intuitiv begreifbar werden lassen. Die Stärken konnten sich in den Bereichen aller operativen Fächer nachweisen, beispielsweise bei der Visualisierung von Frakturen oder Osteosynthesematerial als auch bei der Darstellung von Gefäßen [73,74]. Dennoch geben die reformatierten Bilder nur die Informationen wieder, die in den Quellbildern bereits enthalten sind. Jeder Schritt der

Nachbearbeitung birgt die Gefahr für Fehler, sei es in der Gefäßsegmentierung oder der Messung von dreidimensional abgebildeten Strukturen in einem zweidimensionalen Bild [75-78].

Auf der anderen Seite sind exakte Messungen von Strukturen, die sich über eine lange Strecke durch den Volumendatensatz ziehen und Krümmungen/Biegungen aufweisen, nur durch angepasste Reformatierungen möglich. Ein Großteil der Gefäßmessungen aller hier verwendeten Arbeiten basiert auf gekrümmten Reformatierungen. Eine visuelle Plausibilitätsprüfung des Reformatierungspfades ist ebenso unerlässlich wie der sorgsame Umgang mit Messungen in Bildern, die keiner anatomisch klaren Ebene zugeordnet werden können.

### **3.5 Kritik am Modell von Russel und Burch**

Obwohl das Konzept von Russel und Burch viele Befürworter findet, wurde auch häufig Kritik an der Grundidee geübt. Das Konzept der 3R verhindert keine Versuche mit Tieren, sondern zielt im Wesentlichen auf den Aufbau der Tierversuche ab. Eine genaue Definition einer „Notwendigkeit“, einen Versuch am Tiermodell durchzuführen, wird nicht formuliert. Hürden oder Eingangsvoraussetzungen, die einen Tierversuch erlauben, werden ebenfalls nicht formuliert. Kritiker sehen die Hauptanwendung der 3R in der Reduktion eines möglichen Leidens oder Regulation von Versuchen, jedoch nicht in der Verhinderung unnötiger oder trivialer Vorhaben. Hinzu kommt das Problem, dass viele Versuche und deren Ergebnisse nicht den Weg in die Literatur finden, vor allem nicht, wenn das gewünschte Ergebnis nicht erreicht wird oder ein großer Konkurrenzdruck besteht. Daraus ergibt sich das Problem, dass weitere Arbeitsgruppen Fehler wiederholen können.

In den letzten Jahren haben sich viele alternative Testmethoden zu Tierversuchen entwickelt, in-vitro-Modelle wie EpiOcular™ oder Corrositex können Tests auf Hautirritation oder korrosive Eigenschaften mit gleicher Präzision und teilweise geringerem Zeitaufwand nachweisen, sind aber in der Regel auch kostenintensiver [79-83]. Diese Weiterentwicklung konnte von Russel und Burch nicht vorausgesehen werden und wurde daher auch nicht in dem Maße thematisiert, wie sie aktuell in der Literatur aufgegriffen wird. Konsens besteht aber dahingehend, dass wissenschaftlich etablierte Methoden mit dem Potential, Tierversuche komplett zu ersetzen, eingesetzt werden sollten. Der Impuls, Leiden zu verringern, die Anzahl der Versuche zu verringern und letztendlich die Versuche auch zu ersetzen, wird von allen



Parteien befürwortet. Die regelmäßige Aktualisierung der European Pharmacopoeia stellt ebenso einen wichtigen Hebel dar wie auch der Fokus auf die schnelle Etablierung und Zulassung der *in vitro*-Technik und Polymerasekettenreaktion (PCR) [84-87]. Die Weiterentwicklung und Aktualisierung der Arbeit von Russel und Burch wird von vielen Autoren vorgeschlagen, Cussler empfiehlt ein Reassessment als viertes R [88]. Damit greift er den Kritikpunkt der Notwendigkeit auf. Durch die Vorgaben der Europäischen Richtlinie und die fortschreitende Suche nach schnelleren und leistungsfähigeren Testmethoden erhält die Grundidee, Tierversuche durch Alternativen zu ersetzen, weiter Auftrieb. Bis dies möglich ist, müssen alle verfügbaren Techniken eingesetzt werden, die aus den verbleibenden Versuchen mit einem Minimum an Tieren die größtmögliche Ergebnisdichte erreichen. Der Einsatz bildgebender Verfahren hat sich bei Kleintieren mit der Biolumineszenz [89-91], oder zunehmend auch mit CT, MRT und Positronenemissionstomographie (PET) durchsetzen können [92,93]. Die vorgestellten Arbeiten konnten einen Beitrag auch für große Säugetiere nachweisen.

## 4. Zusammenfassung

In dieser Habilitationsarbeit wurde untersucht, inwiefern der Einsatz der Computertomographie mit nachfolgenden 2D- und 3D-Reformatierungen einen Beitrag in Tierexperimenten und zu dem 3R-Konzept in Form einer Verringerung, Verfeinerung und Vermeidung von Tierversuchen leisten kann.

Gerade computertomographische Untersuchungen besitzen aufgrund der kurzen Akquisitionszeit einen hohen Wert bei der umfassenden Auswertung von tierexperimentellen Versuchsvorhaben. Die risikoarme Darstellung des Versuchstieres mittels CT sowie die Nachverarbeitung der Volumendatensätze ermöglicht die Beantwortung von Fragen weit über die initiale Fragestellung hinaus. Die hier dargestellten Arbeiten belegen den Wert der CT für tierexperimentelle Studien und in den Bereichen Vermeidung, Verfeinerung und Verringerung nach den 3R-Prinzipien von Russel und Burch:

So konnten pulmonale Veränderungen mittels CT nachgewiesen werden, die den Einfluss unphysiologischer Positionierung auf Lungenperfusion und-ventilation widerspiegelt (s. Seite 13). Ebenso konnten bildmorphologisch die Einschränkungen bei der venovenösen Haemofiltration erklärt und Alternativen aufgezeigt werden (s. Seite 23).

Zur **Verfeinerung** des Tiermodells „Minipig“ wurden die zentralen Gefäße in vivo mittels CT zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und zur Histologie korreliert. Damit wurde erstmalig ein Datenpool generiert, der ohne Einschränkung von Fixierung und Schrumpfung das widerspiegelt, was intraoperativ oder interventionell vorgefunden werden wird (s. Seite 35). Zudem konnte der Einfluss von Gewicht und Wachstum auf das Gefäßsystem von Minipigs im untersuchten Alter zwischen 16 und 20 Monaten relativiert werden.

Die Evaluation einer Venenmanschette, die auf Ortsständigkeit, Funktion und Biokompatibilität getestet wurde, greift bis zum Finaltag ausschließlich auf CT-Datensätze zurück. Aufgrund des Einsatzes der CT konnten alle wesentlichen Fragen im Verlauf des Versuches ohne serielle Tötung der Tiere beantwortet werden. Der Aspekt der **Verringerung** (weniger Tiere zur vollständigen Beantwortung der Hypothesen) konnte hier aufgegriffen und erfolgreich umgesetzt werden (s. Seite 40).

Zwei Aspekte physiologischer und pathophysiologischer Veränderungen wurden erfolgreich mittels computertomographischer Volumendatensätze dargestellt: So wurde nachgewiesen und

bildmorphologisch aufgearbeitet, dass -und wie- ein vollständiger Verschluss der Aorta bei weiblichen Hausschweinen aufgrund stark ausgeprägter Kollateralkreisläufe weitestgehend ohne klinische Symptome kompensiert werden kann (s. Seite 51). Zuletzt wurde durch die Betrachtung von Knochendefekten am Unterkiefer von Minipigs das Konzept der kritischen Defektgröße in Frage gestellt. Bei unterschiedlichen Defektgrößen weit über der als kritisch betrachteten Defektgröße zeigte sich im CT und auch volumetrisch eine ausgedehnte Knochenneubildung (s. Seite 65). Gleichzeitig konnten in dieser Studie auch die Limitationen eines Tiermodelles und die Folgen artspezifischer Besonderheiten aufgegriffen und bildmorphologisch belegt werden. Das hier gewonnen Wissen kann zur **Vermeidung** von eingeschränkt-aussagekräftigen Versuchsvorhaben eingesetzt werden, da diese Daten einmal mehr zeigen, dass ein an sich etabliertes Tiermodell aufgrund unzureichender physiologischer Deskription kritisch hinterfragt werden muss.

Zuletzt ermöglicht ein Datenpool aus allen durchgeführten Studien an Hausschweinen und Minipigs eine Auswertung der Datensätze mit neuen Fragestellungen ohne weitere Versuche oder Messungen. Beispielhaft sei hier auf Originalarbeit 3 verwiesen, die ohne zusätzliche Untersuchungen auskommt und sich auf die vorhandenen Daten des Bildarchives stützt. Fragestellungen zum muskuloskelettalen System, zu Reifung und Wachstum können aus einem solchen Pool beispielsweise beantwortet oder geplante Versuchsvorhaben optimiert werden. Der Einsatz bildgebender Verfahren bietet somit ein Potential, welches weit über die initialen Fragestellungen eines Versuches hinausgeht.

## 5. Publikationen, die dieser Arbeit zugrunde liegen

1. Niehues SM, Müller C, Plendl J, Richardson KC, Gemeinhardt O, Hünigen H, Unger JK, Jung F, Hamm B, Hiebl B.

The effect of prone versus supine positioning of Goettingen minipigs on lung density as viewed by computed tomography. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2012;52(2-4):85-92. doi: 10.3233/CH-2012-1586.

2. Unger J. K., Pietzner K., Francis R. C., Birnbaum J., Theisen M. M., Lemke A. J., Niehues S. M.

Dual-lumen catheters for continuous venovenous hemofiltration: limits for blood delivery via femoral vein access and a potential alternative in an experimental setting in anesthetized pigs. *Critical Care*, 11, 2007, R18

3. Hiebl B., Müller C., Jung F., Hünigen H., Hamm B., Plendl J., Niehues S. M.

Macro- and micromorphometric studies of the vascular structures from the Göttingen® minipig. *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology*, 13, 2009, 318-321

4. Hiebl B., Müller C., Gors J., Jung F., Lendlein A., Junger M., Hamm B. Niehues S. M.

A NiTi alloy-based cuff for external banding valvuloplasty: a six-week follow-up study in pigs. *Phlebology*, 27, 2011, 337-346

5. Haacke N., Unger J. K., Haidenhein C., Russ M., Hiebl B., Niehues S. M.

Pig specific vascular anatomy allows acute infrarenal aortic occlusion without hind limb ischemia and stepwise occlusion without clinical signs. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 48, 2011, 173-185

6. Ruehe B., Niehues S., Heberer S., Nelson K.

Miniature pigs as an animal model for implant research: bone regeneration in critical-size defects. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*, 108, 2009, 699-706

## 6. Literatur

1. Russell WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen; 1959
2. Niehues SM, Müller C, Plendl J et al. The effect of prone versus supine positioning of Goettingen minipigs on lung density as viewed by computed tomography. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2012; 52: 85-92
3. Lüdemann L, Nafz B, Elsner F et al. Dependence of renal blood flow on renal artery stenosis measured using CT angiography. *Fortschr Röntgenstr* 2011; 183: 267-273
4. Hiebl B, Müller C, Gors J et al. A NiTi alloy-based cuff for external banding valvuloplasty: a six-week follow-up study in pigs. *Phlebology / Venous Forum of the Royal Society of Medicine* 2011; 27: 337-346
5. Haacke N, Unger JK, Haidenhein C et al. Pig specific vascular anatomy allows acute infrarenal aortic occlusion without hind limb ischemia and stepwise occlusion without clinical signs. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2011; 48: 173-185
6. Ruehe B, Niehues S, Heberer S et al. Miniature pigs as an animal model for implant research: bone regeneration in critical-size defects. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2009; 108: 699-706
7. Lüdemann L, Nafz B, Elsner F et al. Absolute quantification of regional renal blood flow in swine by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging using a blood pool contrast agent. *Investigative radiology* 2009; 44: 125-134
8. Glodek P ed. Entstehung und züchterische Fortentwicklung Berlin, Hamburg: Paul Parey; 1981
9. Lehmann H. The minipig in general toxicology. *Scand J Lab Anim Sci* 1998; 25: 59-62
10. Mahl JA, Vogel BE, Court M et al. The minipig in dermatotoxicology: methods and challenges. *Exp Toxicol Pathol* 2006; 57: 341-345
11. Swindle MM, Smith AC, Laber-Laird K et al. Swine in biomedical research: management and models. *ILAR News* 1994; 36: 1-5
12. Henke J, Brill T, Feußner H. Experimentelle Medizin: Vom Tiermodell zur Computeranimation. *Arzt Krankenh* 2005; 11: 329-335
13. Balls M, Clothier R. Differentiated cell and organ culture in toxicity testing. *Acta pharmacologica et toxicologica* 1983; 52 Suppl 2: 115-137
14. Smyth D. Alternatives to Animal Experiments. London: Scholar Press; 1978

15. Katayama H, Yamaguchi K, Kozuka T et al. Adverse reactions to ionic and nonionic contrast media. A report from the Japanese Committee on the Safety of Contrast Media. *Radiology* 1990; 175: 621-628
16. Almen T. The etiology of contrast medium reactions. *Investigative radiology* 1994; Suppl. 1, 29: 37-45
17. Suzuki K, Morita S, Masukawa A et al. Utility of CT perfusion with 64-row multi-detector CT for acute ischemic brain stroke. *Emergency radiology* 2011; 18: 95-101
18. König M. Brain perfusion CT in acute stroke: current status. *European journal of radiology* 2003; 45 Suppl 1: S11-22
19. Lin WC, Lin CH, Chen JH et al. Computed tomographic imaging in determining the need of embolization for high-grade blunt renal injury. *The journal of trauma and acute care surgery* 2013; 74: 230-235
20. Soto JA, Anderson SW. Multidetector CT of blunt abdominal trauma. *Radiology* 2012; 265: 678-693
21. Munera F, Rivas LA, Nunez DB, Jr. et al. Imaging evaluation of adult spinal injuries: emphasis on multidetector CT in cervical spine trauma. *Radiology* 2012; 263: 645-660
22. Singh AK, Hiroyuki Y, Sahani DV. Advanced postprocessing and the emerging role of computer-aided detection. *Radiologic clinics of North America* 2009; 47: 59-77
23. Firouzian A, Manniesing R, Metz CT et al. Quantification of intracranial aneurysm morphodynamics from ECG-gated CT angiography. *Academic radiology* 2013; 20: 52-58
24. Alhonnoro T, Pollari M, Lilja M et al. Vessel segmentation for ablation treatment planning and simulation. *Medical image computing and computer-assisted intervention : MICCAI International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention* 2010; 13: 45-52
25. Melissano G, Civilini E, Bertoglio L et al. Angio-CT imaging of the spinal cord vascularisation: a pictorial essay. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2010; 39: 436-440
26. Churchill RJ, Wesbey G, 3rd, Marsan RE et al. Computed tomographic demonstration of anomalous inferior vena cava with azygos continuation. *J Comput Assist Tomogr* 1980; 4: 398-402
27. Gouliamos A, Striggaris K, Haliasos N et al. The diagnostic importance of the recognition of the inferior vena cava abnormalities on CT-examinations. *Der Radiologe* 1981; 21: 437-440
28. Gomes MN, Choyke PL. Assessment of major venous anomalies by computerized tomography. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1990; 31: 621-628

29. Hazirolan T, Oz M, Turkbey B et al. CT angiography of the renal arteries and veins: normal anatomy and variants. *Diagn Interv Radiol* 2010; 17: 67-73
30. Lenhard M, Johnson T, Weckbach S et al. Three-dimensional pelvimetry by computed tomography. *La Radiologia medica* 2009; 114: 827-834
31. Saba L, Pascalis L, Mallarini G. Multi-detector-row CT of muscles with volume rendering technique. *Panminerva medica* 2009; 51: 43-49
32. Rubin GD. 3-D imaging with MDCT. *European journal of radiology* 2003; 45 Suppl 1: S37-41
33. Jolliet P, Watremez C, Roeseler J et al. Comparative effects of helium-oxygen and external positive end-expiratory pressure on respiratory mechanics, gas exchange, and ventilation-perfusion relationships in mechanically ventilated patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Intensive care medicine* 2003; 29: 1442-1450
34. Kaza AK, Cope JT, Fiser SM et al. Contrasting natures of lung growth after transplantation and lobectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123: 288-294
35. Lichtwarck-Aschoff M, Nielsen JB, Sjostrand UH et al. An experimental randomized study of five different ventilatory modes in a piglet model of severe respiratory distress. *Intensive care medicine* 1992; 18: 339-347
36. Mitchell HW, Turner DJ, Noble PB. Cholinergic responsiveness of the individual airway after allergen instillation in sensitised pigs. *Pulm Pharmacol Ther* 2004; 17: 81-88
37. Schwarzkopf K, Schreiber T, Gaser E et al. The effects of xenon or nitrous oxide supplementation on systemic oxygenation and pulmonary perfusion during one-lung ventilation in pigs. *Anesth Analg* 2005; 100: 335-339
38. Sommerer D, Suss R, Hammerschmidt S et al. Analysis of the phospholipid composition of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from man and minipig by MALDI-TOF mass spectrometry in combination with TLC. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35: 199-206
39. Sylvin H, Weitzberg E, Alving K. Endothelin-induced vascular and bronchial effects in pig airways: role in acute allergic responses. *J Appl Physiol* 2002; 93: 1608-1615
40. Engelhardt Wv. Untersuchungen am Schwein über die Systolen- und Diastolendauer des Herzens und über den Blutdruck in der Ruhe und während der Erholung nach körperlicher Belastung. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 1963; 10: 39-50
41. Kronberger H. Electrocardiographic studies on the relationship between systole and diastole in native domestic pigs, Chinese masked pigs, Vietnamese pigs with pendulous abdomen and European wild pigs. *Arch Exp Veterinarmed* 1966; 20: 1049-1056
42. Spörri H. Warum ist das Schwein für den Herztod prädisponiert? *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 1954; 1: 799-800

43. Baldwin I, Bellomo R, Koch B. Blood flow reductions during continuous renal replacement therapy and circuit life. *Intensive care medicine* 2004; 30: 2074-2079
44. Tal MG, Peixoto AJ, Crowley ST et al. Comparison of side hole versus non side hole high flow hemodialysis catheters. *Hemodialysis international International Symposium on Home Hemodialysis* 2006; 10: 63-67
45. Ribot S, Siddiqi SW, Chen C. Right heart complications of dual lumen tunneled venous catheters in hemodialysis patients. *The American journal of the medical sciences* 2005; 330: 204-208
46. Tokgoz H, Onaran M, Senocak C et al. Temporary vascular access via the external iliac vein as a salvage procedure: a report of two cases. *The journal of vascular access* 2005; 6: 200-202
47. Unger JK, Janssen VR, Kashefi A et al. Enhancing filtration rates by the use of blood flow around the capillaries of plasmafilters: an in vitro study. *The International journal of artificial organs* 2001; 24: 821-831
48. Maeda N, Shiga T. Opposite effect of albumin on the erythrocyte aggregation induced by immunoglobulin G and fibrinogen. *Biochimica et biophysica acta* 1986; 855: 127-135
49. Schnoor J, Schreck R, Baumert JH et al. Influence of differences in body weight and volume management on experimental results in porcine models. *The International journal of artificial organs* 2004; 27: 924-934
50. Stefanidis I, Heintz B, Frank D et al. Influence of hematocrit on hemostasis in continuous venovenous hemofiltration during acute renal failure. *Kidney international Supplement* 1999: S51-55
51. Kohn F, Sharifi AR, Malovrh S et al. Estimation of genetic parameters for body weight of the Goettingen minipig with random regression models. *Journal of animal science* 2007; 85: 2423-2428
52. Kohn F, Sharifi AR, Simianer H. Modeling the growth of the Goettingen minipig. *Journal of animal science* 2007; 85: 84-92
53. Schade I, Knaut M, Plotze K et al. Development of an animal model: a key role in investigational research. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2008; 39: 359-362
54. Stubhan M, Markert M, Mayer K et al. Evaluation of cardiovascular and ECG parameters in the normal, freely moving Göttingen Minipig. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2008; 57: 202-211
55. Müller C. Computertomographisch gestützte Makro- und Mikromorphometrie von Blutgefäßen des Göttingen Minipigs: Ein Beitrag zum Refinement biomedizinischer Forschungsansätze. In, *Fachbereich Veterinärmedizin*. Berlin: Freie Universität Berlin; 2011



56. Edwards JE, Edwards EA. The saphenous valves in varicose veins. *Am Heart J* 1940; 19: 338-351
57. Corcos L, Peruzzi G, Romeo V et al. Preliminary results of external valvuloplasty in sapheno-femoral junction insufficiency. *Phlebology / Venous Forum of the Royal Society of Medicine* 1989; 3: 197-202
58. Corcos L, Peruzzi G, Romeo V et al. Valvuloplastie externe de la jonction saphéno-femorale. *Phlebology / Venous Forum of the Royal Society of Medicine* 1991; 44: 497-508
59. Guarnera G, Furgiuele S, Camilli S. The role of external banding valvuloplasty with the veno cuff in the treatment of primary deep venous insufficiency. *Phlebology / Venous Forum of the Royal Society of Medicine* 1994; 9: 150-153
60. Heising S, Haase H, Sippel K et al. Cutaneous vasomotion in patients with chronic venous insufficiency and the influence of compression therapy. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2009; 41: 57-66
61. Bunger CM, Grabow N, Hauenstein K et al. Anastomotic stenting in a porcine aortoiliac graft model. *Laboratory animals* 2007; 41: 71-79
62. Tsushimi T, Furukawa S, Gohra H et al. Nonocclusive mesenteric ischemia after aorto-iliac reconstruction of a ruptured abdominal aortic aneurysm: report of a case. *Surg Today* 2003; 33: 922-924
63. Liao SL, Luthra M, Rogers KM. Leriche syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 2009; 54: e11
64. Ruehm SG, Weishaupt D, Debatin JF. Contrast-enhanced MR angiography in patients with aortic occlusion (Leriche syndrome). *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 2000; 11: 401-410
65. Mosekilde L, Kragstrup J, Richards A. Compressive strength, ash weight, and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs. *Calcified tissue international* 1987; 40: 318-322
66. Aerssens J, Boonen S, Lowet G et al. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 1998; 139: 663-670
67. Henkel KO, Gerber T, Dorfling P et al. Repair of bone defects by applying biomatrices with and without autologous osteoblasts. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2005; 33: 45-49
68. Hiebl B, Müller C, Jung F et al. Macro- and micromorphometric studies of the vascular structures from the Göttingen® minipig. *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology* 2009; 4: 313-321

69. Unger JK, Pietzner K, Francis RC et al. Dual-lumen catheters for continuous venovenous hemofiltration: limits for blood delivery via femoral vein access and a potential alternative in an experimental setting in anesthetized pigs. *Critical care* 2007; 11: R18
70. Ruehe B, Kershaw O, Niehues S et al. Sudden death in miniature pigs. *Lab animal* 2008; 37: 65-66, 68-69
71. Theisen MM, Maas M, Hartlage MA et al. Ventral recumbency is crucial for fast and safe orotracheal intubation in laboratory swine. *Laboratory animals* 2009; 43: 96-101
72. Stadlinger B, Pourmand P, Locher MC et al. Systematic review of animal models for the study of implant integration, assessing the influence of material, surface and design. *Journal of clinical periodontology* 2012; 39 Suppl 12: 28-36
73. Burkhardt M, Gansslen A, Uder M et al. New possibilities in fracture visualization by means of CT: reconstructions, 3D plannings--difficult joint fractures--modern management--improved visualization and operative planning in joint fractures. *Zentralblatt fur Chirurgie* 2003; 128: 34-39
74. Grieser C, Denecke T, Steffen IG et al. Multidetector computed tomography for preoperative assessment of hepatic vasculature and prediction of splenic artery steal syndrome in patients with liver cirrhosis before transplantation. *European radiology* 2010; 20: 108-117
75. Lell MM, Anders K, Uder M et al. New techniques in CT angiography. *Radiographics: a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 2006; 26 Suppl 1: S45-62
76. Nakanishi T, Kayashima Y, Inoue R et al. Pitfalls in 16-detector row CT of the coronary arteries. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 2005; 25: 425-438; discussion 438-440
77. Takhtani D. CT neuroangiography: a glance at the common pitfalls and their prevention. *AJR American journal of roentgenology* 2005; 185: 772-783
78. Tomandl BF, Kostner NC, Schempershofe M et al. CT angiography of intracranial aneurysms: a focus on postprocessing. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 2004; 24: 637-655
79. Pfannenbecker U, Bessou-Touya S, Faller C et al. Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular reconstituted human tissue test method for the prediction of eye irritation. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2012:
80. Hayashi K, Mori T, Abo T et al. Two-stage bottom-up tiered approach combining several alternatives for identification of eye irritation potential of chemicals including insoluble or volatile substances. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2012; 26: 1199-1208

81. Forsby A, Norman KG, El Andaloussi-Lilja J et al. Using novel in vitro NociOcular assay based on TRPV1 channel activation for prediction of eye sting potential of baby shampoos. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2012; 129: 325-331
82. Leist M, Lidbury BA, Yang C et al. Novel technologies and an overall strategy to allow hazard assessment and risk prediction of chemicals, cosmetics, and drugs with animal-free methods. *Altex* 2012; 29: 373-388
83. Mehling A, Eriksson T, Eltze T et al. Non-animal test methods for predicting skin sensitization potentials. *Archives of toxicology* 2012; 86: 1273-1295
84. Halder M. Three Rs potential in the development and quality control of immunobiologicals. *Altex* 2001; 18 Suppl 1: 13-47
85. Dodet B, Hesselink W, Jungback C et al. Viral safety and extraneous agents testing for veterinary vaccines. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 2010; 38: 326-331
86. Motitschke A, Ottiger HP, Jungback C. Evaluation of the sensitivity of PCR methods for the detection of extraneous agents and comparison with in vivo testing. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 2010; 38: 389-392
87. Jungback C, Motitschke A. Extraneous agents testing for substrates of avian origin and viral vaccines for poultry: current provisions and proposals for future approaches. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 2010; 38: 362-365
88. Cussler K. A 4R concept for the safety testing of immunobiologicals. *Developments in biological standardization* 1999; 101: 121-126
89. Hochgrafe K, Mandelkow EM. Making the Brain Glow: In Vivo Bioluminescence Imaging to Study Neurodegeneration. *Molecular neurobiology* 2012:
90. Müller J, Wunder A, Licha K. Optical imaging. Recent results in cancer research *Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* 2013; 187: 221-246
91. Kelkar M, De A. Bioluminescence based in vivo screening technologies. *Current opinion in pharmacology* 2012; 12: 592-600
92. Koba W, Jelicks LA, Fine EJ. MicroPET/SPECT/CT Imaging of Small Animal Models of Disease. *The American journal of pathology* 2013; 182: 319-324
93. Masuda H, Okano HJ, Maruyama T et al. In vivo imaging in humanized mice. *Current topics in microbiology and immunology* 2008; 324: 179-196

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Bernd Hamm, der mir an der Charité eine ausgezeichnete klinische und wissenschaftliche Ausbildung ermöglicht hat. Die erfahrene Freiheit, an Projekten weit über die Grenzen der klassischen Radiologie mitzuwirken, ist nicht selbstverständlich. Sein Vertrauen und stete Unterstützung auch in aufgewühlten Zeiten haben mich stets begleitet und diese Arbeit erst ermöglicht.

Weiterer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. med. vet. Juliane Unger und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Bernhard Hiebl für ihre Kooperation, den Rat und die vielen Informationen und Erklärungen, die jedes dieser Projekte so unendlich bereichert haben.

Ein vielbeachteter Kollege aus den ersten Tagen meiner Tätigkeit riet mir, immer diejenigen Kollegen in wissenschaftlichen Arbeiten als Autoren zu berücksichtigen, die mich am wenigsten behindert hätten - ein Rat, dem ich glücklicherweise nie folgen musste.

Die Arbeit wäre ohne die angenehme Teamarbeit mit meinen Kollegen, MTRAs und Kooperationspartnern der Charité – Universitätsmedizin Berlin nicht möglich gewesen. Allen sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meiner Frau, für ihre verständnisvolle Geduld, Zeit und den steten Ansporn danken.

## **Eidesstattliche Erklärung**

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
  
- die vorliegende Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen / Wissenschaftlern und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
  
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

18. Juli 2013