

**Ultraschallkontrastmittel**

# Mikrobläschen als Kontrastmittel für die diagnostische Ultraschall-Bildgebung: die Schlüsselrolle von Perfluorverbindungen\*\*

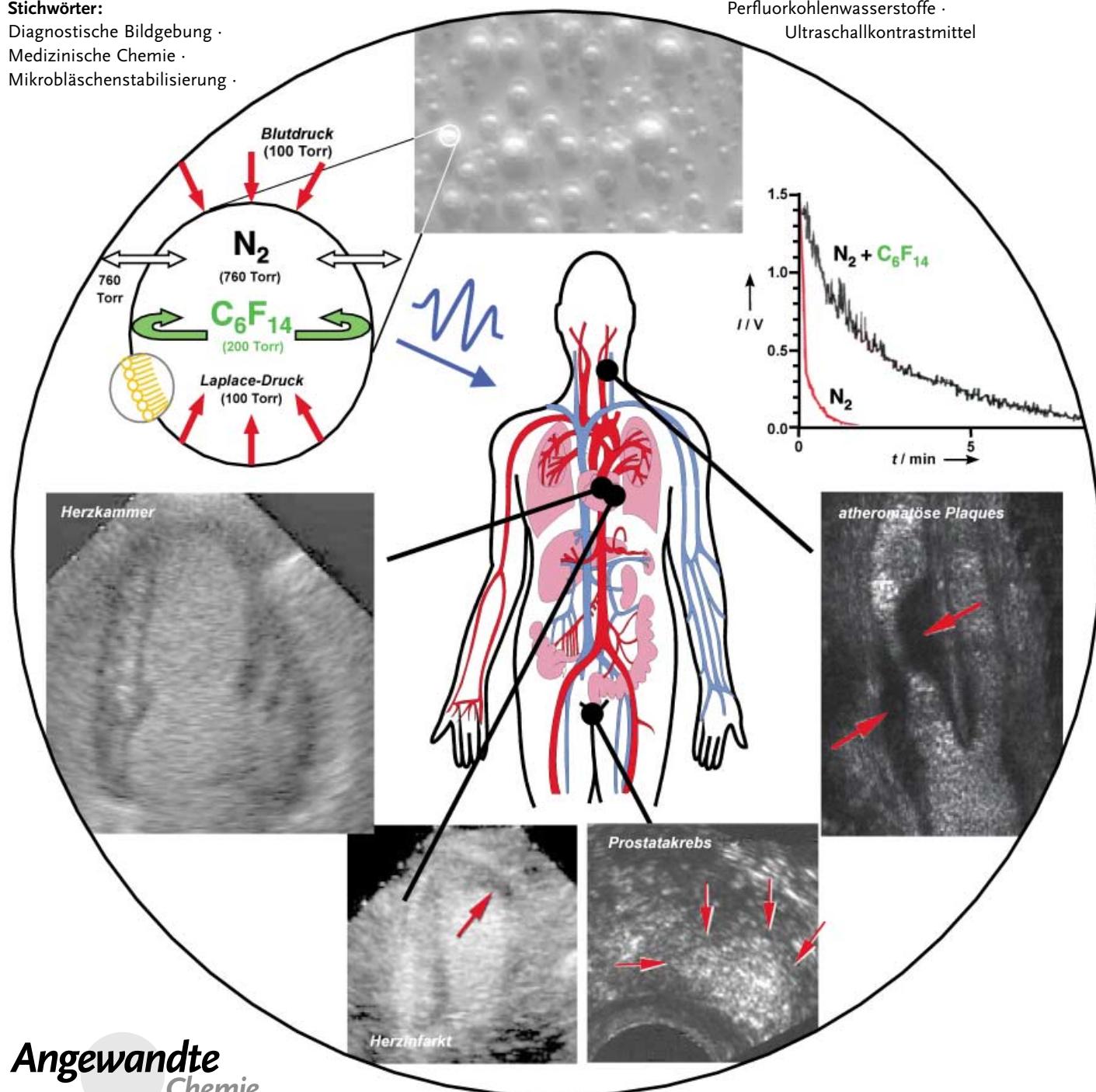
Ernest G. Schutt, David H. Klein, Robert M. Mattrey und Jean G. Riess\*

**Stichwörter:**

Diagnostische Bildgebung ·

Medizinische Chemie ·

Mikrobläschenstabilisierung ·

Perfluorkohlenwasserstoffe ·  
Ultraschallkontrastmittel**Angewandte  
Chemie**

**M**ikrometergroße Gasbläschen, die bei den für diagnostische Zwecke genutzten Ultraschallfrequenzen als Resonator fungieren, sind effektive Kontrastmittel für die Ultrasonographie. Doch einfache Luftbläschen lösen sich nach der Injektion in die Blutbahn innerhalb weniger Sekunden auf. Erst Fluorkohlenwasserstoffe, die die Lebensdauer der Mikrobläschen *in vivo* von Sekunden auf Minuten erhöhen, machten die Kontrast-Ultrasonographie zu einer klinisch einsetzbaren Technik. Durch selektives Unterdrücken der Gewebe signale erhält man noch kontrastreichere Bilder. Zugelassen sind bisher  $C_3F_8$ - und  $SF_6$ -Mikrobläschen sowie  $N_2$ -Mikrobläschen, die osmotisch durch  $C_6F_{14}$  stabilisiert sind. Mit ihnen lassen sich kardiovaskuläre Anomalitäten und Organschäden wie Tumore nachweisen und charakterisieren. Die so erhaltenen genauen Bilder tragen zu zuverlässigeren Diagnosen bei; damit kann dieser Technik eine entscheidende Rolle bei der klinischen Entscheidungsfindung zukommen. Neue Forschungsziele sind Mikrobläschen, die bestimmte Zellen ansteuern – sowohl für die Untersuchung einer Erkrankung als auch für die Wirkstoff-Freisetzung und den Gentransport.

„Ein Bild sagt mehr als tausend Worte.“

### 1. Einleitung – warum ein besserer Kontrast bei Ultraschalluntersuchungen nötig ist

Die Ultraschalluntersuchung ist das weltweit am häufigsten eingesetzte Bildgebungsverfahren. So sind in den USA 75 000 Ultraschallgeräte in Betrieb gegenüber 7000 Computer- und 5000 Kernspintomographen. Es handelt sich um eine vielseitige, nichtinvasive, mit geringem Risiko verbundene, preiswerte und mit einem handlichen Gerät durchführbare Bildgebung in Echtzeit. Jedes Jahr werden auf der ganzen Welt schätzungsweise 100 Millionen Ultraschalluntersuchungen am Herzen, am Gefäßsystem und an den Unterleibsgangenen durchgeführt, davon mehr als 30 Millionen in den USA. Doch im Gegensatz zu den anderen bedeutenden Bildgebungsverfahren in der Medizin, wozu die Untersuchungen mit Röntgen-Strahlen und die NMR-Bildgebung gehören, waren Ultraschalluntersuchungen bis vor kurzem durch den Mangel an effektiven Kontrastmitteln in ihrer Anwendungsbreite eingeschränkt.

Definitionsgemäß verändert ein Kontrastmittel den Bildkontrast so, dass es dem Arzt hilft, normale von anomalen Verhältnissen zu unterscheiden. Das könnte beispielsweise dadurch geschehen, dass es Begrenzungen eines Gewebes hervorhebt wie etwa eine Herzkammer- oder eine Ventrikellwand oder dass es die erwarteten zeitabhängigen oder räumlichen Verteilungsmuster im zu untersuchenden Gewebe, z.B. einem Lebertumor, verändert. Die Darstellung des Blutes und Blutstroms in einem Organ ist eine entscheidende Hilfe bei der Unterscheidung von normalem und verletztem oder anomalem Gewebe. Da Leber, Milz und Nieren, wenn sie in sonst gesundem Zustand eine Verletzung aufweisen, ähnliche Ultraschallbilder geben wie viele Tumore

### Aus dem Inhalt

1. Einleitung – warum ein besserer Kontrast bei Ultraschalluntersuchungen nötig ist	3337
2. Konzepte und Methoden	3338
3. Pharmazeutische Produkte	3345
4. Bildgebung in der Physiologie und Pathologie	3347
5. Zusammenfassung und Ausblick	3352

oder ein Hämatom, gibt es prinzipielle Grenzen für die Unterscheidung zwischen gesundem und krankem Gewebe mithilfe von Ultraschall. Während das vaskuläre Lumen großer und mittelgroßer Gefäße leicht dargestellt werden kann, lässt sich das Lumen kleiner Gefäße, besonders von solchen im Organinnern, nicht vom umgebenden Gewebe unterscheiden.

Doch unabhängig von der Fähigkeit eines Bildgebungsverfahrens zur Darstellung struktureller Details benötigt man Kontrastmittel zur Steigerung der Informationsausbeute. Zusätzlich zu einem höheren Kontrast zwischen pathologischem Gewebe und Gewebehintergrund erhält man mit einem Kontrastmittel, dessen Pharmakokinetik man versteht, sinnvolle physiologische Informationen, indem man die Freisetzungsgeschwindigkeit, die Ausscheidungsgeschwindigkeit und das Ausmaß der Akkumulation über die Zeit im interessierenden Bereich verfolgt.

Etwa 20% der Untersuchungen am Herzen (Echokardiogramme) liefern keine Bildqualität, die eine Darstellung der Herzinnenwand erlauben würde, um damit eine Dysfunktion der Ventrikel genau zu diagnostizieren. Dies macht zusätzliche Untersuchungen nötig, die oft einen größeren Eingriff erfordern, immer teurer und manchmal auch mit einem

[\*] Prof. J. G. Riess  
Les Giances, 06950 Falicon (Frankreich)  
Fax: (+33) 493-84-98-25  
E-mail: jriess@allp.com  
E. G. Schutt, Dr. D. H. Klein  
Research and Development Department  
Alliance Pharmaceutical Corp.  
6175 Lusk Blvd, San Diego, CA 92121 (USA)  
Prof. J. G. Riess, Prof. R. M. Mattrey  
MRI Institute  
University of California at San Diego, Medical Center  
410 Dickinson St, San Diego, CA 92103-1990 (USA)

[\*\*] Alle Autoren sind entweder bei Alliance Pharmaceutical Corp. beschäftigt oder über dort eine Beratertätigkeit aus. Im Folgenden vertreten sie aber ausschließlich ihre eigene Meinung und nicht unbedingt die der Firma.

größeren Risiko verbunden sind. Die Entwicklung injizierbarer mikrometergroßer Gasbläschen als effektiver Ultraschallkontrastmittel, mit denen die Herzinnenwand hervorgehoben werden kann, verschaffte der Echokardiographie mit Kontrastmittel den Zugang zum klinischen Alltag.<sup>[1-5]</sup>

Bei der Darstellung kompakter Organe wie der Leber sind anomale Areale, z.B. Blutergüsse nach einem Trauma oder ein Tumor, in 40 bis 50% der Fälle nicht sichtbar. Da man bei Verwendung von Mikrobläschen als Kontrastmittel das Einströmen des Blutes in die Leber über das Einsickern dieser Bläschen in die Leberblutbahnen beobachten kann, besteht die Möglichkeit, wenn alle Blutgefäße mit den Bläschen gefüllt sind, die Art des vorliegenden pathologischen Zustands zu diagnostizieren. Man erwartet darum von der Kontrast-Echosonographie einen wesentlichen Beitrag zum derzeitigen weltweiten Bemühen um frühere, genauere und kostengünstigere Diagnosen.

Bei der Entwicklung von Ultraschallkontrastmitteln wirken Perfluorkohlenwasserstoff(FKW)-, Oberflächen- und Kolloidchemie zusammen.<sup>[6,7]</sup> Einzigartig an der Ultraschall-Bildgebung mithilfe von Kontrastmitteln ist, dass das Kontrastmittel mit dem bildgebenden Strahl wechselwirkt und dabei modifiziert wird. Das bedeutet, dass Kontrastmittel und Bildgebungsverfahren in enger Wechselbeziehung stehen, was zur Beeinflussung des Signals und zur Verbesserung des Kontrasts genutzt werden kann. Im Folgenden beschreiben wir zusammenfassend die grundlegenden Prinzipien der Ultraschallkontrastmittel und die technischen Fortschritte, die zu deren Vermarktung geführt haben. Es wird lediglich eine begrenzte Auswahl von Literaturquellen aufgeführt, über die aber der Zugang zu einer Fülle anderer Veröffentlichungen eröffnet wird.

## 2. Konzepte und Methoden

Ein effektives Ultraschallkontrastmittel sollte helfen, zwischen normalem und pathologisch verändertem Gewebe zu differenzieren, und zwar anhand unterschiedlicher Rückstreuung (Echos). Dazu muss die akustische Impedanz (Widerstand gegen die Schallausbreitung; steht in Beziehung zum Produkt aus Gewebedichte und Schallgeschwindigkeit) der beiden Gewebearten unterschiedlich gemacht werden.



Jean G. Riess promovierte in Straßburg bei Prof. G. Ourisson und wurde nach zwei Jahren bei Prof. J. Van Wazer (Monsanto, USA) 1968 Professor in Nizza, wo er die Unité de Chimie Moléculaire (angegliedert an das Centre National de la Recherche Scientifique) gründete, leitete und schließlich ihr Ehrendirektor wurde. Seine derzeitigen Interessensgebiete sind unter anderem Fluorkohlenwasserstoffemulsionen zur In-vivo-Freisetzung von Sauerstoff („Blutersatzstoffe“), Kontrastmittel auf der Grundlage von Fluorkohlenwasserstoffen, fluorierte Selbstassoziate und Systeme zur Freisetzung von Medikamenten. Er hat ungefähr 365 Arbeiten veröffentlicht und ist Inhaber von gut 25 Patenten.

Mikrobläschen haben nicht nur eine drastisch andere akustische Impedanz als Gewebe, sondern wirken zudem als Resonatoren für Ultraschallwellen und erhöhen so den Rückstreueneffekt von Blut um bis zu zehn Größenordnungen mehr als rote Blutzellen,<sup>[8a]</sup> was in Verbindung mit einem für das Kontrastmittel spezifischen Bildgebungsverfahren die Beobachtung eines einzigen Mikrobläschens ermöglicht.<sup>[8b]</sup> Mithilfe von Kontrastmitteln lassen sich somit Aufnahmen des Blutflusses durch Herzkammern, Gefäße und Kapillarbett in Echtzeit erhalten. Einige der Kontrastmittel verlieren bei der Zirkulation durch Leber und Milz an Geschwindigkeit oder werden von Phagozyten aufgenommen und erhöhen so spezifisch den Kontrast dieser Organe.<sup>[9]</sup> Andere Kontrastmittel lassen sich auf bestimmte Rezeptorsysteme abstimmen.

### 2.1. Injizierbare mikrometergroße Gasbläschen für eine verstärkte und länger andauernde Rückstreuung

Werden Ultraschallwellen an kugelförmigen Partikeln gestreut, die kleiner sind als die Ultraschallwellenlänge, ist die Intensität der Streustrahlung proportional zum Quadrat der Differenz der Kompressibilitäten von Streuobjekt und Medium und zum Quadrat der Differenz der Dichten von Streuobjekt und Medium [Gl. (1)].<sup>[10]</sup> Dabei ist  $I$  die Intensität

$$I/I_0 = 1/9 n V [k^4 r^6 (\gamma_c + \gamma_d \cos\theta)^2 / d^2] \quad (1)$$

der gestreuten,  $I_0$  die Intensität der einfallenden Wellen,  $n$  die Zahlendichte der streuenden Partikel,  $V$  das Streuvolumen,  $k$  die Wellenzahl,  $r$  der Partikelradius,  $\gamma_c$  der Ausdruck für die Kompressibilität ( $\gamma_c = (\kappa_s - \kappa_m)/\kappa_m$ ;  $\kappa_s$  ist die Kompressibilität des Streuobjekts,  $\kappa_m$  die des Mediums),  $\gamma_d$  der Ausdruck für die Dichte ( $\gamma_d = (3\rho_s - 3\rho_m)/(2\rho_s + \rho_m)$ ;  $\rho_s$  ist die Dichte des Streuobjekts,  $\rho_m$  die des Mediums),  $\theta$  der Streuwinkel (180° für Rückstreuung) und  $d$  der Abstand vom Streuobjekt. (Anmerkung: Wenn in den Bläschen der Resonanzfall eintritt, ist die Streuleistung um ein Vielfaches größer als es Gleichung (1) vorhersagt.)

Die Kompressibilität gasförmiger Gebilde (Gasbläschen) ist um mehrere Größenordnungen höher als die von Flüssigkeiten oder Festkörpern, was dazu führt, dass Bläschen ein starkes Echo erzeugen, d.h., die Streuintensität pro Teilchen ist bei mikrometergroßen Gasbläschen sehr hoch.<sup>[8a]</sup> Wenn folglich eine kleine Menge eines solchen Kontrastmittels intravenös injiziert wird (typischerweise handelt es sich um 0.25 mL des injizierbaren Mittels – eine winzige Dosis – mit ungefähr  $2.5 \times 10^8$  Mikrobläschen), werden mit Blut gefüllte Bereiche wie etwa die Herzkammern hell, und man kann das Blut vom umgebenden Gewebe unterscheiden.

Hinzu kommt Folgendes: Sind Mikrobläschen den Kompressions- und Expansionskräften einer Schallwelle bei einer kritischen Frequenz ausgesetzt, tritt der Resonanzfall ein, und sie werden selbst zu Sendern. Bei mikrometergroßen Mikrobläschen geschieht das genau in dem Frequenzbereich, den man gewöhnlich bei diagnostischen Ultraschalluntersuchungen anwendet (1–3 MHz). Die die Gasbläschen umgebende Hülle kann die Möglichkeit der Gasbläschen,

Resonanz zu treten, erschweren. Das Ausmaß der Störung hängt dabei von der Art der Hülle ab. Da die Mikrobläschen zudem die ausgesandten Schallwellen effektiv reflektieren, können zu viele Mikrobläschen das Eindringen der Schallwellen in die Tiefen des Gewebes verhindern, was zur „Verdunklung“ der tiefer liegenden Strukturen führt.

## 2.2. Das als Ultraschallkontrastmittel ideale Gasbläschen

Die Gasbläschengröße ist ein entscheidender Parameter, den man innerhalb vorgegebener Grenzen einstellen muss. Die Streuintensität der Gasbläschen ist im Nichtresonanzfall der sechsten Potenz des Gasbläschenradius proportional [Gl. (1)]; es gilt also: je größer desto besser. Allerdings ist beim In-vivo-Einsatz eine Obergrenze dadurch gegeben, dass die Gasbläschen das Kapillarbett der Blutgefäße passieren müssen und dass sich Gasbläschen, die größer als 6–8 µm sind, in den Lungenkapillaren verfangen. Zurzeit werden Größen im Bereich von 1–7 µm, vorzugsweise um 3 µm, akzeptiert, wobei die Größenverteilung so eng wie möglich sein sollte. Die Größe der Gasbläschen muss im Augenblick ihrer Injektion und während der gesamten Zeit ihrer Zirkulation kontrollierbar sein. Eine Gasbläschenvergrößerung oder -aggregation während der Zirkulation muss vermieden werden.

Da die sinnvolle Untersuchung eines Patienten einige Minuten erfordert, müssen die Gasbläschen zudem so stabil sein, dass sie bei ihrer Zirkulation im Körper zahlreiche Passagen durch Herz und Lunge überstehen. Folglich ist eine ausreichende Lebensdauer der Gasbläschen *in vivo* eine weitere wichtige Voraussetzung.

Darüber hinaus sollte das Kontrastmittel möglichst keine von Blutbestandteilen abgeleitete proteinöse Komponenten enthalten, und die Bläschen sollten, damit maximale Resonanz eintritt, eine weiche, elastische Hülle haben. Das Kontrastmittel sollte schon bei geringer Dosierung wirksam sein, leicht metabolisiert und/oder ausgeschieden werden und minimale Nebenwirkungen haben. Als pharmazeutisches Produkt sollte es einfach und reproduzierbar herzustellen sein, man sollte es vorzugsweise durch Hitze sterilisieren können, und man sollte es mindestens zwei Jahre lagern können, wenn möglich bei Raumtemperatur. Es sollte nutzergünstlich sein und eine gut steuerbare, stetige Dosierung ermöglichen. Das Design der Gasbläschen sollte auch für spezielle Anwendungen wie die Bildgebung mit harmonischen Obertönen oder die gezielte Untersuchung eines Gewebes optimiert werden können.

## 2.3. Stabilität der Gasbläschen *in vivo*: hier kommen Perfluorverbindungen ins Spiel

Mikroluftbläschen eignen sich nicht besonders als Kontrastmittel, da sich die Luft nach intravenöser Infusion sehr schnell im Blut auflöst, sodass die Gasbläschen aus dem Blutkreislauf verschwinden, bevor die Ultraschalluntersuchung abgeschlossen ist. Der Grund dafür ist, dass der Gasdruck im Innern der Bläschen die Summe aus dem

Gleichgewichtsdruck (Henry-Gesetz), dem Laplace-Druck und dem Blutdruck ist und dass diese Summe größer ist als der Gasdruck im Blut. Außerdem erniedrigt der Sauerstoffmetabolismus den Sauerstoffdruck im Blut, was den Austritt von Sauerstoff aus den Bläschen zusätzlich erleichtert. Darüber hinaus führt eine intensive Beschallung zur Zerstörung der Gasbläschen, da das schnelle Kontrahieren und Expandieren im Resonanzfall die Gasbläschenhülle mechanisch beansprucht und schwächt.

Der Laplace-Druck (oder Krümmungsdruck)  $\Delta P$ , der auf ein Gasbläschen einwirkt, ist durch Gleichung (2) gegeben, in

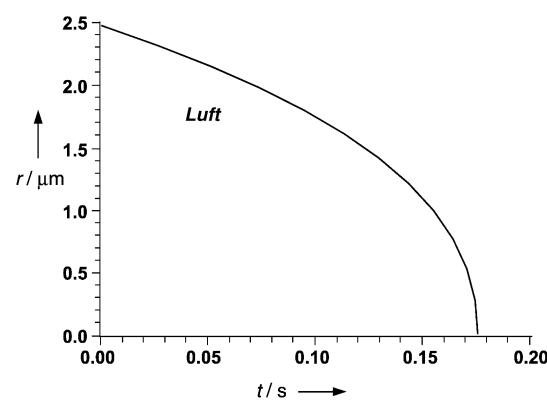
$$\Delta P = 2\sigma/r \quad (2)$$

der  $\sigma$  für die Oberflächenspannung an der Luft-Wasser-Grenzfläche und  $r$  für den Radius des Gasbläschens steht. Der Tensidfilm an der Oberfläche des Gasbläschens reduziert die Oberflächenspannung  $\sigma$  zwischen Luft und Wasser und damit auch den Laplace-Druck, eliminiert ihn aber nicht. Wenn aufgrund des Druckgradienten Gas aus dem Gasbläschen entweicht, schrumpft das Bläschen und der Laplace-Druck steigt, was wiederum das Lösen des Gases und das daraus resultierende Schrumpfen des Bläschens beschleunigt. Die Geschwindigkeit, mit der das Gasbläschen schrumpft, wenn sich das Gas im Blutstrom löst, sollte Gleichung (3)

$$dr/dt = -D L [(\bar{p}^* + 2\sigma/r)/(p_{\text{atm}} + 4\sigma/3r)][1/r + 1/\sqrt{\pi D t}] \quad (3)$$

gehören; der Verlauf ist in Abbildung 1 dargestellt.<sup>[11]</sup>  $D$  ist der Diffusionskoeffizient des Gases in Wasser,  $L$  der Verteilungskoeffizient des Gases zwischen Gas- und wässriger Phase (wenn man ihn als Quotient aus der Löslichkeit des Gases in der Flüssigkeit und der Gasdichte berechnet, entspricht er der Ostwaldschen Löslichkeitskonstanten),  $p_{\text{atm}}$  der Atmosphärendruck und  $\bar{p}^*$  der Innenüberdruck mit Beiträgen aus dem systemischen Blutdruck und dem Sauerstoffmetabolismus.

Um die Geschwindigkeit zu verringern, mit der sich Gasbläschen im Blut auflösen, muss man  $L$ , d.h. die Löslichkeit des eingeschlossenen Gases in Wasser, reduzieren. Je kleiner  $L$  ist, umso größer ist die Lebensdauer der Gasbläs-



**Abbildung 1.** Lösen eines Luftbläschens im Blutstrom (Bläschenradius  $r$  als Funktion der Zeit  $t$ ) nach Gleichung (3). Radius zu Beginn: 2.5 µm; Innenüberdruck  $\bar{p}^*$ : 4300 Pa; Oberflächenspannung: 70 mN m<sup>-1</sup> (aus Lit. [11]).

chen. Eine Möglichkeit ist, in die Gasbläschen einen gewissen Anteil eines FKW einzuschließen, denn solche Verbindungen sind die am wenigsten wasserlöslichen und gleichwohl flüchtigen chemischen Verbindungen, die man kennt (Tabelle 1). Diejenigen mit den kleinsten Werten für  $L$  sind am effektivsten. Bringt man einen geeigneten FKW in ein Luftbläschen mit einem Durchmesser von etwa  $5\text{ }\mu\text{m}$ , so erhöht sich die Lebensdauer des Bläschens im Blutstrom von Sekunden auf einige Minuten.

## 2.4. Die Steuerung der Bläschengröße: Perfluorkohlenwasserstoffe als osmotische Gasblasenstabilisatoren

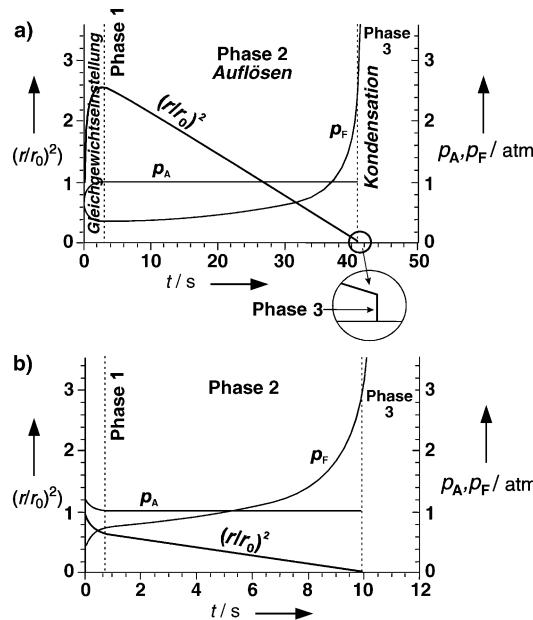
Injiziert man Mikrobläschen, die nur FKW-Gas enthalten, ins Blut, nehmen sie daraus Luft auf, da ein Luftkonzentrationsgradient zwischen dem Blut und den Gasbläschen besteht. Dabei schwellen die Bläschen so weit an, bis der Partialdruck der Luft in ihrem Innern gleich der umgebenden Sättigungskonzentration ist und der FKW-Partialdruck gleich groß ist wie die Summe aus Laplace-Druck und arteriellem Blutdruck (Abbildung 2). Ist andererseits nicht genug FKW vorhanden, schrumpft das Gasbläschen rasch, bis es schließlich den Radius erreicht, bei dem es kollabiert [Gl. (4)] mit

$$r_c = 2\sigma/p_{\text{sat}(T)} \quad (4)$$

$p_{\text{sat}(T)}$  als Sättigungsdampfdruck des FKW bei der Temperatur  $T$ . Dies unterstützt die Idee, Gasbläschen mit einem FKW-Partialdruck zu entwerfen, der der Summe aus Laplace-Druck und arteriellem Blutdruck genau entspricht.<sup>[11,12]</sup> Der thermodynamisch gesteuerte Kollaps der Mikrobläschen ist dann verzögert, und auch ein Wachstum in vivo ist unterbunden; dies ermöglicht eine sichere Diagnose dank verlängerter Zirkulation der Gasbläschen. Diese Art der Stabilisierung erfordert keine mechanischen Vorkehrungen wie etwa Strukturen mit einer harten Hülle.

**Tabelle 1:** Für die Stabilisierung von Mikrobläschen ausschlaggebende Eigenschaften von Perfluorverbindungen.<sup>[11,15]</sup>

Gas	$M_r$ (Sdp. [°C])	Wasserlöslichkeit der Substanz [mol m <sup>-3</sup> ] (25 °C)	$L$ (25 °C, $\times 10^6$ )	Sättigungsdampfdruck [kPa] (37 °C)
N <sub>2</sub>	30 (-196)	0.63	14480 (35 °C)	
O <sub>2</sub>	32 (-183)	1.32	27730 (35 °C)	
C <sub>2</sub> F <sub>6</sub>	138 (-73)	1.45	1272	3500
SF <sub>6</sub>	146 (-64)	0.27		2530 (27 °C)
n-C <sub>3</sub> F <sub>8</sub>	188 (-37)	0.19	530	1160
n-C <sub>4</sub> F <sub>10</sub>	238 (-2)	0.021	202	380
n-C <sub>5</sub> F <sub>12</sub>	288 (29)	$4 \times 10^{-3}$	117	130
n-C <sub>6</sub> F <sub>14</sub>	338 (57)	$2.7 \times 10^{-4}$	23	48
CF <sub>3</sub> (OCF <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OCF <sub>3</sub>	352 (59)		17 (37 °C)	39
CF <sub>3</sub> (OCF <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> OCF <sub>3</sub>	386 (64)		4 (37 °C)	33
CF <sub>3</sub> (OCF <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> OCF <sub>3</sub>	418 (83)		3 (37 °C)	17



**Abbildung 2:** Simulation der Änderung der Größe,  $(r/r_0)^2$ , eines Mikrobläschens in Wasser, das mit *n*-Perfluorbutan (F) und Luft (A) gefüllt ist, mit der Zeit  $t$  (aus Lit. [11]). Der Molenbruch FKW/(FKW+N<sub>2</sub>) beträgt in a) 1 und in b) 0.25 (Radius zu Beginn: 2.5  $\mu\text{m}$ ; Innenüberdruck  $\bar{p}^*$ : 4300 Pa; Oberflächenspannung: 70 mN m<sup>-1</sup>; 37°C). Die Änderungen der Partialdrücke  $p_A$  und  $p_F$  beider Gase im Bläschen sind ebenfalls angegeben.

## 2.5. Die Dynamik von Gasbläschen in vivo

Von van Liew et al.<sup>[13]</sup> sowie von Kabalnov et al.<sup>[11]</sup> stammen theoretische Analysen der Kinetik der Auflösung von Mikrobläschen im Blutstrom für Gasmischungen mit einem wenig löslichen Gas als Bestandteil, das als osmotischer Stabilisator fungiert. In der zweiten Veröffentlichung wurde auch der Fall berücksichtigt, dass das osmotisch wirkende Agens kondensiert, und die Autoren behandeln das Thema analytisch und nicht nur rein numerisch.

Die Geschwindigkeit, mit der der Partikelradius abnimmt, weil sich ein im Innern des Gasbläschens befindliches Gas in Wasser löst, wird durch Gleichung (3) beschrieben. Bei einem gegebenen FKW hängt diese Geschwindigkeit primär vom Laplace-Druck ab und darüber hinaus vom Innenüberdruck  $\bar{p}^*$ , so wie er oben definiert ist. Auch der Dampfdruck des osmotisch wirkenden Gases bei Körpertemperatur ist entscheidend für die Lebensdauer des Gasbläschens: Ist er niedrig, so erreicht das Gasbläschen vielleicht den Radius, bei dem es kollabiert [Gl. (4)]; dann kondensiert das schwach lösliche Gas möglicherweise.<sup>[11]</sup>

Man unterscheidet drei Phasen, wenn sich ein Gasbläschen, das Luft und ein in Wasser kaum lösliches

Gas enthält, im Blutstrom auflöst (Abbildung 2). Zunächst stellt sich das Gasbläschen auf die Bedingungen im Blutstrom ein; es schwollt schnell an oder schrumpft schnell, je nachdem ob  $O_2$ ,  $N_2$  und  $CO_2$  in das Bläschen eindringen oder so lange daraus entweichen, bis ihre Aktivitäten innerhalb und außerhalb des Bläschens gleich sind. Zu den Schlüsselparametern gehören der Anfangs-Molenbruch des als osmotisches Agens fungierenden Gases, die Oberflächenspannung des Gasbläschen, der Blutdruck und das Ausmaß des Sauerstoffmetabolismus. Der Ausdruck für das Gleichgewicht in bis zum Atmosphärendruck mit Luft gesättigtem Blut ist durch Gleichung (5) gegeben,<sup>[11]</sup> in der  $C_F$  und  $C_A$  die Konzentra-

$$(C_F + C_A)RT = p_A + p_F = 2\sigma/r + p_{\text{Blut}} + p_{\text{atm}} \quad (5)$$

tionen,  $p_A$  und  $p_F$  die Partialdrücke der Gase A (Luft) bzw. F (stabilisierendes Gas) im Gasbläschen,  $p_{\text{Blut}}$  und  $p_{\text{atm}}$  der Blut- bzw. Atmosphärendruck,  $2\sigma/r$  der Laplace-Druck,  $R$  die Gaskonstante und  $T$  die absolute Temperatur sind. Ändert sich die Gaszusammensetzung als Folge des Metabolismus nicht, hält der Partialdruck des in Wasser kaum löslichen osmotisch wirkenden Gases F das Gleichgewicht zum Laplace-Druck und zum Blutdruck, sodass sich Gleichung (5) zu Gleichung (6) vereinfacht. Im lebenden Organismus

$$p_F = 2\sigma/r + p_{\text{Blut}} \quad (6)$$

führen Stoffwechsel und Temperaturänderungen zu Verschiebungen der Partialdrücke von  $O_2$ ,  $CO_2$  und  $H_2O$  gegenüber den Sättigungswerten bei Atmosphärendruck, und der Druck des osmotisch wirkenden Gases trägt ebenfalls zu diesen Verschiebungen bei [Gl. (7) mit  $\Delta p_{O_2}$ ,  $\Delta p_{CO_2}$  und  $\Delta p_{H_2O}$  als den

$$p_F = 2\sigma/r + p_{\text{Blut}} + \Delta p_{O_2} + \Delta p_{CO_2} + \Delta p_{H_2O} \quad (7)$$

Partialüberdrücken von  $O_2$ ,  $CO_2$  bzw.  $H_2O$  im Gasbläschen bezogen auf die Sättigungswerte bei Atmosphärendruck].<sup>[13]</sup>

In der zweiten Phase diffundiert das kaum lösliche osmotisch wirkende Gas langsam aus dem Gasbläschen hinaus. Die Geschwindigkeit hierfür ist durch die geringe Löslichkeit dieses Gases im Blut begrenzt. Während der Abnahme des Gasbläschenradius steigt der Partialdruck des osmotisch wirkenden Gases und hält so dem steigenden Laplace-Druck stand.

In der letzten Phase wird der Partialdruck des osmotisch wirkenden Gases möglicherweise so hoch, dass es kondensieren kann. Dann wird das Gasbläschen zu einem winzigen, aus einer flüssigen Emulsion bestehenden Tropfen, dessen geringe Kompressibilität ihn für den Ultraschall nahezu unsichtbar werden lässt. Verringert man die Oberflächenspannung, wird auch der Laplace-Druck geringer, was die Kondensation zeitlich nach hinten verschiebt, doch wenn die Oberflächenspannung nicht auf null fällt, kann der Kollaps des Gasbläschens nur verzögert, nicht aber verhindert werden.

Die in Abbildung 2 gezeigten Simulationen belegen deutlich den Unterschied im Verhalten eines nur mit einem FKW-Gas gefüllten Gasbläschen (a) gegenüber einem Gasbläschen, das osmotisch mit eben diesem FKW-Gas

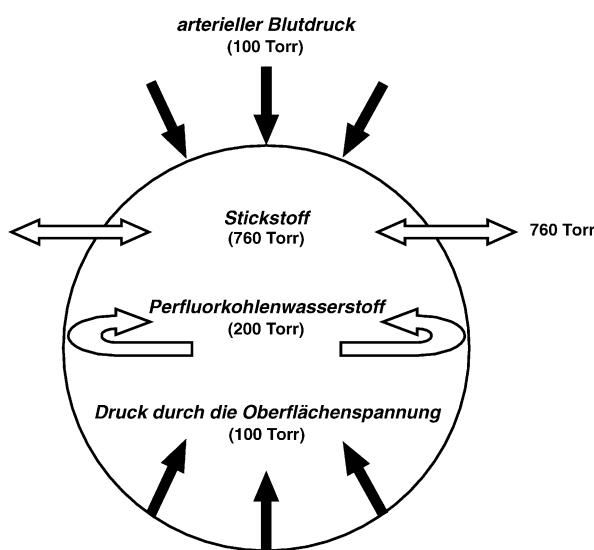
stabilisiert ist (b).<sup>[11]</sup> Im ersten Fall wächst der Durchmesser eines isolierten Gasbläschens zuerst rasch an, da die im Blut gelösten Gase bis zum Erreichen des Gleichgewichts [Gl. (5)] in das Gasbläschen drängen, und danach nimmt er langsam wieder ab (das Quadrat des Durchmessers nimmt mit der Zeit nahezu linear ab), während das FKW-Gas langsam aus dem Gasbläschen hinaus diffundiert. Im zweiten Fall hat sich das Gleichgewicht zwischen den Gasen im Gasbläschen und im Blut bereits grob eingestellt, sodass man nicht den anfänglichen Wachstumsschub sieht, sondern das Gasbläschen direkt in die langsame Schrumpfphase übergeht. Während das Gasbläschen wegen des fortschreitenden Verlusts an stabilisierendem Gas schrumpft, bleibt der Partialdruck der Luft in ihm nahezu konstant bei etwa 1 atm, der Partialdruck des osmotisch wirkenden Gases hingegen steigt steil an, da er mit dem Laplace-Druck Schritt hält, der als Folge des kleiner werdenden Radius zunimmt. Schließlich führt der Laplace-Druck dazu, dass das FKW-Gas kondensiert. Darum ist der Sättigungsdampfdruck ein wichtiger Faktor bei der Auswahl des FKW-Gases.

Ein weiterer Mechanismus läuft parallel zur Wechselwirkung des FKW-Gases im Innern des Mikrobläschens mit dem Blut ab. Wenn die Mikrobläschen durch die Lungenkapillaren wandern, kommt das FKW-Gas mit den mit Luft gefüllten Alveolen in Kontakt, was dazu führt, dass das Gas aus dem Gasbläschen entweicht, in die Alveolen eindringt und in der Folge ausgeatmet wird. Dieser Vorgang, der der normale Ausscheidungsweg für FKW-Gase ist,<sup>[14]</sup> reduziert den FKW-Gehalt in den Mikrobläschen, verringert deren Größe und führt zu einer erhöhten Oberflächenspannung und schließlich zum Kollaps der Gasbläschen. Darüber hinaus verringert er auch die Größe voluminöserer Mikrobläschen, die in der Lunge eingefangen wurden: Wenn der Durchmesser des Gasbläschens unter ca. 8  $\mu\text{m}$  fällt, wird es in den Blutkreislauf abgegeben, was einer Art langsamer Freisetzung entspricht.

## 2.6. Die Auswahl von Perfluorverbindungen zur Stabilisierung von Gasbläschen

In der osmotisch wirkenden Verbindung muss eine geringe Ostwaldsche Löslichkeitskonstante ( $< 10^{-4}$ ) mit einem relativ hohen Sättigungsdampfdruck bei Körpertemperatur ( $> 3 \times 10^4 \text{ Pa}$ ) zusammentreffen. Polare Gase, die Edelgase Ne und Ar oder gar die Kohlenwasserstoffe erfüllen diese Bedingungen nicht. Lediglich einige FKWs tun es. Wegen ihrer extrem geringen Wasserlöslichkeit bleibt ihr Dampf im Mikrobläschen, in dem er die wasserlöslichen Gase in der Weise verdünnt, dass deren Partialdruck eine Atmosphäre beträgt (der Druck, unter dem das Blut in der Lunge mit Luft gesättigt wird), wenngleich der Gesamtdruck im Gasbläschen größer ist. Dadurch stellt sich ein Gleichgewicht ein, bei dem die wasserlöslichen Gase in das Gasbläschen hinein und aus ihm heraus diffundieren, während das FKW-Gas den Kräften der Oberflächenspannung und des Blutdrucks standhält (Abbildung 3). Die effektivsten osmotischen Stabilisatoren finden sich im unteren Bereich von Tabelle 1.

Experimentelle Untersuchungen stützen die von der Theorie vorhergesagten allgemeinen Trends, den Verlauf

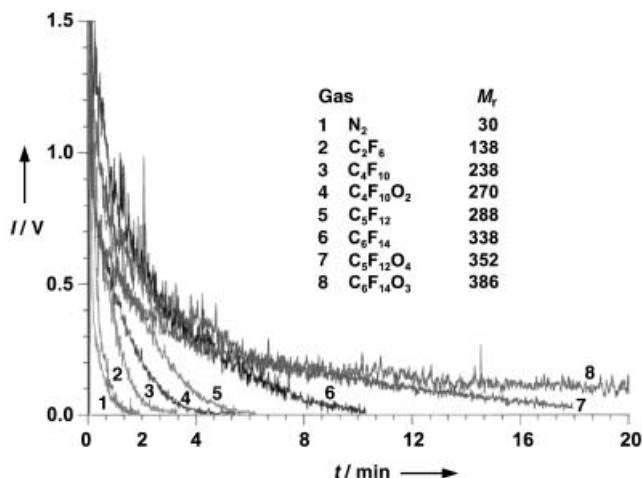


**Abbildung 3.** Das Konzept des osmotisch stabilisierten Bläschens. Es stellt sich ein osmotisches Gleichgewicht ein, wenn die wasserlöslichen Gase, deren Gesamtpartialdruck im Innern des Bläschens im Wesentlichen konstant bei 1 atm bleibt, vom Bläscheninnern nach außen und von außen nach innen diffundieren und der durch das FKW-Gas beigesteuerte Partialdruck die zusammen wirksamen Kräfte des Blutdrucks und des Laplace-Drucks ausgleicht.

der Auflösung von Gasbläschen und die starke Abhängigkeit von der Art und dem Sättigungsdampfdruck des FKW-Gases. Insbesondere wurde der Einfluss des FKW-Gases auf die Haltbarkeit von Gasbläschen ähnlicher Zusammensetzung im Blutkreislauf von Kaninchen bestätigt, ob sie nun allein mit FKW-Gas gefüllt waren oder das FKW-Gas als osmotischer Stabilisator in FKW/N<sub>2</sub>-Mischungen diente.<sup>[15]</sup> Die Haltbarkeit der Gasbläschen nahm mit dem FKW-Molekulargewicht zu (Abnahme der Ostwaldschen Löslichkeitskonstanten, Abbildung 4): von rund 2 min für C<sub>2</sub>F<sub>6</sub> auf >40 min für F-Diglyme (F- steht hier und im Folgenden für Perfluor-), C<sub>6</sub>F<sub>14</sub>O<sub>3</sub>; bei C<sub>6</sub>F<sub>14</sub>O<sub>5</sub> ging sie auf 8 min zurück, wohl weil dessen Sättigungsdampfdruck nicht mehr ausreicht, sodass es zur Kondensation und zum Kollaps der Gasbläschen kommt.

Da das Abklingen des Signals sehr stark von der Natur des Füllgases abhing und kaum von der Dosis, schloss man, dass die Haltbarkeit der Mikrobläschen in den Blutgefäßen wahrscheinlich hauptsächlich durch ihr Auflösen gesteuert wird und weniger durch ihre Eliminierung mithilfe des retikuloendothelialen Systems (des Systems, das neben anderen für die Reinigung des Blutes von Fremdkörpern verantwortlich ist).

Es stellten sich allerdings bedeutende quantitative Unterschiede zwischen der Theorie und den experimentellen Ergebnissen heraus, besonders was die absolute Zeit für die Haltbarkeit der Mikrobläschen in vivo betrifft, die etwa um den Faktor drei zu klein berechnet wurde.<sup>[15]</sup> Dies könnte teilweise eine Auswirkung der mechanischen Eigenschaften der Hülle sein, die die Gasbläschen umgeben, oder von den zahlreichen Annahmen herrühren, die die Gültigkeit der theoretischen Modelle begrenzen. Auch die theoretischen Vorhersagen über die Rückstreuung der Schallwellen waren



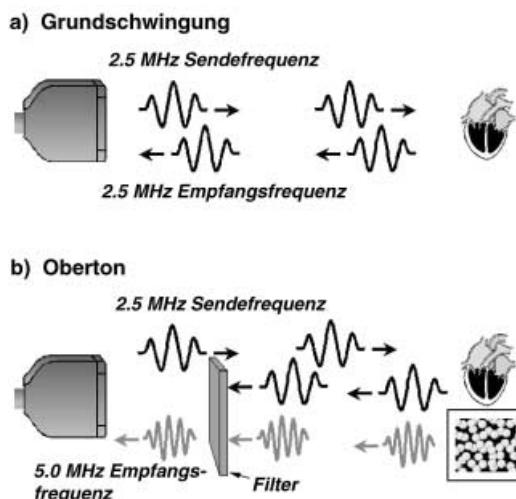
**Abbildung 4.** Abklingen des Ultraschallsignals (Doppler-Signalintensität  $I/V$  als Funktion der Zeit  $t$ ) bei Kaninchen für verschiedene osmotische Stabilisatoren. Der Molenbruch (FKW)/(FKW+N<sub>2</sub>) lag zwischen 0.1 und 0.2, die Dosierung betrug 1 mg pro kg Körpergewicht (aus Lit. [15]).

nicht ganz passend.<sup>[16]</sup> Als mögliche Erklärungen wurde vorgeschlagen, dass sich die Hülle aufgrund von Wechselwirkungen mit oberflächenaktiven Blutbestandteilen in ihrer Zusammensetzung ändert und dass sich die Oberflächenspannung der Tenside in der Hülle ändert, während die Gasbläschen unter Kompression schrumpfen.

## 2.7. Gasbläschen-spezifische Bildgebung mit harmonischen Obertönen

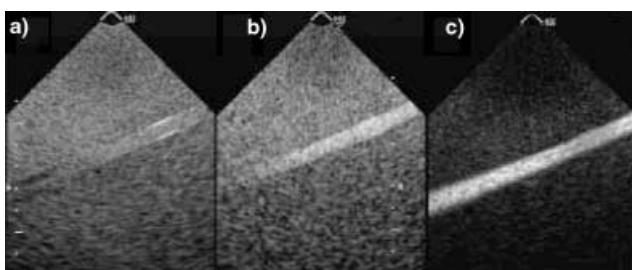
Setzt man Mikrobläschen dem Ultraschall aus, dehnen sie sich aus und ziehen sich wieder zusammen, und bei einer Frequenz, die in erster Linie von der Gasbläschengröße abhängt und die bei einer Bläschengröße von 3 µm bei etwa 3 MHz liegt, kommt es zur Resonanz. Bei einer hinreichenden Ultraschallintensität erzeugen die Gasbläschen nicht nur reflektierte Schallwellen hoher Intensität, deren Frequenz der Sendefrequenz entspricht, sondern auch ein beträchtliches Ausmaß an harmonischen Ober- und Untertönen der einfallenden Schallwellen.<sup>[17,18]</sup> Die nichtlinearen Echos entstehen aus asymmetrischen Schwingungen der Gasbläschen im Ultraschallfeld. Starre Hüllen sind a priori weniger wünschenswert, da sie die Schwingungen dämpfen, die die nichtlineare Rückstreuung erzeugen.

Die harmonischen Obertöne hat man sich zunutze gemacht, um unnötige Signale zu unterdrücken (Abbildung 5) und so den Kontrast bei der Ultraschall-Bildgebung weiter zu verbessern. Man kann hierzu Breitbandwandler herstellen, die typischerweise zwischen 1.3 und 3 MHz emittieren und bei der doppelten Frequenz empfangen, also zwischen 2.6 und 6 MHz, und dabei die Sendefrequenz aus dem empfangenen Signal herausfiltern. Da die Echos der roten Blutzellen und der Gewebe die Frequenz der emittierten Schallwellen aufweisen und diejenigen der Mikrobläschen, entsprechend dem ersten harmonischen Oberton, die doppelte Frequenz, werden auf diese Art alle reflektierten



**Abbildung 5.** Gegenüberstellung der Bildgebung mithilfe der Ultraschallgrundfrequenz (a) und harmonischer Obertöne (b). Im Fall a, dem ursprünglichen Ultraschall-Bildgebungsverfahren, sendet der Ultraschallwandler einen Puls mit einer schmalen Frequenzbandbreite z.B. um 2.5 MHz in den Körper hinein. Während der Signalaufzeichnung wird aus einem Teil des an den verschiedenen Stellen im Körper reflektierten Schalls ein Bild erzeugt (a). Da Mikrobläschen viel stärker komprimiert werden können als alle Gewebearten, reflektieren sie nicht nur den Schall besser, sondern erzeugen auch harmonische Obertöne als Bestandteil des reflektierten Schalls. Die Frequenz eines der stärksten harmonischen Obertöne ist doppelt so groß wie die Sendefrequenz; er heißt erster harmonischer Oberton. Bei den ersten Geräten zur Bildgebung mit harmonischen Obertönen nutzte man elektronische Filter, um die Gewebesignale herauszufiltern und Bilder aus dem Signal des ersten harmonischen Obertons zu erzeugen, der in den Mikrobläschen entsteht (b).

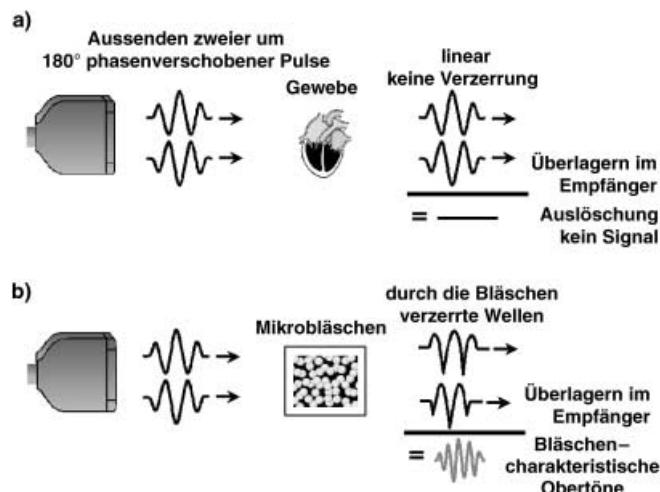
Signale, die nicht von den Mikrobläschen stammen, im Wesentlichen unterdrückt. Damit wird die Ultraschalluntersuchung mit harmonischen Obertönen eine „Mikrobläschen-spezifische“ Bildgebungsmethode, die den Kontrast zwischen Arealen mit und ohne Mikrobläschen erhöht, da Areale ohne Mikrobläschen schlechte harmonische Resonatoren sind (Abbildung 6a,b). Die Bildgebung mit harmonischen Obertönen ist darum besonders für die Darstellung des Blutes



**Abbildung 6.** Bilder eines „Phantom“-Gefäßes (Modell) in vitro, in dem sich das FKW-Kontrastmittel Optison umgeben von Material befindet, das das Gewebe nachbildet (aus Lit. [3]). a) Konventionelles Bild ohne Kontraststeigerung, b) Bild mithilfe harmonischer Obertöne, das den höheren Kontrast zwischen Kontrastmittel und Gewebe zeigt, c) Bild mithilfe harmonischer Obertöne und Pulsinversion, bei dem der Kontrast durch Unterdrückung der linearen Echos aus dem Gewebe weiter verstärkt ist.

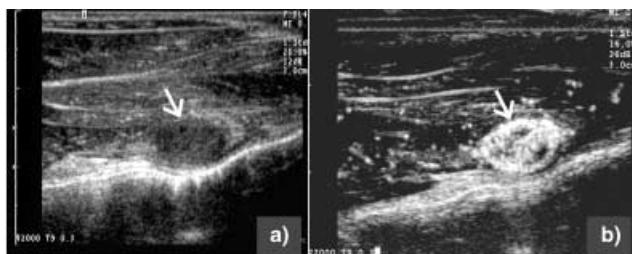
vorteilhaft, selbst wenn das Blut sehr langsam fließt oder sich in sehr kleinen Gefäßen im Gewebe befindet, in denen die Doppler-Techniken deutlich an ihre Grenzen stoßen.<sup>[19-22]</sup>

Auflösung und Empfindlichkeit der Bildgebung mit harmonischen Obertönen lassen sich weiter verbessern, wenn man Pulsinversionsmethoden einsetzt, bei denen zwei um 180° phasenverschobene Pulse kurz nacheinander ausgesendet werden (Abbildung 7). Bei der Überlagerung dieser



**Abbildung 7.** Bildgebung mit harmonischen Obertönen niedriger Energie und Phaseninversion. Für Einzelheiten siehe Text.

beiden Pulse im Empfänger erhält man von linearen Reflektoren (etwa roten Blutkörperchen) nur ein minimales Signal, da in diesem Fall beide Echos gleich intensiv, aber phasenverkehrt sind und sich folglich auslöschen. Da sich Mikrobläschen während der positiven und der negativen Druckphase der Schallwelle unterschiedlich verhalten (nichtlineare Reflektoren), löschen sich deren beide Echos nicht aus, sondern ergeben ein Bild mit scharfem Kontrast (Abbildung 6c).<sup>[3]</sup> Da man bei dieser Pulsfolge mit Breitbandpulsen arbeiten kann, erhält man Bilder, deren räumliche Auflösung höher ist als bei der Aufnahmetechnik mit dem ersten Oberton allein. Da außerdem die Mikrobläschen durch Schallwellen besonders bei hohem Druck und im Resonanzfall zerstört werden,<sup>[23]</sup> besteht die Möglichkeit, dass der erste Puls das Mikrobläschen zerstört und der zweite, invertierte Puls daher überhaupt nicht abgeschwächt wird und ein noch stärkeres Signal resultiert.<sup>[24]</sup> Auch wenn sich das Mikrobläschen bewegt, z.B. in einer Arterie, löschen sich die beiden Echos nicht aus, da das Mikrobläschen zwischen der Bildung des ersten und zweiten Echos seine Position verändert hat und damit die Auslösung reduziert ist.<sup>[24]</sup> Diese Pulsinversionsmethode, auch Phaseninversionsmethode genannt, ist eine sehr leistungsfähige Methode, mit der man Bilder mit scharfem Kontrast und hoher Auflösung erhält und die bei der Darstellung von Blutgefäßen besonders effektiv ist.<sup>[25,26]</sup> Die Empfindlichkeit ist hierbei so hoch, dass man einzelne Mikrobläschen darstellen kann.<sup>[8b]</sup> Dieses Hochkontrast-Bildgebungsverfahren ist inzwischen zur Standardmethode bei der Ultraschall-Bildgebung geworden. Abbildung 8 ist ein illustratives Beispiel für seinen Einsatz.



**Abbildung 8.** Bilder eines  $6 \times 10$  mm großen Vx2-Tumors (Pfeil), der in den Oberschenkel eines Kaninchens eingepflanzt wurde, a) vor und b) nach der intravenösen Gabe von  $0.3\text{ mL}$  Imagent, aufgenommen mit der Phaseninversionstechnik bei  $7\text{ MHz}$ . Da Tumore stärker durchblutet sind als Muskeln und darum mehr Mikrobläschen enthalten und da mit der Phaseninversionstechnik die Gewebesignale unterdrückt werden, nicht jedoch die Signale der Mikrobläschen, ist der Tumor viel heller und dadurch deutlicher zu sehen als das Muskelgewebe.

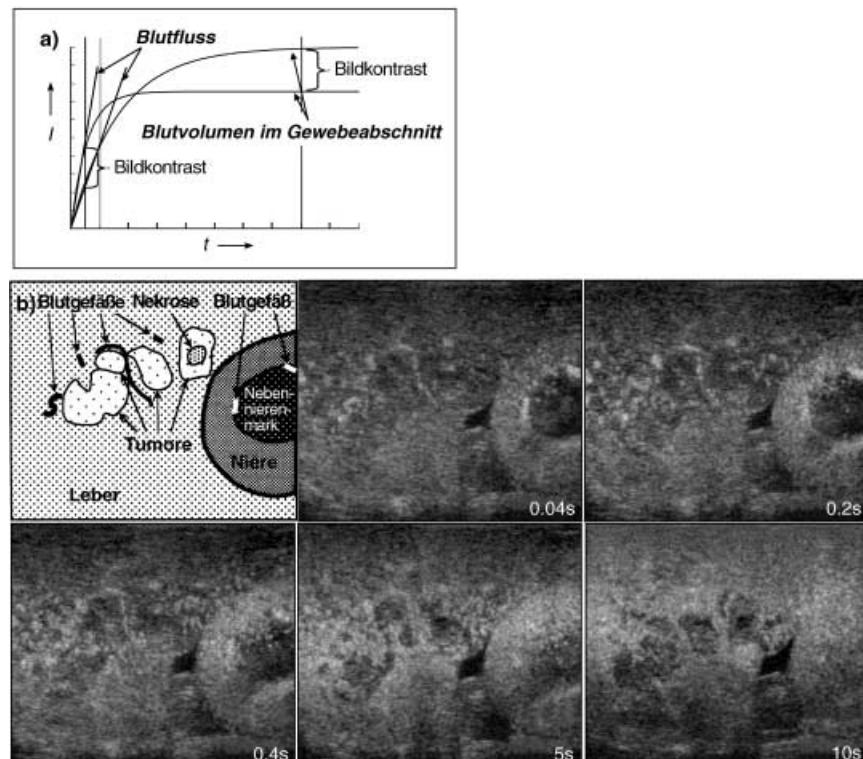
Weitere Verbesserungen bei der Bildgebung resultieren aus der Entwicklung neuer Pulsfolgen und neuer Methoden zur Signalverarbeitung, die speziell für die Kontrastsonographie entworfen sind, mit anderen Worten aus der Anpassung der Messgeräte an die Kontrastmittel.

## 2.8. Quantifizierung des Blutstroms

Die Mikrobläschen haben als Kontrastmittel zwei einzigartige Eigenschaften, die all die Kontrastmittel nicht aufweisen, die man bei der Bildgebung mithilfe von Röntgen-Strahlen und der magnetischen Kernresonanz einsetzt. Zum einen ist ihr Durchmesser größer als  $1\text{ }\mu\text{m}$ , sodass sie sich nur im Gefäßsystem verteilen und darum echte Blutkontrastmittel sind. Die von ihnen erhaltenen Signale stammen folglich nur aus dem Gefäßsystem. Zum anderen können die Gasbläschen durch die Ultraschallwelle zerstört werden, was „Ausbleich“messungen ermöglicht, bei denen die Gasbläschen im zu untersuchenden Bereich zerstört (ausgebleicht) werden und anschließend ihr Wiederauflaufen dort verfolgt wird.<sup>[17,27,28]</sup> Eine kontrollierte Zerstörung erreicht man mit einer periodischen Abfolge von Ultraschallpulsen hoher Energie, die das Gewebe frei von Mikrobläschen machen. Die Bildgebung mit periodischer Abfolge der Messsignale oder mit niedrigerenergetischen Schallwellen nach dem Puls zur Zerstörung der Mikrobläschen ist ein einzigartiges Werkzeug für kinetische Messungen, mit denen man

den Blutfluss im Gewebe und das Blutvolumen in solchen Ausschnitten abschätzen kann.<sup>[28–30]</sup> Des Weiteren gibt es Arbeiten zu den möglichen Folgen, die das durch Ultraschall ausgelöste Zerstören von Mikrobläschen in Gewebe hat.<sup>[31]</sup>

Ausbleichmessungen lassen sich auf zwei Arten durchführen. Bei der einen bedient man sich einer periodischen Abfolge von Messsignalen, wobei die Mikrobläschen im Gewebe bei der Aufnahme eines jeden Abtastbildes zerstört werden. Ist das Gewebe auf diese Weise von Mikrobläschen frei geworden, steigt danach die Helligkeit des Gewebes exponentiell mit einer Zeitkonstante an, die umgekehrt proportional zum Blutfluss ist, und erreicht ein Plateau, dessen Höhe proportional zum Blutvolumen in diesem Gewebeabschnitt ist (Abbildung 9a). Der Bildkontrast zwischen zwei Gewebebereichen ändert sich als Funktion des Zeitintervalls zwischen zwei aufeinanderfolgenden Kontrast-



**Abbildung 9.** Die Auswirkung periodischer Bildgebung auf die Helligkeit des Gewebes und den Bildkontrast (aus Lit. [80]). a) Aus der Theorie erhaltene graphische Darstellung der Gewebehelligkeit als Funktion der Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Einzelbildern, wobei nach jedem Bild alle Mikrobläschen zerstört werden, für zwei Gewebearten, die unterschiedlich schnell und unterschiedlich stark durchblutet werden. b) Die Auswirkung der periodischen Bildgebung auf die Darstellung eines Vx2-Tumor in einer Kaninchenleber während der Infusion von Imagent. Die Skizze beschreibt die bei allen Aufnahmen dargestellte Anatomie; die Abstände zwischen zwei Bildern einer Bildfolge betragen  $0.04, 0.2, 0.4, 5$  und  $10\text{ s}$ . Vor der Leber als Hintergrund zeigen die Bilder eine Niere und die in die Leber eingepflanzten kleinen Tumorknoten. Mit dem Anwachsen des Zeitabstands zwischen zwei Bildern bis auf  $10\text{ s}$  verbessert sich die Darstellung der kleinen Tumorknoten und der Tumorränder; einen kleinen Nekrosebereich im Innern eines dieser Tumorknoten sieht man nur beim  $10\text{-s}$ -Zeitabstand. Das deutet darauf hin, dass die Tumore nahezu gleich schnell durchblutet werden wie die Leber, aber weniger stark als diese. Blutgefäße dagegen sieht man am besten bei einem  $0.04\text{-s}$ -Zeitabstand, da sie am schnellsten durchblutet werden und daher in dieser sehr kurzen Zeitspanne mit Mikrobläschen erneut gefüllt werden können. Bei längeren Zeitintervallen kann man die Blutgefäße nicht mehr erkennen. Man beachte auch, dass die Gewebe bei längeren Zeitintervallen heller erscheinen, da immer mehr Mikrobläschen in ihre Mikrozirkulation eindringen.

bildern. Bei kleinen Zeitintervallen (< 1 s) spiegelt die unterschiedliche Signalstärke der Gewebe bzw. der Bildkontrast wider, wie unterschiedlich schnell die Gewebebereiche durchblutet werden, da sich in schneller durchbluteten Bereichen mehr Mikrobläschen ansammeln als in weniger schnell durchbluteten. Nimmt man dagegen Kontrastbilder mit einer periodischen Abfolge von Messsignalen mit einem großen Zeitintervall (> 5 s) auf, dann gibt die unterschiedliche Signalstärke der Gewebe bzw. der Bildkontrast wieder, wie stark die verschiedenen Bereiche durchblutet werden (Blutvolumen), da die Mikrobläschen in diesem Fall genug Zeit haben, den ganzen Gefäßraum auszufüllen, sodass die Helligkeit eines Gewebebereichs der Menge des in ihm vorhandenen Blutes entspricht (Abbildung 9b).

Bei der zweiten Art von Ausbleichmessungen zerstört man zuerst mit sehr leistungsstarken Pulsen (innerhalb des für die Diagnose zulässigen Energiebereichs) die Mikrobläschen im Gewebe und beobachtet dann in Echtzeit bei niedriger Leistung des Messsignals und möglichst geringer Zerstörung der Mikrobläschen, wie sich das Gewebe wieder mit Mikrobläschen füllt, als ob eine neue Bolusinjektion von Kontrastmittel verabreicht worden wäre. Dies ermöglicht den Nachweis zeitabhängiger Unterschiede in der Durchblutung verschiedener Gewebebereiche. Natürlich kann man diese Untersuchung mit einer einzigen Injektion mehrmals durchführen, solange sich noch eine genügende Anzahl Mikrobläschen in der Blutzirkulation befindet.

### 3. Pharmazeutische Produkte

Die Entwicklung injizierbarer Kontrastmittel geschieht nach den Regeln und Vorgaben, wie sie für alle Arzneimittel gelten. Sauberkeit und Reinheit beim gesamten Herstellungsverfahren (good manufacturing practice, GMP), Qualitätskontrolle und Qualitätssicherung sind erforderlich und reglementiert. Die Zulassung durch Gesundheitsbehörden erfordert den Nachweis der Unbedenklichkeit und der Wirksamkeit. Für eine breite Akzeptanz müssen der klinische Wert und der ökonomische Nutzen deutlich werden. Bei der Entwicklung von Arzneimitteln mit einem großen Markt herrscht ein starker Wettbewerb, der dazu führt, dass spezifische Daten zu den chemischen Grundlagen und der Herstellung bestimmter pharmazeutischer Produkte nur beschränkt zugänglich sind.

#### 3.1. Die ersten Kontrastmittel

Pionierarbeiten zu Ultraschallkontrastmitteln leisteten Gramiak und Shah, nachdem sie beobachtet hatten, dass starke, aber kurzlebige Echos in der Aorta und dem Herzen entstanden, wenn sie mit Luft aufgewirbelte Salzlösungen, die freie Luftbläschen enthielten, in einen in die Aorta gelegten Katheter injizierten.<sup>[32]</sup> Daraufhin wurden nacheinander mit Kohlensäure versetztes Wasser, Natriumcitrat-, Dextrose- und Renografinlösungen (eine Lösung eines Salzes der 3,5-Diacetamino-2,4,6-triiodbenzoësäure, die man als Röntgenkontrastmittel verwendet) untersucht.<sup>[8a]</sup> Die gebildeten

Gasbläschen waren jedoch zu groß und zu instabil. Zur Darstellung der Leber versuchte man, Luftbläschen durch mikrometergroße Festkörperteilchen zu stabilisieren, beispielsweise indem man feste Iodipamidethylether-Teilchen mit eingeschlossener Luft verwendete.<sup>[33]</sup> Die feste Matrix lieferte die für langlebige Echos erforderliche Stabilität, doch die Fähigkeit zur Erzeugung eines Echos war geringer als bei „freien“ Gasbläschen.

Danach wurden verkapselte Gasbläschen vorgeschlagen. Beispielsweise wurden mit Stickstoff gefüllte, 7–8 µm große DPPC-„Liposomen“ (DPPC = Dipalmitoylphosphatidylcholin) hergestellt, doch die Halbwertszeit im Blutkreislauf lag lediglich in der Größenordnung von einer Minute.<sup>[34]</sup> Des Weiteren wurden Mikrokapseln mit einer harten Hülle (Gelatine, Alginat) untersucht, doch sie waren für einen intravenösen Einsatz zu groß. Auch wurden mithilfe der Emulsionspolymerisation Mikroballone aus biologisch abbaubarem Poly[(*tert*-butyloxycarbonylmethyl)glutamat] mit einem Durchmesser von etwa 3 µm hergestellt.<sup>[35]</sup> Dabei erwartete man, dass die polymere Hülle den Widerstand des Gasbläschen gegenüber Druck erhöhte. Der Einsatz von dicken Hüllen, die für Gase weniger durchlässig sind, ist eine alternative Art der Stabilisierung von Mikrobläschen (oder in diesem Fall besser Mikrokapseln). Bei solchen Gasbläschen ist jedoch die Intensität gestreuter Ultraschallwellen oft beträchtlich reduziert.

Flüssige Partikel wurden ebenfalls getestet, darunter submikrometergroße Emulsionen von *F*-Octylbromid.<sup>[36]</sup> Flüssige FKWs sind tatsächlich kompressibler, und die Schallgeschwindigkeit in ihnen ist geringer als in Wasser. Die Emulsionspartikel überlebten *in vivo* lange und ermöglichen zunächst die Darstellung des Blutpools und später auch der Leber und Milz. Die für eine effektive Darstellung notwendige FKW-Dosis war jedoch um drei Größenordnungen höher als bei auf FKWs beruhenden Gasbläschen.

Die ersten kommerziellen Produkte, die in den frühen 1990er Jahren in Europa und den USA auf den Markt gebracht wurden, waren Echovist (Schering AG, Berlin) bzw. Albunex (Molecular Biosystems Inc., San Diego). Echovist besteht aus mikrokristallinen Galactosepartikeln, die als Templat dienen und Stellen aufweisen, an denen sich Luftbläschen bilden und einnisten, wenn man die Partikel in Wasser suspendiert.<sup>[37]</sup> Albunex wiederum enthält Mikroluftbläschen im Innern von Hüllen aus hitzedenaturiertem Humanalbumin.<sup>[38]</sup> Diese Partikel waren allerdings nicht stabil genug, um das Kapillarbett der Lunge zu passieren und in die linke Herzhälfte zu gelangen, wenn man sie intravenös injizierte. Ihre Halbwertszeit *in vivo* liegt im Sekundenbereich, sodass sie nur begrenzt einsetzbar sind. Schering entwickelte in der Folge Levovist, das ebenfalls aus mikrokristallinen Galactosepartikeln besteht, doch nun mit Palmitinsäure als Zusatz. Wenn man diese Partikel in Wasser auflöst und heftig durchwirbelt, bilden sich die Mikrobläschen mit einer Schicht des Zusatzes überzogen, was ihnen eine höhere Stabilität verleiht.<sup>[39,40]</sup>

### 3.2. Kontrastmittel auf der Basis von Perfluorverbindungen – die entscheidenden Komponenten

FKWs sind die idealen wenig löslichen Gase, die man zur Stabilisierung von Luftbläschen im Blutkreislauf benötigt. Sie sind äußerst stabil, biologisch inert und können in sehr hoher Reinheit hergestellt werden. Injiziert man sie in die Blutbahn, werden sie unverändert mit der ausgeatmeten Luft ausgeschieden (d.h., sie werden nicht metabolisiert). Die Halbwertszeit für die über die Lunge abgeatmeten *F*-Alkane, die man als Ultraschallkontrastmittel einsetzt, liegt in der Größenordnung von Minuten. Es gibt ausführliche Daten zur Toxizität, Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von FKWs in Reinform und als Emulsionen, die man bei den intensiven Forschungs- und Entwicklungsbemühungen im Zusammenhang mit dem Einsatz von FKWs in Blutersatzstoffen,<sup>[14,41]</sup> bei der Belüftung von Flüssigkeiten und bei der kontrollierten Freisetzung von Arzneistoffen<sup>[7,42,43]</sup> erhielt.

Die zur Zeit gebräuchlichen Ultraschallkontrastmittel und auch die in der Entwicklung befindlichen Produkte enthalten einen FKW, entweder als einzige Substanz oder als eine der Komponenten der Gasphase. Zu den Materialien, aus denen die Oberfläche der Gasbläschen besteht, gehören denaturiertes (hitzopolymerisiertes) Humanalbumin, biologisch abbaubare synthetische Polymere und Phospholipidmembranen. Im letzten Fall existiert vom Standpunkt der Kolloidchemie eine eindeutige Analogie zwischen einer wässrigen Suspension aus Mikrobläschen und injizierbaren Lipid- oder FKW-Emulsionen, Liposomen und einzelnen lebenden Zellen. Die eingesetzten Phospholipide bestehen typischerweise aus synthetischen, zwitterionischen Phosphatidylcholinen und Ethanolaminen, Diglyceriden und deprotonierten Fettsäuren und Phosphatidsäuren, obwohl der Einsatz negativ geladener Komponenten möglicherweise nicht wünschenswert ist.<sup>[44]</sup> Weitere Bestandteile, die in pharmazeutischen Formulierungen üblich sind, können Polyethylenglycol oder Poloxamere, Hydroxyethylstärke, Puffer und Salze sein.

Obwohl die injizierbaren Gasblasensuspensionen, die man zur Diagnose einsetzt, typischerweise mehrere Hundert Millionen Gasbläschen pro mL enthalten, beträgt die Gesamtmenge der fein verteilten, intravenös injizierten Gase, die man zur Untersuchung einer Person mit 70 kg Körpergewicht benötigt, weniger als 250 µL und der FKW-Anteil daran braucht nur ein Fünftel zu sein. Die maximale FKW-Konzentration im Blut liegt dann bei etwa 10 ng pro mL Blut, und der Großteil des FKW-Anteils wird innerhalb von Minuten ausgeatmet.

### 3.3. Ein FKW-Kontrastmittel in einer Hülle, die sich von Albumin ableitet

Die Firma Molecular Biosystems verbesserte die intravaskuläre Stabilität von Albunex, dem Produkt der ersten Generation, indem sie Luft durch *F*-Propan ersetzte. Optison, so der Name des neuen Produkts, ist eine gebrauchsfertige Suspension von Mikrokapseln aus hitzedenaturiertem Humanalbumin, die mit *F*-Propan gefüllt sind.<sup>[30,45–47]</sup> Das Mittel, das

kühl gelagert werden muss, wurde 1998 im Markt eingeführt und wird zurzeit von Amersham Health Corp. (Großbritannien) in Europa und den USA vertrieben. Zahlreiche experimentelle Untersuchungen und klinische Studien belegen seine Wirksamkeit.<sup>[30,45–48]</sup>

### 3.4. Ein Perfluorkohlenwasserstoff, der durch den Phasenwechsel flüssig/gasförmig zum Kontrastmittel wird

EchoGen (Sonus Pharmaceuticals Inc., USA) besteht aus einer Emulsion von flüssigem *F*-Pantan in Wasser. Dieser FKW geht bei Körpertemperatur in die Gasform über (Sdp.: 29°C), es sei denn, es besteht eine Barriere für die Keimbildung. Zur Stabilisierung der Emulsion ist ein fluoriertes Tensid nötig. Nach der Injektion sollten sich die Emulsionströpfchen mit einem Durchmesser von etwa 0.3 µm zusammenlagern und in Gasbläschen von etwa 2–5 µm Größe umwandeln.<sup>[49]</sup> Erste Tests deuteten auf eine längere Wirksamkeit hin und auf die Fähigkeit, bessere Bilder in der Kardiologie und Radiologie zu liefern.<sup>[50,51]</sup> Das Produkt wurde bis zur klinischen Phase III getestet, doch letztlich zog es die Firma von der Beurteilung durch die Gesundheitsbehörde der USA (United States Food and Drug Administration, FDA) zurück.

Zu den möglichen Schwierigkeiten bei solch einem Ansatz mit Phasenwechsel zählt die vorausgesagte Instabilität der Emulsion mit dem flüchtigen *F*-Pantan, da die Geschwindigkeit, mit der Partikel aufgrund der Ostwald-Reifung wachsen, mit abnehmendem Molekulargewicht und steigender Wasserlöslichkeit steil zunimmt. Bei den klinischen Studien wurde ein Aktivierungsschritt vor der Injektion eingeführt, um die Unsicherheiten zu verringern, die mit einer Keimbildungsbarriere für den Phasenwechsel verbunden sind; dazu wurde an die Spritze, in der sich das Produkt befand, ein Vakuum angelegt, um die Emulsion vor der Injektion zu „köchen“.<sup>[49b]</sup> Dies wurde als unpraktisch empfunden. Und schließlich dürfte es unter diesen Umständen schwierig sein, die Größe und das Wachstum der Partikel zu steuern (siehe Abschnitt 2.5).

### 3.5. Mikrobläschen mit einer Lipidhülle und einer gasförmigen Perfluorverbindung

Definity ist ein Kontrastmittel aus Mikrobläschen, das ursprünglich von ImaRx (USA) und in der Folge von DuPont Pharmaceuticals (USA) entwickelt wurde und in Glasfläschchen geliefert wird, die zunächst die als Vorstufen dienenden Bestandteile und nach der „Aktivierung“ eine Suspension mit *F*-Propan gefüllter Lipid-Mikrotügelchen enthalten. Die Lipide sind eine Mischung aus DPPC, einem Methyl(polyethylenglycol)dipalmitoylphosphatidylethanolamin (MPEG5000 DPPE) und der negativ geladenen Dipalmitoylphosphatidsäure (DPPA) als Nebenbestandteil. Diese Bestandteile werden unter *F*-Propan kühl gelagert. Hieraus bereitet der Pharmazeut oder derjenige, der die Ultraschalluntersuchung ausführt, das eigentliche injizierbare Kontrastmittel, indem er das Gläschen in einem kalibrierten mecha-

nischen Rüttler schüttelt, wobei eine Suspension von FKW-Bläschen von 1.1–3.3 µm Größe mit Lipidhülle entsteht. Definity wurde von der FDA im August 2001 zugelassen und von Bristol-Myers-Squibb (USA) in den Vertrieb gebracht. Die Wirksamkeit dieses Kontrastmittels ist unter anderem in Lit. [52,53] beschrieben.

Bei SonoVue, einem Kontrastmittel, das von Bracco International (Italien) entwickelt wurde, bedient man sich des Schwefelhexafluorids, SF<sub>6</sub>, als Perfluorverbindung. Man erhält das Kontrastmittel als lyophilisiertes Phospholipid/Polyethylenglycol/Palmitinsäure-Pulver unter SF<sub>6</sub> aufbewahrt, wobei das Pulver wahrscheinlich aus lyophilisierten Liposomen besteht. Bei Raumtemperatur kann man es zwei Jahre lagern. Gibt man eine Salzlösung hinzu, erhält man eine Suspension von Mikrobläschen mit einem mittleren Durchmesser von etwa 2.5 µm, die durch eine Lipidmonoschicht stabilisiert sind.<sup>[54]</sup> Wie bei den FKWs wird auch bei SF<sub>6</sub> der Großteil innerhalb von ungefähr 10 min unverändert abgetmet. SonoVue ist in Europa zugelassen und wird derzeit von der FDA geprüft. Ausgewählte Veröffentlichungen über SonoVue finden sich in Lit. [55–57].

### 3.6. Mit Perfluorkohlenwasserstoff osmotisch stabilisierte Mikrobläschen

Das Konzept von Imagent (früher unter dem Namen Imavist bekannt; Alliance Pharmaceutical Corp., USA) beruht auf der osmotischen Stabilisierung. Die optimale Bläschengröße in vivo lässt sich dadurch einstellen, dass man Stickstoff mit gerade der Menge *F*-Hexan mischt, die nötig ist, um die Bläschen osmotisch bei etwa 3 µm zu stabilisieren. Dieser Betrag ist etwa fünfmal kleiner, als wenn man nur den FKW einsetzen würde. Imagent wird in Form sprühgetrockneter, mikrometergroßer, hohler, poröser Kugelchen angeboten (Abbildung 10a), die als Einzeldosen unter der Mischung aus Stickstoff und *F*-Hexan in Fläschchen abgefüllt sind, sodass ihr Transport und eine längere Lagerung bei Raumtemperatur möglich sind. Die Formulierung des Kontrastmittels enthält außerdem Hydroxyethylstärke (als ein wasserlösliches Strukturagens, das als Gussform oder Templat

für die gewünschten Bläschen dient), Dimyristoylphosphatidylcholin (aus dem sich die Hülle bildet), ein Poloxamer (als Befeuchter), einen Phosphatpuffer und Natriumchlorid, die für korrekten pH-Wert und korrekte Osmolalität sorgen. Diese Substanzen bilden bei der Sprühgetrocknung eine kugelförmige Hülle, die sich bei der Zugabe von steriles Wasser auflöst und eine aus einer Monoschicht bestehende Phospholipidmembran zurücklässt, in der die Gase eingeschlossen sind; so entsteht eine isotone, auf einen bestimmten pH-Wert eingestellte, sofort einsatzbereite Dispersion von Mikrobläschen (Abbildung 10b).

Die Teilchengröße der sich bildenden Mikrobläschen ist durch die Größe der sprühgetrockneten Mikrokugelchen festgelegt und bleibt *in vivo* aufgrund der osmotischen Stabilisierung konstant, da die *F*-Hexan-Menge so berechnet wurde, dass sichergestellt ist, dass die Bläschen *in vivo* nicht wachsen. Imagent wurde im Frühjahr 2002 in den USA zugelassen. Beschreibungen der Wirksamkeit dieses Kontrastmittels finden sich in Lit. [21,22,58,59].

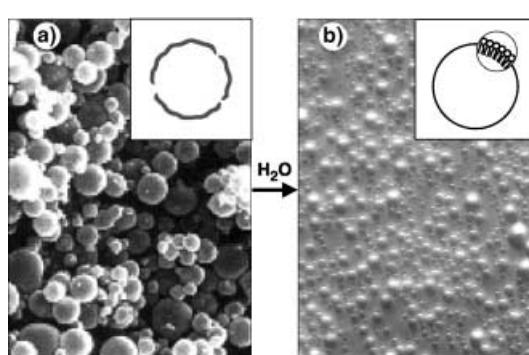
### 3.7. Weitere Kontrastmittel, zu denen noch geforscht wird

Sonazoid (Amersham Health) ist ein weiteres Kontrastmittel mit einer Lipidhülle, bei dem *F*-Butan als FKW-Gas eingesetzt wird;<sup>[60,61]</sup> doch scheint seine weitere Entwicklung eingestellt zu sein. AI-700 (Acusphere, USA) besteht aus FKW-haltigen Gasbläschen mit einer biologisch abbaubaren Hülle aus einem synthetischen Polymer.<sup>[62]</sup>

Weitere interessante Präparate sind Mikrobläschen, die bei der Beschallung von Dextrosealbumin unter *F*-Butan entstehen (PESDA),<sup>[28,63–65]</sup> BR14,<sup>[66]</sup> ein Kontrastmittel aus Mikrobläschen mit einer Lipidhülle und *F*-Butan als FKW-Gas, das eine längere Zirkulationszeit als das mit SF<sub>6</sub> gefüllte Analogon aufweist, und MP1950 (Mallinckrodt, USA), mit *F*-Butan gefüllte Mikrobläschen in einer Hülle aus Phospholipiden.<sup>[67]</sup>

## 4. Bildgebung in der Physiologie und Pathologie

Zwar begann man mit der Forschung zu Ultraschallkontrastmitteln in den 1960er Jahren<sup>[68]</sup> und gelangte zur klinischen Anwendung in den späten 1980er<sup>[69]</sup> und den 1990er Jahren,<sup>[38,70]</sup> doch großes Interesse fand dieses Thema erst vor kurzem. Drei entscheidende Fortschritte in den letzten Jahren führten zu einer erweiterten klinischen Anwendung: 1) Der Einsatz von FKW-Gas zur Stabilisierung von Mikrobläschen erweiterte deren *In-vivo*-Lebensdauer von Sekunden auf Minuten und ermöglichte damit ihren praktischen Einsatz; 2) die vollständig digitalisierten Ultraschallgeräte und die Anwendung von Breitbandwandlern vereinfachten die Implementierung neuartiger Pulsfolgen und die Signalverarbeitung; 3) das bessere Verständnis der Wechselwirkung zwischen Mikrobläschen und Schallwellen, das zur Einführung der Bildgebung mit harmonischen Obertönen führte, und das Nutzen der Tatsache, dass man Mikrobläschen durch Ultraschall zerstören kann, machte die Unterdrückung des Gewebesignals in Echtzeit möglich, ohne das Signal der



**Abbildung 10.** Sprühgetrocknete, hohle, perforierte Mikrokugelchen (a, Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie), die sich bei Kontakt mit Wasser in Mikrobläschen mit Lipidhülle verwandeln (b, optische Mikroskopie). Das Füllgas ist dann in den Bläschen eingeschlossen. Mit freundlicher Genehmigung von Alliance Pharmaceutical Corp.

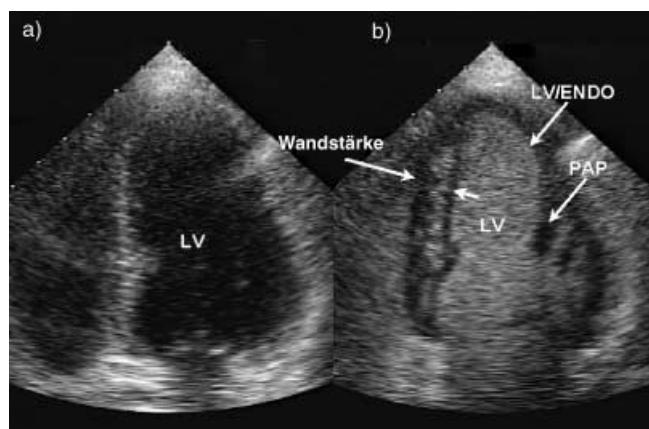
Bläschen zu beeinflussen, wodurch sich der Bildkontrast drastisch erhöhte. Die Puls- oder Phaseninversionstechnik ist inzwischen die Standardtechnik bei der Bildgebung mit Kontrastmitteln, die von allen Geräteherstellern angeboten wird. Diese Technik reagiert äußerst empfindlich auf Mikrobläschen, die sich im Untersuchungsareal befinden, und ermöglicht sogar die Beobachtung einzelner Mikrobläschen.<sup>[8b]</sup>

Die derzeit existierenden Ultraschallkontrastmittel auf der Basis von FKW-gefüllten Mikrobläschen wurden in erster Linie mit dem Ziel entwickelt, dass sich ihr Aufenthaltsort auf das Gefäßsystem beschränkt, um so den Blutpool abzubilden. Diese Eigenschaft ist ideal für die Kontrast-Echokardiographie und für die Darstellung der Blutgefäße, insbesondere im Fall einer Kombination mit Gasbläschen-spezifischen Bildgebungsverfahren. Da sich die Mikrobläschen ausschließlich im Gefäßsystem bewegen und durch Ultraschall kontrolliert zerstört werden können, sind sie ideal zur Untersuchung von kompakten Organen wie der Leber oder den Nieren.

Die Anwendungsmöglichkeiten für Ultraschallkontrastmittel bei der Darstellung des Herzens, der Blutgefäße und von kompakten Organen werden im Folgenden beleuchtet, ausführliche Diskussionen finden sich in Lit. [1–5]. Da die Darstellung des Herzens in den USA und bis zu einem gewissen Grad auch in Europa typischerweise in den Händen von Kardiologen liegt und andere Anwendungen vorwiegend in denen von Radiologen, entstand eine willkürliche Einteilung der Anwendungen in „kardiologische“ und „radiologische“, je nachdem welcher Facharzt die Untersuchung durchführt. Hier handelt es sich eher um eine scheinbare als eine tatsächliche Unterscheidung, da die Mikrobläschen zunächst alle vier Herzkammern und das Gefäßsystem ausfüllen und danach in die Mikrozirkulation aller Gewebe eindringen, was die Darstellung des Herzens, der Blutgefäße und der Gewebe, darunter des Herzmuskel, der Leber, der Milz und der Nieren, ermöglicht.

## 4.1. Darstellung der Herzkammern

Die Echokardiographie dient häufig zur Beurteilung ischämischer Herzerkrankungen, der Haupttodesursache in der westlichen Welt. Ungefähr 20 % der Untersuchungen, besonders bei den älteren und fettleibigen Patienten, bei denen die Krankheit stärker verbreitet ist, zeigen nicht alle Schlüsselbereiche des linken Ventrikels, um die drei koronaren Durchblutungswege auf eine Insuffizienz hin zu beurteilen. Setzt man ein Kontrastmittel ein, das die Herzkammer mit einem Signalgeber füllt, wird der Hohlraum des linken Ventrikels hervorgehoben, was beim Erkennen der inneren Begrenzung der linken Ventrikelwand hilft, um so deren Bewegung während der systolischen Kontraktion zu beurteilen. Die Darstellung der endokardialen Begrenzung des linken Ventrikels ist die erste und einzige Indikation, für die in den USA die gegenwärtig zur Verfügung stehenden Techniken zugelassen sind, die den Verfahren ohne Kontrastmittel überlegen sind. Eine effektive Darstellung der Ventrikelbegrenzung (Abbildung 11) hilft bei der Beurteilung der gesamten Herzfunktion, weil man dabei die Pumpleistung



**Abbildung 11.** Die Darstellung des linken Ventrikelhohlraums als dunkler Bereich (aus Lit. [101]). a) Linker Ventrikel (LV) eines Patienten ohne Zugabe eines Kontrastmittels, b) derselbe Blick nach einer Bolus-injektion von Imagent. In (b) sind der linke Ventrikel, die endokardiale Begrenzung (LV/ENDO) und der Papillarmuskel (PAP) deutlich zu erkennen. Auf diese Art kann die Verdickung des Herzmuskels studiert werden. Ein normal funktionierender Herzmuskel verdickt sich bei der Kontraktion, während sich ein anomalfunktionierender weniger bewegt und nicht verdickt.

dieses Teils (der Anteil an Blut, der während eines Herzschlags aus dem linken Ventrikel ausgestoßen wird) und die Wandbewegungen der Durchblutungswege der Koronararterien bestimmen und so eine Herzinsuffizienz aufspüren kann.

Die kontrastverstärkte Darstellung des Herzens unter Belastung ist noch weit aussagekräftiger als die im Ruhezustand.<sup>[2]</sup> Da in den Herzkreislauf eine Blutreserve eingebaut ist, kann sich das Herz bei Ruhe auf einen geringeren koronaren Blutfluss einstellen. Bei pharmakologisch oder durch körperliche Betätigung ausgelöster erhöhter Anstrengung (Stress) manifestiert sich der Verlust an koronarer Blutreserve als Folge einer Verengung der betreffenden Arterie als eine lokale anomale Wandbewegung. Sind die Koronararterien erheblich krankhaft verändert, dann liegt natürlich schon im Ruhezustand eine anomale Wandbewegung vor.

Mit Kontrastmitteln auf der Basis von FKWs erzielte man eine drastische Verbesserung der Bildqualität, was zu einer höheren diagnostischen Genauigkeit, zu weniger nachgeschalteten Untersuchungen und zu einer möglichen Verbesserung der Ergebnis-Qualität („patient outcome“) führt.<sup>[2]</sup> Diese Kontrastmittel erwiesen sich als sehr nützlich bei Patienten, bei denen eine Untersuchung mit Bildgebungsverfahren sonst schwierig ist.<sup>[47]</sup> Die nun mögliche direkte Darstellung der Herzkammern zur Beurteilung der Funktion einzelner Bereiche und des gesamten linken Ventrikels macht die kontrastspezifische Ultraschall-Bildgebung zu einem einfachen Mittel, um das Ergebnis chirurgischer oder medikamentöser Eingriffe zu verfolgen.

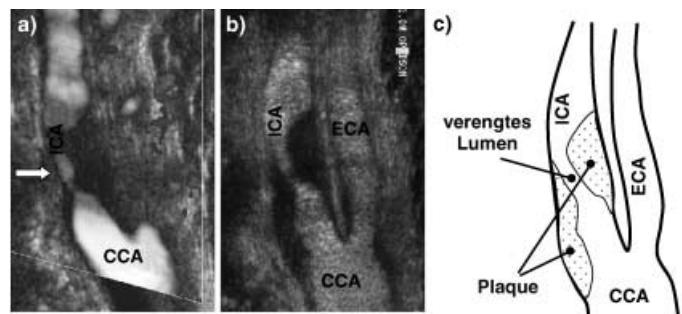
## 4.2. Darstellung der Blutgefäße

Die Darstellung von Blutgefäßen dient zur Überprüfung folgender Punkte: ob der Versorgung dienende Gefäße

verstopft sind, ob Anomalitäten in Arterienwänden, etwa atherosklerotische Plaques (Herde), vorliegen und wenn sie vorliegen, ob und wie sie den Blutfluss beeinflussen, ob die Fließrichtung im Herzkreislauf und das Geschwindigkeitsprofil normal sind. Ein weiteres Ziel ist eine dem Röntgenangiogramm (der Darstellung der Blutgefäße) ähnliche Darstellung der Gefäßverzweigungen im Innern von Organen. Die Standard-Doppler-Methode liefert zwar Daten über die Fließgeschwindigkeit, sie kann aber strukturelle Veränderungen in Gefäßen nicht zuverlässig aufzeigen. Füllt man jedoch das Gefäß mit einem signalgebenden Kontrastmittel, dann lässt sich eine krankhafte Veränderung durch Röntgenangiographie, kontrastverstärkte Computer- oder NMR-Tomographie eindeutig nachweisen.

Die Verwendung eines Kontrastmittels bei der Ultraschalluntersuchung von Blutgefäßen ist zudem wichtig, weil man einen akuten Thrombus kaum erkennen kann, da sein Erscheinungsbild dem des Blutes ähnelt und das Blutgefäß normal erscheinen lässt, obwohl es tatsächlich völlig verstopft sein mag. Um diesem Nachteil beizukommen und ein mögliches Blutgerinsel zu lokalisieren, drückt man die Vene ab; der bei diesem Abdrücken zu erwartende Effekt bleibt aus, wenn sich in der Vene ein Blutgerinsel befindet. Dieser Ansatz ließ die Ultraschalluntersuchung zum Bildgebungsverfahren der Wahl für die Beurteilung von Arm- und Beinvenen werden, doch versagt die Technik für Venen im Becken- und Bauchbereich, bei denen ein Abdrücken unmöglich ist. Füllt man die Vene jedoch mit einem Ultraschallkontrastmittel, lassen sich Blutgerinsel und sogar die feinen, gewundenen Kanäle eindeutig abbilden, die entstehen, wenn sich ein Blutgerinsel zu lösen und mit dem Blutstrom weiterzubewegen beginnt.<sup>[71]</sup> Man kann diese Kanäle erkennen, weil der Ultraschall einzelne Mikrobläschen auf ihrem Weg durch das Blutgerinsel sichtbar macht. Daher ist mit dieser Technik eine umfassende und zuverlässige Beurteilung der Venen im Bauch- und Beckenbereich sowie in der oberen Thoraxapertur möglich.

Bei der Darstellung der Halsschlagadern bis zu der Stelle, an der sie in den Schädel eintreten, versagen Standard-Ultraschalluntersuchungen ohne Kontrastmittel, wenn es darum geht, nichtverkalkte atherosklerotische Plaques eindeutig wiederzugeben oder die Ulkusbildung von Plaques aufzuzeigen. Bringt man aber in die Arterie ein Ultraschallkontrastmittel auf der Basis von FKWs ein, erhält man ein genaues Bild der Innenwand, das die Plaques detailliert zeigt (Abbildung 12).<sup>[59,72a]</sup> Ja selbst eine Ulkusbildung von Plaques lässt sich so beobachten. Sie zu erkennen ist wichtig, weil sich Blutgerinsel aus Blutplättchen und Fibrin, die sich im Krater des Ulkus bilden, mit dem Blutstrom lösen und zu einem Arterienverschluss führen können und so Ursache einer vorübergehenden oder dauernden Ischämie und eines Schlaganfalls werden können. Bei der direkten Bestimmung des relativen Ausmaßes der Verengung des Halsschlagaderdurchmessers außerhalb des Schädels von Patienten erwies sich die kontrastverstärkte Ultraschalluntersuchung als ebenso genau wie die übliche Röntgenangiographie.<sup>[72a]</sup> Darüber hinaus kann die kontrastverstärkte Ultraschallmessung, da sie sowohl Innen- wie Außenfläche der Arterienwand darstellt und eine Querschnittstechnik ist, das prozentuale Ausmaß



**Abbildung 12.** Der Bereich der Gabelung der Halsschlagader (Arteria carotis), aufgenommen mit dem Doppler-Verfahren bei hoher Leistung a) vor der Verabreichung des Kontrastmittels, b) mit der Phaseninversionstechnik bei 7 MHz nach einer intravenösen Bolusinjektion von 1.0 mL Optison. c) Skizze zu der in (b) abgebildeten Anatomie. Zwar legt schon das Bild a eine Verengung der Arteria carotis interna (ICA) (Pfeil) aufgrund von Plaque-Bildung nahe, doch zeigt erst das nach der Kontrastmittelgabe erhaltenen Graustufen-Bild die anatomischen Verhältnisse im Detail (vgl. auch (c)). CCA und ECA stehen für Arteria carotis communis bzw. Arteria carotis externa. Man erkennt die genaue Form des verengten Lumens sowie die Dicke und den inneren Aufbau der Plaques an den Arterienwänden. So wird die Schwere der Stenose (Gefäßverengung) deutlich.

der auf die Fläche bezogenen Verengung genau bestimmen, was mehr über die Beeinträchtigung des Blutflusses aussagt.

Die Darstellung der Blutzirkulation im Schädelinnern ist eine schwierige Aufgabe, da die starke Schallabschwächung im Schädel die Beurteilung einer Arterienerkrankung beeinträchtigt. Der Einsatz eines Ultraschallkontrastmittels zur Verstärkung des Doppler-Signals aus der Blutzirkulation im Schädelinnern erlaubt nun nicht nur eine bessere Datensammlung, sondern auch eine Grobdarstellung der wichtigsten Arterien. Damit wird eine solche Untersuchung deutlich verkürzt.<sup>[72b]</sup>

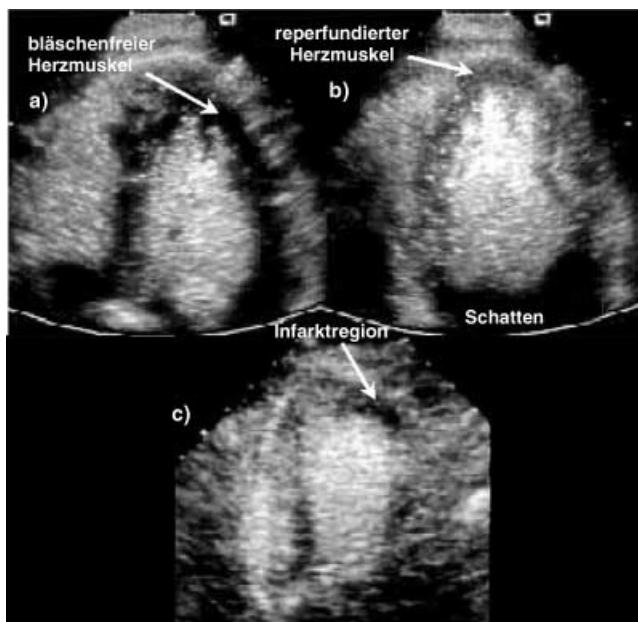
#### 4.3. Darstellung der Gewebedurchblutung

Die Fähigkeit, durchblutetes Gewebe und das Muster der Durchblutung zu erkennen, ist entscheidend, um krankes Gewebe aufzuspüren. Die herkömmliche Ultraschalluntersuchung vermag zwar den Aufbau der Gewebe des Herzmuskelns und kompakter Organe darzustellen, sie ist jedoch zu unempfindlich für Gewebeveränderungen, wie sie durch eine Ischämie, z.B. eine Koronarinsuffizienz, verursacht werden, und sie hilft nicht einmal, Gewebeveränderungen zu entdecken, die sich während der ersten Phase eines vollständigen Gefäßverschlusses und eines Gewebeinfarkts bilden.<sup>[21b]</sup>

Der Einsatz von Ultraschallkontrastmitteln, die in alle Blutgefäße im Gewebe gelangen, ermöglicht eine eindeutige Identifizierung von nichtdurchbluteten Bereichen,<sup>[21a]</sup> und damit wird es möglich, einen Gefäßverschluss unmittelbar nach seinem Eintritt festzustellen. Da das Durchblutungsmuster während des Einströmens der Mikrobläschen in das Organ in Echtzeit beobachtet werden kann, sind auch anomale Durchblutungsmuster zu erkennen, wie sie in Tumoren auftreten.<sup>[21a]</sup> Mit den in Abschnitt 2.8 beschriebenen Ausbleichmessungen, bei denen man die Mikrobläs-

chen durch Ultraschall zerstört und beobachtet, wie schnell sie ein Areal im Vergleich zu einem anderen wieder füllen, lässt sich eine Blutgefässinsuffizienz nachweisen.<sup>[29,73]</sup>

Die Beurteilung der Durchblutung des Herzmuskel ist der Schlüssel zur Diagnose von Erkrankungen der Koronararterien und eines akuten Herzinfarkts (Abbildung 13): zur



**Abbildung 13.** Durchblutung des Herzmuskel. a) Ultraschallbild des linken Ventrikels eines normalen, gesunden Herzens, direkt nachdem mit einem energiereichen Ultraschallpuls die Imagent-Mikrobläschen im Herzmuskel zerstört wurden, was dazu führt, dass der Herzmuskel dunkel erscheint, während der Ventrikohrraum hell bleibt. b) Aufhellung des Herzmuskel, weil frisches Blut, das den Muskel durchblutet, neues Kontrastmittel in das Messfeld bringt. Der Schatten im unteren Bildteil beruht darauf, dass die Konzentration der Mikrobläschen so hoch ist, dass der Ultraschall nicht so tief eindringen kann. c) Bild, in dem die Infarktregion eines Patienten (Infarktsache war ein blockiertes Blutgefäß) als dunkler Bereich erkennbar ist (vgl. mit dem gesunden Herzmuskel in (b)). Mit freundlicher Genehmigung von Alliance Pharmaceutical Corp.

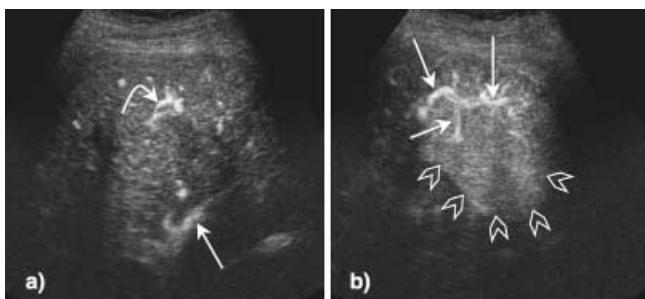
Bestimmung des Bereichs, der durch Nekrose gefährdet ist, zur Messung, wie schnell ein Gewebe durchblutet wird, und zur Beurteilung, ja sogar zur Bestimmung des Grades einer Gefäßverengung und der Erfolgsaussichten einer Behandlung zur Auflösung des Thrombus.<sup>[19,45,50,55,74]</sup>

Eine kontrastspezifische Darstellung des Herzmuskel mithilfe von Ultraschall liefert möglicherweise Ergebnisse, die denen äquivalent sind, die man mit Radiopharmaka im Ruhezustand und unter Belastung des Patienten erhält. Und man gewinnt darüber hinaus direkte Daten über die Funktion und die Durchblutung des Herzens in Echtzeit.<sup>[47]</sup> Der Vorteil beim Einsatz von Ultraschallkontrastmitteln besteht nicht nur in den geringeren Kosten des Kontrastmittels, sondern auch darin, dass man kein radioaktives Material handhaben und entsorgen muss, dass ein Umweltgift entfällt und ebenso die Aufnahme der vom Strahler ausgesandten Strahlung und dass die Zeit, in der der Patient beansprucht wird, kürzer ist. Diese Vorteile führen zu erheblichen Kosteneinsparungen.

Zurzeit wird auch untersucht, wie man die Durchblutung des Gehirns darstellen kann.<sup>[72c,d]</sup>

Mit Ultraschall lassen sich Tumore in Organen entdecken, da Tumore das Erscheinungsbild einer normalen Gewebestruktur verändern. Allerdings bleibt das Auffinden von Tumoren schwierig, besonders wenn sie klein sind (<2 cm), und die Unterscheidung, ob eine Schädigung gutartig oder bösartig ist, ist sogar noch schwieriger. Bei Ultraschalluntersuchungen der Leber, die unter den kompakten Organen am häufigsten von einem Tumor befallen wird, liegt die Wahrscheinlichkeit, dass man den Tumor entdeckt, zwischen 40 und 70% – je nach Geschick dessen, der die Untersuchung ausführt.

Durch die kontrastspezifische Ultraschall-Bildgebung kann man, wenn man das Muster in Echtzeit beobachtet, das sich ergibt, wenn die Mikrobläschen in das Gefäßsystem und die Verästelungen der Arterien eines Organs eindringen, nicht nur anomale Bereiche des Gewebes entdecken, sondern auch die Krankheit besser charakterisieren, d. h. entscheiden, ob es sich um eine Infektion, einen Infarkt, ein Trauma, einen Krebs oder etwas anderes handelt (Abbildung 14).<sup>[75]</sup> So ist die Versorgung von bösartigem Gewebe über Gefäße anders als die von normalem Gewebe; man findet gewöhnlich gewundene und ungeordnete Verästelungen, am Rand des Tumors eine höhere Dichte der Mikrogefäß sowie eine erhöhte Durchblutung der Peripherie und eine langsamere und geringere oder vollständig fehlende Durchblutung des Tumorinneren.<sup>[75]</sup> Die Kontrast-Echosonographie ermöglicht eine Quantifizierung der Mikrozirkulation im Tumor und eine Beurteilung der Gefäßbildung, die sich aus dem Tumorgewachstum ergibt.<sup>[76]</sup>



**Abbildung 14.** Zwei ausgewählte Bilder aus einer während einer Injektion von Optison bei einem Patienten mit einem Lebertumor in Echtzeit aufgenommenen Bilderserie. a) Beim ersten Eintreffen von Kontrastmittel wird die den Tumor versorgende Arterie (Pfeil) hervorgehoben, und man sieht sofort eine zentrale Tumorarterie (gebogener Pfeil) in einem Bereich, der ohne Kontrastmittel wie normales Lebergewebe erscheint. b) Einige Augenblicke später kann man das Gefäßbett im Innern des Tumors in Form von Blutgefäßen sehen, die den Tumor vom Zentrum nach außen hin versorgen (Pfeile). Gleichzeitig mit dem Füllen dieser Tumorgefäße mit Kontrastmittel hebt sich das Tumorgewebe deutlich besser von der Leber (dunkler Hintergrund) ab, sodass der Rand des Tumors klar dargestellt wird (Pfeilspitzen). Das Signalmuster dieses Schadens mit einer wohlgeordneten Arterie im Zentrum, die dann in ein Muster in der Art eines Speichenrads übergeht, und die vollständige und homogene Verstärkung des Tumors sind charakteristisch für einen gutartigen Lebertumor, eine fokale noduläre Hyperplasie. Die Gefäße im Tumorinnern sichtbar zu machen gelingt nur mit der Ultraschall-Bildgebung mithilfe von Kontrastmitteln.

Eine deutliche Verbesserung wurde bei der Erkennung von Erkrankungen in Kaninchenmodellen<sup>[77]</sup> und bei der Entdeckung und Charakterisierung von Krankheiten beim Menschen erzielt.<sup>[58,75]</sup> Eine klinische Untersuchung des Prostata-Gefäßsystems deutet darauf hin, dass ein Kontrastmittel die Wahrscheinlichkeit erhöhen könnte, einen Prostatakrebs zu entdecken, da der Kontrast von bösartigem Prostatagewebe selektiv verstärkt wird.<sup>[58]</sup> Auch der Blutstrom und eine Ischämie in der Nierenrinde konnten beurteilt werden.<sup>[78]</sup> Im Fall eines Niereninfarkts konnte man mit der Kontrast-Echosonographie den vom Infarkt betroffenen Bereich abbilden, der ohne Kontrastmittel nicht sichtbar war; die Darstellung mithilfe harmonischer Obertöne erwies sich als noch besser, was den Bildkontrast und die Dauer der Untersuchung betrifft, und lieferte außergewöhnliche Details.<sup>[21a]</sup>

Mikrobläschen sind möglicherweise auch wertvolle Kontrastmittel zur Darstellung der Leber, für den Fall, dass die Bläschen vom retikuloendothelialen System (RES) bereits aufgenommen sind oder sich im komplexen Gefäßbett der Leber befinden.<sup>[79]</sup> Leberschäden, auch Karzinome und Metastasen, lassen sich in Gegenwart von Mikrobläschen deutlich besser sichtbar machen, sodass auch kleinere Metastasen nachgewiesen werden konnten.<sup>[79,80]</sup>

#### 4.4. Molekül-Imaging und therapeutische Mikrobläschen

Die Kontrast-Ultrasonographie setzt man zur Führung der Biopsienadel ein, zur Positionierung von Elektroden, über die man mit einer Radiofrequenz Metastasen in der Leber thermisch entfernt, zur Beurteilung, wie weit ein Gewebe zerstört ist, und zur Entdeckung lebensfähiger Tumorreste über die Bewertung von Durchblutungsmessungen. Kontrastverstärkte Ultraschallbilder, die man zu verschiedenen Zeitpunkten aufnimmt, können sich als nützlich erweisen bei der Überprüfung eines therapeutischen Fortschritts und somit Wirksamkeitsnachweise für die Zulassung eines Medikaments liefern. So kann die Herzfunktion vor, während und nach einer bestimmten Behandlung überprüft werden. Ebenso lässt sich feststellen, ob ein Gefäßtransplantat funktionsfähig ist.

Es lassen sich gewebespezifische Kontrastmittel entwickeln, die vom RES, von den Lymphknoten oder von anderen Gewebearten aufgenommen werden. Der Einbau von Phosphatidylserin in die Mikrobläschen-Lipiddüre beginnstigt die Aufnahme der Bläschen durch Leukozyten in Entzündungs herden und ermöglicht so die Darstellung einer Entzündung mithilfe von Ultraschall.<sup>[84]</sup> Mikrobläschen, die mit einem zielspezifischen Element ausgestattet sind, kann man einsetzen, um nach diesem Ziel zu suchen und es zu markieren, damit es für die Ultraschall-Bildgebung sichtbar wird. Ein derartiger Nachweis der spezifischen molekularen Signatur eines bestimmten pathologischen Zustands wird Molekül-Imaging genannt.<sup>[82]</sup> Die Zielspezifität lässt sich durch Anheften (kovalent, durch lipophobe Wechselwirkung oder durch Avidin-Biotin-Kupplung) geeigneter Liganden, darunter auch Antikörper, erreichen. Da sich Mikrobläschen normalerweise nur im Gefäßsystem aufhalten, ist ihr Einsatz allerdings weitgehend auf Krankheiten beschränkt, die sich

durch spezifische Antigene im Gefäßlumen zu erkennen geben. Zu den Geweben, auf die man bevorzugt abzielt, gehören Thromben (Blutgerinsel), atheromatöse Plaques, Entzündungsherde und Tumore. So wurden Thrombus-spezifische F-Butan-Mikrobläschen (Aerosome MRX-408, ImaRx) hergestellt, indem man in ihre Oberfläche einen Liganden einbaute, der als Ziel den auf aktivierten Blutplättchen nachgewiesenen GPIIb/IIIa-Rezeptor ansteuert.<sup>[83]</sup> Die Anbindung von Anti-P-Selektin-Antikörpern über einen Avidin-Biotin-Komplex bewirkte bei Tieren die selektive Anhäufung der Mikrobläschen in Entzündungsherden und in Stellen, die als Folge einer Reperfusion (Wiederdurchblutung) nach einer Ischämie geschädigt waren.<sup>[85]</sup> Ein Ansteuern spezifischer Rezeptoren auf der Oberfläche des Endothels hilft möglicherweise, die Gefäßbildung in Tumoren zu verfolgen.<sup>[86]</sup>

Mikrobläschen, die dem Ultraschall ausgesetzt werden, können auch zu therapeutischen Werkzeugen werden. So konnte man in Kaninchen einen Thrombus in einer Arterie in vivo ohne ein thrombenlösendes Medikament einfach durch Einsatz von Mikrobläschen und externer Anwendung von Ultraschallenergie auflösen.<sup>[65,81]</sup> Das Auflösen von Blutgerinseln ließ sich durch eine kombinierte Behandlung mit Mikrobläschen, Urokinase und Ultraschall weiter verbessern. Von einer aus ziemlich großen Teilchen (ca. 1.5 µm) bestehenden Emulsion aus F-Pantan und Rinderalbumin, die sich bei dem mit der Aktivierung verbundenen Phasenwechsel bei Ultrabeschallung in große Blasen (ca. 75–150 µm) umwandelt, wird angenommen, dass sie Blutgefäße in Krebsgeweben verschließen (und damit die Blutzufuhr zum Tumor blockieren) könnten.<sup>[87]</sup>

Sonoporation ist ein Verfahren, um mithilfe von Ultraschall vorübergehende, nichttödliche Perforationen in Zellmembranen und Kapillaren (Erhöhung der Kapillarpermeabilität) zu erzeugen und so den Eintritt aktiver Substanzen wie großer Moleküle, Gene und Partikel in die Zelle zu erleichtern. Dieser Prozess lässt sich möglicherweise durch das Verabreichen von Mikrobläschen unterstützen.<sup>[88,89]</sup> Die zur Bildung der Poren benötigte Schallenergie scheint beträchtlich kleiner zu sein, wenn Mikrobläschen vorliegen.<sup>[88]</sup> Das Einbringen kolloidalen Teilchen und roter Blutzellen durch das Endothel hindurch in Gewebe ließ sich dadurch erreichen, dass man in den Wänden von Mikrogefäß Risse erzeugte, indem man mit hoher Ultraschallenergie gezielt Mikrobläschen zerstörte.<sup>[88]</sup>

Wie andere fluorierte Kolloide<sup>[6,7c,43,82c,90]</sup> können auch Mikrobläschen mit Therapeutika beladen werden. Taxol beispielsweise, ein lipophiles Chemotherapeutikum, zeigte eine geringere Toxizität, wenn es in F-Butan-Mikrobläschen mit einer Lipiddüre eingebettet war.<sup>[91]</sup> Allerdings ist der „Laderraum“ in der Membran der Bläschen gewöhnlich recht klein, was bedeutet, dass man für dieses Verfahren nur sehr wirksame Medikamente in Betracht ziehen kann. Man kann zwar dickere Hüllen einsetzen, doch geht dies zu Lasten der Ultraschall-Streueffizienz. Einige Teilchenarten, die mit denen nahe verwandt sind, die man als Hüllen in Ultraschallkontrastmittel verwendet, werden zurzeit im Hinblick auf die Freisetzung von Antibiotika, Medikamenten gegen Asthma und Immunglobulinen in der Lunge untersucht.<sup>[92–94]</sup>

Stabilisierte Mikrobläschen können vielleicht auch zum Transport von Sauerstoff und anderen Gasen zu Geweben eingesetzt werden.<sup>[95, 96]</sup> Mikrobläschen, die je nach Umgebung leicht anschwellen und schrumpfen können, sollten für diese Anwendung besonders geeignet sein.

Die Möglichkeit, Bläschen, die auf ein bestimmtes Gewebe abzielen, dort dann durch Ultraschall aufzureißen, bietet weitere Perspektiven. Mit einem Medikament oder mit Genen beladene zielerichtete Mikrobläschen könnten durch den Ultraschall zum Kollabieren gebracht werden und ihren aktiven Inhalt in spezifische Zellen entladen. Auf diese Art könnte normales Gewebe vor toxischen Medikamenten geschützt werden. *F*-Propan-Mikrokügelchen, an deren Oberfläche ein rekombinanter Genvektor des Adenovirus angeheftet war, wurden in die Halsvene (*Vena jugularis*) von Ratten infundiert und danach durch Beschallung aufgerissen.<sup>[97]</sup> Die Expression des Transgens im Herzmuskel des Tieres war gegenüber der in Kontrolltieren um das Zehnfache erhöht. Mikrobläschenhüllen, die positiv geladene Lipide enthalten, wären zur Aufnahme von Plasmid-DNA prädestiniert.<sup>[98]</sup> Zielerichtete Liganden könnten dann die Anbindung von Mikrobläschen-DNA-Komplexen an spezifische Zellen fördern. Bei Ultrabeschallung schließlich würde die DNA für eine Transfektion in das umgebende Gewebe geschleudert. Nach intravenöser Gabe von Dextrosealbumin-Mikrobläschen, die mit einem Oligonucleotid markiert waren und in Gegenwart eines FKW beschallt wurden, bewirkte eine diagnostische Ultraschalluntersuchung der beschallten Niere eine erhöhte Ablagerung von synthetischen Antisense-Oligonucleotiden.<sup>[63]</sup>

## 4.5. Nebenwirkungen

Seit in den späten 1990er Jahren Optison als erstes Kontrastmittel auf der Basis von FKW-Mikrobläschen zugelassen wurde und danach einige weitere Mittel auf FKW-Basis ihre Zulassung erhielten, wurden in klinischen Untersuchungen mehrere Millionen Injektionen verabreicht. Bis jetzt wurde von keinem Todesfall berichtet, der auf eines dieser Mittel zurückzuführen gewesen wäre, noch traten irgendwelche klinisch bedeutenden Nebenwirkungen auf. Der einzige reproduzierbare klinische Effekt, den man beobachtet hat, sind vorzeitige Ventrikelkontraktionen, wenn sich das Ultraschallkontrastmittel im Blutkreislauf befindet und die Darstellung des Herzens mit hoher Ultraschallenergie erfolgt.<sup>[99]</sup> Dieses nicht eindeutig verstandene Phänomen ist klinisch gesehen wahrscheinlich irrelevant angesichts der Tatsache, dass nach Millionen verabreichten Dosen keine negativen Spätfolgen aufgetreten sind.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Für Ultraschalluntersuchungen, das am häufigsten angewendete diagnostische Bildgebungsverfahren, gab es bis vor kurzem keine effektiven kontrastverstärkenden Mittel. Mikrometergroße Gasbläschen reflektieren Ultraschall a priori auf ideale Weise. Injiziert man allerdings Luftbläs-

chen in den Blutkreislauf, lösen sie sich aufgrund des Zusammenspiels von Laplace-Druck, Blutdruck, Sauerstoffmetabolismus und Ultraschallenergie innerhalb von Sekunden auf und kollabieren. Da Perfluorverbindungen nur äußerst wenig wasserlöslich sind, waren sie entscheidend dafür, dass gashaltige Mikrobläschen mit einer dünnen Hülle die Stabilität erhielten, die notwendig ist, damit sie sich im ganzen Gefäßsystem verteilen können und *in vivo* für die Zeit der Ultraschalluntersuchung stabil bleiben. Bisher wurden mehrere Konzepte mit durch Perfluorverbindungen stabilisierten Mikrobläschen entwickelt. Zu deren entscheidenden Merkmalen zählen die geringe Wasserlöslichkeit und der hohe Dampfdruck der Perfluorverbindung, eine Möglichkeit zur angemessenen Steuerung der Größe und des Wachstums der Bläschen und möglichst eine stark deformierbare elastische Hülle. Zu den aus Mikrobläschen bestehenden Kontrastmitteln, die inzwischen in der Medizin eingesetzt werden, zählen *F*-Propan in einer Albuminhülle, *F*-Propan oder Schwefelhexafluorid in einer Lipidmonoschichthülle und Stickstoff mit *F*-Hexan als osmotisch wirkendem Agens in einer Lipidmonoschichthülle.

Dass Mikrobläschen als nichtlineare Resonatoren für Ultraschallwellen fungieren und damit harmonische Ober töne aussenden können, führte zur Entwicklung kontrastspezifischer Bildgebungsmethoden. Die Wechselwirkung des Schalls mit den Mikrobläschen und die Möglichkeit, aus der gesamten Antwort das Signal der Mikrobläschen herauszu filtern, sind einzigartige Merkmale der Ultraschall-Bildgebung, weshalb dieses Verfahren als eine völlig neuartige Bildgebungsmethode betrachtet werden kann. Parallel dazu wurden für die Ultraschalluntersuchung mit Kontrastmitteln gezielt neue Hardware- und Softwaresysteme entwickelt, um damit Bilder nach dem neuesten Stand der Technik zu erhalten.

Mikrobläschen können dabei helfen, die Herzkammern ebenso wie den Blutstrom in den Blutgefäßen und die Durchblutung der Organe abzubilden. Damit wird eine Charakterisierung von strukturellen und funktionellen kardiovaskulären Anomalitäten, Organschäden und Tumoren möglich. Die Kontrast-Echokardiographie liefert ein eindeutiges Bild der Herzinnenwand sowie eine bessere Beschreibung der Wandbewegung und -verdickung in Ruhe und unter Belastung. Eine genauere Wiedergabe der endokardialen Begrenzung ermöglicht eine bessere Beurteilung der Struktur und Funktion des Herzens und erhöht damit die Genauigkeit und Zuverlässigkeit von Diagnose und Prognose. Außerdem hilft sie, die zugrunde liegende Pathophysiologie des Herzens früher zu erkennen und zu behandeln.

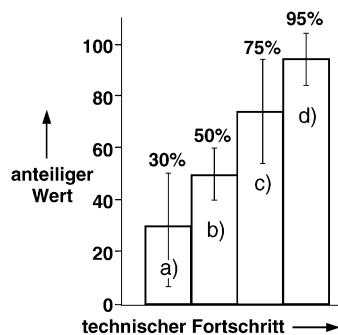
Bei der Beurteilung der Durchblutung des Herzmuskels und der Koronarinsuffizienz wird die Genauigkeit verbessert, und das klinische Potenzial zur Darstellung kompakter Organe wird derzeit abgeklärt und scheint äußerst vielversprechend zu sein.

Weitere Ziele der Kontrastsonographie scheinen nun in Reichweite zu liegen. Dazu gehört, dass einfachere und effektivere Methoden zur Darstellung von Blutgefäßen verfügbar werden, die in einem breiten Anwendungsbereich zu einer genaueren Diagnose führen sollten, etwa bei der Erkennung von Plaques oder Bluterinseln in den Hals-

schlagadern oder in den Bauch- und Beckenvenen, bei der Beurteilung des Blutflusses in der Mikrozirkulation, d.h. der Durchblutung von Geweben, bei der Quantifizierung einer lokalen Ischämie oder eines Infarkts, bei der Erkennung und Charakterisierung von Krebs und bei der Beurteilung, in welcher Phase sich ein Tumor in Organen wie der Leber, der Brust und der Prostata befindet. Das gezielte Ansteuern bestimmter Gewebe ermutigt möglicherweise zur Entwicklung anwendungsspezifischer Bläschen.

Mit dem Aufkommen effektiver Ultraschallkontrastmittel erhält man bei Ultraschalluntersuchungen Bilder besserer Qualität, was die Durchführung und Zuverlässigkeit der Diagnostik verbessert und die Zeit für die Untersuchung reduziert, weshalb dieser Methode eine entscheidende Rolle bei der klinischen Entscheidungsfindung zukommen sollte.

Bedeutsam ist, dass die Kontrastsonographie, indem sie eine genaue und zuverlässige Diagnose im frühen Stadium einer Krankheit liefert und damit zu einer effizienteren Behandlung des Patienten führt, helfen könnte, den Einsatz nachfolgender Untersuchungsmethoden zu verringern. Eine Reduzierung der Gesamtkosten der Gesundheitsuntersuchungen rechtfertigt darum eine schrittweise Analyse der Kosten (Abbildung 15).<sup>[47,100]</sup> Die höhere Genauigkeit und



**Abbildung 15.** Abschätzung des zusätzlichen diagnostischen Wertes einer Ultraschalluntersuchung, bei der Kontrastmittel und Echokardiographie mit harmonischen Obertönen verwendet werden (aus Lit. [100]): a) Bildgebung mit der Ultraschallgrundfrequenz, b) Bildgebung mit harmonischen Obertönen, c) Kontrast-Echokardiographie des Herzmuskel, d) Kontrast-Echokardiographie des Herzmuskel plus Bildgebung mit harmonischen Obertönen.

Zuverlässigkeit der Diagnose, die aus der Kombination von FKW-Ultraschallkontrastmitteln mit Verbesserungen der Geräte-Software resultiert, wird zusammen mit den niedrigen Kosten und der leichten Transportierbarkeit der Geräte für dieses Bildgebungsverfahren im Vergleich zu den meisten anderen modernen Diagnoseverfahren das Spektrum der Anwendungsmöglichkeiten der Ultraschall-Bildgebung sicherlich auch künftig erweitern. Insbesondere dürfte die Kontrast-Echosonographie beträchtliche Kosteneinsparungen gegenüber der NMR- und der Computertomographie bringen. Bei ähnlicher Genauigkeit der Diagnose werden die steigenden Kosten im Medizinbereich dazu zwingen, auf das kostengünstigste Verfahren zu setzen. Da die Kontrast-Echosonographie eine ähnliche oder sogar bessere Genauigkeit der Diagnose und Prognose bei geringeren Kosten liefert,

wird sie vermutlich bei der Untersuchung von Patienten eine zentrale Stelle einnehmen.<sup>[11]</sup>

Weitere medizinische Fortschritte bei den Mikrobläschen sind in folgenden Bereichen zu erwarten: beim Aufspüren spezifischer Gewebearten, bei der Freisetzung von Medikamenten, Genen und Gasen (auch von Sauerstoff), wozu auch die vorübergehende Erhöhung der Kapillarpermeabilität gehört, sowie beim gezielten Transport verschiedener Stoffe und bei deren durch Ultraschall ausgelösten Freisetzung. Das Ansteuern bestimmter Zellen könnte gelingen, indem man Liganden, die auf Rezeptoren an deren Oberfläche zielen, an die Mikrobläschen anbindet, was das Molekül-Imaging von Entzündungen, von Schäden als Folge einer Ischämie/Reperfusions, von atheromatösen Plaques oder von Stellen, an denen sich neue Blutgefäße bilden, also Stellen eines aktiven Tumorwachstums, möglich machen sollte.

Ein Medikament lässt sich in die Hülle des Bläschen einbauen oder an die Oberfläche der Hülle anbinden. Die Zirkulation der Bläschen und damit des Medikaments kann dann über Ultraschall-Bildgebung verfolgt werden. Erreichen die Mikrokügelchen das vorgesehene Ziel, kann man durch Ultraschall ihre Zerstörung auslösen, sodass der Wirkstoff gezielt an diesem Ort freigesetzt wird. Die Kombination zielgerichteter Bläschen mit ihrer durch Ultraschall ausgelösten Zerstörung im anvisierten Gewebe könnte dazu verhelfen, das normale Gewebe in der Umgebung vor toxisch wirkenden Medikamenten zu schützen. Möglicherweise ließe sich Ultraschall auch einsetzen, um Prodrugs zu aktivieren. Die Konzepte und Techniken, die man für die Herstellung von Kontrastmitteln entwickelt hat, kann man vielleicht auch auf die Herstellung neuer Vektorsysteme für Medikamente anwenden, darunter auch Mikrokügelchen mit einem kleinen aerodynamischen Radius, die zur Freisetzung von Medikamenten in der Lunge dienen könnten.

*Wir danken unseren Kollegen bei Alliance für ihren Einsatz in der Forschungs- und Entwicklungsarbeit.*

Eingegangen am 7. August 2002 [A550]  
Übersetzt von Dr. Hans Jörg Meier, Konstanz

- [1] *Trends in Contrast Media* (Hrsg.: H. S. Thomsen, R. N. Muller, R. F. Mattrey), Springer, Heidelberg, **1999**.
- [2] S. L. Mulvagh, A. N. DeMaria, S. B. Feinstein, P. N. Burns, S. Kaul, J. G. Miller, M. Monaghan, T. R. Porter, L. J. Shaw, F. S. Villanueva, *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **2000**, *13*, 331.
- [3] H. Becher, P. N. Burns, *Handbook of Contrast Echocardiography—Left Ventricular Function and Myocardial Perfusion*, Springer, Berlin, **2000**.
- [4] G. A. Taylor, *Pediatr. Radiol.* **2000**, *30*, 101.
- [5] *Ultrasound Contrast Agents—Basic Principles and Clinical Applications*, 2. Aufl. (Hrsg.: B. B. Goldberg, J. S. Raichlen, F. Forsberg), Martin Dunitz, London, **2001**.
- [6] J. G. Riess, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4113.
- [7] a) J. G. Riess, *J. Fluorine Chem.* **2002**, *114*, 119; b) J. G. Riess, *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* **2003**, im Druck; J. G. Riess in *Handbook of Fluorous Chemistry* (Hrsg.: J. A. Gladysz, D. P. Curran, I. Horváth), Wiley-VCH, Weinheim, im Druck.
- [8] a) J. Ophir, K. J. Parker, *Ultrasound Med. Biol.* **1989**, *15*, 319; b) A. L. Klibanov, P. T. Rasche, M. S. Hughes, J. K. Wojdyla,

- K. P. Galen, J. H. Wible, G. H. Brandenburger, *Acad. Radiol.* **2002**, 9 (Suppl. 2), S279.
- [9] Y. Kono, G. C. Steinbach, T. Peterson, G. W. Schmid-Schönenbein, R. F. Mattrey, *Radiology* **2002**, 224, 253.
- [10] P. M. Morse, K. U. Ingard, *Theoretical Acoustics*, McGraw Hill, New York **1968**.
- [11] A. Kabalnov, D. Klein, T. Pelura, E. Schutt, J. Weers, *Ultrasound Med. Biol.* **1998**, 24, 739.
- [12] E. G. Schutt, T. J. Pelura, R. M. Hopkins, *Acad. Radiol.* **1996**, 35, S188.
- [13] H. D. van Liew, M. E. Burkard, *J. Appl. Physiol.* **1995**, 79, 1379; H. D. van Liew, S. Raychaudhuri, *J. Appl. Physiol.* **1997**, 82, 2045.
- [14] J. G. Riess, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2797.
- [15] A. Kabalnov, J. Bradley, S. Flaim, D. Klein, T. Pelura, B. Peters, S. Otto, J. Reynolds, E. Schutt, J. Weers, *Ultrasound Med. Biol.* **1998**, 24, 751.
- [16] F. Forsberg, R. Basude, J.-B. Liu, J. Alessandro, W. T. Shi, N. M. Rawool, B. B. Goldberg, M. A. Weatley, *Ultrasound Med. Biol.* **1999**, 25, 1203.
- [17] P. N. Burns, *Clin. Radiol.* **1996**, 51 Suppl. 1, 50.
- [18] a) P. D. Krishna, V. L. Newhouse, *Ultrasound Med. Biol.* **1997**, 23, 453; b) N. de Jong, A. Bouakaz, F. J. Ten Cate, *Ultrasonics* **2002**, 40, 567.
- [19] S. L. Mulvagh, D. A. Foley, B. C. Aeschbacher, K. W. Klarich, J. B. Seward, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1996**, 27, 1519.
- [20] M. R. Allen, P. A. Pellikka, H. R. Villarraga, K. W. Klarich, D. A. Foley, S. L. Mulvagh, J. B. Seward, *Int. J. Cardiac Imaging* **1999**, 15, 215.
- [21] a) M. S. Girard, R. F. Mattrey, K. G. Baker, T. Peterson, L. H. Deiranieh, G. C. Steinbach, *J. Ultrasound Med.* **2000**, 19, 185; b) C. B. Sirlin, M. S. Girard, K. G. Baker, G. C. Steinbach, L. H. Deiranieh, R. F. Mattrey, *Ultrasound Med. Biol.* **1999**, 25, 331.
- [22] F. Forsberg, J. B. Liu, H. J. Chiou, N. M. Rawool, L. Parker, B. B. Goldberg, *Ultrasonics* **2000**, 38, 110.
- [23] C. B. Sirlin, T. Pelura, R. F. Mattrey in Lit. [1], Kapitel 28, S. 333.
- [24] G. C. Steinbach in Lit. [1], Kapitel 27, S. 321.
- [25] D. Hope Simpson, C. T. Chin, P. N. Burns, *IEEE Trans. Ultras. Ferroelectr. Freq. Control* **1999**, 46, 372.
- [26] C. B. Sirlin, B. Coley, R. F. Mattrey in Lit. [1], Kapitel 30, S. 355.
- [27] T. R. Porter, S. Li, L. Jiang, P. Grayburn, U. Deligonul, *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **1999**, 12, 266.
- [28] R. E. Ronderos, M. Boskis, N. Chung, D. B. Corneli, E. M. Escudero, J. W. Ha, C. Charlante, S.-J. Rim, M. Portis, N. Fabris, J. Camilletti, A. A. Mele, F. Otero, T. R. Porter, *Clin. Cardiol.* **2002**, 25, 103.
- [29] K. Wei, A. R. Jayaweera, S. Firoozan, A. Linka, D. M. Skyba, S. Kaul, *Circulation* **1998**, 97, 473.
- [30] a) S. Kaul, R. Senior, H. Dittrich, U. Raval, R. Khattar, A. Lahiri, *Circulation* **1997**, 96, 785; b) P. N. Burns, S. R. Wilson, D. H. Simpson, *Invest. Radiol.* **2000**, 35, 58.
- [31] a) D. M. Skyba, R. J. Price, A. Z. Linka, T. C. Skalak, S. Kaul, *Circulation* **1998**, 98, 290; b) T. Ay, X. Havaux, G. Van Kamp, B. Campanelli, G. Gisellu, A. Pasquet, J.-F. Denet, J. Merlin, J.-L. J. Vanoverschelde, *Circulation* **2001**, 104, 461.
- [32] R. Gramiak, P. M. Shah, *Invest. Radiol.* **1968**, 3, 356.
- [33] M. R. Violante, R. B. Baggs, T. Tuthill, P. Dentinger, K. J. Parker, *Invest. Radiol.* **1991**, 26, S194.
- [34] E. C. Unger, D. Shen, T. Fritz, B. Kulik, P. Lund, G.-L. Lu, D. Yellowhair, R. Ramaswami, T. Matsunaga, *Invest. Radiol.* **1994**, 29, S134.
- [35] M. Schneider, P. Bussat, M. B. Barrau, F. Bodino, C. Gotti, E. Hybl, M. L. Pelaprat, F. Yan, *Invest. Radiol.* **1991**, 26, S190.
- [36] R. F. Mattrey, *Artif. Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol.* **1994**, 22, 295.
- [37] H. von Bibra, F. Hartmann, M. Petrik, R. Schlieff, U. Renner, H. Blomer, *Z. Kardiol.* **1989**, 78, 101.
- [38] S. B. Feinstein, J. Cheirif, F. J. Ten Cate, P. R. Silverman, P. A. Heidenreich, C. Dick, R. M. Desir, W. F. Armstrong, M. A. Quinones, P. M. Shah, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1990**, 16, 316.
- [39] B. B. Goldberg, J.-B. Liu, P. N. Burns, D. A. Merton, F. Forsberg, *J. Ultrasound Med.* **1993**, 12, 463.
- [40] R. Schurmann, R. Schlieff, *Radiol. Med.* **1994**, 87 (Suppl. 1), 15.
- [41] a) M. P. Krafft, J. G. Riess, J. G. Weers in *Submicronic Emulsions in Drug Targeting and Delivery* (Hrsg.: S. Benita), Harwood, Amsterdam, **1998**, S. 235; b) M. P. Krafft, A. Chittofrati, J. G. Riess, *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* **2003**, im Druck.
- [42] M. P. Krafft, J. G. Riess, *Biochimie* **1998**, 80, 489.
- [43] M. P. Krafft, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 47, 209.
- [44] N. G. Fisher, J. P. Christiansen, A. Klibanov, R. P. Taylor, S. Kaul, J. R. Lindner, *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **2002**, 15, 479.
- [45] a) H. C. Dittrich, G. L. Bales, T. Kuvelas, R. M. Hunt, B. A. McFerran, Y. Greener, *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **1995**, 8, 465; b) J. Hancock, H. Dittrich, D. E. Levitt, M. J. Monaghan, *Heart* **1999**, 81, 636; c) J. Cwajg, F. Xie, E. O'Leary, D. Kricsfeld, H. Dittrich, T. R. Porter, *Am. Heart J.* **2000**, 139, 675.
- [46] J. L. Cohen, J. Cheirif, D. S. Segar, L. D. Gillam, J. S. Gottdiener, E. Hausnerova, D. E. Bruns, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1998**, 32, 746.
- [47] L. J. Shaw, L. Gillam, S. Feinstein, J. Dent, G. Plotnick, *Am. J. Managed Care* **1998**, 4, SP169.
- [48] S. R. Wilson, P. N. Burns, D. Muradali, J. A. Wilson, X. Lai, *Radiology* **2000**, 215, 153.
- [49] a) J.-M. Correas, S. D. Quay, *Clin. Radiol.* **1996**, 51 (Suppl. 1), 11; b) F. Forsberg, R. Roy, D. A. Merton, N. M. Rawool, J. B. Liu, M. Huang, D. Kessler, B. B. Goldberg, *Ultrasound Med. Biol.* **1998**, 24, 1143; c) J.-M. Correas, A. R. Meuter, E. Singlas, D. R. Kessler, D. Wozak, S. C. Quay, *Ultrasound Med. Biol.* **2001**, 27, 565.
- [50] S. Beppu, H. Matsuda, T. Shishido, M. Matsumura, K. Niylatake, *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **1997**, 10, 11.
- [51] P. A. Grayburn, J. Weiss, T. Hack, E. Klodas, J. Raichlen, M. Vannan, A. Klein, D. Kitzman, S. Chrysant, J. Cohen, D. Abrahamson, E. Foster, J. Perez, G. Aurigemma, J. Panza, M. Picard, B. Byrd, D. Segar, S. Jacobson, D. Sahn, A. DeMaria, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1998**, 32, 230.
- [52] K. Tiemann, S. Lohmeier, S. Kuntz, J. Köster, C. Pohl, P. Burns, T. R. Porter, N. C. Nanda, B. Lüderitz, H. Becher, *Echocardiography* **1999**, 16, 799.
- [53] H. Maruyama, S. Matsutani, H. Saisho, N. Kamiyama, H. Yuki, K. Miyata, *Ultrasound Med. Biol.* **2000**, 26, 1429.
- [54] M. Schneider, *Echocardiography* **1999**, 16, 743.
- [55] a) D. Rovai, V. Lubrano, C. Vassalle, M. Paterni, C. Marini, M. Kozakova, M. Castellari, L. Taddei, M. G. Trivella, A. Distante, A. N. DeMaria, A. L'Abbate, *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **1998**, 11, 169; b) S. Lafitte, A. Higashiyama, H. Masugata, B. Peters, M. Strachan, O. L. Kwan, A. N. DeMaria, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2002**, 39, 1546.
- [56] a) R. Senior, O. Andersson, K. Caidahl, P. Carlens, M. C. Herregods, R. Jenni, A. Kenny, A. Melcher, J. Svedenag, J. L. Vanoverschelde, B. Wandt, B. R. Widgren, G. Williams, P. Guerret, K. la Rosee, L. Agati, G. Bezante, *Echocardiography* **2000**, 17, 705; b) D. Bokor, J. B. Chambers, J. P. Rees, T. G. K. Mant, F. Luzzani, A. Spinazzi, *Invest. Radiol.* **2001**, 36, 104.
- [57] H. Madjar, H. J. Prömpeler, C. Del Favero, B. J. Hackelöer, J. B. Llull, *Eur. J. Ultrasound* **2000**, 12, 123.
- [58] E. J. Halpern, L. Verkh, F. Forsberg, L. G. Gomella, R. F. Mattrey, B. B. Goldberg, *Am. J. Roentgenol.* **2000**, 174, 1575.
- [59] C. B. Sirlin, Y. Z. Lee, M. S. Girard, T. M. Peterson, G. C. Steinbach, K. G. Baker, R. F. Mattrey, *Acad. Radiol.* **2001**, 8, 162.

- [60] J.-B. Liu, D. A. Meron, B. B. Goldberg, N. M. Rawool, W. T. Shi, F. Forsberg, *J. Ultrasound Med.* **2002**, *21*, 161.
- [61] T. H. Marwick, R. Brunken, N. Meland, E. Brochet, F. M. Baer, T. Binder, F. Flachskampf, O. Kamp, C. Nienaber, P. Nihoyannopoulos, L. Pierard, J.-L. Vanoverschelde, P. van der Wouw, K. Lindvall, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1998**, *32*, 1260.
- [62] M. Picard, N. Pandian, F. Morecerf, F. Wackers, J. E. Udelson, N. Weissman, P. Grayburn, A. Klein, M. Vannan, J. Yao, R. Fetterman, R. Walovitch, A. DeMaria, *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **2001**, *14*, 460.
- [63] T. P. Porter, P. L. Iversen, S. Li, F. Xie, *J. Ultrasound Med.* **1996**, *15*, 577.
- [64] a) T. R. Porter, S. Li, D. Kricsfeld, R. W. Armbruster, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1997**, *29*, 791; b) G. Rocchi, J. D. Kasperek, T. W. Galema, N. de Jong, F. J. Ten Cate, *Am. J. Cardiol.* **2001**, *87*, 278.
- [65] T. R. Porter, R. F. LeVeen, R. Fox, A. Kricsfeld, F. Xie, *Am. Heart J.* **1999**, *132*, 964.
- [66] a) R. Leischik, C. Kuhlmann, C. Bruch, A. Jeremias, T. Buck, R. Erbel, *Int. J. Cardiac Imaging* **1997**, *13*, 387; b) N. G. Fisher, J. P. Christiansen, H. Leong-Poi, A. R. Jayaweera, J. R. Lindner, S. Kaul, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2002**, *39*, 530; c) G. Seidel, K. Meyer, C. Algermissen, A. Broillet, *Ultrasound Med. Biol.* **2001**, *27*, 915.
- [67] P. A. Dayton, J. E. Chomas, A. F. H. Lum, J. S. Allen, J. R. Lindner, S. I. Simon, K. W. Ferrara, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 1547.
- [68] R. Gramiak, P. M. Shah, D. H. Kramer, *Radiology* **1969**, *92*, 939.
- [69] R. F. Mattrey, G. Strich, R. E. Shelton, B. B. Gosink, G. R. Leopold, T. Lee, J. Forsythe, *Radiology* **1987**, *163*, 339.
- [70] S. Beckmann, M. Schartl, W. Bocksch, H. Paepke, *Z. Kardiol.* **1993**, *82*, 317.
- [71] B. D. Coley, M. A. Tramert, R. F. Mattrey, *Am. J. Roentgenol.* **1994**, *163*, 961.
- [72] a) Y. Kono, S. P. Pinnell, C. B. Sirlin, S. R. Sparks, B. Georgy, W. Wong, R. F. Mattrey, *Radiology*, im Druck; b) T. Postert, B. Braun, N. Pfundner, R. Sprengelmeyer, S. Meves, H. Przuntek, T. Buttner, *Ultrasound Med. Biol.* **1998**, *24*, 953; c) G. Seidel, L. Claassen, K. Meyer, M. Vidal-Langwasser, *Ultrasound Med. Biol.* **2001**, *27*, 1059; d) G. Seidel, K. Meyer, V. Metzler, D. Toth, M. Vida-Langwasser, T. Aach, *Ultrasound Med. Biol.* **2002**, *28*, 183.
- [73] K. Ohmori, B. Cotter, O. L. Kwan, K. Mitzushige, A. N. DeMaria, *Am. Heart J.* **1997**, *134*, 1066.
- [74] J. M. A. Swinburn, A. Lahiri, R. Senior, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2001**, *38*, 19.
- [75] S. R. Wilson, P. N. Burns, *Semin. Liver Dis.* **2001**, *21*, 147.
- [76] D. Strohmeyer, F. Frauscher, A. Klauser, W. Recheis, G. Eibl, W. Horninger, H. Steiner, H. Volgger, G. Bartsch, *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 2907.
- [77] M. S. Girard, Y. Kono, C. B. Sirlin, K. G. Baker, L. H. Deiranieh, R. F. Mattrey, *Acad. Radiol.* **2001**, *8*, 734.
- [78] G. A. Taylor, C. E. Barnewolt, B. H. Adler, P. S. Dunning, *Am. J. Roentgenol.* **1998**, *170*, 417.
- [79] M. J. K. Blomley, J. C. Cooke, E. C. Unger, M. J. Monaghan, D. O. Cosgrove, *BMJ Br. Med. J.* **2001**, *322*, 1222.
- [80] T. Albrecht, C. W. Hoffmann, S. A. Schmitz, S. Schettler, A. Overberg, C. T. Germer, K. J. Wolf, *Am. J. Roentgenol.* **2001**, *176*, 1191.
- [81] a) Y. Birnbaum, H. Luo, T. Nagai, M. C. Fishbein, T. M. Peterson, S. Li, D. Kricsfeld, T. R. Porter, R. J. Siegel, *Circulation* **1998**, *97*, 130; b) T. R. Porter, R. F. LeVeen, R. Fox, A. Kricsfeld, F. Xie, *Am. Heart J.* **1996**, *132*, 964.
- [82] a) P. A. Dayton, K. W. Ferrara, *J. Magn. Reson. Imaging* **2002**, *16*, 362; b) A. L. Klibanov, *Top. Curr. Chem.* **2002**, *222*, 73; c) G. M. Lanza, S. A. Wickline, *Prog. Cardiovasc. Dis.* **2001**, *44*, 13; d) J. R. Lindner, *Am. J. Cardiol.* **2002**, *90* (Suppl.), 723.
- [83] a) Y. Wu, E. C. Unger, T. P. McCreery, R. H. Schweitzer, D. Shen, G. Wu, M. D. Vielhauer, *Invest. Radiol.* **1998**, *33*, 880; b) P. A. Schumann, J. P. Christiansen, R. M. Quigley, T. P. McCreery, R. H. Schweitzer, E. C. Unger, J. R. Lindner, T. O. Matsunaga, *Invest. Radiol.* **2002**, *37*, 587.
- [84] J. R. Lindner, J. Song, F. Xu, A. L. Klibanov, K. Singbartl, K. Ley, S. Kaul, *Circulation* **2000**, *102*, 2745.
- [85] J. R. Lindner, J. Song, J. Christiansen, A. L. Klibanov, F. Xu, K. Ley, *Circulation* **2001**, *104*, 2107.
- [86] K. W. Ferrara, C. R. Merritt, P. N. Burns, F. S. Foster, R. F. Mattrey, S. A. Wickline, *Acad. Radiol.* **2000**, *7*, 824.
- [87] O. D. Kripfgans, J. B. Fowlkes, D. L. Miller, O. P. Eldevik, P. L. Carson, *Ultrasound Med. Biol.* **2000**, *26*, 1177.
- [88] R. J. Price, D. M. Skyba, S. Kaul, T. C. Skalak, *Circulation* **1998**, *98*, 1264.
- [89] E. C. Unger, E. Hersh, M. Vannan, T. O. Matsunaga, T. McCreery, *Prog. Cardiovasc. Dis.* **2001**, *44*, 45.
- [90] J. G. Riess, *J. Drug Targeting* **1994**, *2*, 455.
- [91] E. C. Unger, T. P. McCreery, R. H. Schweitzer, V. E. Caldwell, Y. Wu, *Invest. Radiol.* **1998**, *33*, 886.
- [92] L. A. Dellamary, T. E. Tarara, D. J. Smith, C. H. Woelk, A. Adractas, M. L. Costello, H. Gill, J. G. Weers, *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 168.
- [93] D. J. Smith, L. M. Gambone, T. Tarara, D. R. Meays, L. A. Dellamary, C. M. Woods, J. Weers, *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 1556.
- [94] A. I. Bot, T. E. Tarara, D. J. Smith, S. R. Bot, C. M. Woods, J. G. Weers, *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 275.
- [95] H. D. van Liew, M. E. Burkard, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1997**, *411*, 395.
- [96] C. E. G. Lundgren, G. W. Bergoe, I. Tyssebotn, Syllabus, 4th International Symposium on Current Issues in Blood Substitute Research (Stockholm, 2002), S. 40.
- [97] R. V. Shohet, S. Chen, Y.-T. Zhou, Z. Wang, R. S. Meidell, R. H. Unger, P. A. Grayburn, *Circulation* **2000**, *101*, 2554.
- [98] M. W. Miller, *Ultrasound Med. Biol.* **2000**, *26* (Suppl. 1), S59.
- [99] P. A. van der Wouw, A. C. Brauns, S. E. Bailey, J. E. Powers, A. A. Wilde, *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **2000**, *13*, 288.
- [100] L. J. Shaw, M. J. Monaghan, P. Nihoyannopoulos, *Heart* **1999**, *82* (Suppl. III), 16.
- [101] N. C. Nanda, D. W. Kitzman, L. J. Crouse, H. C. Dittrich, *Echocardiography* **2002**, im Druck.