



KU LEUVEN
FACULTEIT GENEESKUNDE
BIOMEDISCHE WETENSCHAPPEN

Multimodale beeldvorming voor de visualisatie en kwantificatie van longfibrose en pulmonaire cryptococcose in de muis

Masterproef voorgedragen
tot het behalen van de
graad van Master of Science in de
biomedische wetenschappen
door **Jennifer Deborah POELMANS**

Promotor: Prof. dr. Uwe HIMMELREICH
Faculteit Geneeskunde
Departement Beeldvorming & Pathologie
Biomedische MRI eenheid

Begeleidster: Dr. Greetje VANDE VELDE

Leuven, 2013

Dit proefschrift is een examendocument dat na verdediging niet werd gecorrigeerd voor eventueel vastgestelde fouten. In publicaties mag naar dit werk gerefereerd worden, mits schriftelijke toelating van de promotor(en) die met naam vermeld zijn op de titelpagina.



KU LEUVEN
FACULTEIT GENEESKUNDE
BIOMEDISCHE WETENSCHAPPEN

Multimodale beeldvorming voor de visualisatie en kwantificatie van longfibrose en pulmonaire cryptococcose in de muis

Masterproef voorgedragen
tot het behalen van de
graad van Master of Science in de
biomedische wetenschappen
door **Jennifer Deborah POELMANS**

Promotor: Prof. dr. Uwe HIMMELREICH
Faculteit Geneeskunde
Departement Beeldvorming & Pathologie
Biomedische MRI eenheid

Begeleidster: Dr. Greetje VANDE VELDE

Leuven, 2013

WOORD VOORAF

Het einde van mijn studie komt stilaan in zicht, bijna ben ik klaar om een volgende grote stap te zetten in mijn leven. Maar voor het zover is, heb ik eerst nog de kans om het resultaat van een jaar hard werken te tonen aan de wereld: mijn Masterthesis. Dit werk is natuurlijk tot stand gebracht met de hulp van een heleboel mensen, die ik bij deze hartelijk zou willen bedanken.

Graag zou ik prof. Uwe Himmelreich willen bedanken om me de kans te geven om een jaar lang in het MoSAIC te werken. Het was een zeer leerrijke periode waarin ik veel nieuwe ervaringen heb opgedaan, zoals voor de allereerste keer op congres gaan. Ook zou ik mijn begeleidster Dr. Greetje Vande Velde willen bedanken voor een fantastisch thesisjaar om nooit meer te vergeten. Je enorme enthousiasme en passie voor het onderzoek zijn het afgelopen jaar een bron van inspiratie voor mij geweest. Dankzij jou heb ik geleerd om steeds positief te blijven denken en om in mezelf te geloven. Bedankt! Aan alle anderen in en rond het MoSAIC: bedankt dat ik steeds met al mijn vragen en problemen bij jullie terecht kon. Daarnaast wil ik Elien, Kristof en Bryan bedankten voor een supertof thesisjaar. We zijn een goed team!

Bedankt aan prof. Rik Lories en prof. Katrien Lagrou voor de aangename samenwerking. Bedankt Ellen De Langhe voor de uitleg en de hulp bij mijn experimenten en bedankt Ann Hens omdat je zelfs in de drukste periodes steeds voor mij klaarstond.

Graag wil ik mijn vriend Raf bedanken. De afgelopen 5 jaar ben jij mijn steun en toeverlaat geweest. Altijd stond je klaar voor mij, ook in die verschrikkelijk examenperiodes waarin ik er niet voor jou kon zijn. Samen staan we sterk! We zijn al tot hier geraakt en wie weet wat de toekomst nog zal brengen.

Mama en papa, bedankt om steeds achter al mijn keuzes te staan. Het was niet gemakkelijk voor jullie toen we beslisten om naar Leuven te trekken. Toch hebben jullie me altijd op alle manieren proberen helpen, zelfs in de zwaarste tijden. Al die hulp heeft me enorm goed vooruit geholpen. Ik heb hard gewerkt en hoop dat jullie trots op me zijn.

Bedankt allemaal!

Jenny

KORTE SAMENVATTING

Over de hele wereld leiden miljoenen mensen aan chronische longaandoeningen. Voor veel longaandoeningen is de pathogenese nog grotendeels ongekend en bestaan er tot op heden geen afdoende behandeling. Bij longfibrose zorgt de vorming van littekenweefsel in de longen voor een belemmerd zuurstoftransport. *Cryptococcus neoformans* en *gattii* veroorzaken pulmonaire cryptococcose, een longinfectie die kan uitmonden in een levensbedreigende meningo-encefalitis. Preklinisch onderzoek naar de achterliggende pathologische processen is essentieel in de zoektocht naar nieuwe therapeutische strategieën. Daarbij spelen histologische technieken standaard een belangrijke rol, maar enkel met geavanceerde beeldvormingstechnieken zoals magnetische resonantiebeeldvorming (MRI) en computertomografie (CT) kan het dynamisch verloop van longaandoeningen niet-invasief opgevolgd worden in kleine proefdieren. Het gebruik van CT in longitudinale muislongstudies kan echter potentieel radiotoxische effecten teweegbrengen. We onderzochten verschillende long-CT scanprotocols en observeerden zelfs na drie maanden geen radiotoxiciteit-geïnduceerde longfibrose. We toonden aan dat de ontwikkeling van longfibrose *in vivo* veilig gevisualiseerd en gekwantificeerd kan worden met CT, alsook met drie verschillende MRI protocols die we hier evalueerden. Ook toonden we aan dat MRI en CT visuele en kwantitatieve informatie kunnen verschaffen over het verloop van pulmonaire cryptococcose in individuele muizen, lang voor het verschijnen van enige symptomen. Zo kunnen relevante tijdstippen geïdentificeerd worden voor verder onderzoek met histologische en microscopische technieken. Longfunctietesten en confocale endomicroscopie waren eveneens bruikbaar voor het evalueren van infectie, maar deze technieken zijn invasief en moeten dus beschouwd worden als eindpuntonderzoeken. Met het ontwikkelen van niet-invasieve beeldvormingmethoden willen we een bijdrage leveren in het onderzoek naar pathogenese en therapie van longaandoeningen.

ABSTRACT

All around the world, millions of people suffer from chronic respiratory diseases. The pathogenesis of many of these diseases is still not fully understood. Pulmonary fibrosis is such a disease, characterized by the excessive formation of scar tissue within the lungs. Pulmonary cryptococcosis is caused by the inhalation of *Cryptococcus* spores. It mostly affects the lungs, but in some cases it disseminates to the brain where it can cause life-threatening meningoencephalitis. Further preclinical research is crucial to investigate underlying pathological processes and potential new therapeutic strategies. Standard techniques like histology are essential to explore molecular and cellular events. However, advanced non-invasive imaging techniques like magnetic resonance imaging (MRI) and computed tomography (CT) are indispensable to dynamically monitor lung disease progression in small animal models. Longitudinal follow-up of lung disease progression with CT could raise some questions about possible radiotoxic effects. We therefore investigated different CT protocols, but no radiation induced lung fibrosis was observed up to three months. We showed that CT and three different MRI protocols can safely visualize and quantify disease progression in a mouse model of pulmonary fibrosis. CT and MRI can also provide visual and quantitative information on the progression of pulmonary cryptococcosis, long before phenotypical signs appear. Fibered confocal fluorescence microscopy and functional lung tests were also found to be suitable techniques to evaluate infection, but due to their invasive nature it is best to consider them as end-point measurements. This work will greatly help unraveling the still enigmatic pathogenesis of these life-threatening lung diseases.

LIJST MET AFKORTINGEN

2D	2-dimensionaal	kVp	kilovolt piek
3D	3-dimensionaal	M	molair
ANOVA	analysis of variance	MCh	methacholine
AUC	oppervlakte onder de curve	MRI	magnetische resonantiebeeldvorming
BAL	bronchalveolaire lavage	NaN ₃	natriumazide
BBB	bloed-hersenbarrière	NaOH	natriumhydroxide
C	compliantie	O ₂	zuurstof
CT	computertomografie	OCT	optische coherentietomografie
CZS	centraal zenuwstelsel	PAS	periodic acid schiff
E	elastantie	PBS	fosfaat-gebufferde zoutoplossing
EEV	eind-expiratoir volume	PCA	pyrrool-2-carboxylzuur
GFP	groen fluorescent proteïne	PET	positron emissie tomografie
EIV	eind-inspiratoir volume	PF	proflex
FA	fliphhoek	R	resistentie
FCFM	fibred confocal fluorescence microscopy	R ²	determinatiecoëfficiënt
FID	free inducing decay	RARE	rapid acquisition with relaxation enhancement
FLASH	fast low angle shot	RCF	relatieve centrifugale kracht
FRV	functioneel residueel volume	ROI	regio van interesse
Gy	gray	SD	standaard deviatie
HCl	waterstofchloride	SI	signaalintensiteit
H&E	haematoxyline-eosine-kleuring	T	tesla
H ₂ O	water	T ₁	spin-rooster relaxatie
IN	intranasaal	T ₂	spin-spin relaxatie
IP	intraperitoneaal	TE	echotijd
IPA	invasieve pulmonaire aspergillosis	TLC	totale longcapaciteit
IPF	idiopathische pulmonaire fibrose	TR	repetitietijd
IT	intratracheaal	UTE	ultrakorte echotijd
IV	intraveneus	vx	voxel
KVE	kolonievormende eenheden	WT	wildtype

INHOUDSOPGAVE

WOORD VOORAF	iv
KORTE SAMENVATTING.....	v
ABSTRACT.....	vi
LIJST MET AFKORTINGEN.....	vii
INHOUDSOPGAVE	viii
1. Inleiding	1
2. Literatuuroverzicht	3
2.1. CT versus MRI	3
2.2. Radiotoxiciteit	5
2.3. Pulmonaire fibrose	6
2.3.1. Het bleomycine diermodel	6
2.3.2. MRI voor het opvolgen van bleomycine-geïnduceerde longfibrose	8
2.3.3. CT voor het opvolgen van bleomycine-geïnduceerde longfibrose	8
2.4. Cryptococcosis	9
2.4.1. Niet-invasieve beeldvormingstechnieken	11
2.4.2. Longfunctietesten	12
3. Doelstellingen van deze thesis	13
4. Experimenteel werk	14
4.1. Materiaal en methoden.....	14
4.1.1. <i>Cryptococcus gattii</i>	14
4.1.2. Diermodellen.....	14
4.1.3. CT protocol	14
4.1.4. CT beeldanalyse	15
4.1.5. MRI	16
4.1.6. MRI beeldanalyse	16
4.1.7. Longfunctietesten	17
4.1.8. FCFM	17
4.1.9. Histologische kwantificatie van fibrose	18

4.1.10.	Histologie en KVE calculatie.....	18
4.1.11.	Statistische analyse	19
4.2.	Resultaten	19
4.2.1.	Onderzoek naar de potentiële radiotoxiciteit van longitudinale long-CT-scans	19
4.2.1.1.	Wekelijkse CT-scans gedurende 5 weken.....	20
4.2.1.2.	Twee CT-scans per week gedurende 5 weken	21
4.2.1.3.	Eenmalig acuut verhoogde stralingsdosis halverwege 5 weken	22
4.2.1.4.	Wekelijkse CT-scans gedurende 12 weken.....	23
4.2.1.5.	Histologie en hydroxyproline kwantificatie	24
4.2.2.	Validatie van MRI voor het visualiseren van longfibrose in het bleomycine muismodel	25
4.2.3.	Visualisatie van cryptococcale pneumonie met CT en MRI	29
4.2.3.1.	Longitudinale opvolging van pulmonaire cryptococcosse met MRI en CT.....	30
4.2.3.2.	Evaluatie van de longfunctie	32
4.2.3.3.	Evaluatie van longinfectie met FCFM.....	35
5.	Algemene bespreking.....	37
6.	Besluit	46
	LIJST VAN TABELLEN	47
	LIJST VAN FIGUREN.....	47
	LITERATUURLIJST.....	48

1. INLEIDING

Longfibrose, longemfyseem, astma en longkanker zijn slechts enkele voorbeelden van levensbedreigende longaandoeningen die voorkomen in de mens. Deze aandoeningen kunnen niet enkel de grote en kleine luchtwegen aantasten, maar ook de alveolen of het interstitium. Vaak zijn micro-organismen de oorzaak, denk maar aan pneumonie ten gevolge van een influenza besmetting, maar dit is niet altijd het geval. Ook andere factoren zoals omgevingsfactoren en geneesmiddelen kunnen een oorzakelijke rol spelen (1-3).

Pulmonaire fibrose is een veel voorkomende chronische longaandoening in de mens waarbij een zware inflammatie ter hoogte van de long leidt tot de vorming van littekenweefsel. Hierdoor wordt de gasuitwisseling bemoeilijkt en krijgt de patiënt last van kortademigheid. In veel gevallen is longfibrose het gevolg van de inhalatie van schadelijke stoffen of van de inname van bepaalde geneesmiddelen. De oorzakelijke factor is echter niet altijd te achterhalen en in dat geval spreekt men van idiopathische longfibrose. Het onderliggende moleculair mechanisme van deze aandoening is nog steeds niet volledig ontrafeld, waardoor men er nog niet in geslaagd is om een werkzaam geneesmiddel te vinden. Bovendien is de vorming van littekenweefsel een onomkeerbaar proces, waardoor een longtransplantatie op dit moment de enige succesvolle behandeling is. Om de moleculaire mechanismes gedetailleerd te onderzoeken en nieuwe therapieën te testen, zijn goede proefdiermodellen noodzakelijk. Het meest gebruikte diermodel op dit moment is bleomycine-geïnduceerde longfibrose in muizen (4). Histologie wordt beschouwd als de gouden standaard om het ziekteproces in deze muizen te onderzoeken. Deze techniek heeft echter als groot nadeel dat het niet herhaald toegepast kan worden op eenzelfde dier. Daarom is er nood aan een niet-invasieve manier om de voortgang van de aandoening en de eventuele effecten van therapie op te volgen.

In dit eindwerk werden zowel magnetische resonantiebeeldvorming (MRI) als computertomografie (CT) geëvalueerd om het ziekteproces in bleomycine-geïnduceerde muizen op een niet-invasieve manier en over een langere tijd op te volgen. Het is al aangetoond dat CT een goede techniek is om het ziekteverloop op te volgen (5), maar de herhaalde blootstelling aan röntgenstralen zou schadelijke gevolgen kunnen hebben. MRI wordt beschouwd als een interessant alternatief omdat deze techniek geen gebruik maakt van röntgenstralen en er bijgevolg geen radiotoxische effecten kunnen optreden. Naast het opvolgen van het ziekteverloop ligt onze interesse in het visualiseren van de overgang van inflammatie naar fibrose met MRI. Dit zou een mogelijkheid bieden om het therapeutisch potentieel van middelen specifiek tegen inflammatie en fibrose of beide te onderzoeken.

Ook micro-organismen kunnen longinfecties veroorzaken. Gisten, zoals *Cryptococcus neoformans* en *Cryptococcus gattii*, kunnen bij inhalatie een infectie veroorzaken van de long. Deze infectie kan zich verspreiden naar de hersenen waar het kan resulteren in een levensbedreigende meningo-encefalitis. Dit is hoofdzakelijk een probleem voor immuungecompromitteerde personen (6). Het exacte mechanisme waarmee de gistcellen door de bloed-hersenbarrière (BBB) dringen, is nog grotendeels ongekend (7-9).

Preklinisch onderzoek is dus cruciaal om enerzijds de pathogenese te ontrafelen en om anderzijds therapeutische doelwitten te identificeren. In knaagdieren is het echter een enorme uitdaging om de relevante tijdstippen voor *ex vivo* analyse te karakteriseren, omdat de geïnfecteerde dieren pas fenotypisch kenmerken vertonen als de ziekte zich in een lethaal stadium bevindt. Er is met andere woorden nood aan een niet-invasieve manier om het ziekteverloop op te volgen. Tot op heden is er echter nog geen geschikt beeldvormingprotocol beschikbaar.

Ook voor dit longinfectiemodel werd nagegaan of met een specifiek MRI en CT protocol de longinfectie niet-invasief gevisualiseerd en gekwantificeerd kan worden. Dit zou het mogelijk maken om de essentiële tijdstippen in de pathogenese vast te leggen voor verder moleculair en cellulair onderzoek. De MRI- en CT-resultaten werden enerzijds gevalideerd met longfunctietesten en door middel van confocale endomicroscopie (FCFM), en anderzijds met de standaard histologische en microscopische technieken. Dit is een nieuwe soort microscopie waarbij op basis van laserlicht *in vivo* fluorescente structuren gevisualiseerd kunnen worden op cellulair niveau.

Zoals eerder vermeld, kan radiotoxiciteit een probleem zijn indien op regelmatige basis CT-beelden genomen moeten worden. Vooral in kleine dieren zoals de muis is het relevant om na te gaan in welke mate de herhaaldelijke blootstelling aan straling schade veroorzaakt aan het weefsel. Het is immers onvermijdelijk dat muizen een hogere stralingsdosis ontvangen om een vergelijkbare resolutie te krijgen als in de mens (10). In dit eindwerk werd nagegaan in welke mate de blootstelling aan straling een invloed kan hebben op experimentele resultaten.

2. LITERATUUROVERZICHT

2.1. CT versus MRI

CT-beelden zijn gebaseerd op de attenuatie van X-stralen door weefsels. Tijdens een CT-scan worden projectiebeelden gemaakt, die vervolgens gereconstrueerd worden met een terugprojectie-algoritme. Het resultaat is een verzameling van 2-dimensionale (2D) transversale beelden die dankzij het isotropisch karakter van de voxels tegelijkertijd ook beschouwd kan worden als een 3-dimensionale (3D) volumetrische dataset (11). Dit maakt het mogelijk om met CT de ruimtelijke oriëntatie van weefsels te visualiseren (12). Dankzij het sterke contrast tussen lucht of bot en het omringend weefsel, is CT een goede modaliteit om morfologische veranderingen in zowel de long als het bot te onderzoeken (11). In onze groep werd eerder al aangetoond dat CT een niet-invasieve techniek is met een zeer hoge spatiale resolutie, waardoor de pathologische veranderingen in longfibrose nauwkeurig en over een langer tijdsverloop opgevolgd kunnen worden (13). Verder zijn de kosten betrekkelijk laag en is de acquisitietijd behoorlijk snel (14). Daarnaast heeft onderzoek uitgewezen dat CT-data minder beïnvloed wordt door een eventueel ongelijkmatige verdeling van schade over de verschillende longlobben omdat de volledige thorax in beschouwing genomen wordt (15). Ondanks al deze sterke punten, vertoont CT ook enkele zwaktes (Tabel 1). Zachte weefsels zoals de lever contrasteren slecht met het omringende weefsel. Zulke organen kunnen bijgevolg enkel duidelijk gevisualiseerd worden met behulp van contraststoffen (16). In de long is het door een gebrek aan specificiteit niet mogelijk om een onderscheid te maken tussen inflammatie en fibrose (15). Daarnaast bestaat er een risico op radiotoxische effecten door de blootstelling aan ioniserende straling. Vooral bij herhaald scannen mag de stralingsdosis dus zeker niet uit het oog verloren worden (17).

MRI is een niet-ioniserend alternatief voor CT. Bij proton MRI is het gedetecteerde signaal evenredig met de protodensiteit in de weefsels. Het visualiseren van de long met deze techniek is echter niet vanzelfsprekend omdat 80% van het longvolume bestaat uit lucht (18). De protodensiteit is met andere woorden laag, waardoor het gedetecteerde MR signaal bij benadering tien keer zwakker is dan voor andere weefsels (19, 20). Toch wordt MRI zowel klinisch als preklinisch gebruikt om longfibrose te onderzoeken (20,21), voornamelijk omdat oedeem in de longen gedetecteerd kan worden zonder rekening te hoeven houden met radiotoxische effecten (19). Uit verschillende studies blijkt dat zulke vochttopstapelingen gekarakteriseerd wordt door een verlengde spin-rooster (T_1)- en spin-spin (T_2)-relaxatie, waardoor een hoge signaalintensiteit zichtbaar is op T_1 - en T_2 - gewogen beelden (22,23). Zoals bij CT, heeft ook MRI sterke als zwakke punten (Tabel 1). In vergelijking met CT kan een hogere temporele resolutie bereikt worden in longitudinale studies. Er hoeft immers geen rekening gehouden te worden met mogelijk radiotoxische effecten (24). In tegenstelling tot CT heeft MRI een hoge gevoeligheid om veranderingen in zacht weefsel te detecteren (25). Met de huidige beschikbare protocols kan men echter nog geen onderscheid maken tussen inflammatie en fibrose in de long (15,26).

Contraststoffen zoals collageen bindende stoffen op basis van gadolinium zouden een mogelijke oplossing kunnen bieden (27). Ten opzichte van CT is de spatiale resolutie van MRI ook wat lager (28).

Bij beide beeldvormingstechnieken zorgen zowel de ademhaling als de hartslag voor bewegingsartefacten met een sterke daling in beeldkwaliteit als gevolg (29). Dit probleem kan aangepakt worden door prospectieve of retrospectieve ademhalingsregistratie toe te passen (13). Er zijn verschillende prospectieve registratiemethoden beschreven in de literatuur. Bij een vrij ademend knaagdier kan de beweging van het diafragma gevolgd worden met behulp van een drukkamer. Deze beweging wordt dan omgezet naar een spanningssignaal, dat gebruikt wordt om de beeldacquisitie aan te sturen. Zo kunnen enkel beelden genomen worden in de eindfase van de expiratie, wanneer beweging tot een minimum beperkt is (30). Mechanisch ventileren is een alternatieve manier om een signaal te verkrijgen waarmee de beeldacquisitie aangestuurd kan worden. Intubatie van de muis of rat is hierbij een vereiste, waardoor er een risico bestaat dat de trachea beschadigd raakt (31). Bij retrospectieve ademhalingsregistratie worden continu beelden genomen in een vrij ademend dier. Naderhand worden deze beelden opgedeeld naargelang de ademhalingsfase waarin ze genomen zijn. Er zijn verschillende manieren om deze fase te bepalen. In een eerste benadering wordt de thoracale beweging van een vrij ademend dier geregistreerd tijdens het scannen (13,19). In een alternatieve benadering wordt na beeldacquisitie de totale intensiteit in de longen bepaald. Deze intensiteit verandert doorheen de ademhalingscyclus en kan gebruikt worden om een ademhalingscurve op te stellen. Deze curve kan dan gebruikt worden om de beelden uit dezelfde ademhalingsfase te filteren. Een voordeel van retrospectieve ademhalingsregistratie is de mogelijkheid om te beschikken over beelden van verschillende ademhalingsfases. Een nadeel is de significante toename in hoeveelheid data bij zowel MRI als CT en een significante toename in stralingsdosis bij CT (19,30).

Voor CT staat intussen vast dat het een uitermate geschikte techniek is voor het in beeld brengen van longaandoeningen in knaagdieren (13), maar MRI wint steeds meer aan belang dankzij de talrijke inspanningen om deze techniek te verbeteren voor beeldvorming van de longen (28). Zo is er grote interesse in het gebruik van de ultrakorte echotijd (UTE)-sequentie. Bij deze sequentie duurt de echotijd korter dan 1 ms. Hierdoor verhoogt het T_2 signaal ter hoogte van de long en kan de negatieve invloed van de lage protodensiteit op de beeldkwaliteit gelimiteerd worden (32,33).

Tabel 1: vergelijking tussen CT en MRI

	CT	MRI
Contrast zacht weefsel	slecht (16)	goed (25)
Contrast bot en lucht	goed (11)	slecht (19)
Spatiale resolutie	hoog (13)	laag (28)
Temporele resolutie	laag (17)	hoog (19)
radiotoxiciteit	potentieel (17)	neen (19)

2.2. Radiotoxiciteit

CT kan gebruikt worden om longfibrose te visualiseren en kwantificeren in proefdieren (13), maar om een vergelijkbare resolutie te verkrijgen als in de mens moet de scantijd verhoogd worden. Hierdoor neemt de stralingsdosis sterk toe (24). Doorheen de tijd heeft men ervaren dat röntgenstralen in hoge dosissen zeer schadelijk kunnen zijn (34). De verhoogde stralingsdosis tijdens long-CT-scans in proefdieren houdt dus meer risico in op enerzijds acute stralingsschade en anderzijds genetische schade in de long, waardoor experimentele resultaten negatief beïnvloed kunnen worden (10). Het is gekend dat een eenmalige stralingsdosis van 6 Gray (Gy) dodelijk is voor kleine proefdieren (35). Het is dan ook zeer belangrijk om ruim onder deze limiet te blijven. Met stralingsdosis wordt hier de hoeveelheid geabsorbeerde energie per eenheid massa in een specifiek punt bedoeld, uitgedrukt in Gy (36). Deze is bij CT sterk afhankelijk van de duur van de scan, de stralingsintensiteit en de resolutie (37). Uit de literatuur blijkt dat voor de meeste longapplicaties in de muis de stralingsdosis niet hoger is dan 0,5 tot 1 Gy (13,37-39). Dit is een factor 10 meer dan voor het maken van een standaard CT-scan in de mens (12) en een factor 6,5 meer dan bij het gebruik van een ultrasnel beeldvormingsprotocol in de muis, waarbij een gemiddelde interne dosis van 0,016 Gy per scan wordt gemeten (37). De reden waarom de stralingsdosis voor longscans hoger is, is omdat men tijdens het scannen van de thorax meestal aan ademhalingsregistratie doet waardoor de blootstellingstijd toeneemt. Onderzoek heeft uitgewezen dat prospectieve ademhalingsregistratie een gemiddeld stralingsdosis van 0,15 Gy per scan oplevert (31), omdat er enkel gescand wordt na het uitademen. Bij retrospectieve ademhalingsregistratie ligt deze dosis hoger omdat tijdens alle fasen van de ademhaling continu beelden worden gemaakt. De beelden uit de gewenste fase worden er naderhand pas uit gefilterd (40). Hierdoor levert een long-CT-scan met retrospectieve ademhalingsregistratie een stralingsdosis op van 0,813 Gy per scan (13).

Het is nog niet eenduidig bewezen dat de stralingsdosis toegediend door CT-scans interfereert met experimentele resultaten. Hier bestaat een dubbele reden voor. Enerzijds wordt hier door niet veel groepen onderzoek naar gedaan. Anderzijds zorgt het gebruik van diverse modellen, andere protocols en verschillende scanners voor uiteenlopende resultaten (41). *In vivo* muisstudies hebben aangetoond dat seriële opvolging van tumoren met CT onder standaard instellingen geen significant effect heeft op de tumorgroei (14,37). Andere studies, waarbij gemiddeld 0,406 Gy in elk orgaan werd gemeten, bewezen dan weer dat een standaard CT-protocol aantoonbare DNA-schade veroorzaakt (17,41). Hierbij argumenteert men dat het meten van de tumorgroei niet gevoelig genoeg is om subtiele biologische effecten van straling waar te kunnen nemen. Door de kans op accumulatie van stralingsdosis in longitudinale studies, mag de impact van DNA-schade niet onderschat worden. In de literatuur is de informatie over de potentieel schadelijke effecten van longitudinale CT-scans beperkt. Het is juist in zulke situaties belangrijk om de stralingsdosis nauwlettend in de gaten te houden, omdat de dieren herhaaldelijk blootgesteld worden aan ioniserende straling (37).

2.3. Pulmonaire fibrose

Pulmonaire fibrose is een chronische aandoening ter hoogte van het interstitieel weefsel van de long, gekarakteriseerd door de aanwezigheid van inflammatie en fibrose (1,42). Over de pathogenese van deze aandoening bestaat nog zeer veel onzekerheid. Er wordt gesuggereerd dat herhaaldelijke kleine beschadigingen leiden tot inflammatie, destructie van het basaal membraan en activatie van myofibroblasten. Dit wordt gevolgd door de accumulatie van extracellulaire matrix in de long waardoor de gasuitwisseling bemoeilijkt wordt en de patiënten geleidelijk aan last krijgen van droge hoest en kortademigheid (1,43).

Men heeft weet van talrijke risicofactoren die longfibrose kunnen veroorzaken. Denk maar aan een infectie met het Epstein-Barr virus (44) of het inademen van schadelijke stoffen (1,2). Ook de inname van bepaalde kankergeneesmiddelen zoals bleomycine veroorzaken longfibrose als neveneffect (3). Soms is het echter onmogelijk om een oorzakelijke factor te identificeren en spreekt men van idiopathische pulmonaire fibrose (IPF) (45).

Voor het stellen van de diagnose wordt een multidisciplinaire aanpak gebruikt. De belangrijkste eerste stap is een grondig fysiek onderzoek van de patiënt. Vervolgens kan men aan de hand van röntgenbeelden, CT-beelden en MRI-beelden op niet-invasieve wijze structurele veranderingen in de long onderzoeken (1). Fibrotische longen zijn zeer stijve longen, dus ook longfunctietesten kunnen uitgevoerd worden om de werking van de long te controleren (46). Ook is het uitvoeren van een bronchoscopie een standaardprocedure, enerzijds om een biopsie van de long te kunnen nemen en anderzijds om een bronchalveolaire lavage (BAL) uit te kunnen voeren (1).

Door het gebrek aan kennis over het onderliggende moleculair mechanisme, is het geen gemakkelijk taak om een goede behandeling te vinden voor patiënten die lijden aan IPF. De huidige behandelingsstrategie is enkel symptomatisch en bestaat uit het apart of gecombineerd toedienen van corticosteroïden, immunosuppressiva of antifibrotische middelen (1). Het gebruik van deze stoffen staat echter ter discussie omdat de klinische doeltreffendheid niet eenduidig bewezen is (43, 47, 48). Patiënten waarbij therapie faalt en de toestand snel verslechtert, komen in aanmerking voor longtransplantatie (49). Het is dus nodig om verder diepgaand onderzoek te verrichten naar de fibrotische processen in de long en om mogelijke therapeutische strategieën te bestuderen die de progressie van longfibrose kunnen stoppen en idealiter kunnen terugschroeven. Hierbij zijn goede diermodellen onmisbaar.

2.3.1. Het bleomycine diermodel

Er zijn verschillende diermodellen beschikbaar om de pathogenese van longfibrose te onderzoeken. In het stralingsgeïnduceerde diermodel worden muizen eenmalig blootgesteld aan 12-15 Gy, wat na 20 weken resulteert in longfibrose. In het silica diermodel worden minerale vezels aangebracht in de knaagdierlong waardoor fibrotische nodules ontstaan.

Het bleomycinemodel is gebaseerd op de longfibrose die optreedt als neveneffect van de toediening van het kankermedicijn bleomycine en er bestaat eveneens een diermodel waarbij longfibrose geïnduceerd wordt door de introductie van transgenen in het genomisch materiaal (50). Al deze modellen vertonen overeenkomst met de humane ziekte, maar kunnen niet de progressieve en irreversibele aard van de aandoening nabootsen (4).

Het bleomycinemodel is het meest gebruikte diermodel in het preklinisch onderzoek naar humane longfibrose. Redenen hiervoor zijn de reproduceerbaarheid, de klinische relevantie, de goed gekarakteriseerde eigenschappen en de eenvoudige uitvoering (4,50). Bleomycine is een antibioticum met een antineoplastische werking. In het verleden werd deze stof gebruikt voor de behandeling van verscheidene humane kankers (51). Tegenwoordig echter niet meer omdat de stof een dosisafhankelijke pulmonaire toxiciteit veroorzaakt die resulteert in pulmonaire fibrose (4). Dit neveneffect in patiënten wordt ook in een aantal diersoorten gezien, zoals in ratten (51,52), waardoor bleomycine-geïnduceerde longfibrose in zulke dieren gebruikt kan worden als preklinisch diermodel. In dit model zijn een aantal verschillende administratieroutes mogelijk. Standaard wordt bleomycine intratracheaal (IT) toegediend, maar intraveneuze (IV) of intraperitoneale (IP) administratie zijn eveneens mogelijk (53). Een praktisch voordeel van dit model is dat de geïnduceerde longschade detecteerbaar is binnen de week na toediening. Dit is relatief snel in vergelijking met bijvoorbeeld het stralingsgeïnduceerde model, waar longschade pas na maanden zichtbaar wordt (15). Een nadeel van dit model is de voorbijgaande aard van de geïnduceerde fibrose, wat niet in overeenstemming is met het humane ziekteverloop (29).

Preklinische studies op bleomycine-geïnstilleerde dieren is voornamelijk gericht op onderzoek naar het tijdsverloop van longfibrose, de histologische processen en mogelijke therapeutische strategieën (27,52,54-56). In dit onderzoek is er een nood aan technieken om de fibrose in de long te kwantificeren. Histologie wordt over het algemeen als de gouden standaard beschouwd voor deze kwantificatie (5,57-61). Met histologie wordt voornamelijk gekeken naar structurele en cellulaire veranderingen die specifiek zijn voor pulmonaire fibrose (53). Daarnaast kunnen ook semikwantitatieve scoretechnieken gebruikt worden om de fibrose te classificeren (57). Het Ashcroft scoresysteem is hiervan een voorbeeld, waarbij na visuele inspectie een score gegeven tussen 0 en 8, waarbij 0 staat voor een normale long en 8 voor een volledig fibrotische long (62). Naast histologie is de hydroxyproline bepaling ook een veel gebruikte techniek waarmee de totale hoeveelheid collageen in de long gemeten kan worden (22,55,61,63).

Door de destructieve aard van deze technieken kan het ziekteproces enkel opgevolgd worden op groepsniveau. De respons op bleomycine is echter zeer variabel in dit diermodel. Een snelle en niet-invasieve manier om het ziekteverloop op individueel niveau op te volgen zou een enorme vooruitgang betekenen voor dit onderzoek (50). MRI en CT komen hiervoor in aanmerking. Voornamelijk omdat beide technieken structurele veranderingen in beeld kunnen brengen, in 3D en met een hoge spatiale resolutie.

2.3.2. MRI voor het opvolgen van bleomycine-geïnduceerde longfibrose

De veranderingen die bleomycine induceert in de longen van muizen kunnen gedetecteerd worden als een verhoogd MRI signaal (26). In de eerste week na bleomycine toediening werd een maximaal MRI signaal bereikt. Dit signaal kwam overeen met de histologische detectie van alveolair oedeem door ontstekingsreacties (26,60). Tijdens de tweede week gaat de inflammatie geleidelijk over in fibrose. Dit proces eindigt op het einde van de derde week, waardoor enkel nog fibrose aanwezig is in de longen (54,55). Het MRI signaal bleef gedurende deze overgangperiode significant verhoogd door de aanhoudende fibrose. Vervolgens nam het signaal traag af naarmate de tijd vordert. Dit wordt verklaard door een spontaan herstel van het longweefsel (26). Bleomycine-geïnduceerde schade kan dus met MRI gevisualiseerd en gekwantificeerd worden in de longen van ratten (26,59), op voorwaarde dat de echotijd niet langer duurt dan een paar milliseconden (21).

De evaluatie van potentiële geneesmiddelen is een belangrijk deel van het preklinisch onderzoek naar longfibrose. In zulke studies is het echter van belang te weten of de onderzochte stof ingrijpt op de inflammatoire fase of fibrotische fase van het model (4). Beeldvorming zou op dit gebied relevante informatie kunnen verschaffen. Zo blijkt uit een recente studie dat het behandelen van bleomycine-geïnstilleerde ratten met corticosteroïden een ontstekingsremmend effect heeft omdat het MRI signaal vooral tijdens de eerste week sterk daalt (57). Door het gebrek aan specificiteit kan MRI met de huidige beschikbare technologie echter geen onderscheid maken tussen inflammatie en fibrose (15,26) waardoor men er tot op heden nog niet in geslaagd is om met MRI de overgang van inflammatie naar fibrose te detecteren (20,23,26,57,59).

2.3.3. CT voor het opvolgen van bleomycine-geïnduceerde longfibrose

Er zijn verschillende benaderingen om longfibrose te onderzoeken op basis van CT-beelden. Zoals bij de mens kan het in kleine proefdieren geëvalueerd worden op basis van een visueel onderzoek van de beelden. Deze aanpak blijkt te correleren met de histopathologische scores voor inflammatie en fibrose (5), maar er zijn ook enkele nadelen aan verbonden. Personen moeten hiervoor speciaal opgeleid worden, het neemt veel tijd in beslag en het is slechts semikwantitatief.

Er bestaan alternatieve methoden op basis van semiautomatische detectie van de hoeveelheid lucht in de longen. Kwantificatie van deze parameter is zinvol omdat het luchtvolume progressief afneemt naarmate de fibrose verder ontwikkelt (29). Enerzijds kan op basis van visuele inspectie van het intensiteitshistogram een gebied van grijswaarden gekozen worden. Dit gebied mag enkel de lucht in de longen bevatten, die vervolgens automatisch gekwantificeerd wordt. Uiteindelijk blijft bij aftrek van de beelden voor en na bleomycine toediening enkel het beschadigd longweefsel over (15). Anderzijds kan de lucht in de longen gesegmenteerd worden op basis van een 'region growing' algoritme. Hierbij worden manueel verschillende startpunten geplaatst in de juiste longgebieden. Vanuit deze punten worden buurpixels die voldoen aan de vooropgestelde criteria op een iteratieve wijze toegevoegd tot uiteindelijk een volledig volume afgelijnd is (29).

Maar ook hier weer is menselijke interventie noodzakelijk, is het erg tijdrovend en moet de beeldkwaliteit vergelijkbaar zijn met humane CT-beelden. Dit is een enorme uitdaging, omdat kaagdieren hiervoor blootgesteld moeten worden aan een veel hogere stralingsdosis (15,29) waardoor de haalbare beeldkwaliteit beperkt moet worden. Longvolumes kunnen ook semiautomatisch berekend worden uit de CT-beelden, waarna deze waarden gebruikt kunnen worden om de pulmonaire compliantie te berekenen (64). In het bleomycinemodel is er echter een sterke variatie in geïnduceerde longschade. Dit kan duidelijk afgeleid worden uit een visuele inspectie van de CT-beelden, maar niet uit de veranderingen in compliantie. Deze parameter is dus niet zo betrouwbaar als het aankomt om het bepalen van de bleomycine-geïnduceerde longschade.

Recent werd door onze groep een volledig geautomatiseerd algoritme gevalideerd dat op een objectieve, accurate en reproduceerbare manier longvolumes berekent (13). Het is niet meer noodzakelijk om punten manueel te plaatsen, waardoor veel minder tijd verloren gaat en de kans op een vertekend resultaat sterk vermindert. De resulterende kwantitatieve data correleert zeer goed met de standaard evaluatietechnieken.

2.4. Cryptococcosis

Cryptococci zijn gistcellen met een gemiddelde diameter van 5 tot 10 μm . De voornaamste pathogene species voor zowel mens en dier zijn *Cryptococcus neoformans* en *Cryptococcus gattii*. Deze cellen worden omringd door een complex polysaccharidekapsel, dat een belangrijke rol speelt als virulentiefactor (65). *Cryptococcus neoformans* kan wereldwijd geïsoleerd worden uit de bodem of uit de ontlasting van vogels (66). Pulmonaire infectie wordt veroorzaakt door het inhaleren van de gistcellen of de sporen (67).

In immunocompetente personen geneest deze infectie meestal spontaan (68), maar in personen met een verzwakt immuunsysteem kunnen de cryptococci uitzaaien naar het centraal zenuwstelsel (CZS). Dit gebeurt via de bloedbaan en kan resulteren in een levensbedreigende meningo-encefalitis (69). *Cryptococcus gattii* komt eerder voor in gebieden met een tropisch tot subtropisch klimaat, waar het geïsoleerd kan worden uit de schors van bepaalde boomsoorten zoals de eucalyptusboom (67). De uitbraak van *Cryptococcus gattii* infecties op Vancouver Island tussen 1999 en 2003 wijst echter op een evolutie in de geografische distributie. Er wordt gesuggereerd dat de klimaatverandering hierin een rol speelt (70). Opvallend is dat immunocompetente personen significant meer getroffen worden door deze species (71) en dat het primair doelwitorgaan niet de hersenen maar de longen zijn. Over het algemeen is een *Cryptococcus*-infectie in immunocompetente personen dus meestal asymptomatisch en blijft het beperkt tot de longen. In immunogecompromiteerde personen daarentegen kunnen de symptomen vrij zwaar zijn en komt uitzaaiing naar het CZS frequent voor (6).

De diagnose van een pulmonaire cryptococose kan gesteld worden op basis van eventuele symptomen, eenduidige radiografische bevindingen en een positieve cultuur uit sputum of BAL van de patiënt (6). Indien er sprake is van uitzaaiing en cryptococcale meningitis, kan een *Cryptococcus* antigenetest uitsluitend geven (72).

Patiënten worden behandeld met antifungale geneesmiddelen zoals fluconazole en amfotericine b. Deze worden in hoge of lage dosis en alleen of in combinatie gegeven, afhankelijk van de ernst van de toestand. Slechts zelden wordt overwogen om abnormaliteiten in de long chirurgisch te verwijderen (73). Ondanks antifungale behandelingen, blijft de globale mortaliteit in immuungecompromitteerde personen relatief hoog (74). De pathogenese van een *Cryptococcus*-infectie is nog steeds niet volledig gekend. Het is dus belangrijk om de pathogenese enerzijds en potentiële behandelingsstrategieën anderzijds te onderzoeken in diermodellen (75).

Cryptococcus neoformans is een natuurlijk pathogeen voor veel diersoorten, waardoor diverse diermodellen mogelijk zijn. De keuze van diermodel is dus vooral afhankelijk van wat men precies wil onderzoeken. Bijvoorbeeld in studies waarbij men cryptococcale meningo-encefalitis bestudeert, worden bij voorkeur grote knaagdieren gebruikt. In deze dieren zijn de hersenen immers goed bereikbaar voor experimentele manipulaties. Cryptococcale pneumonie daarentegen wordt vaker bestudeerd in muizen omdat de genetische en immunologische achtergrond beter gekend is (75). De proefdieren kunnen op verschillende manieren met cryptococcale cellen geïnoculeerd worden. Intranasale (IN) of IT instillatie geeft het natuurlijk verloop van de aandoening het beste weer en is daarom ook klinisch het meest relevant (65). In het preklinisch onderzoek naar *Cryptococcus*-infecties worden over het algemeen de *Cryptococcus neoformans* H99 en *Cryptococcus gattii* R265 als referentie gebruikt. Beide varianten werden oorspronkelijk geïsoleerd uit een patiënt met cryptococcosis en behoren tot een moleculair type dat zeer relevant is voor de mens (76). De R265 variant blijkt zelfs de hoofdrolspeler te zijn in de uitbraak op Vancouver Island in 1999 (70). Uit een studie blijkt dat muizen geïnfecteerd met R265-cellen via de longen sneller sterven, meer pulmonaire schade vertonen en sterk vergrote longen hebben (76). R265-cellen kunnen gedetecteerd worden in de hersenen en zijn dus in staat om doorheen de bloed-hersenbarrière te dringen. Nochtans kunnen geen R265-cellen aangetoond worden in het bloed en lijden deze muizen niet aan meningo-encefalitis op het tijdstip van overlijden. In het pulmonaire H99 muismodel zijn een groter aantal cryptococcale cellen detecteerbaar in zowel de hersenen als het bloed en deze dieren lijden wel aan zware meningo-encefalitis op het tijdstip van overlijden. Als verklaring wordt gesuggereerd dat bepaalde factoren in het bloed R265-cellen onderdrukken, maar niet H99-cellen. Deze muisdata bevestigen de eerder besproken klinische observaties.

Beide *Cryptococcus* species zijn dus in staat om doorheen de bloed-hersenbarrière te dringen, maar het precieze mechanisme is nog steeds ongekend. Enerzijds wordt een directe transcellulaire migratie gesuggereerd, maar een echt bewijs voor dit mechanisme is nog niet geleverd (7,8). Anderzijds wordt het Trojaans paard model gesuggereerd, een benadering waarbij macrofagen een belangrijke rol spelen in het uitzaaien naar de hersenen (8,9). Onderzoek naar dit mechanisme gebeurt voornamelijk *in vitro* of *ex vivo*, waardoor de vasculaire haemodynamica niet in rekening kan worden gebracht (8,9,77,78). Er is dus nood aan een *in vivo* benadering, waarbij beeldvormingstechnieken zoals FCFM gebruikt worden om de dynamische interacties tussen *Cryptococcus* cellen en de microvasculatuur in de hersenen te visualiseren. Uit de literatuur blijkt eveneens dat tot op heden geen niet-invasieve beeldvormingstechnieken beschikbaar zijn voor de dynamische opvolging van het ziekteproces.

2.4.1. Niet-invasieve beeldvormingstechnieken

Zowel CT als MRI worden gebruikt in patiënten om het ziekteverloop in de long niet-invasief op te volgen. In het preklinisch onderzoek naar pulmonaire infectieziekten is het gebruik ervan echter gelimiteerd. In bacteriële modellen zoals cutane infectie met *Streptococcus pyogenes* en in fungale modellen zoals IN infectie met *Paracoccidioidomycosis* heeft men pathologische veranderingen in de muislong succesvol gevisualiseerd met CT (79,80). Ook met MRI is men erin geslaagd inflammatie en oedeem te visualiseren en kwantificeren in de longen van muizen na IN infectie met virulente pathogenen zoals *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* en het sendai virus (81-83). Naar de longitudinale opvolging van infectieziekten met MRI en CT wordt echter zeer weinig onderzoek verricht. In de studie van Lopera *et al.* werden muizen met *Paracoccidioidomycosis* gedurende 16 weken *in vivo* opgevolgd met CT (80). Ze zijn erin geslaagd om het verloop van de schade in de long op te volgen, al had deze studie enkele limitaties. De longbeelden zijn gemaakt met een humane CT-scanner en niet met een CT-scanner voor kleine proefdieren, waardoor ze een veel minder goede resolutie hadden. Hierdoor wordt de detectie van eventuele schade beperkt. Het tweede limitatie is dat de dieren slechts eenmaal per vier weken gescand werden. Daardoor was het niet mogelijk om een diepgaand inzicht te verwerven in het dynamisch verloop van de infectie. In de studie van Wang *et al.* werden muizen geïnfecteerd met het Sendai virus en gedurende 12 weken *in vivo* opgevolgd met MRI (83). Zij zijn erin geslaagd om veranderingen in de microstructuren van de long te detecteren en kwantificeren, maar ook in deze studie werden de dieren slechts 3 keer gescand. In de literatuur kan geen enkele studie gevonden worden waarin het verloop van een fungale infectieziekte parallel opgevolgd wordt met zowel MRI als CT. Ook heeft nog geen enkele groep het dynamisch verloop van pulmonaire cryptococose in de muis onderzocht met MRI en/of CT.

In vivo en *in situ* onderzoek van biologisch weefsel op cellulair niveau is mogelijk dankzij het aanpassen van bestaande technieken zoals conventionele fluorescentiemicroscopie en optische coherentietomografie (OCT) (84). Hierbij blijven invasieve chirurgische procedures echter vereist, wat een groot nadeel is. Dit probleem heeft men willen oplossen met de ontwikkeling van optische endomicroscopie systemen (FCFM) zoals de Cell-viZio (85). Deze techniek is minimaal invasief dankzij een microsonde die in verbinding staat met het scanapparaat. De microsonde heeft een gemiddelde diameter van 0,34 tot 1.8 mm en bestaat uit duizenden optische vezels. Deze vezels kunnen het uitgezonden laserlicht van 488 nm naar het weefsel geleiden, waardoor fluorescente moleculen op een specifieke diepte geëxciteerd worden. Het uitgestraalde fluorescente licht wordt vervolgens doorheen dezelfde vezels terug naar het scantoestel gestuurd. Hierbij werkt de grootte van elke vezel als een pinhole voor zowel het uitgezonden als het opgevangen licht. Zo kan men tijdens een endoscopisch onderzoek microscopische beelden maken van interne organen in normale fysiologische omstandigheden, zonder de nood aan chirurgische interventies (86).

Er bestaan twee versies van het Cell-viZio systeem waardoor zowel klinische als preklinische toepassingen mogelijk zijn. In de mens gebruikt men endoscopische FCFM om microstructuren te onderzoeken in de luchtwegen van patiënten met bijvoorbeeld een verhoogd risico op longkanker.

De optische sonde kan gemakkelijk verwerkt worden in een standaard bronchoscoop, waardoor dit onderzoek minimaal invasief blijft (87,88). FCFM wordt ook gebruikt om gastrointestinale aandoeningen, zoals de ziekte van Crohn, te onderzoeken (89) en om *Helicobacter pylori* infecties te detecteren in de maag (90). Deze laatste is echter een zeldzame rapportering over het gebruik van FCFM om infectieziektes te onderzoeken in de mens.

In het preklinisch onderzoek kan FCFM gebruikt worden om infectieuze aandoeningen te onderzoeken. De ontwikkeling van een *Candida albicans* infectie na injectie van de gistcellen in het oor van een muis kan men nauwkeurig opvolgen met FCMC. De vorming en de groei van de filamenteuze vorm zijn hierbij ook visualiseerbaar (91). In de rat is men erin geslaagd om invasieve pulmonaire *aspergillosis* (IPA) *in vivo* en *in situ* te diagnosticeren met FCFM. Hierbij moet opgemerkt worden dat men in kleine proefdieren verplicht is om een transthoracale benadering te gebruiken in plaats van een endoscopische benadering. De optische microsonde is immers te groot om in te brengen in de trachea van ratten of muizen (92). Er zijn nog geen publicaties waarin het gebruik van FCFM voor het bestuderen van *Cryptococcus*-infecties wordt beschreven.

2.4.2. Longfunctietesten

Het kan interessant zijn om de longfunctie van geïnfecteerde dieren na te gaan. De plethysmograaf is een populair toestel waarmee op een niet-invasieve manier de respiratoire functie gemeten kan worden (93). De accuraatheid van deze meetwijze wordt in de literatuur echter in vraag gesteld (94). Een evenwaardig alternatief is het FlexiVent systeem waarmee onder andere de resistentie en elastantie van de longen zeer precies gemeten kunnen worden (93). Het invasieve karakter van dit systeem maakt het echter moeilijk om eenzelfde dier herhaald te meten (94). Beide toestellen hebben dus voordelen en nadelen. Met beide toestellen is het mogelijk om een methacholine (MCh)-provocatietest uit te voeren. Met deze test gaat men de reactiviteit van de luchtwegen na door middel van blootstelling aan MCh aerosol met een toenemende concentratie (93). Deze testen worden frequent gebruikt om de bronchiale hyperreactiviteit na te gaan in astmamodellen (95), maar kunnen ook nuttige informatie geven over het effect van pulmonaire infecties op de functie van de luchtwegen.

Enkele groepen hebben onderzoek verricht naar het effect van een pulmonaire *Cryptococcus* infectie op de longfunctie. In een Amerikaanse studie heeft men ratten IT geïnfecteerd met *Cryptococcus neoformans* om vervolgens een plethysmografische MCh-provocatietest uit te voeren. De reactiviteit van de luchtwegen bleek significant verhoogd te zijn in de geïnfecteerde ratten (96). Deze hyperreactiviteit was geassocieerd met zwaardere allergische reacties in de ovalbumine-provocatietest. Soortgelijke resultaten werden verkregen uit plethysmografische metingen van muizen IN geïnfecteerd met *Mycoplasma pneumoniae* (97). In een latere studie heeft men muizen IT geïnfecteerd met *Cryptococcus neoformans* H99-cellen. Drie weken na infectie werden plethysmografische metingen uitgevoerd, waaruit bleek dat geïnfecteerde dieren een significante verhoogde luchtwegresistentie hebben die niet correleert met de fungale groei in de longen.

Immunologische testen toonden aan dat die toename in luchtwegresistentie geassocieerd is met een T-helper-2-cellen type immuunrespons (98). Plethysmografie blijkt dus een goede manier te zijn om de aangetaste longfunctie in pulmonaire cryptococcosis te meten.

3. DOELSTELLINGEN VAN DEZE THESIS

Longfibrose is een aandoening waarbij chronische inflammatie van de longen leidt tot de buitensporige vorming van littekenweefsel. Het bleomycine muismodel wordt frequent gebruikt om de grotendeels ongekende pathogenese van deze aandoening te onderzoeken. De gouden standaard in dit onderzoek is nog steeds histologie, maar door de invasieve aard van deze techniek is het niet mogelijk om een goed overzicht te krijgen van het precieze ziekteverloop in individuele muizen. Hetzelfde probleem doet zich voor in het preklinisch onderzoek naar pulmonaire cryptococcosis. Deze infectieziekte wordt veroorzaakt door de inhalatie van *Cryptococcus* sporen en ook van deze longaandoening is de pathogenese onvoldoende begrepen. Verder preklinisch onderzoek is dus noodzakelijk, maar het is moeilijk om in geïnfecteerde muizen de relevante tijdstippen voor histologie te identificeren. De dieren vertonen immers geen symptomen tot de aandoening zich in een vergevorderd stadium bevindt. In het preklinisch onderzoek naar beide aandoeningen is er met andere woorden nood aan niet-invasieve alternatieven, zoals MRI en CT, om het ziekteverloop op te volgen. De herhaalde blootstelling aan ioniserende straling bij het gebruik van CT in longitudinale studies kan echter radiotoxische effecten uitlokken. Het is daarom steeds aangewezen om te controleren welke stralingsdosissen geassocieerd zijn met de gebruikte CT-protocols.

In deze thesis worden vier relevante CT protocols getest op muizen om zo een goed beeld te krijgen van de mogelijke stralingsgeïnduceerde schade aan het longweefsel. Daarna wordt dieper ingegaan op MRI en CT als mogelijke beeldvormingstechnieken om het dynamisch verloop van pulmonaire fibrose en cryptococcosis niet-invasief in beeld te brengen. Er wordt nagegaan of de MRI- en CT-resultaten in overeenstemming zijn met de standaard histologische technieken. Ook wordt onderzocht of een *Cryptococcus* infectie in muizen geëvalueerd kan worden met functionele longtesten en FCFM.

4. EXPERIMENTEEL WERK

4.1. Materiaal en methoden

4.1.1. Cryptococcus gattii

Voor de experimenten in deze studie werden zowel 'wild type' (WT) R265 cellen als groen fluorescent proteïne positieve (GFP+) *Cryptococcus gattii* R265 cellen gebruikt (99). De R265-cellen werden gedurende 2 dagen opgegroeid in vloeibaar Sabouraud medium in een incubator bij 30°C. Daarna werden de cellen tweemaal gewassen met 6 ml gebalanceerde zoutoplossing (PBS, GIBCO®, Life Technologies-Invitrogen) en 5 minuten gecentrifugeerd met een relatieve centrifugale kracht (RCF) van 1500. Vervolgens werden de cellen geresuspendeerd in 5 ml PBS, waarna het aantal cellen geteld werd met de Neubauer-telkamer (VWR International). Hieruit werd de verdunning met gewenste concentratie cryptococcon berekend, waarmee de muizen geïnfecteerd werden. Volgende concentraties werden gebruikt in dit experiment: 500 cellen / 20 µl en 50000 cellen / 20 µl.

4.1.2. Diermodellen

Voor deze studie werden volwassen C57Bl/6 en vrouwelijke BALB/c muizen gebruikt van 8 weken oud. De dieren werden gehouden met vrije toegang tot voedsel en water. Alle experimenten gebeurden volgens de regels voor dierenexperimenten van de KU Leuven.

In het *Cryptococcus*-experiment werden in totaal 50 vrouwelijke BALB/c muizen (18-20 gram) onder anesthesie gebracht met 2% isofluraan (Nicholas piramal) in 100% O₂. Vervolgens werden de dieren IN geïnfecteerd met 500 (n = 28) of 50000 (n = 4) cryptococcale cellen. De controledieren (n = 11) kregen IN eenzelfde volume PBS toegediend.

In het bleomycine-experiment werden 10 mannelijke C57Bl/6 muizen (23-25 gram) onder anesthesie gebracht door middel van een IP injectie met ketamine (Eurovet Animal Health BV, Bladel, Nederland) en xylazine. Vervolgens werd fibrose geïnduceerd (n = 5) door IT instillatie van 0,05 U bleomycine (Sanofi-Aventis, Diegem, België) in 50µl PBS. De controledieren (n = 5) werden IT geïnstilleerd met enkel PBS.

4.1.3. CT protocol

CT scans werden uitgevoerd zoals eerder beschreven (13). De muizen werden verdoofd met 2 % isofluraan (Nicholas piramal) in 100 % O₂ inhalatie anesthesie. Daarna werden de dieren ruggelings gepositioneerd in de CT-scanner voor kleine proefdieren (SkyScan 1076, software versie 4.2, Bruker microCT, Kontich, België). Tijdens de beeldacquisitie werd de listmodus gebruikt met volgende parameters: 50 kilovolt piek (kVp) bronspanning, 180 µA stroom, 0,5 mm aluminium X-stralenfilter, 120 ms blootstellingstijd per projectie, 35 µm pixelgrootte, 9 projecties per beeld, 23 x 35 mm beeldoppervlakte en een hoek van 0,7° tussen de verschillende projecties over een totale hoek van 180°.

Een enkele scan duurde 13 minuten, wat resulteerde in een gemeten stralingsdosis van 0,813 Gy (13). Bewegingsartefacten werden geminimaliseerd met behulp van retrospectieve ademhalingsregistratie, waardoor de beeldacquisitie doorlopend kon gebeuren en met vrij ademende dieren. Tijdens het scannen werd de op- en neerwaartse beweging van de thorax continu gedetecteerd met een visuele camera. Deze beweging werd vervolgens vertaald in een pseudo-sinusoïdaal signaal, dat na het afronden van de scan gebruikt werd om de beelden te sorteren op basis van de respiratoire fase waarin ze genomen werden (Tsort programma, versie 1.1.3.0, SkyScan). De lengte van een volledige ademhalingscyclus werd verdeeld in 4 gelijke delen (bin 0 tot 3). Dit is in overeenstemming met de 4 fasen van respiratie. Na het sorteren bevatte elke bin minimaal 2 projectiebeelden. Voor het reconstrueren van de beelden werd het NRecon programma (versie 1.6.3.1, SkyScan) gebruikt, waarbij de “smoothing” ingesteld werd op 2 en de “beam-hardening correction” op 31%. De correctie voor optimale alignering en eventuele ringartefacten werden voor elke individuele scan ingesteld. De gereconstrueerde 3D-dataset bevat 1000 x 1000 isotrope voxels met een grootte van $(35 \mu\text{m})^3$ en werd visueel onderzocht in Dataviewer (versie 1.4.3.0 SkyScan, België).

Na de laatste *in vivo*-scan werden de muizen geëuthanaseerd met 18 mg pentobarbital (Nembutal, CEVA Santé Animale, Diegem, België). Vervolgens werden de dieren gescand met volgende parameters: 50 kVp bronspanning; 180 μA stroom; 0,5 mm aluminium X-stralenfilter; 120 ms blootstellingstijd per projectie; 35 μm pixelgrootte; 3 projecties per beeld; 23 x 35 mm beeldoppervlakte en een hoek van $0,7^\circ$ tussen de verschillende projecties over een totale hoek van 180° . De scan duurde gemiddeld 5 minuten. De beelden werden gereconstrueerd met het eerder beschreven programma en de eerder beschreven parameters.

4.1.4. CT beeldanalyse

Zoals eerder beschreven (13) werd een automatisch algoritme samengesteld met het CT Analyser programma (versie 1.11.4.2, SkyScan) om de lucht in de longen te segmenteren. In de eerste stap van dit algoritme werd de grijswaarde-index ingesteld op een ondergrens van 35 en op een bovengrens van 255. Dankzij het instellen van deze drempelwaarde, werden alle pixels met de dichtheid van pure lucht automatisch gesegmenteerd. Dit omvat echter niet enkel de lucht in de longen, maar ook de omringende lucht omdat de geselecteerde regio (ROI) gelijk is aan het totale beeldoppervlak. In de tweede stap werd de “despeckle” functie (“pores”) gebruikt om in 2D stippen in het beeld weg te werken. Vervolgens werd deze “despeckle” functie (“sweep”) opnieuw gebruikt om in 2D alles buiten het grootste object weg te vegen. In de vierde stap werd een 2D morfologische operatie uitgevoerd, waarmee 10 pixels aan de rand van het object geërodeerd werden om zo de grenzen van het object te verscherpen. Vervolgens werd de ROI gelijkgesteld aan een kopie van het resulterende beeld, waarna het beeld herladen werd. De resulterende ROI was nu gelijkgesteld aan het beeld van de muis. In de zevende stap werd voor de grijswaarde-index opnieuw een bovengrens ingesteld van 35. Hierdoor werd de lucht binnenin het dier gesegmenteerd. Dit omvatte niet enkel de lucht in de longen, maar ook pixels met een lage dichtheid buiten de longen.

In de achtste stap werden het beeld en de ROI samengevoegd. Vervolgens werd de “despeckle” functie (“sweep”) opnieuw gebruikt om in 3D de geselecteerde pixels buiten de long te elimineren. In de tiende stap werd de ROI gelijk gesteld aan een kopie van het beeld, waarna het opgeslagen werd als bitmap. Het resultaat was de segmentatie van de lucht in de longen waarvoor in de laatste stap de 3D-parameters werden berekend. De complete segmentatie gebeurde volledig geautomatiseerd. Het algoritme resulteerde in informatie over het longvolume, uitgedrukt in aantal voxels. Het eind-inspiratoir volume (EIV) en eind-expiratoir volume (EEV) werden bepaald. Het EIV werd gedefinieerd als het gecalculeerd volume op het einde van de inspiratie en werd berekend uit bin 0. Het EEV werd gedefinieerd als het gecalculeerd volume na expiratie en werd berekend uit bin 3. Aangezien beide parameters gelijklopende resultaten opleverden, werd in dit werk enkel EEV gerapporteerd.

4.1.5. MRI

Het 9,4 Tesla (T) Bruker Biospec systeem (Bruker Biospin, Ettlingen, Duitsland) met een binnendiameter van 20 cm werd in combinatie met een kwadratuur spoel van 7 cm gebruikt om alle MR beelden te maken. De dieren werden geanestheesd met 2% isofluraan (Nicholas piramal) in 100% zuurstof (O₂). Vervolgens werden de dieren in buikligging gepositioneerd op het dierenbed. Een anale sonde werd aangebracht om de lichaamstemperatuur van het dier op te volgen tijdens de scans. Deze werd op peil gehouden met behulp van een warmwatercircuit. Tegelijkertijd werd met een aparte elektrode de ademhaling gedetecteerd. Drie verschillende MRI sequenties werden gebruikt: de 2D Fast Low Angle Shot (FLASH)-sequentie (Intragate®, Bruker) met intrinsieke ademhalingsregistratie, de ademhalingsgestuurde 2D Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement (RARE)-sequentie en de ademhalingsgestuurde ultrakorte echotijd (UTE)-sequentie.

De 2D FLASH-sequentie werd gebruikt met intrinsieke ademhalingsregistratie en met volgende parameters: repetitietijd (TR)/echotijd (TE) = 30/1,26 ms; 17° fliphoek (FA); 5 doorsneden doorheen de volledige long met dikte 1 mm en een tussenruimte van 0,5 mm; 156 µm resolutie; 80 repetities en 10 minuten acquisitietijd. De navigatorschijf had een breedte van 1 cm en werd geëxciteerd met een 0,8 ms sinc10H puls met 1,5° FA. Voor de reconstructie van de beelden werd 70% van de ademhalingscyclus gebruikt (Paravision versie 5.1, Bruker). De 2D RARE-sequentie werd gebruikt met prospectieve ademhalingsregistratie en met volgende parameters: 6000 ms TR; 15,9 ms effectieve TE; 50 doorsneden doorheen de volledige long met dikte 0,5 mm; 200 µm x 150 µm resolutie; 2 acquisities en 12 minuten acquisitietijd. De UTE-sequentie maakt gebruik van prospectieve ademhalingsregistratie en werd gebruikt met volgende parameters: free inducting decay (FID) modus; 20 ms TR; 0,4 ms TE; 8 doorsneden doorheen de volledige long met dikte 0,6 mm; 175 µm resolutie; 3 acquisities en 12 minuten acquisitietijd.

4.1.6. MRI beeldanalyse

De MR-beelden werden geanalyseerd met het imageJ programma (versie 1.46r, National institutes of Health, USA). De longen werden een eerste maal manueel afgelijnd met behulp van de ‘brush selection tool’. Hierbij werden het hart en de grote bloedvaten zorgvuldig vermeden.

Vervolgens werd de signaalintensiteit (SI) in deze ROI berekend. Daarna werden de longen een tweede maal manueel afgelijnd met de 'polygon selection tool'. Deze keer werden het hart en de grote bloedvaten wel geïnccludeerd, waarna het longvolume berekend werd.

4.1.7. Longfunctietesten

De longfunctietesten werden uitgevoerd zoals eerder beschreven (13,100). De muizen werden onder diepe anesthesie gebracht met een IP injectie met pentobarbital (70 mg / kg) (CEVA Santé Animale, Diegem, België). De spontane ademhaling werd hierdoor onderdrukt. Na tracheotomie werden de muizen bevestigd aan het FlexiVent systeem (SCIREQ, Montreal, Canada) en geventileerd met volgende parameters: ademvolume = 10 ml/kg, gemiddelde frequentie = 150 ademhalingen/minuut en positieve eind-expiratoire druk = 2 cmH₂O. Zo werd een gemiddeld longvolume verkregen dat bij benadering overeenkomt met de spontane ademhaling. Voor elk manoeuvre werden de longen genormaliseerd aan de hand van de totale longcapaciteit (TLC). Dan werd een zogenaamd 'snapshot perturbation' manoeuvre uitgevoerd om de resistentie (R), compliantie (C) en elastantie (E) te bepalen van het volledige respiratoir systeem (luchtwegen, long en thoraxwand). Alle manoeuvres werden uitgevoerd tot 3 acceptabele metingen verkregen werden voor elke parameter en in elke muis, waarvan vervolgens een gemiddelde berekend werd.

Na deze metingen werd de hyperreactiviteit van de luchtwegen bepaald. Hiervoor werden de muizen telkens 5 seconden blootgesteld aan toenemende concentraties methacholine in aerosolvorm. Volgende concentraties werden gebruikt: 0 mg/ml, 0,625 mg/ml, 1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml en 10 mg/ml. Vervolgens werden R en C gemeten met het 'snapshot perturbation' manoeuvre. Voor elke muis werd de methacholine concentratie uitgezet ten opzichte van de gemeten R en C. Vervolgens werd de oppervlakte onder de curve (AUC) berekend. Na het afronden van de longfunctietesten werden de dieren geëuthanaseerd en de longen verwijderd voor verder histologisch onderzoek.

4.1.8. FCFM

De FCFM-metingen werden uitgevoerd met het Cell-viZio® systeem (Mauna Kea Technologies). Dit systeem zendt door middel van een optische microsonde laserlicht uit met een golflengte van 488 nm. Doorheen dezelfde microsonde kan uitgezonden licht met een golflengte van 500 tot 650 nm gedetecteerd worden. In dit experiment werd de 2 confocale microsondes gebruikt. De PF-2295 S-1500 sonde heeft een diameter van 1.5 mm, een laterale resolutie van 3.3 µm, een axiale resolutie van 15 µm en een maximaal beeldoppervlak van 598 µm x 598 µm. De PF-0297 S-1500 sonde heeft een diameter van 1.5 mm, een laterale resolutie van 5 µm, een axiale resolutie van 15 µm en een maximaal beeldoppervlak van 602 µm x 602 µm. Bij de start van het experiment werden dieren onder diepe anesthesie gebracht door middel van een IP injectie met 15 mg pentobarbital (CEVA Santé Animale, Diegem, België). De dieren werden ruggelings gefixeerd, gevolgd door het blootleggen van de longen door middel van een thoracotomie. Vervolgens werden beelden gemaakt door de microsonde direct op het longoppervlak te plaatsen. Zowel de linkerlong als de rechterlong werden op deze manier geanalyseerd.

Na het afronden van de beeldvorming procedure, werden de dieren geëuthanaseerd en de longen verwijderd voor histologisch onderzoek. Er werden 2 verschillende controles gebruikt: een gezonde muis en een muis geïnfecteerd met WT cryptococci (500 cellen). De beelden werden geanalyseerd met het imageJ programma (versie 1.46r, National institutes of Health, USA). Uit elke opname werden representatieve beelden gekozen. Vervolgens werd in elke longlob de SI berekend van een gezond gebied en een aangetast gebied. Omdat de intensiteit van het signaal kan variëren door de calibratie van het systeem, werd van elk dier *in vivo* een controlebeeld gemaakt door de microsonde op de binnenkant van de thoraxwand te plaatsen.

4.1.9. Histologische kwantificatie van fibrose

Na euthanasie en na het maken van de *ex vivo* scans werd de thoraxholte geopend. Vervolgens werden de rechter longlobben afgebonden te hoogte van de longhilus. Na het maken van een kleine opening werd een katheter aangebracht in de trachea. Vervolgens werd de linkerlong opgeblazen met 500 µl 10% formaline. Na isolatie werd de linkerlong gedurende 24 uur gefixeerd in 10% formaline, waarna het overgezet werd in methanol (VWR international, prolabo). Vervolgens werd het weefsel ingebed in paraffine en gesneden in coupes van 5 µm doorheen de volledige long. Om de millimeter werd een coupe gekleurd met de haematoxyline-eosine-kleuring (H&E). Per long werden in totaal 5 coupes gekleurd en geëvalueerd door middel van het bepalen van de Ashcroft score (62). Hierbij wordt de volledige coupe op een 100x vergroting veld per veld bekeken. Elk veld krijgt een score tussen 0 (normaal weefsel) en 8 (volledige fibrose) afhankelijk van de ernst van de fibrose. Van alle waardes uit alle 5 coupes werd vervolgens een gemiddelde gemaakt.

De rechter longlobben werden na isolatie bewaard op -80°C. Om de hoeveelheid collageen in deze lobben te bepalen werd een hydroxyproline kwantificatie uitgevoerd zoals eerder beschreven (101). De longlobben werden gedurende 3 uur gehydrolyseerd in 6 molair (M) waterstofchloride (HCl) op 120°C, gevolgd door een afkoelperiode van 15 minuten. Vervolgens werd de pH geneutraliseerd tot een waarde van 6 à 7 door het toevoegen van 500 µl natriumhydroxide (NaOH). De stalen werden 1/20 verdund met steriel water (H₂O), waarna Chloramine-T werd toegevoegd om vrij hydroxyproline te oxideren. Na exact 20 minuten werd deze oxidatiereactie gestopt met 70% pyrrool-2-carboxylzuur (PCA). Ehrlich's reagens werd toegevoegd en de stalen werden gedurende 20 minuten in een waterbad van 60°C gezet. Na een afkoelperiode van 5 minuten, werd de absorbantie gemeten bij 570 nm. De concentratie hydroxyproline werd berekend aan de hand van de standaardcurve.

4.1.10. Histologie en KVE calculatie

Na euthanasie werden de longen geïsoleerd uit het dier. De linkerlong werd gedurende 24 uur gefixeerd in 10% formaline en daarna bewaard in PBS met natriumazide (NaN₃, Sigma-Aldrich). Vervolgens werd het weefsel ingebed in paraffine en gesneden in coupes. Deze werden gekleurd met H&E en de periodic acid schiff (PAS) kleuring, waarmee het kapsel van cryptococcale cellen gekleurd werd. Een representatieve coupe werd gekozen en ingescand, waarna het aantal cryptococci geteld werd met het panoramic viewer programma (versie 1.15.2, 3DHISTECH).



Figuur 1: KVE bepaling. Twee verschillende verdunningen uitgeplaat op een sabouraud-voedingsbodem. Na twee dagen in de broedstof zijn de individuele kolonies zichtbaar.

Vervolgens werd dit aantal omgerekend naar een aantal cryptococconen per oppervlakte. De geïsoleerde lobben van de rechterlong werden gewogen (Mettler Toledo, AE 260 Deltarange) en PBS werd toegevoegd. De verdunningsfactor werd nauwkeurig bijgehouden. Vervolgens werden de longen gemixt tot een homogeen mengsel. Een 1/5 verdunningsreeks werd gemaakt en de 1/625, 1/3125, 1/15625 en 1/78125 verdunningen werden uitgeplaat op Sabouraud-voedingsbodems (Figuur 1). Na een incubatieperiode van 24 uur op 30°C, werd het aantal kolonies per verdunning bepaald op basis waarvan de KVE werden berekend.

4.1.11. Statistische analyse

Statistische analyse werd uitgevoerd met GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Waardes tussen verschillende groepen werden steeds vergeleken met een niet-gepaarde T-test. Waardes tussen verschillende tijdstippen binnen eenzelfde groep werden vergeleken met een one-way analysis of variance (ANOVA) test. De data werd getest, maar bleek niet normaal verdeeld te zijn. Daarom werd geopteerd voor een non-parametrische Friedman test met een Dunn's post hoc test. Verschillen werden als significant beschouwd vanaf een p-waarde kleiner dan 0,05. De waardes op alle grafieken worden weergegeven als gemiddelde \pm standaarddeviatie (SD). Lineaire regressie werd gebruikt om een mogelijke relatie tussen Ashcroft score en de MRI- en CT-data te onderzoeken.

4.2. Resultaten

4.2.1. Onderzoek naar de potentiële radiotoxiciteit van longitudinale long-CT-scans

32 mannelijke C57Bl/6 muizen (23-25 gram) met een leeftijd van 8 weken werden gelijk verdeeld in 8 groepen, zoals weergegeven in Tabel 2. Elke groep muizen onderging een vooraf bepaald aantal CT-scans per week gedurende een periode van 5 of 12 weken.

Tabel 2: Duur van het radiotoxiciteit experiment en aantal scans per groep.

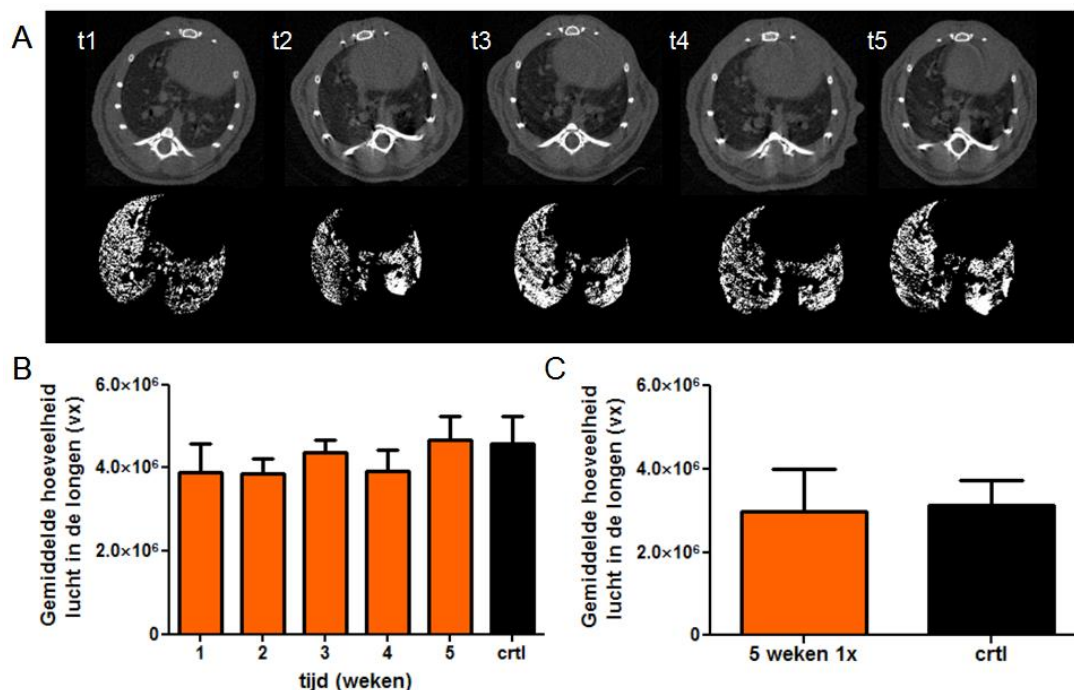
	Soort groep	Duur experiment	scanregime
Groep 1	experimenteel	5 weken	1 scan per week
Groep 2	experimenteel	5 weken	2 scans per week
Groep 3 *	experimenteel	5 weken	2 scans per week *
Groep 4	controle	5 weken	1 scan na 5 weken
Groep 5	controle	5 weken	geen scan
Groep 6	experimenteel	12 weken	1 scan per week
Groep 7	controle	12 weken	1 scan na 12 weken
Groep 8	controle	12 weken	geen scan

Elke groep bestaat uit 4 muizen. Groep 3* werd na 2 weken blootgesteld aan een driedubbele dosis.

Groep 3 werd 2 weken na de start van het experiment blootgesteld aan een driedubbele dosis. Deze scanprotocols werden gekozen op basis van scanschema's die relevant zijn voor de geplande longitudinale studies. Na de laatste *in vivo* scans werden de dieren geëuthanaseerd voor het maken van de *ex vivo* CT-scans.

4.2.1.1. Wekelijkse CT-scans gedurende 5 weken

De dieren in groep 1 ($n = 4$) werden gedurende 5 weken eens per week gescand. Dit resulteerde in een wekelijkse gemeten stralingsdosis (longdosis) van 0,813 Gy en een geaccumuleerde stralingsdosis van 4,065 Gy. De *in vivo* CT-beelden werden gereconstrueerd en op elk tijdstip visueel onderzocht (Figuur 2A, bovenaan). Er werden geen tekens van inflammatie gedetecteerd en de structuur van de longen was op geen enkel tijdstip afwijkend. Uit deze beelden werd met een automatisch algoritme de hoeveelheid lucht in de longen gesegmenteerd (Figuur 2A, onderaan). Kwantificatie van deze parameter op elk tijdstip toonde echter geen uitgesproken variaties (Figuur 2B). Er was enkel een bescheiden toename te zien doorheen de tijd. Deze toename werd verklaard door de natuurlijke groei van de longen. Op het laatste tijdstip werd de gemiddelde hoeveelheid lucht in de longen vergeleken met de controlegroep (groep 4, $n = 4$), die slechts eenmaal gescand werd na 5 weken. Er was geen verschil tussen de 2 groepen, wat aangeeft dat er in de longen geen stralingsgeïnduceerde schade gedetecteerd kon worden met CT.

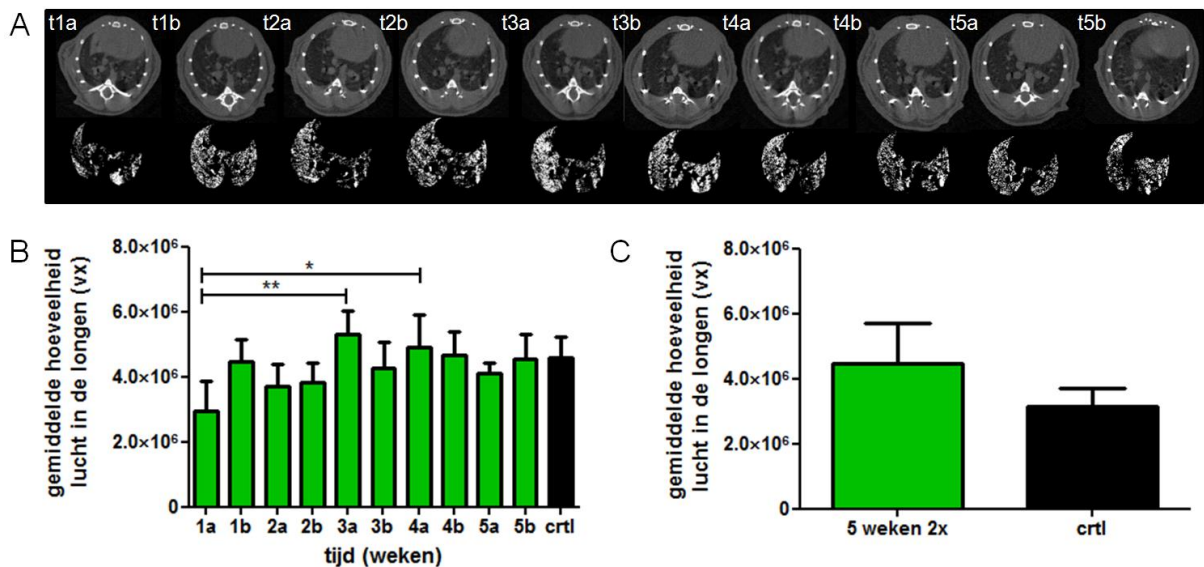


Figuur 2: Kwantitatieve en kwalitatieve beoordeling van de coronale CT-beelden en van de hoeveelheid lucht in de longen (groep 1). De dieren in groep 1 ($n = 4$) werden eens per week gescand gedurende 5 weken, de controledieren in groep 4 ($n = 4$) werden eenmalig gescand na 5 weken. **(A)** Bovenaan de gereconstrueerde CT-beelden op elk tijdstip voor een representatief dier, onderaan binaire beelden van de gesegmenteerde lucht in de longen. **(B)** De gemiddelde hoeveelheid lucht in de longen op elk tijdstip, berekend uit *in vivo* CT-beelden en uitgedrukt in aantal voxels ($n = 4$). Indien niets wordt aangegeven, is het verschil niet-significant. **(C)** De gemiddelde hoeveelheid lucht in de longen op het laatste tijdstip, berekend uit *ex vivo* CT-beelden en uitgedrukt in aantal voxels ($n = 4$). Indien niets wordt aangegeven, is het verschil niet-significant.

Bij het maken van *in vivo* CT-beelden kan het gebeuren dat het ademhalingssignaal op bepaalde momenten tijdens het scannen niet duidelijk genoeg is omdat het dier onregelmatig ademt. Dit maakt het moeilijker om de beelden achteraf juist te sorteren, waardoor projectiebeelden uit verschillende fases van de respiratoire cyclus foutief samen worden gezet. Dit geeft aanleiding tot een degradatie van de beeldkwaliteit en bewegingsartefacten (30). Indien het CT-beeld van minder goede kwaliteit is, zal de segmentatie ook van minder goede kwaliteit zijn en is de berekende hoeveelheid lucht in de longen afwijkend. Om variaties in deze waardes omwille van een slechte beeldkwaliteit te vermijden, werden de dieren na euthanasie op het laatste tijdstip ook *ex vivo* gescand. Uit deze gereconstrueerde beelden werd de hoeveelheid lucht in de longen gekwantificeerd (Figuur 2C). De waarde van 1 dier (groep 4) werd uitgesloten uit deze *ex vivo* analyse wegens een slechte segmentatie van de lucht. Hier werd eveneens aangetoond dat er geen verschil was tussen de experimentele dieren en de controledieren. Deze resultaten toonden aan dat eenmaal per week scannen met ademhalingsregistratie na 5 weken geen detecteerbare schade veroorzaakt aan het longweefsel.

4.2.1.2. Twee CT-scans per week gedurende 5 weken

De dieren in groep 2 ($n = 4$) werden gedurende 5 weken tweemaal per week gescand. Dit resulteerde in een wekelijkse stralingsdosis van 1,626 Gy en een geaccumuleerde stralingsdosis van 8,13 Gy. Op elk tijdstip werden de gereconstrueerde *in vivo* CT-beelden geïnspecteerd op onder andere foci van hyperintense pixels die wijzen op inflammatie of fibrose (Figuur 3A, bovenaan), maar er konden geen afwijkingen gevonden worden. De hoeveelheid lucht in de longen werd gesegmenteerd en gekwantificeerd met het eerder besproken algoritme (Figuur 3A (onderaan) en B). Globaal genomen beantwoordde het verloop van de hoeveelheid lucht in de longen aan de verwachting van een geleidelijke stijging, ondanks de aanwezigheid van enkele schommelingen. Er werd bijvoorbeeld een significant lagere waarde geobserveerd op het eerste tijdstip die waarschijnlijk te wijten was aan een groeisput die de dieren op een leeftijd van 8 weken doormaken. Dit kwam overeen met de bevindingen in groep 3. Tussen de opeenvolgende tijdstippen werden echter geen significante veranderingen geobserveerd die wijzen op longschade. Ook was een stijging van de hoeveelheid lucht in de longen het tegenovergestelde van wat men zou verwachten, aangezien stralingsgeïnduceerde longfibrose een daling zou betekenen van de hoeveelheid lucht in de longen. Op het laatste tijdstip werd de gemiddelde hoeveelheid lucht in de longen vergeleken met de controlegroep (groep 4, $n = 4$), die slechts eenmaal gescand werd na 5 weken. Er was geen verschil tussen de 2 groepen. Kwantificatie van de *ex vivo* hoeveelheid lucht in de longen bevestigde dat er geen verschil was tussen de twee groepen (Figuur 3C). Dit betekent dat ook tweemaal per week scannen met ademhalingsregistratie na 5 weken geen detecteerbare schade veroorzaakt aan het longweefsel.

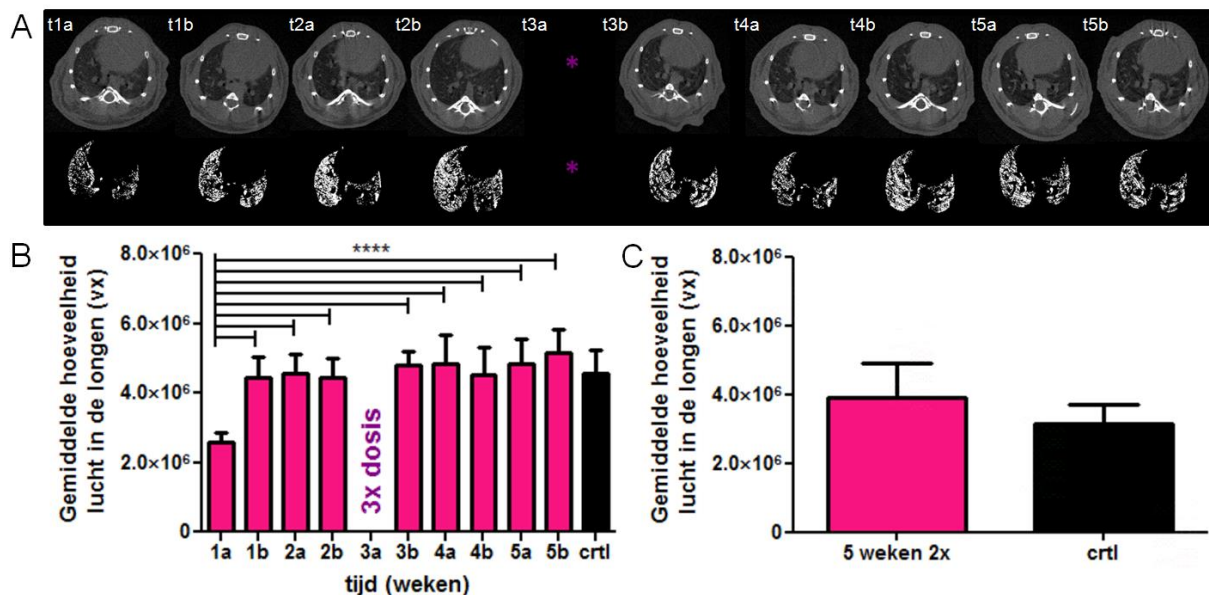


Figuur 3: Kwantitatieve en kwalitatieve beoordeling van de coronale CT-beelden en van de hoeveelheid lucht in de longen (groep 2). De dieren in groep 2 ($n = 4$) werden tweemaal per week gescand gedurende 5 weken, de controledieren in groep 4 ($n = 4$) werden eenmalig gescand na 5 weken. (A) Bovenaan de gereconstrueerde CT-beelden op elk tijdstip voor een representatief dier, onderaan binaire beelden van de gesegmenteerde lucht in de longen. (B) De gemiddelde hoeveelheid lucht in de longen op elk tijdstip, berekend uit *in vivo* CT-beelden en uitgedrukt in aantal voxels ($n = 4$). Indien niets wordt aangegeven, is het verschil niet-significant. * p -waarde $< 0,05$ ** p -waarde $< 0,01$ (C) De gemiddelde hoeveelheid lucht in de longen op het laatste tijdstip, berekend uit *ex vivo* CT-beelden en uitgedrukt in aantal voxels ($n = 4$). Indien niets wordt aangegeven, is het verschil niet-significant.

4.2.1.3. Eenmalig acuut verhoogde stralingsdosis halverwege 5 weken

Het kan gebeuren dat een scan herhaald moet worden, bijvoorbeeld omdat de muis onregelmatig ademde en de beeldkwaliteit daardoor onvoldoende was. Deze acute verhoging in stralingsdosis heeft mogelijk een invloed op het longweefsel. De dieren in groep 3 ($n = 4$) werden, net als de dieren in groep 2, tweemaal per week gescand gedurende 5 weken. Op tijdstip 3a werd de blootstellingstijd verhoogd van 120 ms naar 450 ms waardoor de stralingsdosis 3 maal verhoogd werd. De *in vivo* CT-beelden werden op elk tijdstip gereconstrueerd en de hoeveelheid lucht in de longen werd gesegmenteerd (Figuur 4A). Ondanks de verhoogde blootstelling halverwege het experiment, konden op de beelden nog steeds geen tekens van inflammatie of fibrose gedetecteerd worden. Ook met de structuur van de longen was er niets aan de hand. Kwantificatie van de hoeveelheid lucht in de longen toonde een relatief constant verloop doorheen de tijd (Figuur 4B). Enkel op tijdstip 1a waren de waardes betrekkelijk laag ($2,5 \cdot 10^6$ vx). Dezelfde lagere waardes op het eerste tijdstip zagen we ook in groep 2. Hiervoor werd geen plausibele verklaring gevonden, de correcte scan en reconstructie parameters werden gebruikt, de beelden waren van goede kwaliteit, er waren geen zware bewegingsartefacten en het juiste segmentatie algoritme werd gebruikt. De oorzaak zou dus eerder biologisch gezocht moeten worden. Misschien had het te maken met de stress van het transport, of met een infectie met een micro-organisme. Deze denkpeste kan echter niet meer nagegaan worden. Op het laatste tijdstip werd de gemiddelde hoeveelheid lucht in de longen vergeleken met de controlegroep (groep 4, $n = 4$), die slechts eenmaal gescand werd na 5 weken. Er werd geen verschil gedetecteerd tussen de 2 groepen.

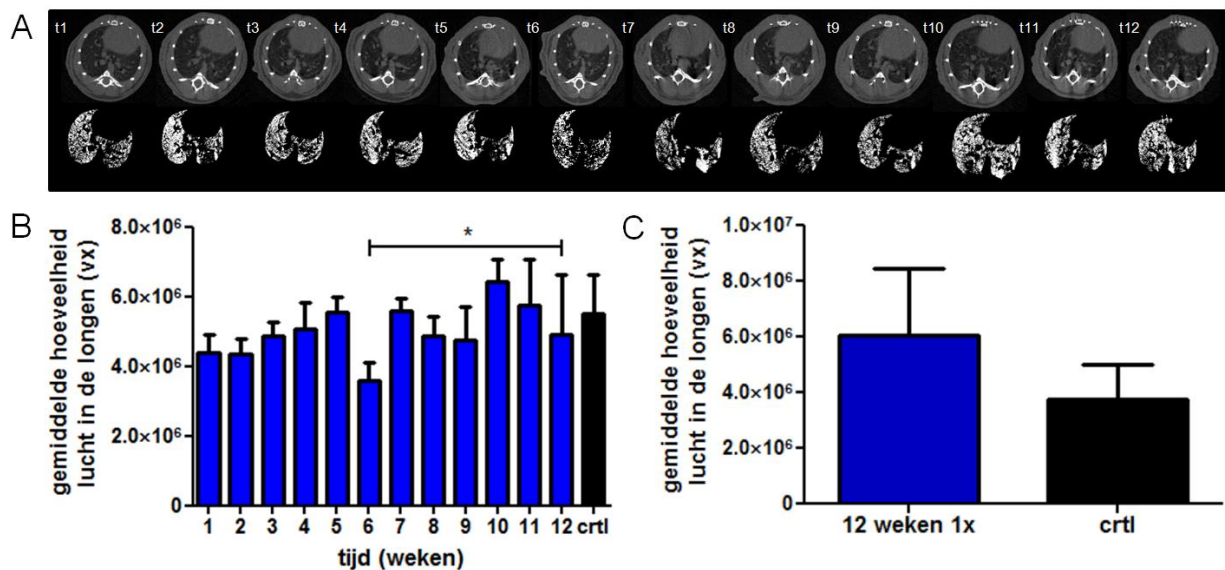
De kwantificatie van deze parameter uit de *ex vivo* scans toonde ook geen verschil tussen beide groepen (Figuur 4C). Deze resultaten toonden aan dat een acuut verhoogde stralingsdosis halverwege het experiment geen detecteerbare schade veroorzaakt aan het longweefsel.



Figuur 4: Kwantitatieve en kwalitatieve beoordeling van de coronale CT-beelden en van de hoeveelheid lucht in de longen (groep 3). De dieren in groep 3 (n = 4) werden eens per week gescand gedurende 5 weken, de controledieren in groep 4 (n = 4) werden eenmalig gescand na 5 weken. (A) Bovenaan de gereconstrueerde CT-beelden op elk tijdstip voor een representatief dier, onderaan binaire beelden van de gesegmenteerde lucht in de longen. (B) De gemiddelde hoeveelheid lucht in de longen op elk tijdstip, berekend uit *in vivo* CT-beelden en uitgedrukt in aantal voxels (n = 4). Indien niets wordt aangegeven, is het verschil niet-significant. **** p-waarde < 0,0001 (C) De gemiddelde hoeveelheid lucht in de longen op het laatste tijdstip, berekend uit *ex vivo* CT-beelden en uitgedrukt in aantal voxels (n = 4). Indien niets wordt aangegeven, is het verschil niet-significant.

4.2.1.4. Wekelijkse CT-scans gedurende 12 weken

De dieren in groep 6 (n = 4) werden gedurende 12 weken eens per week gescand. Dit resulteerde in een wekelijkse stralingsdosis van 0,813 Gy en een geaccumuleerde stralingsdosis van 9,756 Gy. De gereconstrueerde *in vivo* CT-beelden werden onderzocht (Figuur 5A, bovenaan), maar ook in deze groep werden geen tekens van inflammatie of fibrose gevonden. De hoeveelheid lucht in de longen werd eveneens op elk tijdstip gesegmenteerd en gekwantificeerd (Figuur 5B). Deze waarden schommelden enigszins vanaf tijdstip 6, maar die variaties bleken niet significant te zijn. Enkel op tijdstip 6 was er een significante daling ten opzichte van de waarden op het laatste tijdstip. Het vergelijken van deze waarden op tijdstip 12 met de controlewaarden (groep 7, n = 4) leverde geen verschil op. Er kon na 12 weken dus geen schade gedetecteerd worden met CT in de longen van de dieren in groep 6. Na euthanasie werden de dieren *ex vivo* gescand en werd de hoeveelheid lucht in de longen bepaald (Figuur 5C). Hier werd eveneens aangetoond dat er geen verschil was tussen de experimentele dieren en de controledieren. Hiermee toonden we aan dat zelfs na 12 weken geen stralingsgeïnduceerde schade gedetecteerd kan worden in de longen met CT.



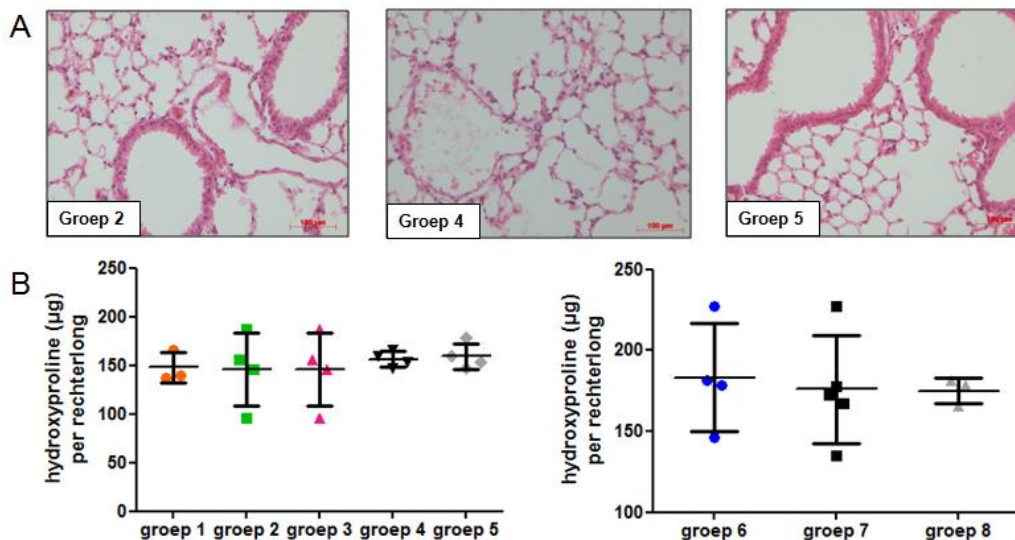
Figuur 5: Kwantitatieve en kwalitatieve beoordeling van de coronale CT-beelden en van de hoeveelheid lucht in de longen (groep 6). De dieren in groep 6 (n = 4) werden eens per week gescand gedurende 12 weken, de controledieren in groep 7 (n = 4) werden eenmalig gescand na 12 weken. (A) Bovenaan de gereconstrueerde CT-beelden op elk tijdstip voor een representatief dier, onderaan binaire beelden van de gesegmenteerde lucht in de longen. (B) De gemiddelde hoeveelheid lucht in de longen op elk tijdstip, berekend uit *in vivo* CT-beelden en uitgedrukt in aantal voxels (n = 4). Indien niets wordt aangegeven, is het verschil niet-significant. * p-waarde < 0,05 (C) De gemiddelde hoeveelheid lucht in de longen op het laatste tijdstip, berekend uit *ex vivo* CT-beelden en uitgedrukt in aantal voxels (n = 4). Indien niets wordt aangegeven, is het verschil niet-significant.

4.2.1.5. Histologie en hydroxyproline kwantificatie

Het is mogelijk dat er stralingsgeïnduceerde longfibrose aanwezig was ter hoogte van de longen, maar dat het onder de detectiegrens van CT lag. Indien dit het geval was, zou de fibrose zeker gedetecteerd moeten kunnen worden met standaard technieken zoals de hydroxyproline bepaling en de Ashcroft score. Met de hydroxyproline bepaling werd de hoeveelheid collageen in de longen gekwantificeerd. De grafieken in figuur 6B toonden aan dat er geen verschil was tussen de hoeveelheid collageen in de experimentele groepen en de controlegroepen. De Ashcroft score is een maat voor de hoeveelheid fibrose die gedetecteerd kan worden op de histologische H&E-coupees. Deze score gaf over de hele lijn een negatief resultaat. Er kon dus geen stralingsgeïnduceerde fibrose gedetecteerd worden met de standaard technieken.

Deze technieken detecteerden natuurlijk enkel fibrose, maar er kon ook stralingsgeïnduceerde schade aanwezig zijn die nog geen fibrose was. Daarom werd een gedetailleerd microscopisch onderzoek uitgevoerd op vijf histologische H&E-coupees per muis door 2 onafhankelijke deskundigen. Voor alle muizen in groep 2 tot 8 zagen de longen er normaal uit, zonder tekens van stralingsgeïnduceerde schade. De histologische coupes van de experimentele dieren en van de controledieren werden met elkaar vergeleken (Figuur 6A). Er konden geen verschillen gedetecteerd worden.

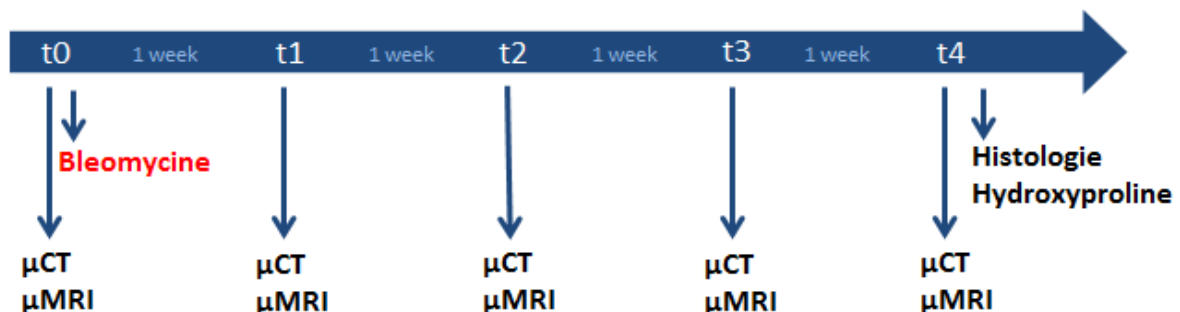
In de longen van 1 muis in groep 1 (5 weken 1x) werd bronchiolitis vastgesteld. Dit kon echter beschouwd worden als een toevallige bevinding die niet veroorzaakt werd door de herhaalde blootstelling aan ioniserende straling. De andere muizen uit deze groep en zelfs de muizen uit groep 6, die dubbel zo lang blootgesteld werden, vertoonden immers geen afwijkingen in de longen.



Figuur 6: Histologie en hydroxyproline kwantificatie. (A) Histologie werd uitgevoerd op de linkerlong. De afbeelding toont een representatief histologisch longbeeld (200x vergroting) van een experimenteel dier (groep 2, tweemaal CT gedurende 5 weken) en twee controledieren (groep 4 (1x gescand) en 5 (nooit gescand)). (B) Resultaten voor de hydroxyproline bepaling, uitgevoerd op de rechterlong na 5 of 12 weken. Op de grafieken staan de experimentele groepen links en de controlegroepen rechts. Indien niets wordt aangegeven, is het verschil niet-significant.

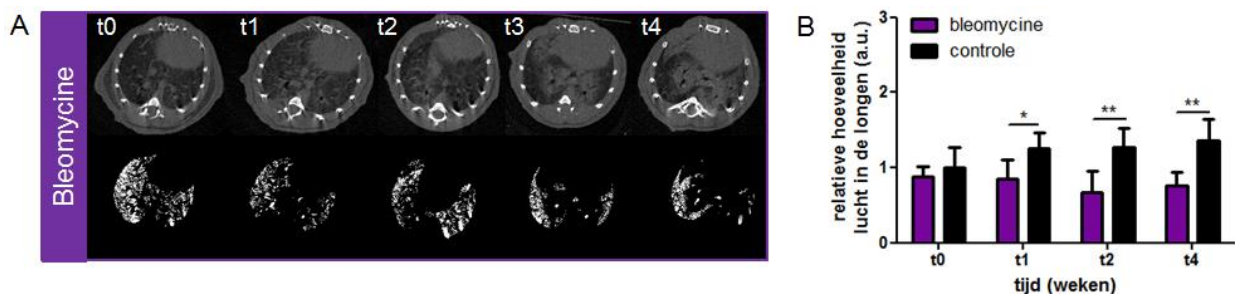
4.2.2. Validatie van MRI voor het visualiseren van longfibrose in het bleomycine muismodel

Onze groep heeft reeds aangetoond dat bleomycine-geïnduceerde fibrose en mogelijke therapieën in hoge resolutie opgevolgd kunnen worden met CT. Nu willen we onderzoeken of MRI eveneens gebruikt kan worden om dit proces op te volgen. MRI is immers potentieel gevoeliger, waardoor de overgang van inflammatie naar fibrose gedetecteerd zou kunnen worden met deze techniek. Deze onderzoeksvraag werd concreet aangepakt zoals weergegeven in Figuur 7. MRI en CT scans werden gemaakt op tijdstip 0, waarna de dieren geïnstilleerd werden met bleomycine. Vervolgens werd van elk dier wekelijks gedurende 4 weken MRI en CT scans gemaakt. Na het laatste tijdstip werden de dieren opgeofferd. Vervolgens werden de longen geïsoleerd voor histologische validatie van de MRI-resultaten.



Figuur 7: Tijdslijn van het bleomycine experiment. Op tijdstip t0 werden zowel MRI- als CT-controlebeelden gemaakt van de dieren. Daarna werden de dieren geïnstilleerd met bleomycine, gevolgd door wekelijkse scans gedurende 4 weken. Histologie en hydroxyproline kwantificatie werden uitgevoerd op het laatste tijdstip.

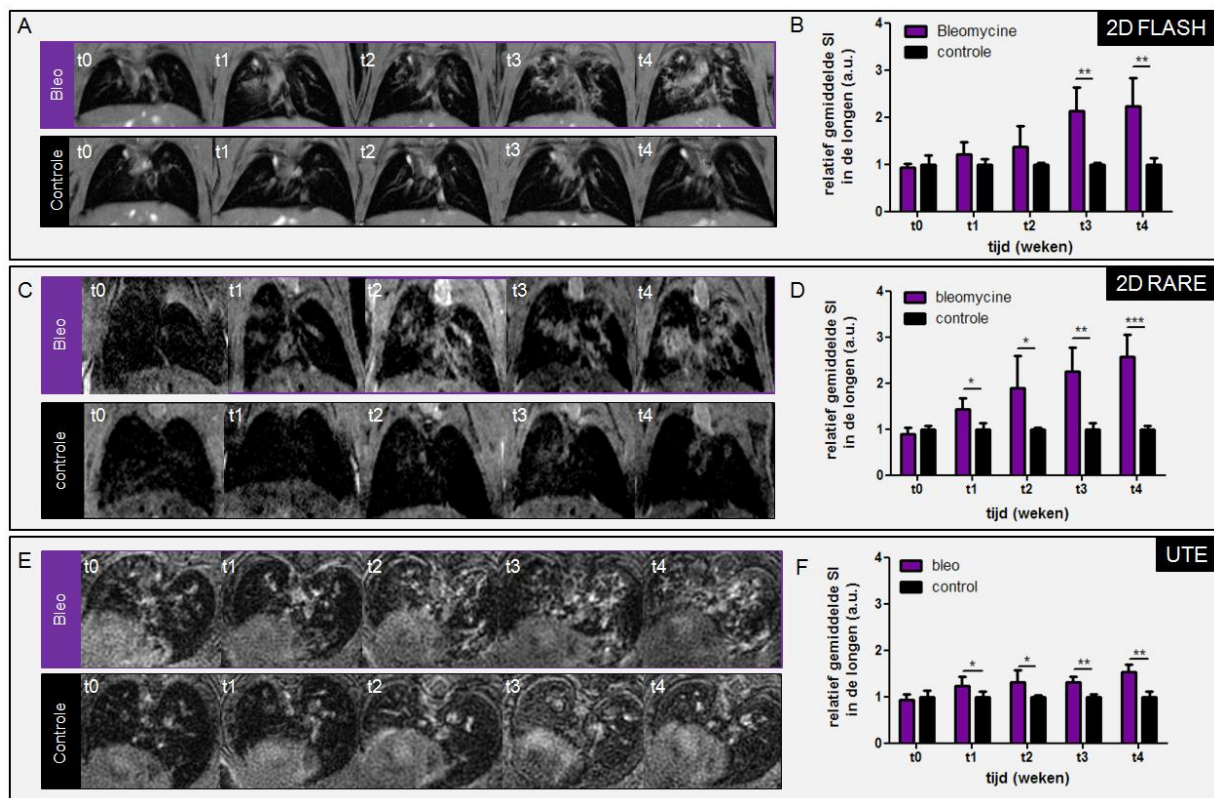
Op de CT-beelden kon in beide longen een duidelijk een toename in densiteit gezien worden (Figuur 8A), die overeenkomt met progressieve longfibrose in deze dieren (13). Visualisatie van de lucht in de longen toonde aan dat deze toename overeenkwam met een afname van de hoeveelheid lucht in de longen. Kwantificatie van deze parameter bevestigde de visuele observaties (Figuur 8B). Vóór bleomycine instillatie (tijds punt 0) was er geen verschil tussen de controlegroep en de bleomycinegroep. Een week na bleomycine instillatie (tijds punt 1) was er al een significante daling in de hoeveelheid lucht in de longen. Het verschil tussen de bleomycinegroep en de controlegroep nam toe naarmate de tijd vorderde. Longfibrose in deze muizen was dus succesvol geïnduceerd en kan gevisualiseerd en gekwantificeerd worden met CT, zoals eerder aangetoond werd (13).



Figuur 8: CT van longfibrose in de muis. (A) Representatieve coronale CT-beelden van de longen voor en na bleomycine instillatie (bovenaan). Segmentatie en visualisatie van de lucht in de longen (onderaan). (B) Kwantificatie van de hoeveelheid lucht in de longen op elk tijds punt. Alle waarden werden genormaliseerd naar de gemiddelde controlegroepwaarde op tijds punt 0. * p-waarde < 0,05 ** p-waarde < 0,01

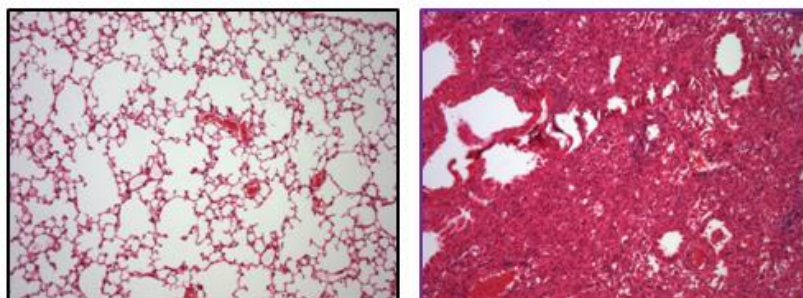
Om het potentieel van long-MRI voor detectie van longfibrose te onderzoeken, werden op elk tijds punt MRI-beelden gemaakt met 3 verschillende sequenties: de 2D FLASH-sequentie, de 2D RARE-sequentie en de UTE-sequentie. Op de 2D FLASH-longbeelden van de bleomycine-geïnduceerde dieren kon doorheen de tijd een duidelijke toename in hyperintens signaal gezien worden (Figuur 9A, bovenaan). Deze toename was met het oog detecteerbaar vanaf tijds punt 3. In de controlegroep, die geïnduceerd werd met PBS, werd geen toename in hyperintens signaal gedetecteerd (Figuur 9A, onderaan). Kwantificatie van de gemiddelde SI toonde een sterke toename in de bleomycinegroep (Figuur 9B). Vanaf tijds punt 3 was deze toename significant ten opzichte van de controlegroep. Op de laatste tijds punten leek de SI echter een plateauwaarde bereikt te hebben. Op de 2D RARE-longbeelden van de bleomycine-geïnduceerde dieren kon eveneens doorheen de tijd een sterke toename in hyperintens signaal gezien worden (Figuur 9C, bovenaan). Deze toename kon al opgemerkt worden vanaf tijds punt 1, maar was pas duidelijk zichtbaar vanaf tijds punt 2. In de longen van de controledieren waren deze hyperintense signalen zoals verwacht niet aanwezig (Figuur 9C, onderaan). De grafiek toonde een significante toename in SI vanaf tijds punt 1 (Figuur 9D). Het verschil in SI werd steeds groter doorheen de tijd, waardoor de p-waarde steeds kleiner werd op elk tijds punt. Op de UTE-longbeelden van de bleomycine-geïnduceerde dieren was de toename in hyperintens signaal minder duidelijk zichtbaar, maar toch detecteerbaar vanaf tijds punt 2 (Figuur 9E). Op de grafiek is de SI al significant verschillend tussen de bleomycinegroep en de controlegroep vanaf tijds punt 1 en blijft het licht stijgen doorheen de tijd (Figuur 9F). Longfibrose in de muis kan dus succesvol gevisualiseerd en gekwantificeerd worden met de drie onderzochte MRI-protocols.

Met de RARE- en UTE-sequentie waren de gekwantificeerde verschillen al vanaf het eerste tijdspunt significant, waar dit met de FLASH-sequentie pas vanaf tijdspunt 3 significant was.



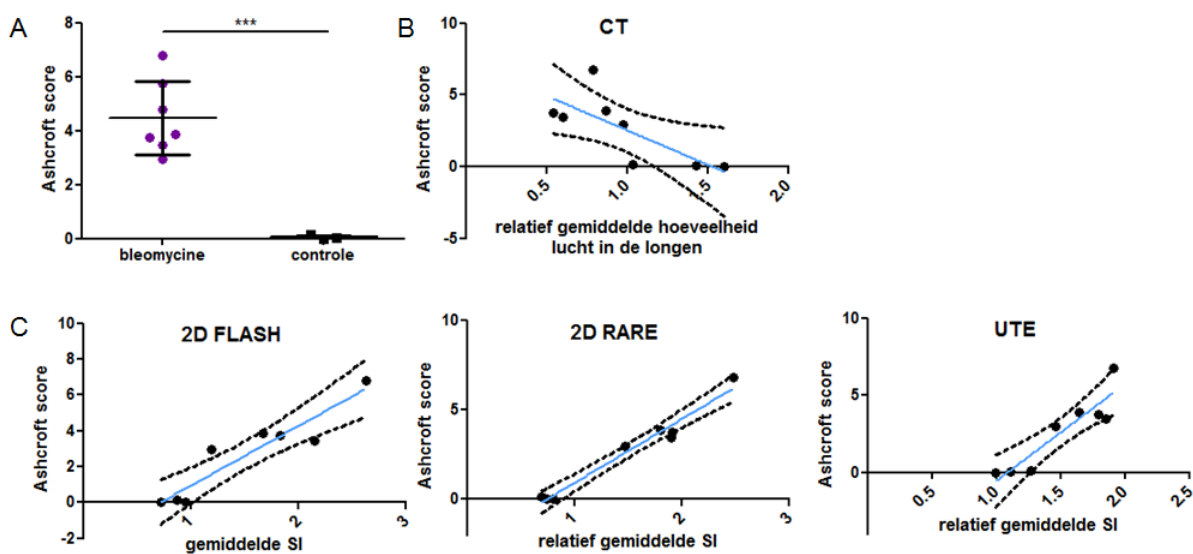
Figuur 9: MRI van longfibrose in de muis. (A-C-E) Representatieve 2D FLASH, RARE en UTE MRI-beelden van de longen op elk tijdspunt voor dezelfde representatieve muis. (B-D-F) Kwantificatie van de gemiddelde signaal intensiteit (SI) in de longen op de 2D FLASH (A-B), 2D RARE (C-D) en UTE (E-F) beelden (n = 10). De berekende waarden werden dan genormaliseerd naar de gemiddelde controlewaardes per tijdspunt. * p-waarde<0,05 ** p-waarde<0,01 *** p-waarde<0,001

Na het laatste beeldvormingstijdspunt werden de dieren opgeofferd voor histologische validatie van de resultaten. De linkerlongen van alle dieren werd gebruikt voor het maken van H&E-coupen en microscopische evaluatie van longfibrose. Op de histologische coupes van de bleomycine-geïnduceerde dieren kon duidelijk de aanwezigheid van fibrose gezien worden (figuur 10).



Figuur 10: H&E-coupen van de linkerlong. Na het laatste tijdspunt uitgevoerd werden de linkerlongen van alle dieren microscopisch onderzocht. De afbeelding toont een representatief longbeeld van een dier uit de controlegroep (links) en uit de bleomycinegroep (rechts).

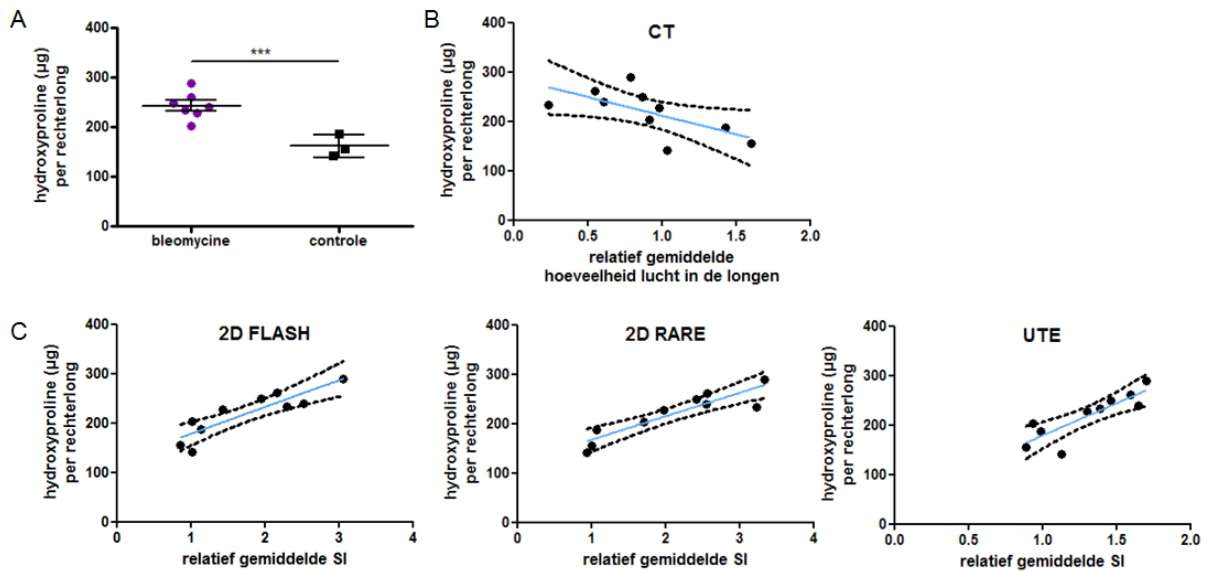
Om deze waarnemingen op een meer kwantitatieve manier weer te geven, werd de Ashcroft score berekend voor elk dier. Deze score was significant toegenomen in de bleomycine-geïnduceerde dieren (Figuur 11A). Dan werd de relatie tussen deze score en de beeldvormingsdata onderzocht voor het laatste tijdstip van de studie. Er werd een negatieve correlatie gevonden tussen de Ashcroft score en de CT-data (Figuur 11B). Een lage hoeveelheid lucht in de longen was dus geassocieerd met een hoge Ashcroft score en wijst op vergevorderde longfibrose. Tussen de MRI-data en de Ashcroft score werd een sterke positieve correlatie gevonden (Figuur 11C). Dit betekende dat een hoge SI in de longen overeenkwam met een uitgesproken aanwezigheid van longfibrose, zoals aangegeven door de hoge Ashcroft score.



Figuur 11: Correlatie van de Ashcroft score met de CT-data en MRI-data. Een lineaire regressie wordt gebruikt om de relatie tussen de Ashcroft score en de beeldvormingsdata te onderzoeken. (A) De gemiddelde Ashcroft score voor de bleomycinegroep en de controlegroep. *** p-waarde $<0,001$ (B) Correlatie van de CT-data met de Ashcroft score ($R^2=0,5508$). (C) Correlatie van de MRI-data met de Ashcroft score (2D FLASH: $R^2=0,8770$; 2D RARE: $R^2=0,9697$; UTE: $R^2=0,8330$).

De hoeveelheid hydroxyproline in de rechterlonglobben werd gekwantificeerd in elk dier om zo op een tweede manier een idee te krijgen van de hoeveelheid collageen in de long (Figuur 12A). Deze hoeveelheid bleek significant hoger te zijn in de bleomycine-geïnduceerde dieren. Dit bevestigde opnieuw dat alle muizen die geïnduceerd waren met bleomycine uiteindelijk longfibrose ontwikkelden. Ook werd de verhouding tussen de hoeveelheid hydroxyproline met de beeldvormingsdata onderzocht. Er werd een negatieve correlatie gevonden met de CT-data (Figuur 12B). Een kleine hoeveelheid lucht in de longen was dus geassocieerd met een grote hoeveelheid collageen in de longen. De MRI-data van alle sequenties was opnieuw sterk positief gecorreleerd met de hoeveelheid hydroxyproline in de longen (Figuur 12C), wat betekende dat een lage SI in de longen geassocieerd was met een lage hoeveelheid collageen in de longen. Deze positieve correlatie was het sterkst voor de 2D RARE MRI-data en iets minder sterk voor de UTE MRI-data.

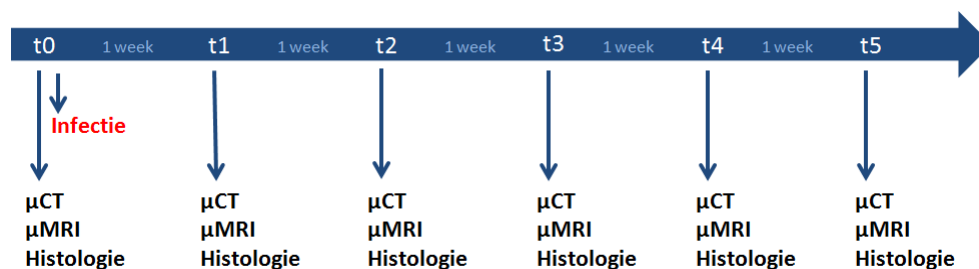
Deze correlaties waren zoals verwacht gelijkaardig aan de correlaties gevonden voor de Ashcroft score; de hydroxyproline kwantificatie was immers sterk positief gecorreleerd met de Ashcroft score (data niet getoond). Hieruit kunnen we afleiden dat voor zieke dieren met een grote hoeveelheid fibrose in de longen, dit overeenkomt met een lage hoeveelheid lucht (CT) en een hoge SI in de longen (MRI). Dit betekent dat de histologische data de MRI-data bevestigen.



Figuur 12: Correlatie van de hydroxyproline kwantificatie met de CT- en MRI-data. Een lineaire regressie wordt gebruikt om de relatie tussen de hydroxyproline kwantificatie en de beeldvormingdata te onderzoeken. (A) Hydroxyproline kwantificatie voor de bleomycinegroep en de controlegroep. *** p-waarde < 0,001 (B) Correlatie van de CT-data met de hydroxyproline kwantificatie ($R^2=0,4283$). (C) Correlatie van de MRI-data met de hydroxyproline kwantificatie (2D FLASH: $R^2=0,7846$; 2D RARE: $R^2=0,8278$; UTE $R^2=0,7271$).

4.2.3. Visualisatie van cryptococcale pneumonie met CT en MRI

In dit experiment werd nagegaan of MRI en CT gebruikt kunnen worden voor het opvolgen van de longinfectie veroorzaakt door *Cryptococcus gattii*. Een eerste groep BALB/c muizen (groep 1), die bestond uit 25 geïnfecteerde dieren (500 cellen) en 8 controledieren, werden een eerste keer gescand vóór inductie van het model (of controle) en daarna wekelijks gedurende 5 weken opgevolgd met zowel MRI als CT, zoals weergegeven in figuur 13. Op ieder tijdstip werden na de scans enkele dieren ($n = 2$) opgeofferd voor histologisch onderzoek en bepaling van het aantal kolonievormende eenheden (KVE) om de beeldvormingsresultaten te valideren.



Figuur 13: tijdslijn van groep 1 in het *Cryptococcus*-experiment. Vóór infectie met cryptococcale cellen werden MRI en CT-controlebeelden gemaakt van alle dieren. Daarna werden wekelijks MRI en CT-beelden gemaakt gedurende 5 weken. Na de scans werden op elk tijdstip enkele dieren ($n = 2$) opgeofferd voor histologie en KVE bepaling.

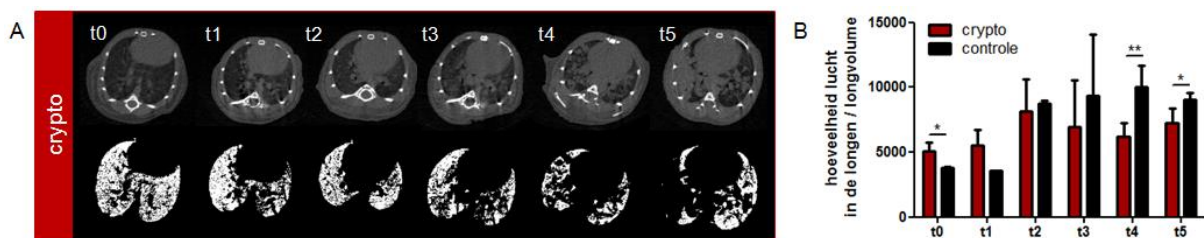
Groep 3 bestond uit 5 geïnfecteerde dieren (500 cellen), 1 geïnfecteerd dier (50000 cellen) en 1 controledier. Vier weken na inductie werden deze dieren onderworpen aan FCFM-metingen. Deze metingen werden 2 weken na inductie uitgevoerd op het dier dat met 50000 cellen geïnfecteerd werd.

Tabel 3: Overzicht van de verschillende groepen in het *Cryptococcus* experiment.

	test	R265-cellen	geïnfecteerde dieren	controledieren
Groep 1	MRI / CT scans	500	n = 25	n = 8
Groep 2	longfunctietesten	500	n = 5	n = 5
Groep 3	FCFM	500 / 50000	n = 6	n = 1

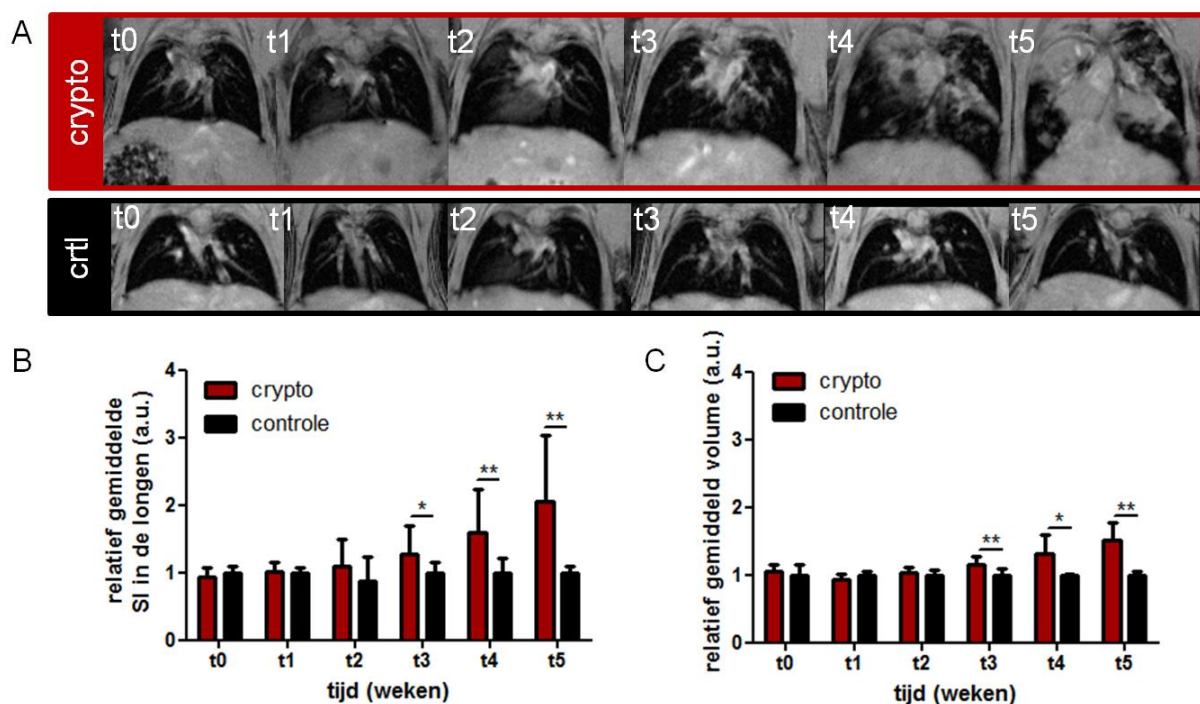
4.2.3.1. Longitudinale opvolging van pulmonaire cryptococcose met MRI en CT

Muizen werden gescand met zowel MRI als CT, waarna ze geïnfecteerd werden met *Cryptococcus gattii*. Vervolgens werden wekelijks gedurende 5 weken MRI- en CT-beelden gemaakt. Op de CT-beelden werd doorheen de tijd een toename in densiteit gezien in de longen (Figuur 14A, bovenaan). Deze toename ging gepaard met een afname in de hoeveelheid lucht in de longen, zoals visueel voorgesteld door de binaire beelden (Figuur 14A, onderaan). De longen van de zieke muizen vergrootten met de tijd (figuur 15A en figuur 17). Daarom werd de hoeveelheid lucht in de longen gekwantificeerd uit deze beelden en vervolgens genormaliseerd naar het longvolume (Figuur 14B). Dit werd gedaan omdat de toename in longgrootte resulteerde in een toename in de absolute hoeveelheid lucht in de longen, waardoor de relatieve afname in hoeveelheid lucht ten gevolge van de pulmonaire infectie niet meer gedetecteerd kon worden. Op de resulterende grafiek werd een significant verschil gezien tussen de controlegroep en de geïnfecteerde groep op tijdstip 4 en 5, maar ook op tijdstip 1. Dit onverwachte resultaat is waarschijnlijk een gevolg van het gebruik van een te laag aantal beelden voor de kwantificatie (n = 2). Een groot aantal beelden van de eerste tijdstippen waren immers onbruikbaar door problemen met de ademhalingsregistratie. Dit resulteerde in zware bewegingsartefacten in de CT-beelden waardoor het algoritme niet meer gebruikt kon worden voor een correcte berekening van de hoeveelheid lucht in de longen. Het experiment zou dus best herhaald worden met een groter aantal dieren. De CT-resultaten tonen aan dat deze beeldvormingstechniek gebruikt kan worden voor de opvolging van een cryptococcale longinfectie.



Figuur 14: CT analyse van pulmonaire cryptococcosis in muizen. (A) Representatieve CT-beelden van geïnfecteerde longen op elk tijdstip (n = 2 op t0-3). Doorheen de tijd werd een sterke toename in attenuatie gezien (bovenaan). Deze toename kwam overeen met een afname van de hoeveelheid lucht in de longen (onderaan). (B) De gekwantificeerde hoeveelheid lucht in de longen, op elk tijdstip genormaliseerd naar het longvolume. Er werd een significant verschil gedetecteerd tussen beide groepen op tijdstip 1, 4 en 5. * p-waarde < 0,05 ** p-waarde < 0,01.

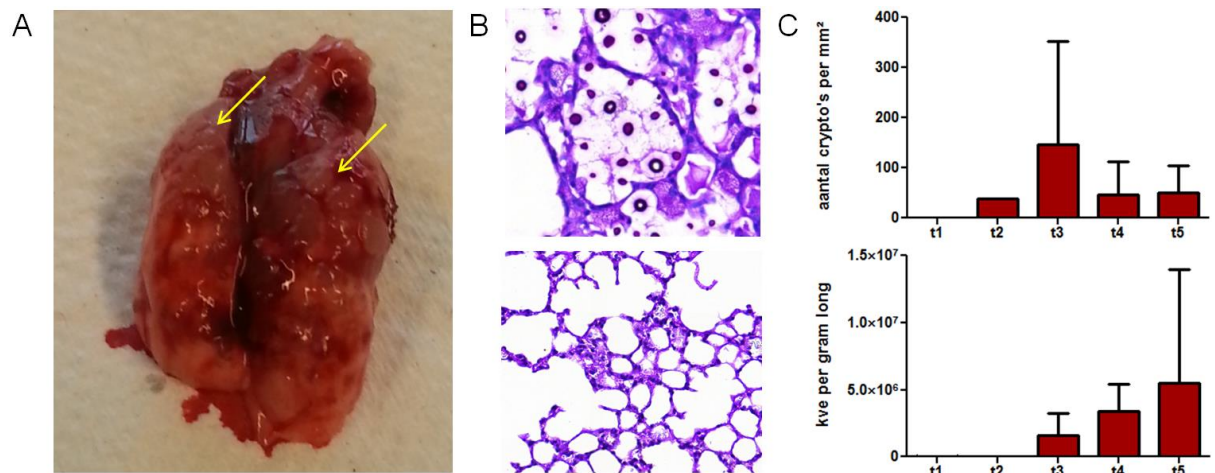
Op de MRI-beelden van de geïnfecteerde dieren werden vanaf tijdstip t3 hyperintense signalen gedetecteerd in de longen (Figuur 15A, bovenaan). Deze hyperintense signalen waren op de overeenkomstige tijdstippen niet aanwezig in de longen van de controledieren (Figuur 15A, onderaan). Ook was vanaf tijdstip t4 duidelijk te zien dat de grootte van de longen sterk toenam in de geïnfecteerde dieren. In de controledieren werd deze toename in longgrootte niet gezien. Uit deze MRI-beelden werden zowel de gemiddelde SI in de longen als het gemiddeld longvolume op elk tijdstip gekwantificeerd (Figuur 15B en C). Beide parameters bleken significant verhoogd te zijn in de geïnfecteerde groep vanaf tijdstip 3. Het is dus mogelijk om een cryptococcale longinfectie succesvol te visualiseren en kwantificeren met MRI.



Figuur 15: MRI van pulmonaire cryptococcosis in muizen. De berekende SI en longvolumes werden steeds genormaliseerd naar de gemiddelde controlewaarde op elk tijdstip. (A) Representatieve 2D FLASH MRI-beelden van de longen op elk tijdstip. Na visuele inspectie werden in de longen van de geïnfecteerde dieren hyperintense signalen gedetecteerd vanaf tijdstip 4 (bovenaan). Ook bleek in deze dieren de grootte van de longen toe te nemen doorheen de tijd. Deze hyperintense signalen en toename in grootte werden niet gezien in de longen van de controledieren (onderaan). (B) Kwantificatie van de relatieve gemiddelde SI in de longen doorheen de tijd. In de geïnfecteerde groep nam de SI significant toe vanaf tijdstip 3. * p-waarde<0,05 ** p-waarde<0,01. (C) Kwantificatie van het relatief gemiddeld longvolume doorheen de tijd. In de geïnfecteerde groep nam het relatief longvolume significant toe vanaf tijdstip 3. * p-waarde<0,05 ** p-waarde<0,01.

Ter validatie van de beeldvormingsresultaten, werden op elk tijdstip 2 dieren opgeofferd, waarna de longen geïsoleerd werden voor histologie en KVE bepaling. De longen van de geïnfecteerde dieren waren duidelijk volledig aangetast (Figuur 16A). Talrijke cryptococcoma's waren diffuus verspreid doorheen de volledige longen (gele pijlen). De linkerlong werd geïsoleerd en gebruikt voor histologisch onderzoek (Figuur 16B). Op een van de resulterende coupes werd het aantal cryptococci geteld (Figuur 16C). Pas vanaf tijdstip 2 waren de cryptococci detecteerbaar in de long. Dit aantal bleef relatief constant doorheen de tijd.

De rechterlongen werden gebruikt voor KVE bepaling. Pas vanaf tijdstip 3 was er een detecteerbaar aantal KVE per gram long en dit aantal nam toe doorheen de tijd (Figuur 16C). Omdat per tijdstip slechts 2 dieren gebruikt werden voor histologie en KVE bepaling, waren de verkregen SD behoorlijk groot. We kunnen hieruit besluiten dat MRI en CT het verloop van de infectie succesvol in beeld kunnen brengen. De resultaten verkregen uit de MRI- en CT-beelden zijn ook in overeenstemming met de histologische bevindingen.



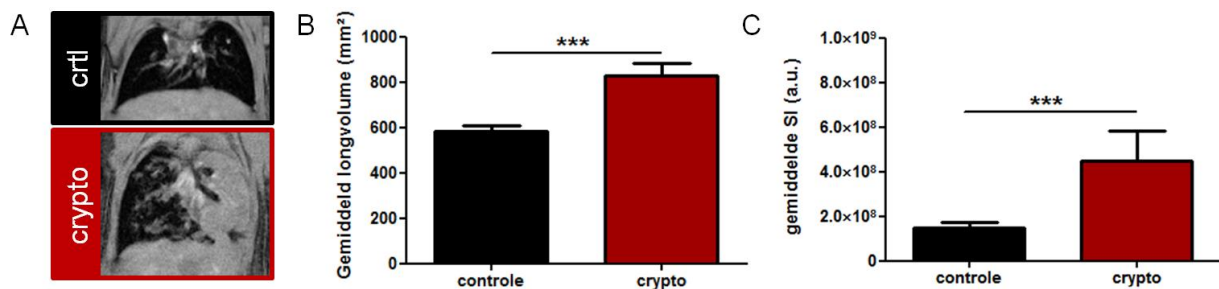
Figuur 16: Histologische validatie. (A) De longen van een geïnfecteerde muis op tijdstip 4. Cryptococcoma's waren diffuus verspreid doorheen de longen (gele pijlen). (B) Lichtmicroscopie van representatieve PAS-coupen (40x vergroting) van een zieke long (bovenaan) en een gezonde long (onderaan) op tijdstip 4. (C) telling van het aantal cryptococcomen per oppervlakte (mm²) longweefsel (bovenaan) en KVE bepaling (onderaan) op elk tijdstip.

4.2.3.2. Evaluatie van de longfunctie

In het vorig experiment was op de MRI-beelden duidelijk te zien dat de longen van de geïnfecteerde dieren sterk toenamen in grootte vanaf tijdstip 3. Omdat deze dieren geen uiterlijk waarneembare tekenen van ziekte vertoonden, zou deze toename in longgrootte een compensatiemechanisme kunnen zijn om de longfunctie op peil te houden. Daarom wilden we met behulp van longfunctiemetingen nagaan in hoeverre de longfunctie van deze dieren aangetast was. Deze metingen werden uitgevoerd op tijdstip 4, omdat op dit tijdstip de scans van alle dieren duidelijk wezen op cryptococcosis en vergroting van de longen terwijl er nog geen uiterlijke kenmerken van ziekte waarneembaar waren.

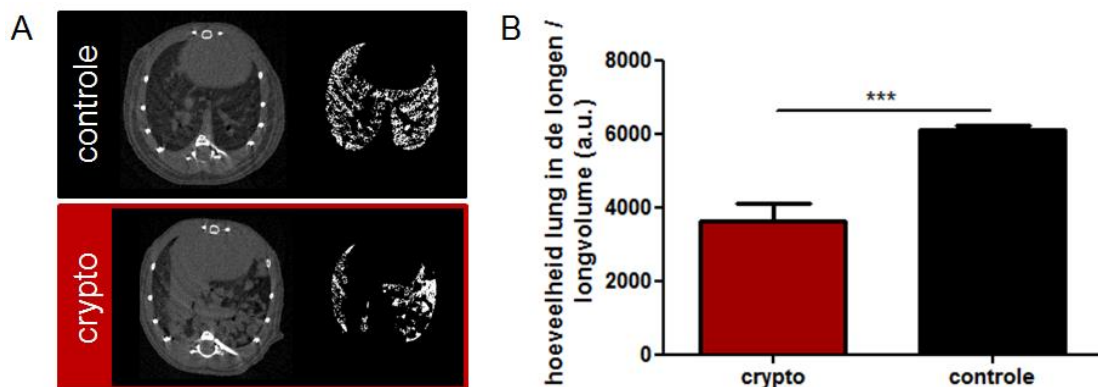
De tweede groep bestond uit 5 geïnfecteerde muizen (500 cellen) en 5 controlemuizen (tabel 3). Vóór inductie en vier weken na inductie werden MRI- en CT-beelden gemaakt van deze dieren, waarna ze onderworpen werden aan longfunctietesten met het FlexiVent systeem. Daarna werden de dieren opgeofferd voor histologisch onderzoek en KVE bepaling.

Op de MRI-beelden werden diffuus verspreide, hyperintense signalen gedetecteerd in de longen van de geïnfecteerde dieren (Figuur 17A). Ook de grootte van de longen was toegenomen in deze groep. Kwantificatie van het gemiddeld longvolume en van de gemiddelde SI bevestigde deze observaties (Figuur 17B en C). Beide parameters waren significant toegenomen in de geïnfecteerde groep. Op de MRI-beelden is de longinfectie dus duidelijk zichtbaar, net zoals de toename longgrootte.



Figuur 17: MRI analyse van de longen 4 weken na infectie. (A) Representatieve 2D FLASH MRI-beelden van de longen in de controlegroep (bovenaan) en in de geïnfecteerde groep (onderaan). (B) Kwantificatie van het gemiddeld longvolume. *** p-waarde<0,001 (C) Kwantificatie van de gemiddelde SI in de longen. *** p-waarde<0,001

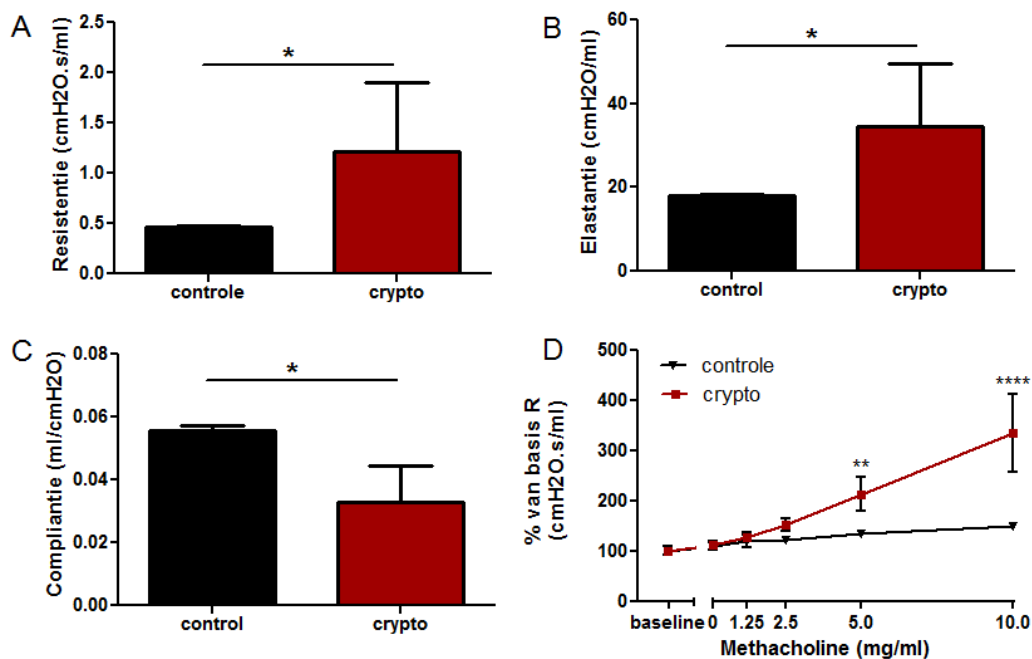
Op hetzelfde tijdstip werden eveneens CT-beelden gemaakt van de longen. Op de CT-beelden van de geïnfecteerde dieren werd een verhoogde attenuatie gezien in de longen, geassocieerd met een afname in de hoeveelheid lucht in de longen (Figuur 18A). Kwantificatie van deze parameter bevestigde de significante daling in de geïnfecteerde groep (Figuur 18B). Ook op de CT-scans zien we dus duidelijk longinfectie en vergroting van de longen. Uiterlijk is er echter geen verschil te zien tussen de zieke muizen en de gezonde controlemuizen.



Figuur 18: CT analyse van de longen 4 weken na infectie. (A) Representatieve CT-beelden van de longen in de controlegroep en de geïnfecteerde groep (links), samen met de gesegmenteerde hoeveelheid lucht in de longen (rechts). In de geïnfecteerde groep werd een verhoogde attenuatie gezien in de longen, geassocieerd met een daling in de hoeveelheid lucht in de longen. (B) Kwantificatie van de hoeveelheid lucht in de longen, genormaliseerd naar het longvolume. In de geïnfecteerde groep was de gemiddelde hoeveelheid lucht in de longen significant gedaald (***) p-waarde<0,001).

Uit de longfunctiemetingen op dit tijdstip (t4) bleek dat in de geïnfecteerde groep zowel de resistentie als de elastantie van de luchtwegen significant gestegen was (Figuur 19A en B). De elastantie is een maat voor de terugveerbaarheid van een orgaan. Het omgekeerde hiervan is de compliantie. In overeenkomst met deze definities bleek de compliantie significant gedaald te zijn in de geïnfecteerde groep (Figuur 19C). Dit houdt in dat de longen van de geïnfecteerde dieren stijver waren dan de longen van de controledieren.

Ook de hyperreactiviteit van de luchtwegen werd getest door middel van een MCh-provocatietest (Figuur 19D). Bij een concentratie van 2,5 mg/ml methacholine werd een sterkere bronchoconstrictie gezien in de geïnfecteerde groep, maar het verschil met de controlegroep was nog niet significant. Pas bij een concentratie van 5-10 mg/ml was de geobserveerde bronchoconstrictie significant sterker in de geïnfecteerde groep. Dit betekent dat de zieke muizen een verhoogde reactiviteit vertoonden in hun longen.



Figuur 19: Longfunctietesten en methacholine-provocatietest. De longfunctie en de hyperreactiviteit van de luchtwegen werd 4 weken na infectie gemeten. (A) De gemiddelde resistentie van de luchtwegen in de geïnfecteerde dieren en de controledieren. (B) De gemiddelde elastantie van de luchtwegen in de geïnfecteerde dieren en de controledieren. (C) De gemiddelde compliantie van de luchtwegen in de geïnfecteerde dieren en de controledieren. (D) Resultaten van de methacholine-provocatietest. * p-waarde<0,05 ** p-waarde<0,01 **** p-waarde<0,0001

Hieruit kunnen we besluiten dat ondanks de vergroting van de longen en het gebrek aan symptomen, muizen met een *Cryptococcus gattii* longinfectie wel degelijk een sterk verminderde longfunctie hebben. Dat de resultaten van deze functionele testen wijzen op een ernstige longinfectie, is in overeenstemming met de MRI- en CT-resultaten op hetzelfde tijdstip. Functionele longtesten kunnen dus eveneens gebruikt worden om de infectie in dit stadium te evalueren.

4.2.3.3. Evaluatie van longinfectie met FCFM

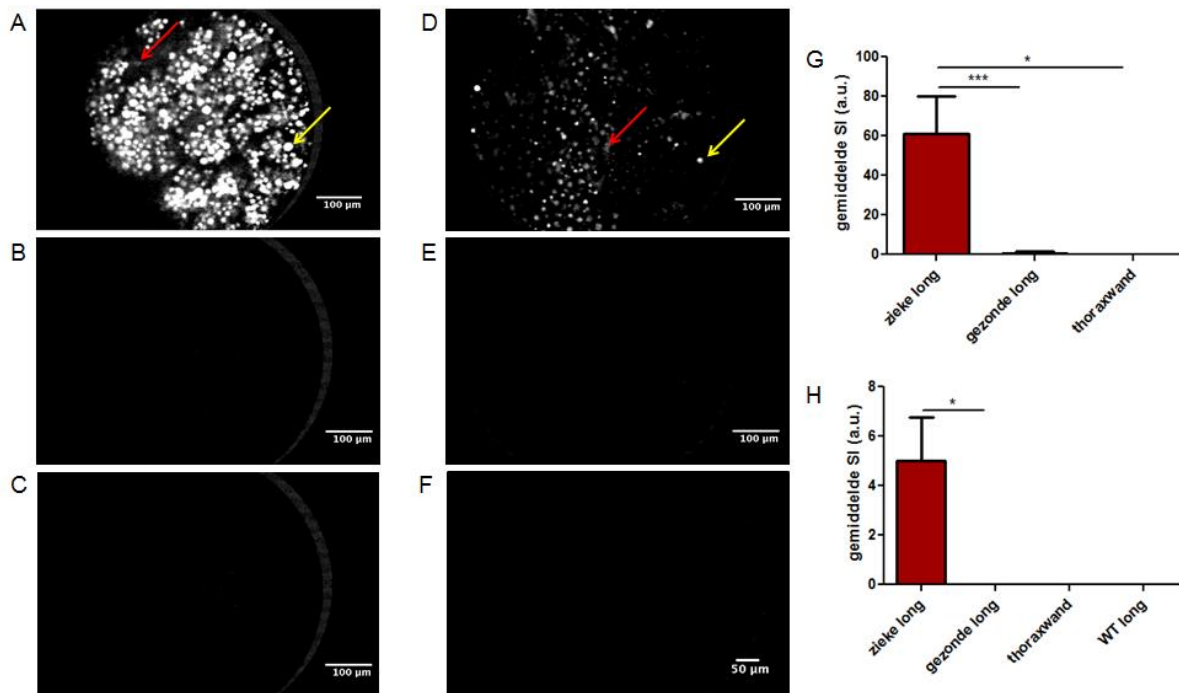
Omdat FCFM de mogelijkheid biedt om *in vivo* fluorescente structuren te visualiseren op cellulair niveau, wilden we nagaan of we deze techniek kunnen gebruiken om de cryptococcale longinfectie te onderzoeken op microscopische schaal in levende dieren.

Voor dit experiment werden 7 muizen gebruikt, waarvan 6 geïnfecteerd met GFP-positieve *Cryptococcus gattii* en 1 met WT *Cryptococcus gattii* (groep 3, tabel 3). Deze dieren werden twee weken (inductie met 50000 cellen) of vier weken (inductie met 500 cellen) na infectie onderworpen aan FCFM-metingen. Eerst werd getracht om de metingen op een endoscopische manier te uitvoeren, maar er werd geen beeld verkregen (data niet getoond). Vervolgens werd besloten om te werken met een transthoracale benadering.

Met de PF-2295 S-1500 sonde werden beelden gemaakt van een ziek deel van de long, een gezond deel van de long en van de thoraxwand. Dit werd gedaan in 3 verschillende muizen geïnfecteerd met GFP+ *Cryptococcus gattii*. Representatieve beelden van 1 dier worden getoond in Figuur 20 A, B en C. Beeld A werd verkregen door de sonde op de oppervlakte van een cryptococcoma te houden. Individuele cryptococcale cellen waren duidelijk zichtbaar als rondjes met een hoge signaalintensiteit (gele pijl) en werden geïdentificeerd op basis van hun grootte (5-10 μm). Deze cellen waren talrijk aanwezig in elke onderzochte cryptococcoma. Ook werden autofluorescente signalen gedetecteerd (rode pijl). Beeld B werd verkregen door de sonde in hetzelfde dier op de oppervlakte van een gezond stuk long te plaatsen. Op het resulterend beeld werd geen signaal gedetecteerd. Beeld C werd verkregen door de sonde in hetzelfde dier tegen de thoraxwand te plaatsen. Op het resulterend beeld werd eveneens geen signaal gedetecteerd. De gemiddelde SI in elk van deze delen werd gekwantificeerd en het resultaat is weergegeven in Figuur 20G. De gemiddelde SI was significant hoger in de zieke delen van de long. Dit is in overeenstemming met de het groot aantal cryptokokken dat aanwezig was in deze gebieden, zoals visueel aangetoond in beeld A.

Dezelfde metingen werden herhaald met een tweede sonde, wat grotendeels dezelfde resultaten opleverde. Individuele cryptococcale cellen waren duidelijk zichtbaar als rondjes met een hoge signaalintensiteit (Figuur 20D, gele pijl). Er werden eveneens autofluorescente signalen gedetecteerd (rode pijl). Op de beelden van een gezond stuk long in een muis besmet met GFP-positieve cryptococcon (Figuur 20E) en in een muis besmet met WT cryptococcon (Figuur 20F) werden geen signalen gedetecteerd. Kwantificatie van de gemiddelde SI in elk deel is weergegeven in Figuur 20H. De gemiddelde SI was significant hoger in de zieke delen van de long.

Bij dezelfde beeldopname-instellingen lagen de SI lager dan de SI verkregen met de PF-2295 S-1500 sonde en waren een kleiner aantal cryptococcale cellen detecteerbaar, wat te verklaren is door de technische specificaties van de sondes. Het is dus mogelijk om de infectie te evalueren met FCFM, maar enkel na het openen van de thoraxholte. Ook tonen de beelden aan dat het gebruik van een sonde met een hogere resolutie een beter beeld kan geven van de verspreiding van individuele cryptokokken in het geïnfecteerd longweefsel.



Figuur 20: Visualisatie van GFP+ cryptococci met FCFM. Beelden A tot C werden gemaakt met de PF-2295 S-1500 sonde, beelden D tot F werden gemaakt met de PF-0297 S-1500 sonde. **(A)** Representatieve FCFM-beelden van een aangetast stuk rechterlong in een muis geïnfecteerd met GFP+ *Cryptococcus gattii* (n = 3). **(B)** Representatieve FCFM-beelden van een relatief gezond deel rechterlong in dezelfde muis (n = 3). **(C)** Representatieve FCFM-beelden van de thoraxwand in dezelfde muis (n = 3). **(D)** Representatieve FCFM-beelden van een aangetast stuk long in een muis geïnfecteerd met GFP+ *Cryptococcus gattii* (n = 2). **(E)** Representatieve FCFM-beelden van een relatief gezond stuk long in dezelfde muis (n = 2). **(F)** Representatieve FCFM-beelden van een aangetast stuk long in een muis geïnfecteerd met WT *Cryptococcus gattii* (n = 1). **(G)** Kwantificatie van de SI in een zieke deel van de long, een gezond deel van de long en de thoraxwand. Deze beelden werden gemaakt met de PF-2295 S-1500 sonde. * p-waarde<0,05 ** p-waarde<0,001. **(H)** Kwantificatie van de SI in een zieke deel van de long (GFP+), een gezond deel van de long (GFP+), de thoraxwand en een zieke deel van de long (WT). Deze beelden werden gemaakt met de PF-0297 S-1500 sonde. * p-waarde<0,05.

5. ALGEMENE BESPREKING

De optimalisatie van CT en MRI als beeldvormingstechnieken voor de long is erg waardevol in het preklinisch onderzoek naar verscheidene longaandoeningen (13,21,26,59). Dankzij de niet-invasieve aard van deze technieken, kan eenzelfde dier *in vivo* en over langere periode geobserveerd worden. Dit maakt het mogelijk om het verloop van een longziekte nauwgezet op te volgen, zonder op regelmatige tijdstippen meerdere dieren op te hoeven offeren. Ook kan elk dier als zijn eigen controle dienen, waardoor het aantal benodigde proefdieren nog verder teruggedrongen kan worden. Het is echter een hele uitdaging om in kleine proefdieren een vergelijkbare spatiale resolutie te verkrijgen als in de mens. Hiervoor moeten de scantijden verhoogd worden, wat vooral bij het maken van CT-beelden problematische gevolgen kan hebben. Een verhoogde scantijd houdt immers een verhoogde blootstelling aan ioniserende straling in. Vooral in longitudinale studies, waar op zeer regelmatige basis CT-beelden genomen worden, is het dus aangewezen om de stralingsdosis nauwgezet in de gaten te houden. Herhaald contact met ioniserende straling houdt immers een verhoogd risico in op schade aan het longweefsel, dat bovendien bijzonder gevoelig is voor deze straling.

Een deel van deze thesis spitst zich toe op het onderzoek naar de schadelijke gevolgen van de blootstelling aan ioniserende straling. Hierbij ligt de focus voornamelijk op de schadelijke invloeden van herhaald CT-scannen op het longweefsel. In het preklinisch onderzoek naar longaandoeningen worden de dieren in longitudinale studies immers meermaals gescand en worden ze dus meermaals blootgesteld aan een verhoogde stralingsdosis. Indien ook aan ademhalingsregistratie gedaan wordt, is er nog een extra toename in stralingsdosis (13,40). In de literatuur zijn echter geen studies terug te vinden rond de mogelijke effecten hiervan. In onze studie werd het potentieel schadelijk effect van 4 verschillende scanprotocols op het longweefsel van C57Bl/6 muizen bestudeerd. Een belangrijke parameter waarmee dit effect onderzocht werd, is de hoeveelheid lucht in de longen. Kwantificatie van deze parameter geeft immers een goed idee over de aanwezige schade. De resultaten van deze studie tonen aan dat een protocol van 1 scan per week met retrospectieve ademhalingsregistratie verspreid over 5 weken, geen schadelijke invloed heeft op het longweefsel. In deze dieren neemt de hoeveelheid lucht in de longen enigszins toe doorheen de tijd, maar dat is te verwachten omdat de dieren groter worden en de longen bijgevolg meegroeien. Dit scanprotocol zou dus veilig gebruikt kunnen worden om longaandoeningen op te volgen. De uitdaging bij veel aandoeningen is echter dat ze snel evolueren en dus nauwgezet opgevolgd moeten worden zodat cruciale gebeurtenissen in de pathogenese niet gemist worden. In deze situaties kan het dus nodig zijn om meermaals per week te scannen. Uit onze studie blijkt eveneens dat tweemaal per week scannen met ademhalingsregistratie na 5 weken geen schadelijke invloed heeft op het longweefsel. Ook dit scanprotocol kan dus veilig gebruikt worden.

Tijdens een longitudinale studie is men soms verplicht om meerdere scans op 1 dag uit te voeren, bijvoorbeeld wanneer een mislukte scan herhaald moet worden. In zulke situaties zou de kortstondige verhoging in stralingsdosis een invloed kunnen hebben op het longweefsel en dus ook op het uiteindelijke studieresultaat. Dit scenario werd eveneens onderzocht in onze studie. Halverwege het vorig besproken scanprotocol kregen de dieren een driedubbele stralingsdosis toegediend, om zo een situatie na te bootsen waarin de dieren driemaal op een dag gescand worden. Ook deze acute verhoging in stralingsdosis leek geen schadelijke gevolgen te hebben op het longweefsel. Het verloop van de hoeveelheid lucht in de longen in deze periode beantwoordde ook goed aan de verwachting van een geleidelijke stijging door toename in lichaamsgewicht.

Het kan in bepaalde gevallen interessant zijn om het verloop van een longaandoening gedurende enkele maanden op te volgen in plaats van slechts enkele weken. Zo kunnen de effecten op lange termijn onderzocht worden. Denk bijvoorbeeld aan het door rook geïnduceerde muismodel voor emfyseem, waarin het maanden duurt voor de ziekte zich volledig ontwikkelt (102). Een gelijkaardig scenario werd eveneens nagebootst in onze studie door muizen gedurende 12 weken eenmaal per week te scannen met retrospectieve ademhalingsregistratie. Dit komt neer op een geaccumuleerde dosis van 9,756 Gy. Ook dit langetermijn scanprotocol had geen schadelijke invloed op het longweefsel. Het verloop van de hoeveelheid lucht in de longen in deze periode beantwoordde vrij goed aan de verwachting van een geleidelijke stijging. Enkel halverwege het experiment werd een significant verlaagde waarde geobserveerd in vergelijking met het laatste tijdstip. Deze uitschieter zou te wijten kunnen zijn aan een variatie in de beeldkwaliteit, zoals eerder besproken.

We kunnen dus vaststellen dat de gereconstrueerde *in vivo* en *ex vivo* longbeelden in geen enkele groep afwijkend waren en dat de scanprotocols dus geen schade induceerden die gedetecteerd konden worden met CT. De mogelijkheid bestaat echter dat er wel degelijk schade aanwezig was, maar dat deze onder de detectiedrempel van CT lag. Daarom werd met histologie op microscopisch niveau nagegaan of enige stralingsgeïnduceerde schade gedetecteerd kon worden. Uit dit histologisch onderzoek bleek eveneens dat de longen geen enkel teken van inflammatie, oedeem of fibrose vertoonden. In alle groepen zagen de longen er met andere woorden normaal uit.

Rond de periode dat wij onze studie afronden, werd een longitudinale studie gepubliceerd door Detombe *et al.* waarin muizen wekelijks gedurende 6 weken blootgesteld werden aan 0,84 Gy (103). Zij stelden vast dat een geaccumuleerde dosis van 5,04 Gy geen significant effect had op het longweefsel. Deze resultaten zijn gelijkaardig aan de resultaten die wij verkregen hebben. Buiten ons gerekend, is dit de enige groep die de effecten van herhaalde longscans op het longweefsel onderzocht heeft. Nochtans zijn zulke studies een belangrijke stap in de goede richting om de scanprotocols die gebruikt worden in longitudinale studies zoveel mogelijk te optimaliseren zodat de stralingsbelasting geminimaliseerd kan worden. De stralingsdosis kan onder andere verminderd worden door de flux (milliampèreseconde) of de duur van de scans te laten afnemen (41). Zulke ingrepen geven echter vaak een stijging van de ruis in het beeld.

Er moet met andere woorden naar een evenwicht gezocht worden tussen kwaliteit en veiligheid (36,37). Het is ook belangrijk om de impact van herhaaldelijke CT-scans te onderzoeken, om zo neveneffecten uit te kunnen sluiten en veilige grenzen te kunnen bepalen.

We kunnen dus vaststellen dat de verschillende onderzochte CT-protocols geen aanleiding geven tot aantoonbare anatomische of cellulaire veranderingen in de longen. Zelfs voor protocols met relatief hoge stralingsdosisen blijven de longen zonder schade, terwijl dit orgaan toch relatief gevoelig is. Hiervoor kunnen er verschillende verklaringen zijn. Ten eerste heeft het longparenchym de capaciteit om subletale schade te herstellen (34). Daardoor zou eventuele stralingsgeïnduceerde schade als verwaarloosbaar beschouwd kunnen worden. Ten tweede kan uit de literatuur afgeleid worden dat een minimale verspreide dosis van 10-15 Gy nodig is om stralingsgeïnduceerde longschade uit te lokken (31). De geaccumuleerde dosis in onze studie liggen onder deze drempel en het verspreiden van de dosis geeft de long voldoende tijd om zich te herstellen. Ten derde heeft een Monte-Carlosimulatie uitgewezen dat de meeste straling geabsorbeerd wordt door het omliggende zachte weefsel en bot (data niet getoond). Dit is een gevolg van de lage dichtheid van het longweefsel, waardoor de straling minder geabsorbeerd wordt.

We kunnen hieruit besluiten dat de bestudeerde scanprotocols gebruikt kunnen worden om pulmonaire aandoeningen longitudinaal op te volgen met CT, zonder het risico dat de resultaten beïnvloed worden door stralingsgeïnduceerde longschade. Een pluspunt van deze studie is het gebruik van retrospectieve ademhalingsregistratie om bewegingsartefacten te verminderen. Zoals eerder besproken, leidt het gebruik van zulke ademhalingsregistratie tot een sterke verhoging in de stralingsdosis. Herhaald scannen zonder ademhalingsregistratie of met prospectieve ademhalingsregistratie is over het algemeen geassocieerd met een lagere stralingsdosis. Onze resultaten zijn dus relevant voor een brede waaier aan toekomstige experimenten, zolang de geaccumuleerde dosis en de spreiding ervan maar beneden de bestudeerde niveaus blijven. Wat we hier niet onderzocht hebben en dus niet volledig kunnen uitsluiten, is schade op subcellulair niveau zoals genetische schade die op veel langere termijn gevolgen zou kunnen hebben. Dit is iets dat we in ons achterhoofd moeten houden, maar voor het verder onderzoek in deze thesis is deze potentiële genetische schade weinig tot niet relevant. Nu het bewezen is dat bovenstaande CT-protocols geen schadelijke invloed hebben op het longweefsel, kunnen ze gebruikt worden voor de visualisatie en kwantificatie van pulmonaire fibrose en cryptococcose in muizen. Het blijft belangrijk om voor elk specifiek model de invloed van straling te bestuderen. Sneldelende cellen, zoals tumorcellen, kunnen toch invloed ondervinden van straling en dit hebben we hier niet onderzocht (14,37).

Dankzij het grote dichtheidsverschil kan met CT de ontwikkeling van bleomycine-geïnduceerde longfibrose in muizen duidelijk waargenomen worden. CT is echter niet enkel een goede techniek om longfibrose te visualiseren, maar het kan ook gebruikt worden voor de kwantificatie ervan (13). Een typisch kenmerk van longfibrose is de afname van de lucht in de long.

Het kwantificeren van de hoeveelheid lucht in de longen kan dus dienen als een indirecte maat voor longfibrose en deze parameter kan berekend worden uit de CT-beelden. Hiervoor moet de lucht in de volledige longen wel correct gesegmenteerd worden uit de beelden.

In onze studie werd hiervoor een volledig geautomatiseerd algoritme gebruikt (13). Een correcte segmentatie kan echter alleen als de beeldkwaliteit goed is. Deze beeldkwaliteit wordt mede bepaald door de resolutie en beweging. In onze studie was de resolutie behoorlijk hoog, zeker in vergelijking met een andere recente studie van Shofer *et al* (64). In deze studie werd drie weken na bleomycine-inductie geen significant verschil geobserveerd met de controlegroep. Een van de mogelijke verklaringen voor dit negatief resultaat is het gebruik van CT-beelden met een resolutie van 100 μm . Beweging werd in onze studie gelimiteerd door het gebruik van retrospectieve ademhalingsregistratie. Ook in andere studies wordt gebruik gemaakt van ademhalingsregistratie om de beeldkwaliteit te verhogen (13,31). Een recente publicatie verklaart echter dat beelden gemaakt zonder ademhalingsregistratie zodanig weinig verschillen in beeldkwaliteit van de beelden gemaakt met ademhalingsregistratie, dat het gebruik ervan als niet essentieel beschouwd kan worden. Hoewel deze redenering klopt, is het streven naar een betere beeldkwaliteit belangrijk. In een extra experiment hebben we muizen ter hoogte van de longen geïmmobiliseerd tijdens het maken van de CT-scans, waardoor ademhalingsregistratie niet nodig was. De beeldkwaliteit verschilde inderdaad weinig met de beelden gemaakt met ademhalingsregistratie, maar deze methode gaf problemen met de kwantificatie van de hoeveelheid lucht in de longen (data niet getoond). De segmentatie zal dus beter verlopen indien de beeldkwaliteit hoger is, waardoor de uiteindelijke resultaten correcter zullen zijn.

In onze studie kon de ontwikkeling van bleomycine-geïnduceerde longfibrose duidelijk gedetecteerd worden op de gereconstrueerde CT-beelden. Reeds een week na inductie werd een significante afname in de hoeveelheid lucht in de longen geobserveerd. Deze resultaten werden bevestigd door histologie. Er werd immers een sterke negatieve correlatie gevonden tussen de berekende hoeveelheid lucht in de longen en de Ashcroft score. We kunnen hieruit besluiten dat bleomycine-geïnduceerde longfibrose succesvol gevisualiseerd en gekwantificeerd kan worden met CT. Door een gebrek aan contrast kan CT echter geen onderscheid maken tussen inflammatie en fibrose. Dit werd eveneens vastgesteld door de groep van Rodt *et al* (29). Zij stellen andere beeldvormingstechnieken zoals positron emissie tomografie (PET) voor om de inflammatoire activiteit mee te beoordelen. MRI zou natuurlijk ook een alternatief kunnen zijn.

Om te onderzoeken of het opvolgen van het ziekteverloop in bleomycine-geïnduceerde longfibrose met MRI eveneens mogelijk is in muizen, werden bleomycine-geïnstilleerde muizen longitudinaal opgevolgd met drie verschillende MRI sequenties, waarvan twee recent ontwikkeld werden. De eerste sequentie was een standaard 2D FLASH-sequentie met intrinsieke ademhalingsregistratie. Deze heeft als voordeel dat in 'steady-state' gescand kan worden.

Op de beelden van de geïnduceerde dieren waren drie weken na inductie hyperintense signalen zichtbaar en kwantificatie van de gemiddelde SI toonde vanaf dit tijdstip een significante verhoging in signaalintensiteit. Deze SI bleef stijgen tot het einde van het experiment. De tweede sequentie was een standaard RARE-sequentie. Door de specifieke instellingen voor de TR en TE waren de resulterende beelden T_2 -gewogen, waardoor vocht een hoog intens signaal krijgt. Op de beelden van de geïnduceerde dieren waren al een week na inductie duidelijke hyperintense signalen zichtbaar. Kwantificatie van de gemiddelde SI toonde aan dat deze signaalverhoging significant was. Tot het einde van het experiment bleef deze SI stijgen. De derde sequentie was een UTE-sequentie. Deze sequentie gebruikt zeer korte TE om een sterk signaal te verkrijgen in weefsels met een korte T_2 (104). Deze weefsels zijn normaal niet detecteerbaar met de basis spin-echo-sequenties. De long bevat korte T_2 -componenten die met deze sequentie dus zichtbaar gemaakt kunnen worden, terwijl de negatieve invloed van de lage protondensiteit op de beeldkwaliteit gelimiteerd wordt (33). Op de beelden was van bij het begin van het experiment een sterk signaal zichtbaar in de longen. Dit was afkomstig van het longparenchym. Daarom was een verhoging in SI moeilijker te zien in de longen van de geïnduceerde dieren. Kwantificatie van de gemiddelde SI toonde echter al een week na inductie een significante stijging. Daarna leek de gedetecteerde SI zich te stabiliseren in plaats van verder te stijgen. Deze drie sequenties waren dus in staat om het ziekteverloop in beeld te brengen en te kwantificeren.

Van deze 3 sequenties lijkt de RARE-sequentie het meest gevoelig te zijn voor de detectie van bleomycine-geïnduceerde longfibrose. Met deze sequentie wordt al na een week een significante stijging in SI gezien. Onderzoek heeft uitgewezen dat in deze periode een uitgebreide inflammatie aanwezig is in de long door het toedienen van bleomycine (55). Pas na twee weken gaat deze inflammatie stilaan over naar fibrose in de long. Ook tijdens en na deze transitie blijft het signaal stijgen in de RARE-beelden. De selfgated 2D FLASH-sequentie lijkt niet in staat te zijn om inflammatie te detecteren, omdat het pas na 3 weken een significante stijging in SI geeft. Dit is de periode waarin de transitie van inflammatie naar fibrose vrijwel afgerond is. De UTE-sequentie lijkt dan weer behoorlijk gevoelig te zijn als het aankomt op het detecteren van inflammatie, want ook deze sequentie geeft na een week reeds een significante stijging in SI. Deze SI stabiliseert zich echter onmiddellijk na de eerste week. De gedetecteerde stijging in SI is ook veel kleiner dan bij de RARE sequentie. Nochtans zou theoretisch gezien de UTE-sequentie het meest gevoelig moeten zijn. Door de extreem korte echotijd is de negatieve impact van de lage protondensiteit en de veelheid aan overgangen tussen lucht en weefsel op de beeldkwaliteit immers gelimiteerd (105). Ook zorgt het voor een verhoging van het signaal afkomstig van het longparenchym (32). Daardoor zouden longbeelden bekomen moeten worden met een goede resolutie en een goede significante signaal-ruisverhouding (SNR). Dit biedt nog ruimte voor verbetering voor onze UTE-beelden. We werken momenteel aan het optimaliseren van de gebruikte parameters om zo een nog betere beeldkwaliteit te krijgen. De resultaten voor alle drie de MRI sequenties worden bevestigd door histologie. Er is een sterke positieve correlatie tussen de berekende SI en de Ashcroft score. Een hoge SI in de longen komt dus overeen met een hoge Ashcroft score en veel fibrose in de long.

In deze studie worden zowel prospectieve als retrospectieve ademhalingsregistratie toegepast. Een voordeel van retrospectieve ademhalingsregistratie is dat het intrinsiek kan plaatsvinden. Dit houdt in dat de variaties in MR signaalintensiteit ten gevolge van de respiratoire cyclus gebruikt kunnen worden om het ademhalingssignaal retrospectief te observeren (32). Hierdoor wordt het overbodig om op elk individueel dier een elektrode aan te brengen voor de registratie van de ademhaling tijdens de scan.

Een tweede voordeel is dat er gescand kan worden gedurende de volledige ademhalingscyclus, waardoor de 'steady-state' behouden kan worden in het dier. Bij prospectieve ademhalingsregistratie kan slechts gedurende 80% van de ademhalingscyclus gescand worden. De overige 20% bevindt zich in de inspiratoire fase en bevat teveel beweging om goede MR beelden te maken, waardoor het scannen onderbroken moet worden gedurende deze periode. Dit brengt natuurlijk met zich mee dat niet in 'steady-state' gescand kan worden. We hebben gemerkt dat in deze studie de 2D FLASH-sequentie met intrinsieke ademhalingsregistratie niet de beste resultaten geeft voor de vroegere stadia van longfibrose. Voor studies waarin de gevoeligheid voor de eerste fases van ziekte minder cruciaal zijn, kan deze sequentie toch goede resultaten geven in snelle en eenvoudige scans.

We kunnen besluiten dat MRI eveneens een geschikte techniek is om inflammatie en fibrose te lokaliseren en kwantificeren in de longen van een muis. In de literatuur kan meermaals teruggevonden worden dat MRI door het gebrek aan specificiteit geen onderscheid kan maken tussen inflammatie en fibrose. Deze techniek zou dus enkel een globaal idee kunnen geven over de uitgebreidheid van het geïnduceerd letsel (15,20,23,26,57,59). Het gebruik van deze drie verschillende MRI sequenties en de verkregen resultaten tonen echter aan dat MRI wel degelijk het potentieel heeft om een onderscheid te maken tussen inflammatie en fibrose. Hier zal door onze groep zeker nog verder onderzoek naar gedaan worden. Concreet zal er dieper ingegaan op het potentieel van RARE- en UTE-MRI om de overgang van inflammatie naar fibrose in beeld te brengen. Daarvoor zal er in de eerste weken na bleomycine-inductie, wanneer inflammatie overgaat in fibrose, meermaals per week gescand worden om zo een nog beter overzicht te krijgen van het ziekteverloop. Ook zullen op deze tijdstippen dieren opgeofferd worden voor histologie en BAL. Zo kan de evolutie van de geïnduceerde longschade gedetailleerd geanalyseerd worden. Ter aanvulling zou onderzocht kunnen worden wat de invloed van longfibrose op de longfunctie is. In de literatuur wordt vermeld dat de stijfheid van de longen in bleomycine-geïnduceerde ratten sterk correleert met de Ashcroft score en CT densiteit (106). Het zou dus interessant zijn om te weten hoe de longfunctie in muizen zou correleren met de MRI- en CT-data. Dit kan bijzonder interessant zijn bij het evalueren van potentiële therapieën tegen longfibrose met CT en MRI. Over het algemeen stelt deze studie ons wel in staat om te concluderen dat CT en MRI beide erg waardevolle technieken zijn om de ontwikkeling van longfibrose op te volgen. Voorlopig is het enkel mogelijk om een onderscheid te maken tussen inflammatie en fibrose door histologie en BAL, maar MRI en CT kunnen dan weer wel topografische informatie verschaffen over het pathologisch proces in de gehele long. Dit laatste is een groot voordeel ten opzichte van histologie.

MRI en CT hebben ook het potentieel om de ontwikkeling van pulmonaire cryptococcose niet-invasief op te volgen in de muis. Hiervoor werden de dieren geïnfecteerd met *Cryptococcus gattii*, waarna de dieren wekelijks over een periode van 5 weken gescand werden met MRI en CT. Op de 2D FLASH-MRI-beelden van de longen waren in de eerste weken na infectie geen veranderingen te zien. Pas na 3 weken konden hyperintense signalen zowel visueel als kwantitatief waargenomen worden, wat bevestigd werd door de standaard histologische technieken. MRI stelt ons dus in staat om de verspreiding van de infectie over de longen succesvol op te volgen.

Ook op de gereconstrueerde CT-beelden kon drie weken na infectie een verhoogde densiteit gezien worden, die gepaard ging met een sterke afname in hoeveelheid lucht in de longen. De MRI- en CT-resultaten komen goed overeen met conventionele technieken zoals de KVE bepaling en histologie.

In deze studie worden de dieren wekelijks gescand, waardoor het dynamisch verloop van experimentele pulmonaire cryptococcose nauwgezet opgevolgd kan worden. Ook worden in parallel twee verschillende beeldvormingstechnieken gebruikt, waardoor de informatie verkregen uit beide technieken met elkaar vergeleken kunnen worden. Dit zou ons in staat moeten stellen om te bepalen of een van beide technieken gevoeliger is dan de andere en of de verkregen informatie complementair is. Op basis van de onze resultaten kan hier echter geen uitspraak over gedaan worden omdat de CT-data en de MRI data op een verschillende manier gekwantificeerd werden. In MRI werd gekeken naar de globale SI in de hele longen, waar we voor de CT-data de geconnecteerde lucht in de longen kwantificeerden. Dankzij de hoge spatiale resolutie kunnen MRI en CT veel informatie verschaffen over zowel het ziekteverloop als de doeltreffendheid van mogelijke therapieën zonder een groot aantal dieren op te hoeven offeren. Daarom zal het gebruik van deze technieken als niet-invasieve alternatieven voor het onderzoek naar infectieziekten in de komende jaren waarschijnlijk aan belang gaan winnen. Vooral in het onderzoek naar de pathogenese van *Cryptococcus* infecties kan beeldvorming een belangrijke rol spelen in de identificatie van de exacte tijdstippen waarop de cryptococcale cellen zich vanuit de longen verspreiden naar de hersenen.

In onze studie werd met MRI vier weken na infectie een duidelijke toename gezien in de grootte van de longen. Die observatie bevestigt eerdere bevindingen van Ngamskulrungraj *et al* (76). Deze groep observeerde 2 weken na besmetting met 50000 cryptococcale cellen eveneens een toename in de grootte van de muislongen, maar hier werd niet dieper op ingegaan. Er zou nochtans een interessante link kunnen bestaan tussen deze observatie en de afwezigheid van fenotypische kenmerken in muizen. Het groter worden van de longen zou immers een compensatiemechanisme kunnen zijn om de longfunctie in de geïnfecteerde dieren te behouden. Daarom hebben we besloten vier weken na infectie longfunctietesten uit te voeren. Dit tijdstip is gekozen op basis van de MRI en CT-beelden, waarop duidelijk de vergroting van de longen zichtbaar is. Ondanks de afwezigheid van uiterlijke tekens van ziekte, hadden de geïnfecteerde muizen een duidelijk verslechterde longfunctie. De resistentie en elastantie van de longen was sterk verhoogd. Dit houdt in dat de luchtwegen vernauwd zijn en de longen gemakkelijker terugveren naar hun oorspronkelijke vorm (100).

Het omgekeerde van de elastantie is de compliantie en deze factor bleek significant gedaald te zijn in de geïnfecteerde dieren, wat erop wijst dat de longen minder gemakkelijk uitzetten (100). Dit kan twee verschillende oorzaken hebben. Enerzijds kan het een gevolg zijn van een verhoogde stijfheid van het longweefsel. Anderzijds kan het een gevolg zijn van de afname in vrije ruimte ter hoogte van de thorax. Omdat de thoraxwand van een muis extreem compliant blijkt te zijn, gaat de voorkeur uit naar de eerste verklaring (101). Dit is logisch, omdat de longen volledig gevuld zijn met cryptococcale cellen.

Na het meten van deze parameters hebben we eveneens de reactiviteit van de luchtwegen onderzocht door middel van een MCh-provocatietest. MCh is een spasmogene substantie, dat zorgt voor een vernauwing van de luchtwegen. Indien deze stof in aerosolvorm toegediend wordt aan dieren met hyperreactieve luchtwegen, zoals bij dieren die lijden aan astma, zal er bij lage concentraties MCh bronchoconstrictie optreden. Uit de resultaten van onze metingen kunnen we vaststellen dat de luchtwegen van geïnfecteerde muizen hyperreactief zijn. Gelijklopende resultaten werden verkregen door de groep van Jain *et al* (98). Ze bestudeerden met dezelfde test de longfunctie in ratten geïnfecteerd met *Cryptococcus neoformans*. Ook deze dieren vertoonden hyperreactiviteit van de luchtwegen. Enkele voorgestelde oorzaken voor de verandering in longfunctie zijn de accumulatie van pathogenen in het lumen of een inflammatoire respons. Ze vinden echter niet voldoende bewijs om deze hypothese hard te maken. In onze studie werd eveneens geen correlatie gevonden tussen de KVE waarden en eender welke MCh concentratie (data niet getoond), waardoor de eerste hypothese niet bevestigd kan worden. De tweede hypothese kan niet nagegaan worden omdat we geen immunologische testen uitgevoerd hebben.

We kunnen concluderen dat de vergroting van de longen allicht een onvolledig compensatiemechanisme is om de longfunctie te behouden. Vier weken na infectie is de longfunctie immers sterk achteruit gegaan in geïnfecteerde dieren en vertonen de luchtwegen tekens van hyperreactiviteit. Dit is in overeenkomst met de zware aantasting van de longen die we met CT en MRI kunnen detecteren. Een nadeel van deze techniek is de invasieve aard, waardoor een herhaalde meting van de longfunctie in hetzelfde dier niet aan te raden is (100). Het zou interessant zijn om deze studie te herhalen met extra longfunctiemetingen op elk tijdstip. Zo zou achterhaald kunnen worden of de aantasting van de longen eerder gedetecteerd kan worden door de longfunctietesten in vergelijking met de beeldvormingstechnieken. Ook zou nagegaan kunnen worden of de vergroting van de longen in direct verband staat met de aantasting van de longfunctie.

Het is duidelijk dat vier weken na infectie een grote hoeveelheid cryptococcale cellen aanwezig is in de longen. De dieren zijn geïnfecteerd met GFP+ cryptococci, waardoor het mogelijk zou moeten zijn om de longinfectie *in vivo* te visualiseren met FCFM. Op de FCFM-beelden van aangetast longweefsel waren inderdaad duidelijk fluorescente signalen zichtbaar. Deze signalen zijn hoogst waarschijnlijk afkomstig van individuele cryptococcale cellen, omdat de diameter van de signalen vergelijkbaar is met de gemiddelde grootte van een cryptococcale cel. Naast deze mooi afgelijnde structuren, werden echter ook autofluorescente signalen gedetecteerd.

Zulke signalen zijn eveneens opgemerkt in de studie van Morisse et al (92). Zij speculeren dat deze signalen afkomstig zijn van geactiveerde macrofagen in inflammatoire gebieden. De reeds aanwezige macrofagen, die niet-gerelateerd zijn met inflammatie, geven geen fluorescent signaal bij 488 nm. Ze zijn met andere woorden ook niet detecteerbaar met FCFM en dit wordt bevestigd door de negatieve controlebeelden van gezond longweefsel. Onze beelden tonen aan dat beide sondes gebruikt kunnen worden om pulmonaire cryptococcosis te visualiseren. Wel opvallend zijn de verschillen tussen de beelden gemaakt met de twee verschillende sondes. Door de hogere laterale resolutie kunnen met de PF-2295 S-1500 sonde veel meer details in beeld gebracht worden. Ook worden dieper gelegen structuren duidelijker zichtbaar, ondanks het feit dat de axiale resolutie van beide sondes hetzelfde is. Daarnaast zijn de gedetecteerde SI veel hoger, ondanks het feit dat beide beelden gemaakt zijn met dezelfde instellingen. Door deze verschillen is het echter moeilijk de beelden met elkaar te vergelijken. Een ander nadeel van deze studie is de diameter van de gebruikte sondes. Normaal gesproken zouden de sondes aangebracht moeten kunnen worden in de trachea van het dier zodat de longen op een niet-invasieve wijze onderzocht kunnen worden. Dit blijkt echter niet mogelijk te zijn in de muis. Het openen van de thorax is daarom de enige manier om de sonde *in vivo* tegen het longweefsel te kunnen plaatsen, wat deze techniek zeer invasief maakt. Hetzelfde probleem doet zich voor bij de rat (92). Dit heeft als gevolg dat enkel het oppervlakkig longweefsel onderzocht kan worden. Er is met andere woorden nood aan de ontwikkeling van smallere sondes, zodat *in vivo* ook de interne longdelen bereikt kunnen worden.

We kunnen besluiten dat pulmonaire cryptococcosis succesvol gevisualiseerd kan worden met FCFM, maar dat de techniek beschouwd moet worden als een invasieve eindpuntmeting. In de literatuur is een studie verschenen waarin de passage van de BBB door cryptococcale cellen succesvol gevisualiseerd werd met een confocale fluorescentiemicroscoop (76). Het zou interessant kunnen zijn om met FCFM *in vivo* en op microscopisch niveau de verspreiding van cryptokokken te onderzoeken, maar door de grootte van de probes en de invasiviteit van de techniek lijkt ons dit heden niet haalbaar. Daarnaast zou het ook interessant zijn om de longen van bleomycine-geïnstilleerde dieren te onderzoeken met FCFM. Volgens de theorie van Morisse *et al.* zou de geïnduceerde inflammatie eveneens visualiseerbaar moeten zijn dankzij de aanwezigheid van geactiveerde macrofagen.

6. BESLUIT

Deze studie bewijst dat MRI en CT gebruikt kunnen worden als niet-invasieve technieken om pulmonaire fibrose en cryptococcosis longitudinaal op te volgen. Beide beeldvormingstechnieken zijn in staat om zowel visuele als kwantitatieve informatie te verschaffen over beide longaandoeningen. Ook is bewezen dat het gebruik van CT in longitudinale studies geen aantoonbare schade veroorzaakt aan het longweefsel. Dit is natuurlijk enkel het geval indien scanprotocols gebruikt worden die de onderzochte stralingsdosissen niet overschrijden. In de toekomst kunnen MRI en CT dus een belangrijke rol gaan spelen in het ontrafelen van de pathogenese van longaandoeningen. In het geval van longfibrose kunnen deze technieken door de lage specificiteit echter geen onderscheid maken tussen inflammatie en fibrose. Daarom blijven invasieve technieken zoals histologie en BAL nog steeds een belangrijke plaats innemen in dit onderzoek. In het geval van pulmonaire cryptococcosis hebben MRI en CT het potentieel om de infectie te visualiseren vóór het verschijnen van enige symptomen. De infectie kan ook gevisualiseerd worden met FCFM. Deze techniek maakt het zelfs mogelijk individuele cryptokokken zichtbaar te maken in de long. Door technische complicaties is het echter niet haalbaar om deze metingen op een niet-invasieve wijze uit te voeren. Ook longfunctietesten zijn een geschikte manier om longaandoeningen te evalueren. Deze metingen zijn echter eveneens tamelijk invasief waardoor het bijzonder moeilijk wordt om eenzelfde dier herhaald te meten. Dit maakt CT en MRI tot enige echte niet-invasieve methoden voor het opvolgen van longaandoeningen in de muis.

LIJST VAN TABELLEN

TABEL 1: VERGELIJKING TUSSEN CT EN MRI	4
TABEL 2: DUUR VAN HET RADIOTOXICITEIT EXPERIMENT EN AANTAL SCANS PER GROEP.....	19
TABEL 3: OVERZICHT VAN DE VERSCHILLENDE GROEPEN IN HET <i>CRYPTOCOCCUS</i> EXPERIMENT.....	30

LIJST VAN FIGUREN

FIGUUR 1: KVE BEPALING.....	19
FIGUUR 2: KWANTITATIEVE EN KWALITATIEVE BEOORDELING VAN DE CORONALE CT-BEELDEN EN VAN DE HOEVEELHEID LUCHT IN DE LONGEN (GROEP 1).....	20
FIGUUR 3: KWANTITATIEVE EN KWALITATIEVE BEOORDELING VAN DE CORONALE CT-BEELDEN EN VAN DE HOEVEELHEID LUCHT IN DE LONGEN (GROEP 2).....	22
FIGUUR 4: KWANTITATIEVE EN KWALITATIEVE BEOORDELING VAN DE CORONALE CT-BEELDEN EN VAN DE HOEVEELHEID LUCHT IN DE LONGEN (GROEP 3).....	23
FIGUUR 5: KWANTITATIEVE EN KWALITATIEVE BEOORDELING VAN DE CORONALE CT-BEELDEN EN VAN DE HOEVEELHEID LUCHT IN DE LONGEN (GROEP 6).....	24
FIGUUR 6: HISTOLOGIE EN HYDROXYPROLINE KWANTIFICATIE	25
FIGUUR 7: TIJDSLIIJN VAN HET BLEOMYCINE EXPERIMENT.	25
FIGUUR 8: CT VAN LONGFIBROSE IN DE MUIS	26
FIGUUR 9: MRI VAN LONGFIBROSE IN DE MUIS.....	27
FIGUUR 10: H&E-COUPES VAN DE LINKERLONG.....	27
FIGUUR 11: CORRELATIE VAN DE ASHCROFT SCORE MET DE CT-DATA EN MRI-DATA	28
FIGUUR 12: CORRELATIE VAN DE HYDROXYPROLINE KWANTIFICATIE MET DE CT- EN MRI-DATA.	29
FIGUUR 13: TIJDSLIIJN VAN GROEP 1 IN HET <i>CRYPTOCOCCUS</i> -EXPERIMENT.....	29
FIGUUR 14: CT ANALYSE VAN PULMONAIRE CRYPTOCOCCOSIS IN MUIZEN	30
FIGUUR 15: MRI VAN PULMONAIRE CRYPTOCOCCOSIS IN MUIZEN	31
FIGUUR 16: HISTOLOGISCHE VALIDATIE.	32
FIGUUR 17: MRI ANALYSE VAN DE LONGEN 4 WEKEN NA INFECTIE	33
FIGUUR 18: CT ANALYSE VAN DE LONGEN 4 WEKEN NA INFECTIE	33
FIGUUR 19: LONGFUNCTIETESTEN EN METHACHOLINE-PROVOCATIETEST	34
FIGUUR 20: VISUALISATIE VAN GFP+ CRYPTOCOCCEN MET FCFM.	36

LITERATUURLIJST

1. American Thoracic Society. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment. *Am J Respir Care Med.* 2000;161(1):646-64.
2. Aberle DR, Gamsu G, Ray CS. High-resolution CT of benign asbestos-related diseases: clinical and radiographic correlation. *AJR Am J Roentgenol.* 1988 Nov;151(5):883-91.
3. Ziesche R, Hofbauer E, Wittmann K, Petkov V, Block LH. A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 1999 Oct 21;341(17):1264-9.
4. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(3):362-82.
5. Lee HJ, Goo JM, Kim NR, Kim MA, Chung DH, Son KR, et al. Semiquantitative measurement of murine bleomycin-induced lung fibrosis in in vivo and postmortem conditions using microcomputed tomography: correlation with pathologic scores--initial results. *Invest Radiol.* 2008 Jun;43(6):453-60.
6. Smith JA, Kauffman CA. Pulmonary fungal infections. *Respirology.* 2012 Aug;17(6):913-26.
7. Shi M, Li SS, Zheng C, Jones GJ, Kim KS, Zhou H, et al. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *J Clin Invest.* 2010 May;120(5):1683-93.
8. Chretien F, Lortholary O, Kansau I, Neuville S, Gray F, Dromer F. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. *J Infect Dis.* 2002 Aug 15;186(4):522-30.
9. Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chretien F, Dromer F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2009 Jan;77(1):120-7.
10. Ritman EL. Small-animal CT - Its Difference from, and Impact on, Clinical CT. *Nucl Instrum Methods Phys Res A.* 2007 Oct 1;580(2):968-70.
11. Johnson KA. Imaging techniques for small animal imaging models of pulmonary disease: micro-CT. *Toxicol Pathol.* 2007 Jan;35(1):59-64.
12. Ford NL, Thornton MM, Holdsworth DW. Fundamental image quality limits for microcomputed tomography in small animals. *Med Phys.* 2003 Nov;30(11):2869-77.
13. De Langhe E, Vande Velde G, Hostens J, Himmelreich U, Nemery B, Luyten FP, et al. Quantification of lung fibrosis and emphysema in mice using automated micro-computed tomography. *PLoS ONE.* 2012;7(8):e43123.
14. Foster WK, Ford NL. Investigating the effect of longitudinal micro-CT imaging on tumour growth in mice. *Phys Med Biol.* 2011 Jan;56(2):315-26.
15. Cavanaugh D, Travis EL, Price RE, Gladish G, White RA, Wang M, et al. Quantification of bleomycin-induced murine lung damage in vivo with micro-computed tomography. *Acad Radiol.* 2006 Dec;13(12):1505-12.
16. Martinoiva L, Schimel D, Lai EW, Limpuangthip A, Kvetnansky R, Pacak K. In vivo micro-CT imaging of liver lesions in small animal models. *Methods.* 2010 Jan;50(1):20-5.
17. Willekens I, Buls N, Lahoutte T, Baeyens L, Vanhove C, Caveliers V, et al. Evaluation of the radiation dose in micro-CT with optimization of the scan protocol. *Contrast Media Mol Imaging.* 2010 Jul-Aug;5(4):201-7.
18. Harris P, Heath D. *The human pulmonary circulation: Its form and function in health and disease.* 3 ed. Edinburgh and New York: Churchill Livingstone; 1986.
19. Wild JM, Marshall H, Bock M, Schad LR, Jakob PM, Puderbach M, et al. MRI of the lung (1/3): methods. *Insights into imaging.* 2012 Aug;3(4):345-53.
20. McFadden RG, Carr TJ, Wood TE. Proton magnetic resonance imaging to stage activity of interstitial lung disease. *Chest.* 1987 Jul;92(1):31-9.

21. Beckmann N, Tigani B, Mazzoni L, Fozard JR. MRI of lung parenchyma in rats and mice using a gradient-echo sequence. *NMR Biomed*. 2001 Aug;14(5):297-306.
22. Cutillo AG, Chan PH, Ailion DC, Watanabe S, Rao NV, Hansen CB, et al. Characterization of bleomycin lung injury by nuclear magnetic resonance: correlation between NMR relaxation times and lung water and collagen content. *Magn Reson Med*. 2002 Feb;47(2):246-56.
23. Kersjes W, Hildebrandt G, Cagil H, Schunk K, von Zitzewitz H, Schild H. Differentiation of alveolitis and pulmonary fibrosis in rabbits with magnetic resonance imaging after intrabronchial administration of bleomycin. *Invest Radiol*. 1999 Jan;34(1):13-21.
24. Boone JM, Velazquez O, Cherry SR. Small-animal X-ray dose from micro-CT. *Mol Imaging*. 2004 Jul;3(3):149-58.
25. Kennel SJ, Davis IA, Branning J, Pan H, Kabalka GW, Paulus MJ. High resolution computed tomography and MRI for monitoring lung tumor growth in mice undergoing radioimmunotherapy: correlation with histology. *Med Phys*. 2000 May;27(5):1101-7.
26. Babin AL, Cannet C, Gerard C, Saint-Mezard P, Page CP, Sparrer H, et al. Bleomycin-induced lung injury in mice investigated by MRI: model assessment for target analysis. *Magn Reson Med*. 2012 Feb;67(2):499-509.
27. Helm PA, Caravan P, French BA, Jacques V, Shen L, Xu Y, et al. Postinfarction myocardial scarring in mice: molecular MR imaging with use of a collagen-targeting contrast agent. *Radiology*. 2008 Jun;247(3):788-96.
28. van Echteld CJ, Beckmann N. A view on imaging in drug research and development for respiratory diseases. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011 May;337(2):335-49.
29. Rodt T, von Falck C, Dettmer S, Halter R, Maus R, Ask K, et al. Micro-computed tomography of pulmonary fibrosis in mice induced by adenoviral gene transfer of biologically active transforming growth factor-beta1. *Respir Res*. 2010;11:181.
30. Ford NL, Nikolov HN, Norley CJ, Thornton MM, Foster PJ, Drangova M, et al. Prospective respiratory-gated micro-CT of free breathing rodents. *Med Phys*. 2005 Sep;32(9):2888-98.
31. Cavanaugh D, Johnson E, Price RE, Kurie J, Travis EL, Cody DD. In vivo respiratory-gated micro-CT imaging in small-animal oncology models. *Mol Imaging*. 2004 Jan;3(1):55-62.
32. Zurek M, Bessaad A, Cieslar K, Cremillieux Y. Validation of simple and robust protocols for high-resolution lung proton MRI in mice. *Magn Reson Med*. 2010 Aug;64(2):401-7.
33. Robson MD, Gatehouse PD, Bydder M, Bydder GM. Magnetic resonance: an introduction to ultrashort TE (UTE) imaging. *J Comput Assist Tomogr*. 2003 Nov-Dec;27(6):825-46.
34. Plathow C, Li M, Gong P, Zieher H, Kiessling F, Peschke P, et al. Computed tomography monitoring of radiation-induced lung fibrosis in mice. *Invest Radiol*. 2004 Oct;39(10):600-9.
35. Ritman EL. Micro-computed tomography-current status and developments. *Annu Rev Biomed Eng*. 2004;6:185-208.
36. McNitt-Gray MF. AAPM/RSNA Physics Tutorial for Residents: Topics in CT. Radiation dose in CT. *Radiographics*. 2002 Nov-Dec;22(6):1541-53.
37. Carlson SK, Classic KL, Bender CE, Russell SJ. Small animal absorbed radiation dose from serial micro-computed tomography imaging. *Mol Imaging Biol*. 2007 Mar-Apr;9(2):78-82.
38. Winkelmann CT, Figueroa SD, Rold TL, Volkert WA, Hoffman TJ. Microimaging characterization of a B16-F10 melanoma metastasis mouse model. *Mol Imaging*. 2006 Apr-Jun;5(2):105-14.
39. Daibes S, Hoffman TJ, Miller W. Assessment of radiation exposure to laboratory animals during micro-CT imaging. *Mol Imaging*. 2004;3(3):245.
40. Hu J, Haworth ST, Molthen RC, Dawson CA. Dynamic small animal lung imaging via a postacquisition respiratory gating technique using micro-cone beam computed tomography. *Acad Radiol*. 2004 Sep;11(9):961-70.
41. Kersemans V, Thompson J, Cornelissen B, Woodcock M, Allen PD, Buls N, et al. Micro-CT for anatomic referencing in PET and SPECT: radiation dose, biologic damage, and image quality. *J Nucl Med*. 2011 Nov;52(11):1827-33.

42. Katzenstein ALA, Myers JL. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Clinical Relevance of Pathological Classification. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:1301-15.
43. Izumi S, Iikura M, Hirano S. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2012 Aug 30;367(9):870.
44. Vergnon JM, Vincent M, de The G, Mornex JF, Weynants P, Brune J. Cryptogenic fibrosing alveolitis and Epstein-Barr virus: an association? *Lancet.* 1984 Oct 6;2(8406):768-71.
45. Scadding JG. Diffuse pulmonary alveolar fibrosis. *Thorax.* 1974 May;29(3):271-81.
46. Keogh BA, Crystal RG. Clinical significance of pulmonary function tests. Pulmonary function testing in interstitial pulmonary disease. What does it tell us? *Chest.* 1980 Dec;78(6):856-65.
47. Mapel DW, Samet JM, Coultas DB. Corticosteroids and the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. Past, present, and future. *Chest.* 1996 Oct;110(4):1058-67.
48. Taniguchi H, Ebina M, Kondoh Y, Ogura T, Azuma A, Suga M, et al. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2010 Apr;35(4):821-9.
49. Orens JB, Estenne M, Arcasoy S, Conte JV, Corris P, Egan JJ, et al. International Guideline for the Selection of Lung Transplant Candidates: 2006 Update. *J of Heart Lung Transplant.* 2006;25(7):745-55.
50. Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008 Feb;294(2):L152-60.
51. Blum RH, Carter SK, Agre K. A clinical review of bleomycin--a new antineoplastic agent. *Cancer.* 1973 Apr;31(4):903-14.
52. Chaudhary NI, Schnapp A, Park JE. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Apr 1;173(7):769-76.
53. Chua F, Gauldie J, Laurent GJ. Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 Jul;33(1):9-13.
54. Lazenby AJ, Crouch EC, McDonald JA, Kuhn C, 3rd. Remodeling of the lung in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. An immunohistochemical study of laminin, type IV collagen, and fibronectin. *Am Rev Respir Dis.* 1990 Jul;142(1):206-14.
55. Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW, Breuer R. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol.* 2002 Jun;83(3):111-9.
56. Adamson IYR, Bowden DH. The Pathogenesis of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *Am J Pathol.* 1974;77(2):185-202.
57. Babin AL, Cannet C, Gerard C, Wyss D, Page CP, Beckmann N. Noninvasive assessment of bleomycin-induced lung injury and the effects of short-term glucocorticosteroid treatment in rats using MRI. *J Magn Reson Imaging.* 2011 Mar;33(3):603-14.
58. Conti G, Tambalo S, Villetti G, Catinella S, Carnini C, Bassani F, et al. Evaluation of lung inflammation induced by intratracheal administration of LPS in mice: comparison between MRI and histology. *MAGMA.* 2010 Apr;23(2):93-101.
59. Jacob RE, Amidan BG, Soelberg J, Minard KR. In vivo MRI of altered proton signal intensity and T2 relaxation in a bleomycin model of pulmonary inflammation and fibrosis. *J Magn Reson Imaging.* 2010 May;31(5):1091-9.
60. Karmouty-Quintana H, Cannet C, Zurbrugg S, Ble FX, Fozard JR, Page CP, et al. Bleomycin-induced lung injury assessed noninvasively and in spontaneously breathing rats by proton MRI. *J Magn Reson Imaging.* 2007 Oct;26(4):941-9.
61. Srivastava M, Steinwede K, Kiviranta R, Morko J, Hoymann HG, Langer F, et al. Overexpression of cathepsin K in mice decreases collagen deposition and lung resistance in response to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2008;9:54.
62. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol.* 1988 Apr;41(4):467-70.
63. Sikic BI, Young DM, Mimnaugh EG, Gram TE. Quantification of bleomycin pulmonary toxicity in mice by changes in lung hydroxyproline content and morphometric histopathology. *Cancer Res.* 1978 Mar;38(3):787-92.

64. Shofer S, Badea C, Auerbach S, Schwartz DA, Johnson GA. A micro-computed tomography-based method for the measurement of pulmonary compliance in healthy and bleomycin-exposed mice. *Exp Lung Res.* 2007 Apr-May;33(3-4):169-83.
65. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev.* 1995 Oct;8(4):515-48.
66. Liu TB, Perlin DS, Xue C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. *Virulence.* 2012 Mar-Apr;3(2):173-81.
67. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol.* 1990 Jul;28(7):1642-4.
68. Velagapudi R, Hsueh YP, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2009 Oct;77(10):4345-55.
69. Pathmanathan R, Soo-Hoo Tuck S. Cryptococcosis in the University Hospital, Kuala Lumpur and review of published cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982;76(1):21-4.
70. Kidd SE, Hagen F, Tscharke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec 7;101(49):17258-63.
71. Speed B, Dunt D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Dis.* 1995 Jul;21(1):28-34.
72. Singh N, Dromer F, Perfect JR, Lortholary O. Cryptococcosis in solid organ transplant recipients: current state of the science. *Clin Infect Dis.* 2008 Nov 15;47(10):1321-7.
73. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis.* 2010 Feb;50(3):291-322.
74. Charlier C, Dromer F, Leveque C, Chartier L, Cordoliani YS, Fontanet A, et al. Cryptococcal neuroradiological lesions correlate with severity during cryptococcal meningoencephalitis in HIV-positive patients in the HAART era. *PLoS ONE.* 2008;3(4):e1950.
75. Carroll SF, Guillot L, Qureshi ST. Mammalian model hosts of cryptococcal infection. *Comp Med.* 2007 Feb;57(1):9-17.
76. Ngamskulrungrroj P, Chang Y, Sionov E, Kwon-Chung KJ. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *mBio.* 2012;3(3).
77. Chang YC, Stins MF, McCaffery MJ, Miller GF, Pare DR, Dam T, et al. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. *Infect Immun.* 2004 Sep;72(9):4985-95.
78. Jong A, Wu CH, Shackelford GM, Kwon-Chung KJ, Chang YC, Chen HM, et al. Involvement of human CD44 during *Cryptococcus neoformans* infection of brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol.* 2008 Jun;10(6):1313-26.
79. Minami M, Sobue S, Ichihara M, Hasegawa T. Analysis of the pathological lesions of the lung in a mouse model of cutaneous infection with *Streptococcus pyogenes*. *Pathol Int.* 2012 Feb;62(2):99-104.
80. Lopera D, Naranjo T, Hidalgo JM, de Oliveira Pascarelli BM, Patino JH, Lenzi HL, et al. Pulmonary abnormalities in mice with paracoccidiodomycosis: a sequential study comparing high resolution computed tomography and pathologic findings. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(6):e726.
81. Tournebize R, Doan BT, Dillies MA, Maurin S, Beloeil JC, Sansonetti PJ. Magnetic resonance imaging of *Klebsiella pneumoniae*-induced pneumonia in mice. *Cell Microbiol.* 2006 Jan;8(1):33-43.
82. Marzola P, Lanzoni A, Nicolato E, Di Modugno V, Cristofori P, Osculati F, et al. (1)H MRI of pneumococcal pneumonia in a murine model. *J Magn Reson Imaging.* 2005 Jul;22(1):170-4.
83. Wang W, Nguyen NM, Agapov E, Holtzman MJ, Woods JC. Monitoring in vivo changes in lung microstructure with (3)He MRI in Sendai virus-infected mice. *J Appl Physiol.* 2012 May;112(9):1593-9.
84. Podoleanu AG. Optical coherence tomography. *Br J Radiol.* 2005 Nov;78(935):976-88.

85. Perchant A, Goualher GL, Genet M, Viellerobe B, Berier K. An integrated fibered confocal microscopy system for in vivo and in situ fluorescence imaging - applications to endoscopy in small animal imaging. *Biomedical Imaging: Nano to Macro*. 2004;292-5.
86. Laemmel E, Genet M, Le Goualher G, Perchant A, Le Gargasson JF, Vicaut E. Fibered confocal fluorescence microscopy (Cell-viZio) facilitates extended imaging in the field of microcirculation. A comparison with intravital microscopy. *J Vasc Res*. 2004 Sep-Oct;41(5):400-11.
87. Thiberville L, Moreno-Swirc S, Vercauteren T, Peltier E, Cave C, Bourg Heckly G. In vivo imaging of the bronchial wall microstructure using fibered confocal fluorescence microscopy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Jan 1;175(1):22-31.
88. Fuchs FS, Zirlik S, Hildner K, Schubert J, Vieth M, Neurath MF. Confocal laser endomicroscopy for diagnosing lung cancer in vivo. *Eur Respir J*. 2012, in press.
89. Neumann H, Vieth M, Atreya R, Grauer M, Siebler J, Bernatik T, et al. Assessment of Crohn's disease activity by confocal laser endomicroscopy. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Dec;18(12):2261-9.
90. Kiesslich R, Goetz M, Burg J, Stolte M, Siegel E, Maeurer MJ, et al. Diagnosing *Helicobacter pylori* in vivo by confocal laser endoscopy. *Gastroenterology*. 2005 Jun;128(7):2119-23.
91. Mitra S, Dolan K, Foster TH, Wellington M. Imaging morphogenesis of *Candida albicans* during infection in a live animal. *J Biomed Opt*. 2010 Jan-Feb;15(1):010504.
92. Morisse H, Heyman L, Salaun M, Favennec L, Picquenot JM, Bohn P, et al. In vivo and in situ imaging of experimental invasive pulmonary aspergillosis using fibered confocal fluorescence microscopy. *Med Mycol*. 2012 May;50(4):386-95.
93. Lorenz JN. A practical guide to evaluating cardiovascular, renal, and pulmonary function in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 Jun;282(6):R1565-82.
94. De Vleeschauwer SI, Rinaldi M, De Vooght V, Vanoirbeek JA, Vanaudenaerde BM, Verbeken EK, et al. Repeated invasive lung function measurements in intubated mice: an approach for longitudinal lung research. *Lab Anim*. 2011 Apr;45(2):81-9.
95. Fernandez-Rodriguez S, Ford WR, Broadley KJ, Kidd EJ. Establishing the phenotype in novel acute and chronic murine models of allergic asthma. *Int Immunopharmacol*. 2008 May;8(5):756-63.
96. Goldman DL, Davis J, Bommarito F, Shao X, Casadevall A. Enhanced allergic inflammation and airway responsiveness in rats with chronic *Cryptococcus neoformans* infection: potential role for fungal pulmonary infection in the pathogenesis of asthma. *J Infect Dis*. 2006 Apr;193(8):1178-86.
97. Hardy RD, Jafri HS, Olsen K, Hatfield J, Iglehart J, Rogers BB, et al. *Mycoplasma pneumoniae* induces chronic respiratory infection, airway hyperreactivity, and pulmonary inflammation: a murine model of infection-associated chronic reactive airway disease. *Infect Immun*. 2002 Feb;70(2):649-54.
98. Jain AV, Zhang Y, Fields WB, McNamara DA, Choe MY, Chen GH, et al. Th2 but not Th1 immune bias results in altered lung functions in a murine model of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun*. 2009 Dec;77(12):5389-99.
99. Voelz K, Johnston SA, Rutherford JC, May RC. Automated analysis of cryptococcal macrophage parasitism using GFP-tagged cryptococci. *PLoS ONE*. 2010;5(12):e15968.
100. Vanoirbeek JA, Rinaldi M, De Vooght V, Haenen S, Bobic S, Gayan-Ramirez G, et al. Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Jan;42(1):96-104.
101. Woessner JJ. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys*. 1961 May;93:440-7.
102. Takubo Y, Guerassimov A, Ghezzi H, Triantafillopoulos A, Bates JH, Hoidal JR, et al. Alpha1-antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice: parallels with human disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Dec 15;166(12):1596-603.
103. Detombe SA, Dunmore-Buyze J, Petrov IE, Drangova M. X-ray dose delivered during a longitudinal micro-CT study has no adverse effect on cardiac and pulmonary tissue in C57BL/6 mice. *Acta Radiol*. 2013 Feb, in press.
104. Holmes JE, Bydder GM. MR imaging with ultrashort TE (UTE) pulse sequences: Basic principles. *Radiography*. 2005;11:163-74.

105. Bianchi A, Lux F, Tillement O, Cremillieux Y. Contrast enhanced lung MRI in mice using ultra-short echo time radial imaging and intratracheally administrated Gd-DOTA-based nanoparticles. *Magn Reson Med*. 2012 Dec, in press.
106. Ask K, Labiris R, Farkas L, Moeller A, Froese A, Farncombe T, et al. Comparison between conventional and "clinical" assessment of experimental lung fibrosis. *J Transl Med*. 2008;6:16.