

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Clinica e Terapia d'Urgenza Veterinaria

Ciclo XXIII

**Settore/i scientifico-disciplinare/i di afferenza: Area 07 – Scienze
Agrarie e Veterinarie VET/08 Clinica Medica Veterinaria**

*Impiego della tecnica ecocontrastografica nella valutazione dell'apparato
gastroenterico del gatto*

Presentata da: Dott. Swan Specchi

Coordinatore Dottorato

Prof. Antonio Venturini

Relatore

Prof. Gualtiero Gandini

Esame finale anno 2011

INDICE

CAPITOLO 1

MEZZI DI CONTRASTO ECOGRAFICI	4
1.1 CARATERISTICHE CHIMICO-FISICHE DELLE MICROBOLLE	5
1.2 INTERAZIONE MEZZI DI CONTRASTO-ULTRASUONO	8

CAPITOLO 2

UTILIZZO DEI MEZZI DI CONTRASTO ECOGRAFICI NELLE PATOLOGIE GASTROENTERICHE IN MEDICINA UMANA	12
2.1 PATOLOGIE INFIAMMATORIE DEL TRATTO GASTROINTESTINALE: MORBO DI CROHN	12
2.2 PATOLOGIE NEOPLASTICHE	16

CAPITOLO 3

ANATOMIA VASCOLARE DEL TRATTO GASTROENTERICO NEL GATTO	22
---	-----------

CAPITOLO 4

PARTE SPERIMENTALE	25
4.1 PARTE PRIMA: GRUPPO DI CONTROLLO	26
4.1.1 MATERIALI E METODI	26
4.1.2 RISULTATI	31

4.1.2.1 ANALISI QUALITATIVA	31
4.1.2.2 ANALISI QUANTITATIVA	33
4.1.3 DISCUSSIONE	35
4.2 STUDIO SU GATTI AFFETTI DA LINFOMA GASTROINTESTINALE	40
4.2.1 MATERIALI E METODI	40
4.2.2 RISULTATI	43
4.2.2.1 VALUTAZIONE B-MODE E COLOR DOPPLER	43
4.2.2.2 STUDIO CEUS: ANALISI QUALITATIVA	45
4.2.2.3 STUDIO CEUS: ANALISI QUANTITATIVA	48
4.2.3 DISCUSSIONE	49
4.3 CONCLUSIONI	52
BIBLIOGRAFIA	53

CAPITOLO 1: MEZZI DI CONTRASTO

ECOGRAFICI

I mezzi di contrasto impiegati in ecografia hanno suscitato un interesse sempre crescente negli ultimi anni, e l'ecografia con mezzo di contrasto (*Contrast Enhanced Ultrasonography, CEUS*) è divenuta una tecnica in rapida evoluzione con molte applicazioni in ambito clinico sia in medicina umana che veterinaria. Nel tempo sono state introdotte tecniche ecografiche “contrasto specifiche” dedicate alla registrazione selettiva del segnale armonico prodotto dal comportamento non lineare delle microbolle ed in grado di sopprimere il segnale proveniente dai tessuti stazionari. Con questa metodica si cerca di migliorare le tecniche dell'ecografia convenzionale B-mode, Color Doppler e Power Doppler ottimizzando la visualizzazione e la valutazione della microvascolarizzazione degli organi esaminati e di eventuali lesioni o alterazioni presenti.

In medicina umana l'ecografia con mezzo di contrasto ha una sensibilità ed una specificità superiori rispetto all'ecografia convenzionale e pressoché paragonabili alle metodiche considerate “*gold standard*” come la tomografia assiale computerizzata e la risonanza magnetica.

1.1 CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE DELLE MICROBOLLE

I mezzi di contrasto di attuale generazione sono costituiti da microbolle provviste di un guscio esterno e di un contenuto gassoso. Le piccole dimensioni delle microbolle (generalmente comprese tra 2 e 6 μm , ed assimilabile ai globuli rossi) consentono al mezzo di contrasto, quando iniettato in una vena periferica, di attraversare il filtro polmonare e raggiungere la rete capillare del circolo sistemico. Affinché il mezzo di contrasto sia efficace, la sua persistenza nel circolo sanguigno deve essere sufficiente per eseguire tutte le valutazioni necessarie a ottenere una conclusione diagnostica. A seconda dell'organo, occorrono circa 10-30 secondi perché il contrasto lo raggiunga; oltre a ciò si deve calcolare il tempo necessario per eseguire le valutazioni diagnostiche che possono richiedere vari minuti. Per questo motivo la durata ottimale di un mezzo di contrasto dovrebbe essere quindi dell'ordine di alcuni minuti (Bokor e Imperatori, 2006). Inoltre, un mezzo di contrasto deve essere costituito da microbolle capaci di attraversare il circolo polmonare, dopo somministrazione endovenosa, ed essere in grado di distribuirsi al sistema periferico.

La persistenza di una microbolla dipende anche dalla pressione presente nell'ambiente in cui si trova ad agire e può essere calcolata usando la legge di Laplace:

$$\Delta P = 2 T_s / r$$

dove la pressione che la microbolla deve controbilanciare per non essere distrutta è direttamente proporzionale alla tensione superficiale T_s ed inversamente proporzionale al raggio della microbolla stessa (Bokor e Imperatori, 2006). Questo implica che le microbolle devono essere rivestite di una membrana (“guscio di stabilizzazione”) capace di controbilanciare la pressione superficiale (Giraud e Sahn, 1993). La stabilizzazione ottenuta deve essere momentanea perché una volta terminato l’esame, le microbolle devono essere eliminate rapidamente dall’organismo per evitare tossicità del paziente.

I mezzi di contrasto di *prima generazione* sono caratterizzati da una membrana esterna rigida di varia natura con aria all’interno della bolla. Questo gli conferisce maggiore stabilità rispetto le bolle non stabilizzate, un diametro più uniforme, la possibilità di bypassare il circolo polmonare e una persistenza nel sangue sufficientemente lunga da poter migliorare il rapporto segnale/rumore a livello del circolo periferico in seguito alla somministrazione endovenosa (Giraud e Sahn, 1993, Imperatori, 2004). In questo gruppo, il mezzo di contrasto che ha avuto maggior successo nell’utilizzo clinico è stato il Levovist®, costituito da bolle di diametro medio di 2,7 μm con un guscio di cristalli di acido palmitico e galattosio; esso era indicato indicato per la visualizzazione ecografica di cuore, addome, reflusso vescico-ureteriale e *imaging* transcranico. Inoltre è stata sfruttata la sua proprietà di avere una specifica distribuzione epato-splenica, che ha consentito i primi studi sulla perfusione di questi organi (Meerbaum, 1993, Powers et al., 1993, Schlieff, 1993). Queste microbolle possono essere distrutte nel corso della preparazione delle sospensioni, durante l’iniezione o, una volta iniettate, essere distrutte in maniera non uniforme dal passaggio nel microcircolo polmonare o a causa delle elevate pressioni intracardiache, con conseguente comportamento molto variabile per

intensità e durata (Greis, 2004). Ne consegue che per avere una un'adeguata produzione del segnale di ritorno è necessario provocare la rottura della bolla. La distribuzione del mezzo di contrasto è rappresentata in modo istantaneo tramite la rottura delle microbolle.

I mezzi di contrasto di *seconda generazione* superano questo limite tramite l'impiego di un guscio elastico e di un gas differente dall'aria. Il diametro di queste microbolle varia da 2 a 4 μm ed è inferiore al diametro degli eritrociti. I gas utilizzati sono caratterizzati da una bassa solubilità e una scarsa diffusibilità in acqua e determinano un aumento della stabilità della microbolla nel circolo periferico. L'emivita si allunga così fino a diventare di alcuni minuti (Quaia, 2007). Inoltre le caratteristiche di elasticità conferiscono una più efficace "risonanza" della bolla una volta che questa è investita dal fascio ultrasonoro con conseguente produzione di maggiore segnale armonico (Rossi, 2007). Il mezzo di contrasto di seconda generazione più utilizzato al momento in Europa è il Sonovue® (Bracco Diagnostics Inc.) costituito da un guscio esterno di fosfolipidi e da un lume contenente esafluoruro di zolfo (SF_6).

In generale, la sopravvivenza di una microbolla nel sangue (T) dipende dalla seguente formula (legge di Laplace modificata):

$$T = r^2 \rho / 2D C_s$$

Dove r è il suo raggio, ρ la densità del gas in essa contenuta, D è la capacità del gas di diffondere all'esterno attraverso la membrana stabilizzata, C_s è la costante di saturazione del gas stesso nel sangue. La vita di una bolla può essere modificata agendo su uno di questi fattori.

1.2 INTERAZIONE MEZZI DI CONTRASTO- ULTRASUONO

L'interazione tra microbolle e gli ultrasuoni è un fenomeno che dipende dalle caratteristiche della microbolla stessa (dimensioni, composizione, chimica, elasticità del guscio, frequenza della risonanza) e dalle caratteristiche del fascio ultrasonoro utilizzato (frequenza, focalizzazione, “*pulse repetition frequency*” e intensità del fascio ultrasonoro). In modo particolare l'intensità influenza la risposta della microbolla che può variare dalla oscillazione alla rottura (Bokor, 2000, Greis, 2004, Imperatori, 2004). Questo parametro può essere variato utilizzando la regolazione dell'indice meccanico (IM) nell'ecografo (Correas et al., 2001).

L'interfaccia gas/sangue di ciascuna microbolla agisce da riflettore del fascio di ultrasuoni incidente, contribuendo ad intensificare il segnale ultrasonoro di ritorno alla sonda. Se molte microbolle vengono insonate contemporaneamente, l'aumento d'intensità del segnale è dato dal numero di microbolle moltiplicato per il coefficiente di ecogenicità di ogni singola microbolla. Possiamo quindi affermare che l'intensità del segnale aumenta con il numero di microbolle presenti in circolo (concentrazione) ed interagenti con il fascio di ultrasuoni (Bokor e Imperatori, 2006).

Le microbolle quando sono colpite da un fascio di ultrasuoni li riflettono con la stessa frequenza del fascio di ultrasuoni incidente. Se le microbolle sono colpite da un fascio contenente ultrasuoni con frequenza uguale a quella di risonanza della microbolla, entrano in risonanza e trasmettono al trasduttore, oltre alla frequenza di insonazione,

una serie di “armoniche” ossia di segnali a frequenza multipla rispetto alla frequenza fondamentale (*imaging non lineare*)(Powers et al., 1993). Tra le armoniche riflesse una è caratterizzata da una frequenza doppia rispetto a quella incidente e viene detta “seconda armonica”. Essendo quest’ultima emessa esclusivamente dalle microbolle, l’ecografo è in grado di costruire un’immagine specifica sul segnale del contrasto, rendendo la metodica così sensibile e selettiva da permettere di studiare piccole variazioni del microcircolo ematico (Frinking et al., 2000).

La pressione acustica del fascio ultrasonoro incidente è un elemento importante per indurre la risposta armonica delle microbolle; essa viene indicata con l’Indice Meccanico (IM) il quale viene definito come rapporto tra P_{NEG} , la pressione acustica negativa ridotta (attenuata) e la radice quadrata della frequenza f :

$$IM = P_{\text{NEG}} / \sqrt{f}$$

L’*IM* rappresenta la probabilità che si verifichino effetti biologici causati dall’energia termica durante l’insonazione e ha lo svantaggio di avere scarsa riproducibilità tra le varie apparecchiature ecografiche.

Esistono diverse tecniche per insonare le microbolle. La prima tecnica consiste nell’insonazione ad alta pressione acustica ($IM > 0,5$) e la risposta armonica aumenta fino a provocare la rottura delle microbolle e determina la rottura massiccia delle microbolle con la conseguente emissione di un segnale irregolare e a banda larga, simile ad uno scoppio unico e intenso (Bauer et al., 1993, Bokor e Maggioni, 2006). Questa tecnica viene principalmente utilizzata con i mezzi di contrasto di prima generazione che hanno un comportamento armonico a bassa potenza di insonazione e sono limitati

dalla scarsa persistenza del segnale che perdura al massimo per 2-3 *frames* (Quaia, 2007). La rottura delle microbolle rende impossibile ulteriori analisi qualitative e quantitative: il risultato è una rappresentazione istantanea della distribuzione del mezzo di contrasto nel tessuto o organo, la cosiddetta *Emissione Acustica Stimolata* (AES) o *Flash Echo Imaging* (Bauer et al., 1993, Bokor e Imperatori 2006).

Una seconda possibilità consiste nell'insonare le microbolle con un IM molto basso ($IM < 0,1$); in tal modo si riduce la probabilità di rottura delle microbolle e la produzione di frequenze armoniche (multipli o sottomultipli della frequenza originaria, detta anche "fondamentale") da parte dei tessuti stazionari, mentre si sfrutta a pieno il comportamento fisico delle microbolle. L'oscillazione della microbolla è lineare, la bolla entra in risonanza, ma le fasi di compressione ed espansione sono identiche. Il risultato è un aumento dell'intensità dell'eco di ritorno che può essere sfruttato per incrementare la visualizzazione del segnale Doppler. Questa tecnica è stata utilizzata per molti anni in associazione al Levovist® (Correas et al., 2001, Bokor e Imperatori, 2006).

Utilizzando invece una pressione acustica intermedia (IM compreso tra 0,1 e 0,5) le microbolle entrano in risonanza e vanno incontro alla cosiddetta oscillazione "non lineare", asimmetrica in quanto il grado di compressione del loro raggio è molto minore rispetto a quello d'espansione. Ciò comporta l'emissione di onde ultrasonore di una frequenza differente (multipla) rispetto a quella d'insonazione. Questo è un fenomeno fisico alla base del moderno utilizzo dei mezzi di contrasto ecografici di seconda generazione (per esempio Sonovue®) che consente di effettuare uno studio dinamico in tempo reale. Entrando in risonanza, le microbolle vanno incontro a fasi di espansione e compressione non uguali, in quanto la fase di espansione predomina rispetto alla fase di

compressione. Il risultato è la produzione di un ultrasuono di ritorno con una forma asimmetrica e che contiene nel suo spettro frequenze diverse da quelle dell'ultrasuono originario, le cosiddette "frequenze armoniche". Queste frequenze possono essere captate in modo selettivo per ottimizzare la ricezione del segnale proveniente dal mezzo di contrasto, poiché vengono prodotte quasi esclusivamente dalle microbolle e non dal tessuto circostante (Correas et al., 2001).

CAPITOLO 2: UTILIZZO DEI MEZZI DI CONTRASTO ECOGRAFICI NELLE PATOLOGIE GASTROENTERICHE IN MEDICINA UMANA

2.1 PATOLOGIE INFIAMMATORIE DEL TRATTO GASTROINTESTINALE: MORBO DI CROHN

Il morbo di Crohn è una patologia caratterizzata da un andamento alterno con fasi di attività della malattia seguiti da periodi di latenza. Uno dei parametri considerati per l'impostazione della terapia è l'attività della malattia e uno dei problemi maggiori consiste nella discrepanza tra i sintomi del paziente e i segni oggettivi della malattia stessa. Nella pratica clinica sono stati impiegati uno score clinico (Best et al., 1976), parametri laboratoristici, endoscopia e diagnostica per immagini per stabilire oggettivamente l'attività della malattia. In modo particolare, le tecniche di diagnostica per immagini impiegate sono state lo studio radiografico con il bario, l'ecografia, la tomografia assiale computerizzata e la medicina nucleare. Lo studio radiografico con il bario è in grado di rilevare solo il 30-50% delle fistole associate al morbo di Crohn (Maconi et al., 2002) e la scintigrafia ha una sensibilità pressoché sovrapponibile alla radiologia nella valutazione delle complicazioni extramurali. La tomografia computerizzata viene invece al momento considerato come “*gold standard*” (Tarjan et

al., 2000). L'ecografia si è dimostrata una delle tecniche migliori nella valutazione delle alterazioni intramurali ed extramurali (ispessimento della parete, fistole, flemmoni e ascessi) del tratto gastroenterico conseguenti al morbo di Crohn (Tarjan et al., 2000, Parente et al., 2005) permettendo di distinguere questa patologia da altri tipi di enteriti (Worliczek et al. 1987). Molti studi hanno inoltre dimostrato una correlazione tra lo spessore della parete intestinale e l'attività clinica del morbo di Crohn (Maconi et al., 1996, Wakefield et al., 1989, Spalinger et al., 2000, Esteban et al., 2001). Uno dei limiti della normale ecografia B-mode consiste nella impossibilità di valutare la vascolarizzazione della parete e di distinguere se l'aumento di spessore sia dovuto all'infiammazione o alla fibrosi. Uno dei cambiamenti precoci rilevabile in corso di questa malattia è la neovascolarizzazione della parete del tratto intestinale colpito, conseguente alla formazione di nuovi vasi capillari (Wakefield et al., 1989). Col fine di valutare i vasi intramurali della parete intestinale in corso di morbo di Crohn sono stati impiegati sia il Color che il Power Doppler (Esteban, 2001, Spalinger, 2000) e l'impiego dei mezzi di contrasto ecografici ha migliorato ulteriormente l'accuratezza del Doppler stesso (Di Sabatino, 2002). Nello studio di Esteban et al. si dimostra un aumento del segnale Doppler nelle anse intestinali dei soggetti con morbo di Crohn "attivo" rispetto i pazienti con malattia "non attiva" e anche l'indice di resistività (RI) delle arterie intraparietali è inferiore nei primi; questo è stato spiegato come conseguenza della vasodilatazione delle arteriole distali in seguito allo stato infiammatorio dell'ansa affetta. L'esame Doppler permette di distinguere la malattia in stato attivo rispetto ad uno stato non attivo, oltreché tra una stenosi infiammatoria o fibrotica, tra un flemmone e un ascesso.

Negli ultimi anni l'impiego di mezzi di contrasto di seconda generazione associato all'utilizzo d'indici meccanici molto bassi ha permesso di visualizzare il microcircolo in tempo reale in molti organi e sono stati impiegati anche in pazienti affetti da morbo di Crohn (Robotti et al. 2004, Kratzer et al. 2005) valutando così la funzionalità del circolo sanguigno intestinale in modo non invasivo.

Nello studio di Serra et al. è stata inoltre dimostrata la presenza di diverse modalità di *enhancement (pattern, FIG.1)* della parete intestinale e sono stati applicati dei metodi semiquantitativi (*pattern di enhancement*) e quantitativi (rapporto E/W che equivale al rapporto tra lo spessore totale di parete e la parte di parete che mostra *enhancement*). Ancora una volta questi parametri hanno permesso di distinguere tra soggetti con malattia attiva e soggetti con malattia non attiva. Si sta ora prendendo in considerazione l'ipotesi di utilizzare i mezzi di contrasto di seconda generazione nel monitoraggio della risposta del paziente alla terapia.

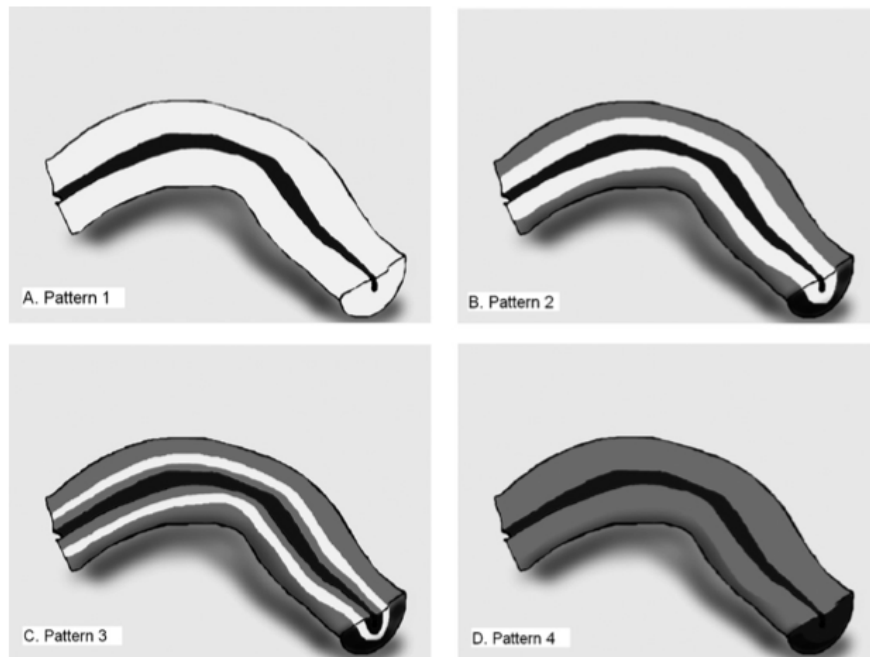


FIGURA1: *Pattern* di enhancement descritti nello studio di Serra et al.; lo strato bianco indica l'enhancement durante la fase arteriosa: A) Pattern 1 corrisponde ad un completo enhancement della parete dalla mucosa alla sierosa; B) Pattern 2 corrisponde ad un mancato enhancement solo dal bordo esterno dello strato muscolare; C) Pattern 3 corrisponde ad un enhancement solo della parte centrale della parete; D) Pattern 4 rappresenta una assenza completa dell'enhancement di parete.

2.2 PATOLOGIE NEOPLASTICHE

I mezzi di contrasto ecografici hanno trovato impiego sia nella diagnosi che nel monitoraggio della risposta alla terapia in pazienti affetti da neoplasie del tratto gastroenterico.

Per quanto riguarda i tumori stromali gastrointestinali (GIST), uno dei fattori più importanti nella diagnosi e nella prognosi è stabilirne la benignità o la malignità. Nello studio di Fukuta et al. del 2005 si è cercato di discriminare GIST maligni da quelli benigni in base alla tipologia della vascolarizzazione. In questo studio sono stati individuati dei pattern di perfusione. Il “*poor*” pattern è stato attribuito a neoplasie benigne che mostravano una vascolarizzazione esclusivamente periferica. Il “*rich*” pattern invece è stato associato a lesioni neoplastiche maligne con vascolarizzazione intensa e con vasi che andavano dalla periferia al centro (**FIG. 2-3**). Questo studio si conclude con dati incoraggianti poiché confermano l'utilità del CEUS nel discriminare con accuratezza diversi tipi di vascolarizzazione potendo poi associare la vascolarizzazione stessa alla diagnosi di benignità o malignità.

In uno studio di Jin-Mei et al., il mezzo di contrasto Sonovue® si è dimostrato utile nel confermare il sospetto diagnostico di carcinoma dell'ampolla del Vater. In questo case report è stata rilevata tramite l'ecografia endoscopica una massa con margini poco definiti e di aspetto disomogeneamente ipoecogeno localizzata in corrispondenza dell'unione del dotto biliare comune con il dotto pancreatico in corrispondenza dell'ampolla di Vater. Dopo l'esame CEUS la massa ha mostrato un wash-out precoce in fase tardiva rispetto il tessuto circostante compatibile con una lesione di tipo maligno.

Questa diagnosi ha permesso poi di impostare una chirurgia più ampia e invasiva rispetto quella che si sarebbe attuata nei confronti di una lesione benigna migliorando anche a prognosi del paziente.

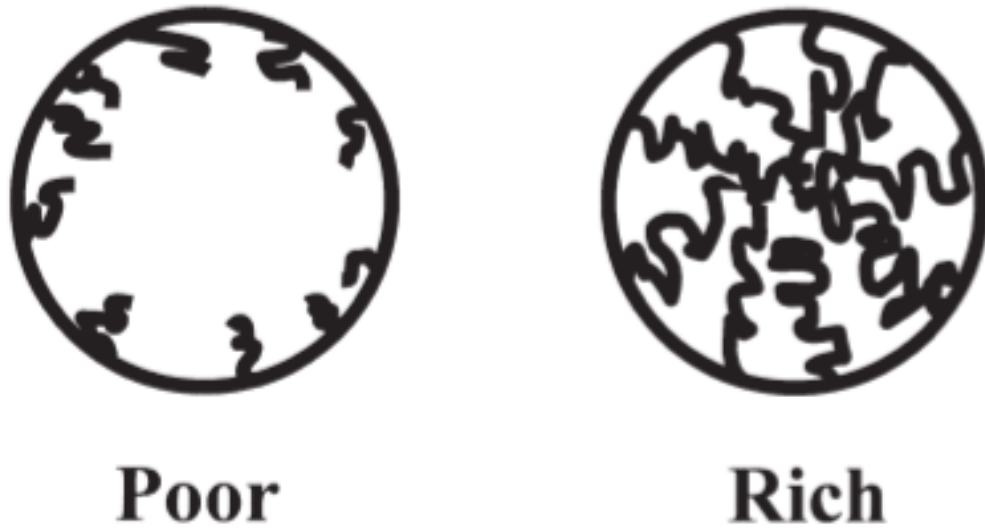


FIGURA2: classificazione dei *patterns* vascolari dei tumori stromali gastrointestinali (GIST) per mezzo della individuazione dei vasi con ecocontrastografia. “*Poor*” rappresenta molti vasi solo alla periferia del tumore; “*Rich*” rappresenta abbondanza di vasi dalla periferia alla parte centrale della neoplasia (Fukuta et al., 2005).

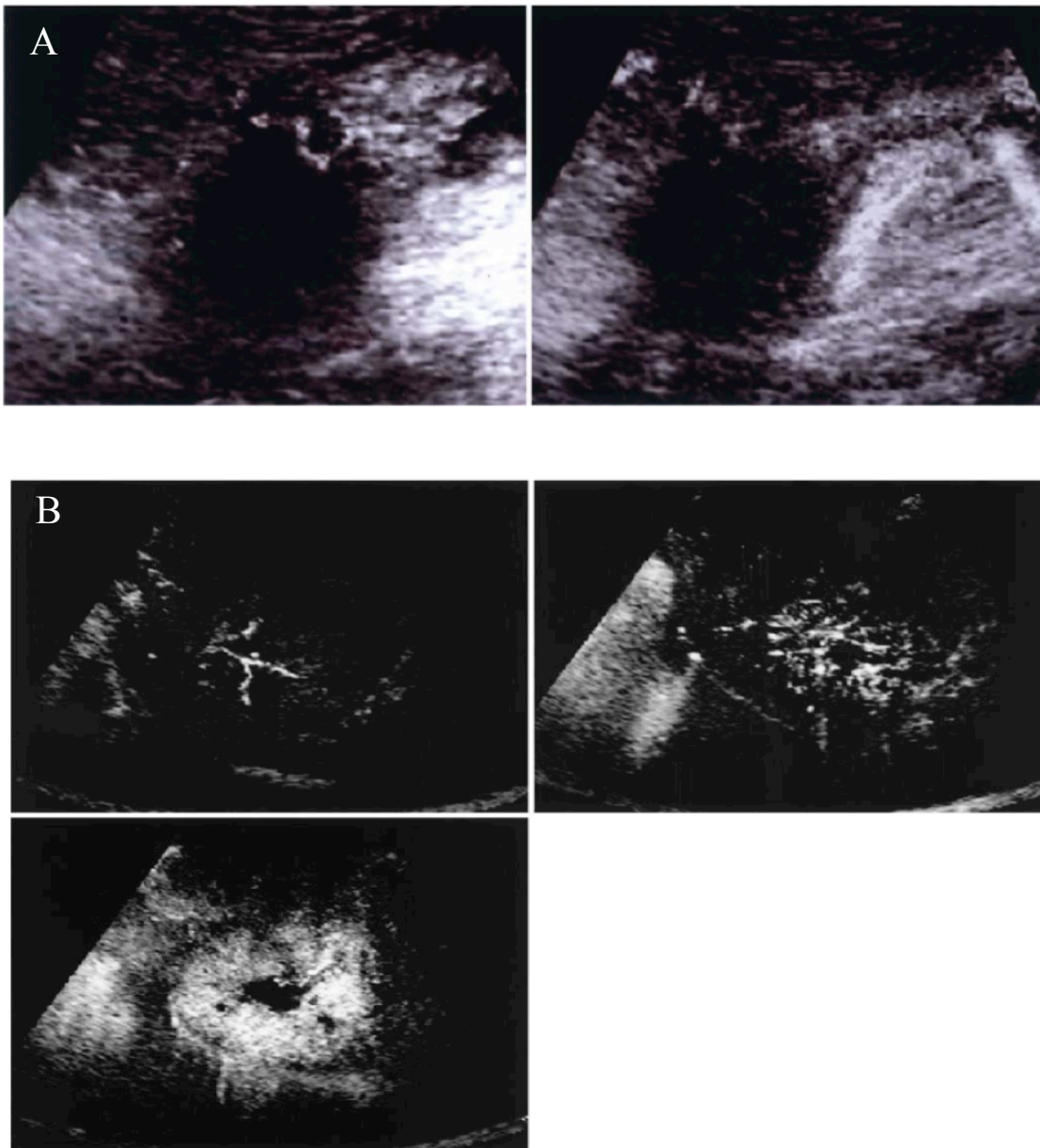


FIGURA3: immagini ecocontrastografiche di metastasi epatiche di GIST. A) *“Poor” pattern*; B) *“Rich” pattern* durante le diverse fasi vascolari (Fukuta et al., 2005).

In medicina umana è stato ormai accertato che nei tumori maligni la vascolarizzazione è correlata con il potenziale invasivo del tumore stesso (Folkman, 1995); anche la densità media vascolare (MDV) è un fattore prognostico in molti tipi di tumore (Weidner et al., 1991, Heimann et al., 1998, Ushijima et al. 2001, Elpek et al., 2001). In modo particolare, l'angiogenesi tumorale è un processo indotto dal rilascio di fattori proangiogenetici che stimolano le cellule endoteliali. Per questo motivo, molti studi sono in questo momento finalizzati alla terapia antiangiogenetica per modulare quella che è la vascolarizzazione tumorale provocando necrosi della lesione neoplastica. Per monitorare precocemente e in modo specifico la risposta terapeutica relativa alla vascolarizzazione, si ricercano metodi per il monitoraggio non invasivo del flusso sanguigno e della perfusione tissutale.

Molti trial clinici hanno dimostrato che i farmaci antiangiogenici possono non influenzare in modo significativo il volume della neoplasia, specialmente poco dopo l'inizio della terapia e per questo motivo la valutazione delle dimensioni può non essere un elemento sensibile nel controllo della risposta del paziente alla terapia stessa. Molte delle tecniche attualmente utilizzate per la misurazione della perfusione dei tumori in vivo, compresa la risonanza magnetica, mostrano ancora dei limiti. L'ecografia si è dimostrata una metodica promettente per la valutazione della vascolarizzazione tumorale poiché con l'esame Doppler è possibile esaminare i vasi di calibro maggiore ed effettuare delle misurazioni quantitative tramite software specifici (Delorme et al., 1995, Fein et al., 1995, Park et al., 1998, Fleischer et al., 1999, Goertz et al., 2000, Foster et al., 1998). La valutazione della perfusione vascolare (flusso sanguigno per unità di tessuto) comprende anche i capillari, ma misurare quest'ultima nei tumori è piuttosto difficoltoso a causa del flusso lento e della natura irregolare dei vasi. A questo

fine, la tecnica convenzionale Power Doppler non è in grado di rilevare il flusso capillare. In modo particolare, a causa della scarsa capacità di questa tecnica nel rilevare il flusso arterioso, normalmente è solo possibile calcolare parametri indiretti come l'area sotto la curva intensità-tempo (AUC)(Cosgrove et al., 2001).

I mezzi di contrasto ecografici sono composti da microbolle con diametro pari o inferiore a quello dei globuli rossi e la maggior parte di essi sono esclusivamente “blood pull” senza alcuna fase parenchimale e per questo motivo l'ecografia con mezzo di contrasto permette di visualizzare anche i vasi di calibro inferiore, compresi i capillari. Per misurare l'indice di perfusione di un organo o di una lesione è possibile attraverso specifici software disegnare una regione d'interesse (*region of interest* ROI) dalla quale possono essere estrapolati dei dati quantitativi. Molti studi in medicina umana hanno cercato di dimostrare una correlazione tra l'indice di perfusione ottenuto tramite analisi quantitativa dell'ecografia con mezzo di contrasto e MDV valutato istologicamente tramite la colorazione dell'endotelio vasale con marcatori specifici senza però ottenere dati significativi (Schroeder et al., 2001, Iordanescu et al., 2002, Denis et al., 2002, Fleischer et al., 1999). Anche utilizzando tecniche “*pulsed-inversion*” e valutando in modo semiquantitativo l'effetto degli intervalli di impulso più lunghi, i risultati non sono stati significativi (Forsberg et al., 2002). Al contrario, l'ecografia a intermittenza con Power doppler dopo la somministrazione di mezzo di contrasto, ha dimostrato una buona abilità nel quantificare e visualizzare il flusso sanguigno (Wei et al., 1998, Linka et al., 1998, Schlosser et al., 2001, Masugata et al., 2001, Koster et al., 2001). L'ultrasonografia a intermittenza si basa sulla cinetica del ritorno delle microbolle nel tessuto dopo che queste sono state distrutte utilizzando un fascio ultrasonoro ad alto indice meccanico. I dati istologici che valutano la densità microvascolare non sono

adatti ad essere comparati con parametri funzionali perché non descrivono il comportamento dinamico del sangue in questi vasi. Per questo motivo, il monitoraggio delle terapie antiangiogenetiche può non essere adeguato impiegando esclusivamente questa tecnica. Il volume sanguigno infatti non può essere calcolato considerando esclusivamente la quantità di vasi che sono all'interno di un tessuto e perciò l'immunofluorescenza non può essere considerata come “*gold standard*” nella valutazione della perfusione sanguigna.

CAPITOLO 3: ANATOMIA VASCOLARE DEL TRATTO GASTROENTERICO NEL GATTO

L'arteria mesenterica craniale nei carnivori nasce a livello della seconda vertebra lombare dirigendosi ventro-caudalmente e formando nel mesentere una curva che la porta in prossimità dell'ileo. Il primo vaso che si diparte è l'arteria ileo-colica, che nasce a breve distanza dall'aorta che si porta poi a destra raggiungendo la vicinanza della giunzione ileo-colica. Poco dopo la sua origine si diparte da essa l'arteria colica media che si anastomizza con un'altra arteria colica media che proviene direttamente dalla arteria mesenterica. Pochi millimetri dopo, l'arteria ileo-colica stacca anche l'arteria colica destra, che raggiunge quasi subito il colon ascendente e le cui branche si anastomizzano da una parte con le arterie coliche medie e dall'altra con il ramo colico a livello della metà della lunghezza del colon ascendente. Il ramo colico nasce vicinissimo alla giunzione ileo-ciecale e risale lungo il colon ascendente per formare quest'ultima arcata. L'arteria ileo-colica invia ancora, alcuni millimetri più avanti, il ramo ileo-mesenteriale, che costeggia il margine mesenteriale dell'ileo per incontrarsi con l'ultima arteria ileale. Le arterie ciecali sono di egual calibro; la dorsale è fornita dal ramo colico ed emette anche il ramo ileo-mesenteriale, mentre la ventrale forma con il ramo ileo-mesenteriale la biforcazione terminale dell'ileo-ciecale. Le due arterie ciecali scambiano esili anastomosi attorno all'ostio ileale, che viene così contornato da un vero cerchio arterioso (Barone, 1996).

L'arteria pancreatico-duodenale caudale costituisce la seconda collaterale della mesenterica craniale. Nasce dalla faccia caudale di questa di fronte o subito dopo l'ileo-colica e si divide in due rami. Il primo si porta a destra nel meso della parte ascendente del duodeno. Si pone tra quest'ultima e il lobo destro del pancreas, al quale fornisce numerosi rami inviando poi una branca a incontrare l'arteria pancreatico-duodenale craniale, poi prosegue il suo cammino fino alla parte trasversa del duodeno. Qui raggiunge l'altro ramo che segue in senso retrogrado la parte ascendente del duodeno dopo aver emesso una branca che si porta alla curvatura duodeno-digiunale per anastomizzarsi con la prima arteria digiunale (Barone, 1996).

Le arterie digiunali, circa una quindicina, nascono dalla convessità dell'arteria mesenterica craniale e si portano le prime a sinistra poi via via in direzione caudale. La prima può nascere in comune con la pancreatico-duodenale caudale. Le successive hanno le loro origini molto ravvicinate formando talvolta dei brevi tronchi comuni; in seguito diventano mano a mano più distanziate. Esse divergono leggermente nel mesentere e formano le loro arcate anastomotiche. Da queste arcate partono i numerosi "rami retti" che si portano all'intestino. Le arterie ileali continuano la serie delle precedenti e sono via via più corte e dirette caudalmente a destra. Le ultime due costituiscono in un certo senso la biforcazione terminale della mesenterica craniale che poi risale a incontrare il ramo ileo-mesenteriale (Barone, 1996).

Assorbimento, secrezione e motilità, le tre più importanti funzioni dell'intestino, sono localizzati in parti differenti della parete intestinale e hanno delle richieste nutrizionali differenti. L'assorbimento "attivo" attraverso l'epitelio intestinale e la secrezione, che avvengono principalmente a livello di cripte, sono processi che consumano

un'importante quantità di ossigeno e in proporzione, la motilità della muscolare ne richiede invece una quantità inferiore.

In generale, è appurato che la quantità di sangue che affluisce a un tessuto è proporzionale alla domanda di ossigeno ed è conosciuto che esistono dei meccanismi di regolazione che incrementano l'apporto di sangue ai tessuti che aumentano il loro metabolismo. Per questo motivo si può presumere che il flusso sanguigno si distribuisca in modo non eguale all'interno della parete intestinale (Lundgren, 1974).

L'architettura microvascolare del piccolo intestino è composta da due differenti letti capillari paralleli tra loro, per la precisione, il plesso mucoso-sottomucoso e quello muscolare-sieroso (Lundgren, 1967; Kampp, 1974, Granger 1979, Lundgren 1974). Per quanto riguarda la parete del piccolo intestino della specie felina, è stato dimostrato che approssimativamente l'80% del flusso sanguigno si distribuisce a livello del plesso mucoso-sottomucoso e il 20% al muscolare-sieroso in condizioni di riposo (Piasecki, 1986; Premen, 1987). In particolare, le anastomosi dei vasi di diametro maggiore (30-80 μm di diametro) sono localizzate a livello di strato sottomucoso, mentre un plesso con vasi di diametro inferiore sono localizzati a livello di *muscularis mucosae*. Le arterie mucosali che originano dalla rete vascolare sovrastante si dividono a stella in branche che si ramificano nello strato mucoso. Il nutrimento di ciascun villo è solitamente fornito da un singolo vaso che scorre al centro del villo stesso. In prossimità dell'apice del villo, il vaso centrale si arborizza in una densa rete di capillari che si raccolgono poi nel letto venoso localizzato alla base del villo (Lundgren, 1967; Kampp, 1974, Granger 1979, Lundgren 1974). Il sistema nervoso della vascolarizzazione intestinale è controllato da fibre del sistema simpatico che inducono vasocostrizione mentre non esistono fibre del sistema parasimpatico che inducono vasodilatazione.

CAPITOLO 4: PARTE SPERIMENTALE

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'impiego di un mezzo di contrasto ultrasonografico di seconda generazione (Sonovue®) per lo studio della perfusione della parete intestinale del gatto. In particolare , lo studio è stato articolato in due fase operative. Nella prima fase sono stati arruolati dei soggetti sani al fine di identificare il *pattern* di perfusione di un'ansa intestinale normale. Successivamente si è proceduto alla valutazione della perfusione parietale di anse intestinali linfomatose.

4.1 PARTE PRIMA: GRUPPO DI CONTROLLO

4.1.1 MATERIALI E METODI

Per questa parte dello studio sono stati utilizzati 10 gatti di razza europea di proprietà degli studenti e del personale del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna. Questo gruppo di soggetti era composto da 5 maschi interi, 4 gatte intere e una gatta sterilizzata con una età media di 5,2 anni ($SD \pm 2$ anni) e un peso corporeo medio di 4 Kg ($SD \pm 0,7$ Kg). Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Bologna. I gatti sono stati considerati sani sulla base della visita clinica e degli esami laboratoristici (profilo emato-biochimico, esame delle urine, esame coprologico). Inoltre tutti i soggetti sono stati testati per l'antigene del virus della leucemia felina, per gli anticorpi della immunodeficienza felina e per gli anticorpi verso coronavirus felino.

L'esame ecografico è stato eseguito dopo un periodo di digiuno di 12 ore.

Tutte le valutazioni ecografiche sono state eseguite da un unico operatore usando un ecografo iU22 Philips®. Per effettuare l'esame, il pelo dell'addome è stato rasato, la pelle pulita con alcool isopropilico al 70 % ed è stato applicato il gel ecografico. I gatti sono stati contenuti manualmente e nessuno è stato sottoposto ad anestesia per evitare alterazioni dell'esame dovute a modificazione dell'apparato cardiocircolatorio indotte da sedazione o anestesia. L'addome è stato esaminato tramite ecografia B-mode 2D tempo reale utilizzando una sonda microconvex a multifrequenza 5-8 MHz. Il tratto

gastroenterico è stato inoltre valutato tramite l'uso di una sonda lineare multifrequenza 3-9 MHz. I pazienti, sono stati poi posizionati in decubito laterale destro ed è stata selezionata un'ansa digiunale molto superficiale per la valutazione tramite esame color Doppler e CEUS (Contrast Enhanced Ultrasound). In seguito, un segmento a pattern mucoso è stato scelto e visualizzato in asse trasverso. La valutazione color Doppler è stata effettuata utilizzando un filtro di parete basso e un "pulse repetition frequency" (PRF) di 300 Hz. Il guadagno è stato modificato manualmente in modo dinamico durante l'esame per migliorare la visualizzazione dei vasi sanguigni cercando di evitare la formazione di artefatti.

In seguito è stato attivato un software contrasto-specifico (*Pulse Inversion Harmonic and Power Modulation combined* – PMPI) con un indice meccanico basso (0,07). Il mezzo di contrasto (Sonovue®) è stato inoculato manualmente in un unico bolo alla dose di 0,5 ml tramite un catetere endovenoso da 22 G posizionato a livello della vena cefalica, seguito poi da un altro bolo rapido di soluzione fisiologica alla dose di 4 ml. Attraverso la modalità "fianco a fianco" è stato possibile visualizzare sia l'immagine in B-mode che quella con software contrasto-specifico. Il guadagno dell'immagine contrasto-specifica è stato poi regolato in modo da ottenere una parete intestinale il più anecogena possibile eccetto che per la tonaca sierosa e il lume intestinale che apparivano iperecogeni. L'acquisizione dell'immagine è stata effettuata registrando un video di 180 secondi in formato DICOM. Tutti i filmati sono stati salvati su una memoria esterna per le successive analisi *off line*.

Il grado di enhancement della parete intestinale è stato valutato soggettivamente come adeguato/inadeguato in corrispondenza del picco di intensità. Si è proceduto inoltre a definire il rapporto E/W (Serra et al., 2007), dove E corrisponde allo spessore di

enhancement maggiore e W alla distanza tra la superficie più esterna della parete e l'interfaccia lume-mucosa nell'immagine B-mode misurati entrambi in millimetri.

Le valutazioni qualitative sono state eseguite durante tutte e tre le fasi di perfusione della parete (precoce, picco di *enhancement*, fase tardiva) affiancando l'immagine in scala di grigi a quella contrasto specifica (**FIG. 4-5**).

Le analisi quantitative sono state effettuate mediante l'impiego di software commerciale (Qlab[®]). Una regione di interesse (ROI) è stata disegnata manualmente per raccogliere al suo interno la porzione più ampia della sezione trasversa dell'intestino. La regione di interesse è stata poi mantenuta in posizione con l'opzione di compensazione del movimento del programma utilizzato ("*Motion Compensation*", MC) che permette di mantenere sul segmento intestinale la ROI nonostante i movimenti dati dagli atti respiratori. In più, la ROI è stata manualmente aggiustata nei *frames* in cui nemmeno l'MC era sufficiente a compensare il movimento respiratorio. Valori ascrivibili ad artefatti (per esempio quelli derivanti da tessuti circostanti che erroneamente entravano nella regione di interesse o il passaggio di bolle di gas) sono stati rimossi manualmente dai dati finali. I dati grezzi ottenuti da ciascun gatto sono stati rappresentati con una curva intensità-tempo. Le variabili di perfusione raccolte sono: il tempo di arrivo (AT *arrival time*), definito come il momento in cui la quantità di mezzo di contrasto aumenta rispetto la linea basale nel grafico intensità-tempo; tempo al picco di *enhancement* dal momento della iniezione ("*Time To Peak from injection*", TTPinj) e il tempo al picco da quando il mezzo di contrasto inizia ad incrementare ("*TTP from initial rise*", TTPinr); *base intensity* (BI), *peak intensity* (PI), l'inclinazione del *wash in* (Wi) e del *wash out* (Wo). Wi e Wo sono stati calcolati utilizzando i dati dal 20% al di sopra della *baseline* al 20% al di sotto del picco in modo tale da escludere variabilità legata ai punti di

concavità e convessità della curva. I dati sono stati analizzati e la linearità è stata considerata significativa per $p < 0.01$ (Prism 5[®]). I dati per ogni variabile sono stati calcolati utilizzando un programma statistico commerciale, inclusi media e deviazione standard (Microsoft Excel).

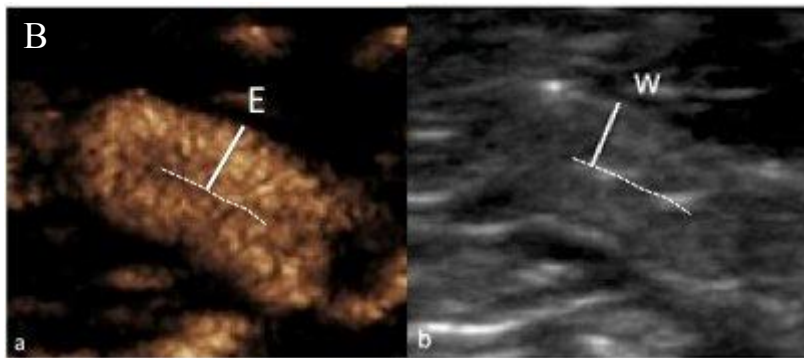
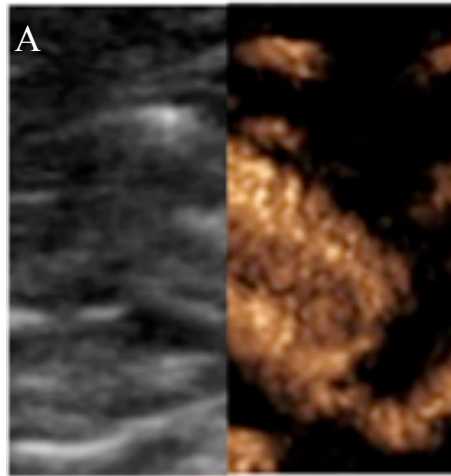


FIGURA 4-5: Esempio di rapporto E/W. Immagine con mezzo di contrasto (sinistra) e immagine in scala di grigi (destra) al picco di *enhancement*. E è lo spessore maggiore di enhancement all'esame CEUS, mentre W è lo spessore di parete compreso tra lo strato più esterno di parete e l'interfaccia della superficie mucosa. La linea tratteggiata rappresenta l'interfaccia della superficie mucosa.

4.1.2 RISULTATI

4.1.2.1 ANALISI QUALITATIVA

L'esame color Doppler della parete intestinale ha mostrato l'assenza del segnale all'interno della parete stessa in tutti i gatti normali. In quattro gatti sono stati evidenziati dei vasi mesenteriali in entrata alla parete mesenteriale. Per quanto riguarda l'enhancement parietale questo è risultato soddisfacente in nove gatti. In un soggetto la captazione del mezzo di contrasto a livello della parete è stata ritenuta inadeguata probabilmente conseguente a un mal posizionamento del catetere endovenoso. Per quanto riguarda l'analisi qualitativa, nei pazienti normali, durante la somministrazione del mezzo di contrasto, le arterie digiunali sono state facilmente identificate e si è notato un rapido e intenso enhancement dello strato sieroso e sottomucoso della parete intestinale. Questa fase è stata poi seguita da un graduale *enhancement* di tutta la parete. Al picco di *enhancement* è stata individuata una perdita della distinzione degli strati di parete mentre nella fase tardiva c'è stato un graduale "*wash out*" della parete intestinale. Lo strato sottomucoso in tutti gli esami effettuati su soggetti normali è stato l'ultima a subire il "*wash out*". Il pattern di perfusione sopradescritto è stato riscontrato in tutti i gatti normali (**FIG. 6**). La media dell'E/W ratio era 0,92 (SD \pm 0,09).

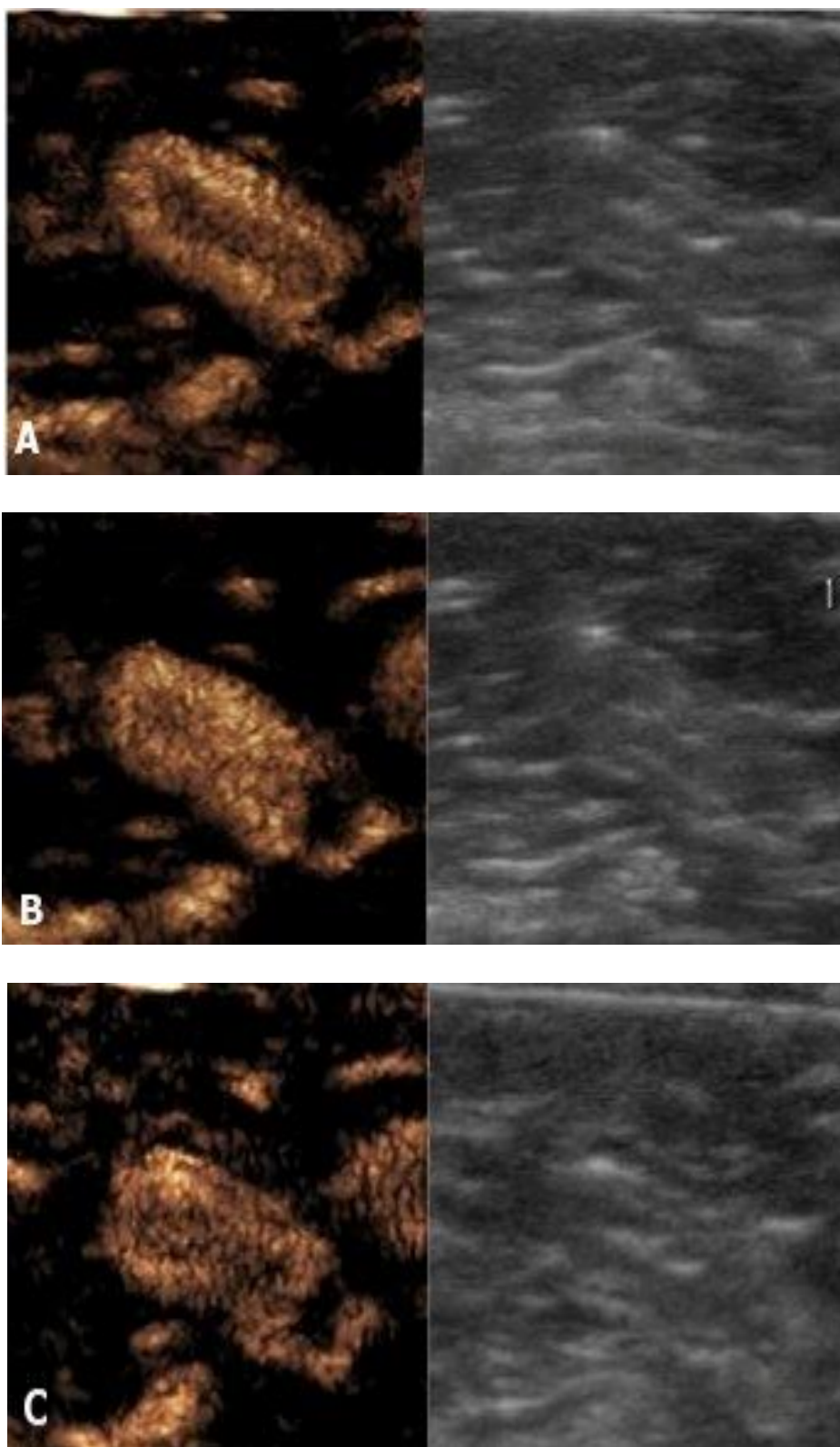


FIGURA 6: Analisi qualitativa della parete di un'ansa digiunale. A) *Enhancement* dello strato sieroso e di quello sottomucoso in fase iniziale. B) *Enhancement* completo della parete al picco: non sono più riconoscibili gli strati. C) Fase di *wash out*: lo strato sottomucoso rimane evidente.

4.1.2.2 ANALISI QUANTITATIVA

L'analisi quantitativa dell'enhancement della parete intestinale è stata effettuata in 9 gatti su 10. I risultati dei parametri analizzati sono riportati in tabella 1. I dati relativi al W_i e al W_o erano significativamente correlati secondo la regressione lineare ($p < 0.01$). Il coefficiente di correlazione (r^2) della linea di regressione variava da 0,77 a 0,98.

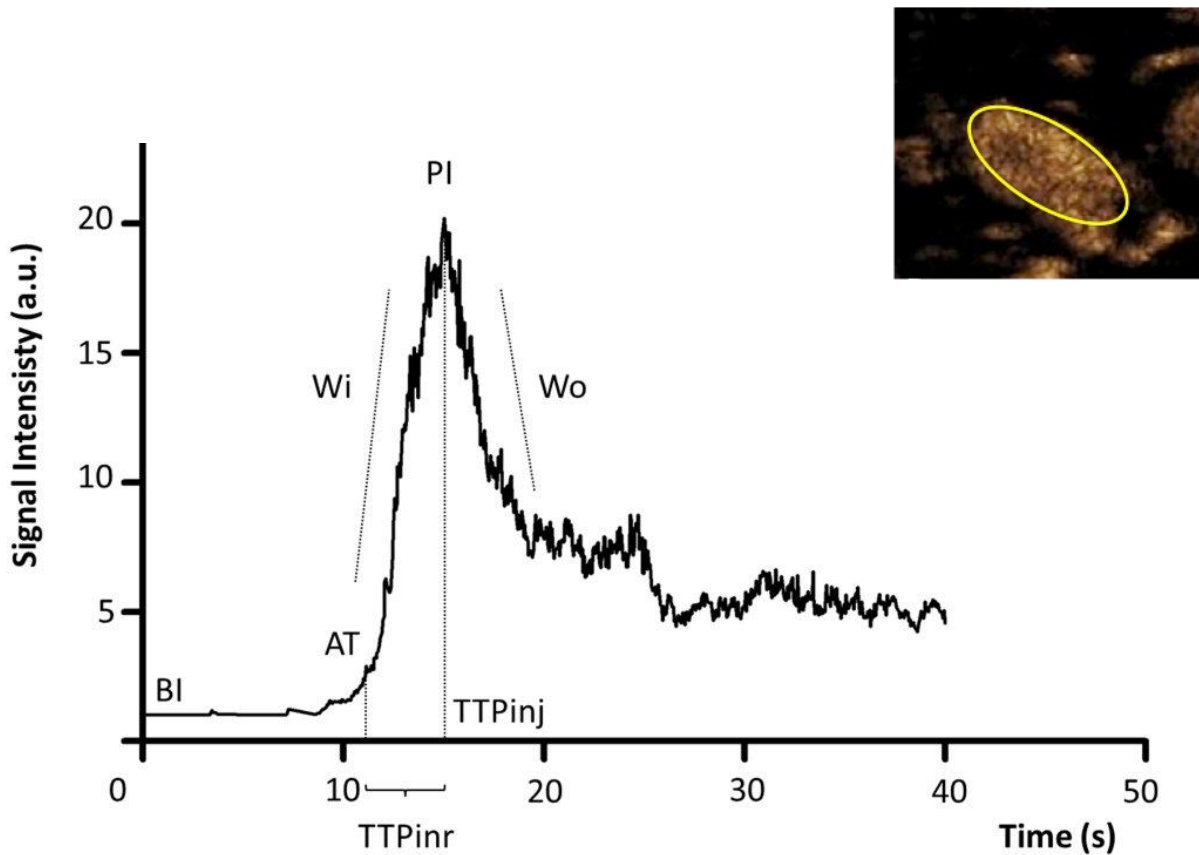


FIGURA 7: Esempio di curva intensità-tempo di un'ansa digiunale di gatto (asse x : tempo in secondi [s]; asse y : intensità segnale in *arbitrary units* [a.u.]). Esempio rappresentativo ottenuto da uno dei gatti dello studio. Si nota l'incremento dell'enhancement fino al picco di intensità. AT, arrival time; BI, baseline intensity; TTPinj, time to peak from injection; PI, peak intensity; TTPinr, time to peak from

PARAMETRO	MEDIA	DS
AT (s)	7.64	2.23
BI (a.u.)	1.04	0.04
TTPinj (s)	10.74	2.08
PI (a.u)	8.92	3.72
TTPinr (s)	3.1	1.15
Wi (a.u./s)	2.06	0.70
Wo (a.u./s)	-1.07	0.91

TABELLA 1: Risultati (media e deviazione standard) dei dati quantitativi dell'esame CEUS sull'intestino di gatti normali.

AT, arrival time; BI, baseline intensity; TTPinj, time to peak from injection; PI, peak intensity; TTPinr, time to peak from initial rise; Wi, wash-in rate; Wo, wash-out rate. S, seconds, a.u., arbitrary units.

4.1.3 DISCUSSIONE

L'architettura microvascolare della parete del piccolo intestino è composta da due differenti letti capillari paralleli, dei quali uno è il plesso mucoso-sottomucoso e l'altro è il muscolare-sieroso (Lundgren et al. 1967, Piasecki et al. 1986, Kampp et al. 1968). Nella parete intestinale del gatto, in condizioni di riposo, circa l'80% del flusso sanguigno è distribuito alla mucosa-sottomucosa e il 20% alla muscolare-sierosa (Lundgren et al. 1974, Granger et al. 1979). In modo particolare, i vasi di dimensioni maggiori (30-80 μm di diametro), sono localizzati nello strato sottomucoso, mentre il plesso di dimensioni minori risiede nella *muscularis mucosae* (Kampp et al. 1968). Le arterie della mucosa si dividono a stella in branche che poi si ramificano nello strato mucoso. Ogni villo è nutrito da un singolo vaso arterioso che scorre al centro del villo stesso. In prossimità dell'apice del villo, il vaso centrale si arborizza in una densa rete capillare che poi vengono raccolti nelle vene localizzate alla base del villo (Premen et al. 1987, Lundgren et al. 1974, Granger et al. 1979).

Il Doppler Colore non è stato in grado di rilevare il flusso sanguigno dei vasi intramurali in tutti i gatti del nostro studio. Solo dai vasi mesenteriali adiacenti la parete, il Doppler Colore ha rilevato un segnale. In medicina umana, questa tecnica è stata utilizzata per valutare la vascolarizzazione dell'intestino di pazienti con malattia di Crohn. Questi studi hanno dimostrato che, i segmenti intestinali patologici, mostrano un aumento del numero e del calibro dei vasi sanguigni intramurali (Spalinger et al. 2000, Esteban et al. 2001, Scholbach et al. 2004). E' stato inoltre dimostrato un incremento del flusso sanguigno nei principali vasi splanchnici sia nell'uomo (Spalinger et al. 2000, Esteban et al. 2001, Scholbach et al. 2004) che nei cani (Gaschen et al. 2007 e 2008),

nei soggetti affetti da malattia infiammatoria intestinale. Anche nel nostro studio si dimostra come il diametro e la lentezza del flusso sanguigno dei normali vasi intramurali della parete intestinale, siano limitanti per il Doppler Colore come già appurato in altri studi (Browne et al. 2004).

L'ultrasonografia con mezzo di contrasto ha rilevato un *pattern* di perfusione della parete caratterizzato da un rapido e più intenso *enhancement* dello strato sieroso e sottomucoso, seguito da un completo e intenso *enhancement* di tutta la parete. In fase tardiva si rileva un graduale *wash-out* della parete. Abbiamo inoltre notato che lo strato sottomucoso è l'ultimo a mostrare un *wash-out*, presentando ancora mezzo di contrasto al suo interno quando negli altri strati è praticamente ormai assente. Questo pattern, che è stato riscontrato in tutti i gatti del nostro studio, è fortemente correlato con la distribuzione anatomica dei vasi intramurali (Kampp et al. 1968, Granger et al. 1979). Il più rapido *enhancement* dello strato sottomucoso dipende dalla presenza al suo interno di ricchi plessi sanguigni che drenano l'80% del totale del sangue destinato alla vascolarizzazione intramurale intestinale (Kampp et al. 1968, Granger et al. 1969, Premen et al. 1987). Allo stesso modo, il più lento *wash-out* dello strato sottomucoso comparato con gli altri strati può essere spiegato dalla forma tortuosa dei capillari a questo livello che rallentano il transito del flusso sanguigno.

L' E/W ratio media è stata di 0,92 e ciò indica un quasi completo *enhancement* della parete dallo strato mucoso fino a quello sieroso. Abbiamo inoltre ottenuto una buona qualità della curva intensità-tempo in nove gatti su dieci. A causa del ridotto spessore della parete intestinale normale dei gatti ($2,41 \pm 0,14$ mm), abbiamo deciso di disegnare una sola ROI che comprendesse tutti gli strati della parete. Di conseguenza, I risultati si

basano su un valore medio ottenuto da tutta la parete intestinale piuttosto che dalla vascolarizzazione di ogni singolo strato.

Con l'analisi quantitativa sono state ottenute delle curve intensità-tempo di buona qualità. I punti nel diagramma intensità-tempo mostrano una distribuzione lineare sia nella parte di "upslope" della curva, sia nella parte di "downslope". Un secondo piccolo picco di enhancement in fase tardiva conseguente alla riperfusione intestinale è stato osservato in tutte le curve.

Questi valori sono stati esclusi dalla misurazione del W_0 per esaminare solo il primo transito delle microbolle nella parete intestinale.

Alcuni dei risultati CEUS quantitativi osservati nei nostri gatti (AT, TTPinj e TTPinr) sono leggermente superiori a quelli riportati in uno studio recente (Leinonen et al. 2010). In questo studio l'autore ha analizzato la perfusione di organi normali incluso il piccolo intestino in gatti sani anestetizzati. La sedazione e l'anestesia sono stati volontariamente evitati nei gatti del presente studio per ottenere valori di base non influenzati da modificazioni iatrogene della pressione e della frequenza cardiaca. La sedazione e l'anestesia influenzano la perfusione di numerosi organi (Leinonen et al. 2010, Brown et al. 1991, Magoon et al. 1998). In studi recenti sull'effetto dell'anestesia sugli studi CEUS della milza del gatto, gli autori riportano un AT più lungo nei gatti anestetizzati rispetto quelli non anestetizzati (Leinonen et al. 2010). Al contrario, i soggetti sotto anestesia mostrano un tempo inferiore di *peak* enhancement durante lo studio CEUS di fegato e reni nel cane (Nyman et al., 2005, Leinonen et al., 2010). L'impatto della anestesia sulla perfusione degli organi dipende dalle caratteristiche degli agenti anestetici (tipo e dose) e dalle strutture vascolari e flusso sanguigno di ogni organo (Leinonen et al., 2010). Sono comunque necessari degli studi addizionali su gatti

non anestetizzati per stabilire come l'anestesia influenzi i tempi del mezzo di contrasto della parete intestinale.

Altri fattori possono influenzare le variabili quantitative dello studio ecocontrastografico, come la tecnica di scansione (settaggio del *gain*, indice meccanico, profondità della struttura da analizzare), caratteristiche del mezzo di contrasto (tipo e volume) e la modalità di iniezione (utilizzo del trevie, volume della soluzione salina usata per il *flush*, rapidità della somministrazione) e fattori relativi al paziente (frequenza cardiaca, pressione sanguigna, frequenza respiratoria) (Nyman et al., 2005, Wllaer et al., 2007, Leinonen et al., 2010, Leinonen et al., 2010, Mule et al., 2008, Li et al., 2005, Sonne et al., 2003). Il valore del *peak intensity* nei nostri pazienti sono inferiori a quelli riportati nello studio di Leinonen et al. L'utilizzo di differenti mezzi di contrasto implica un numero differente di microbolle in circolo e, di conseguenza, una differente risposta di *backscatter* dai tessuti che influenza il grado di *contrast enhancement* (Nyman et al., 2005, Jimenez et al., 2011, Mule et al., 2008, Sonne et al., 2003). Differenze nelle unità e scale di misura tra le differenti metodiche (dB vs unità video-intensità) possono complicare le comparazioni (Nyman et al., 2005, Waller et al., 2007). Per di più, l'indice meccanico influenza la quantità di microbolle che vengono distrutte e l'ampiezza del segnale armonico (Waller et al., 2007, Mule et al., 2008, Sonne et al., 2003). Per i motivi sopra descritti, valori quantitativi ottenuti da protocolli differenti non sono completamente comparabili, come dimostrato in altri studi (Waller et al., 2007, Mule et al., 2008, Leinonen et al. 2010, Mule et al., 2008, Leinonen et al., 2010, Li et al., 2005, Sonn et al., 2003).

Si consiglia il digiuno di almeno 12 ore prima dell'esame CEUS dell'intestino per rendere minima la presenza di gas che crea una forte interferenza durante l'attivazione

del *software* contrasto-specifico. Inoltre, il digiuno è indicato per ridurre l'attività peristaltica che limita lo studio quantitativo a causa dell'artefatto da movimento.

4.2 PARTE SECONDA: STUDIO SU GATTI AFFETTI DA LINFOMA GASTROINTESTINALE

4.2.1 MATERIALI E METODI

In questo gruppo sono stati inclusi soggetti che rispondevano ai seguenti criteri: alterazione ecografica intestinale riferibile a linfoma e conferma citologica e/o istologica dello stesso.

Nei gatti affetti da linfoma intestinale il decubito è stato scelto sulla base al tratto dell'apparato gastroenterico affetto.

Sulle immagini ecografiche bidimensionali acquisite sono state effettuate le seguenti valutazioni:

- Classificazione sulla base di pattern ecografici riportati in bibliografia (Penninck et al., 1998). In particolare, in questo lavoro vengono riconosciuti sei tipologie ecografiche di linfoma alimentare: il trasmurale circumferenziale simmetrico, il trasmurale circumferenziale asimmetrico, il trasmurale voluminoso (“*bulky*”), trasmurale nodulare, trasmurale segmentale e l’infiltrante la mucosa. Studi recenti hanno dimostrato la possibilità che il linfoma si manifesti da un punto di vista ecografico esclusivamente come ipertrofia dello strato muscolare (Zwingenberger et al., 2010) e per questo motivo lo abbiamo aggiunto a questa classificazione (**FIG. 8**);
- Misurazione dello spessore della parete alterata;

- Misurazione della lunghezza dell'estensione della lesione;
- Valutazione dei linfonodi tributari;
- Rilievo di altre alterazioni ecografiche.

L'esame Color Doppler ed ecocontrastografico sulla parete alterata sono stati effettuati utilizzando lo stesso protocollo descritto per il gruppo di gatti sani.

La modalità di presa di contrasto della parete è stata classificata quindi in omogenea e disomogenea sulla base della distribuzione del mezzo di contrasto stesso.

Come nei soggetti sani, le valutazioni quantitative, sono state effettuate con l'impiego del software commerciale Qlab[®]. Quando possibile, la ROI è stata disegnata manualmente per raccogliere al suo interno la porzione più ampia della porzione trasversa dell'intestino. Quando invece la parete si presentava gravemente alterata, la ROI è stata disegnata solo su una parte di parete, sempre il più ampia possibile. In questo caso, oltre evitare gli artefatti da presenza di gas, si è cercato di scegliere una posizione della ROI che non comprendesse i grossi vasi tortuosi già evidenziabili all'esame color Doppler. Le variabili quantitative (TTPin_j, TTPin_r, BI, PI, Wi e Wo) sono state analizzate secondo la procedura precedentemente descritta per i soggetti sani.

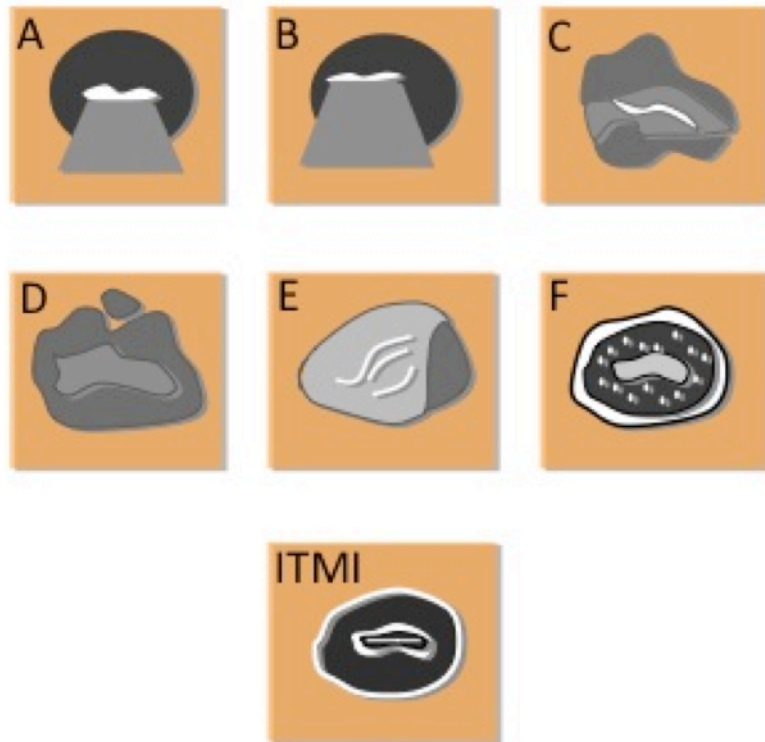


FIGURA 8: Classificazione ecografica dei linfomi alimentari modificata (Penninck et al. 1998). A) Transmurale circumferenziale simmetrico. B) Transmurale circumferenziale asimmetrico. C) Transmurale voluminoso (“*bulky*”). D) Transmurale nodulare. E) Transmurale segmentale. F) Infiltrante la mucosa. ITMI Ipertrafia della tonaca muscolare intestinale.

4.2.2 RISULTATI

4.2.2.1 VALUTAZIONE B-MODE E COLOR DOPPLER

Sono stati selezionati per lo studio 13 gatti, dei quali 12 di razza europea e uno Siamese con un peso medio di 4,4 Kg (SD \pm 1,7 Kg) e un'età media di 13,4 anni (SD \pm 3,5). Di questi 13 gatti, 5 erano maschi castrati, 3 femmine sterilizzate, 3 maschi interi e 1 femmina intera.

I risultati relativi alle valutazioni ecografiche vengono riportati nella tabella 2. Lo spessore medio era di 8,02 mm (SD \pm 5,33 mm) e le alterazioni si estendevano per una lunghezza media di 12,45 mm (SD \pm 11,31 mm). Sono state inoltre riscontrate alterazioni a livello linfonodale: 5 gatti su 13 presentava un aumento delle dimensioni dei linfonodi colici (ampiezza media 7,38 mm SD \pm 4,37) dei quali 2 mostravano un parenchima diffusamente ipoecogeno ed una forma rotondeggiante, 1 solo aveva un parenchima disomogeneo mentre i restanti non presentavano alterazioni di ecogenicità. Tre gatti su 13 hanno mostrato un aumento di dimensioni dei linfonodi digiunali (media: 7,6 mm – SD: \pm 4,6) con parenchima di aspetto nei limiti della norma.

All'esame Color Doppler, in tutte le anse intestinali affette da linfoma alimentare è stata individuata una vascolarizzazione intramurale intensa e con vasi di diametro variabile e che presentavano frequentemente artefatto da *aliasing*.

SOGGETTO	ASPETTI ULTRASONOGRAFICI					
	CLASSIFICAZIONE	LOCALIZZAZIONE	SPESSORE PARETE (mm)	ESTENSIONE (mm)	LINFONODI	ALTRO
1	ITMI FOCALE	DIGIUNO	6,3	38,8	NN	
2	TRANSM. CIRCUM. ASIMMETRICO	DIGIUNO	4,9	28,4	P	
3	TRANSM. CIRCUM. SIMMETRICO	DIGIUNO	4,4	80	NN	ITM DIFFUSA E CORPO ESTRANEO
4	ITMI FOCALE	DUODENO	5,5	17,1	P	
		ILEO	6,7	15,3		
5	TRANSM. CIRCUM. SIMMETRICO	COLON	6,6	22	P	ITM DIFFUSA
		CIECO	5,7	10		
6	TRANSM. CIRCUM. ASIMMETRICO	DIGIUNO	6,6	33,6	P	
7	TRANSM. CIRCUM. SIMMETRICO	DIGIUNO	16,2	48,6	P	
8	TRANSM. CIRCUM. SIMMETRICO	COLON	19	29,7	NN	
9	TRANSMURALE BULKY	DIGIUNO	18,5	47	P	
10	TRANSM. CIRCUM. SIMMETRICO	DIGIUNO	4,7	50	P	
11	TRANSM. CIRCUM. SIMMETRICO	DIGIUNO	6,7	22	P	GAS LIBERO IN ADDOME
12	TRANSM. CIRCUM. SIMMETRICO	DIGIUNO	7,1	30	P	PERITONITE FOCALE
13	TRANSM. CIRCUM. ASIMMETRICO	DIGIUNO	1,4	31	NN	

TABELLA 2: tabella riassuntiva dei dati raccolti all'esame ecografico in scala di grigi nei gatti affetti da linfoma gastrointestinale. NN = nella norma P = patologico.

4.2.2.2 STUDIO CEUS: ANALISI QUALITATIVA

Dieci gatti su 13 presentavano una distribuzione omogenea del mezzo di contrasto mentre i restanti 3 presentavano una distribuzione disomogenea.

Questo studio ha permesso di descrivere nei soggetti con distribuzione omogenea del mezzo di contrasto, due tipologie di *pattern*: *pattern* a raggiera (presenza di vasi che si dipartono dallo strato sieroso e convergono verso il lume intestinale e che scorrono all'interno di un tratto di parete ipovascolare) e un *pattern* a "binario" dove uno strato di parete periferico e uno strato più interno a contatto con il lume intestinale appaiono ipervascolari rispetto la parte centrale della parete (due cerchi ipervascolari concentrici intervallati da un cerchio ipovascolare)(**FIG. 9**). Sulla base di questa classificazione e sui *pattern* descritti abbiamo individuato: 4 distribuzioni omogenee del mezzo di contrasto in tutta la parete senza evidenza di *pattern*, 3 distribuzioni omogenee con *pattern* a binario, 2 con *pattern* raggiera e un soggetto presentava nel tratto duodenale una distribuzione omogenea senza alcun *pattern* mentre nell'ileo una distribuzione omogenea con aspetto a binario. Tre gatti presentavano una distribuzione disomogenea del mezzo di contrasto (**FIG. 10**).

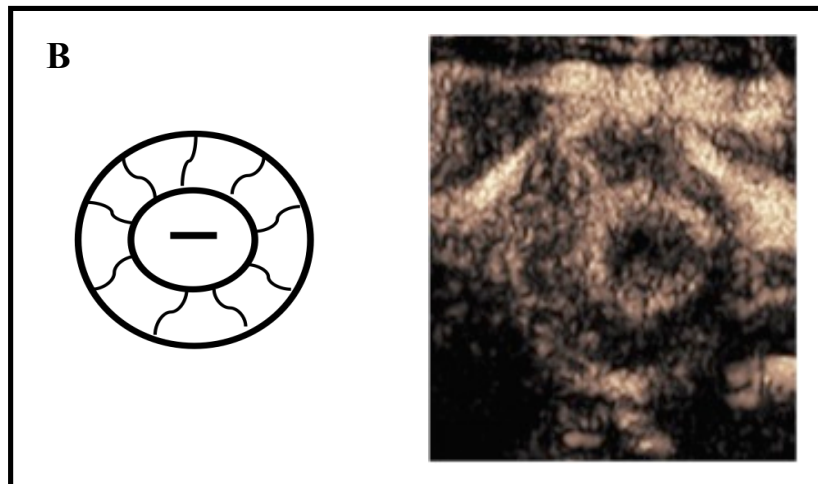
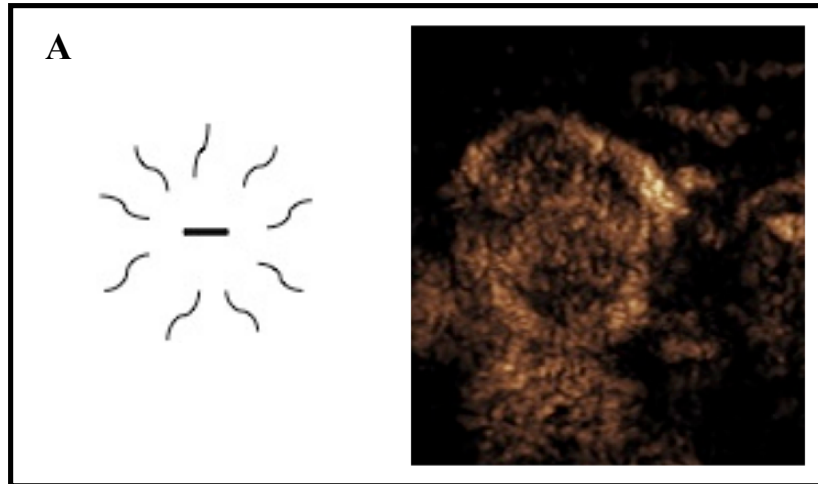


FIGURA 9: Anse intestinali con distribuzione omogenea del mezzo di contrasto. Illustrazione schematica dei due *pattern* rilevati nell'analisi qualitativa; A) *pattern* a raggiera con vasi che si distribuiscono in modo centripeto dalla periferia al centro. B) *pattern* a binario con due cerchi ipervascolari concentrici.

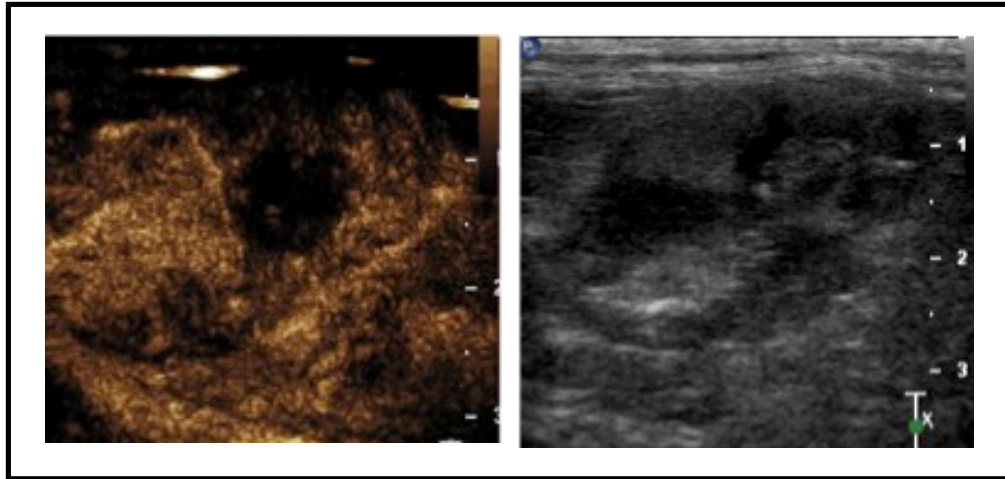


FIGURA 10: Ansa intestinale affetta da linfoma intestinale. Immagine ecocontrastografica sulla sinistra e contemporanea Esemplio di distribuzione disomogenea del mezzo di contrasto all'interno della parete.

4.2.2.3 STUDIO CEUS: ANALISI QUANTITATIVA

L'analisi quantitativa dell'enhancement della parete intestinale affetta da linfoma è stata effettuata in 12 gatti su 13. I risultati dei parametri analizzati sono riportati in tabella 3. I dati relativi al W_i e al W_o erano significativamente correlati secondo la regressione lineare ($p < 0.01$). Il coefficiente di correlazione (r^2) della linea di regressione variava da 0,78 a 0,99.

PARAMETRO	MEDIA	DS
AT (s)	4,74	1,66
BI (a.u.)	1,02	0,01
TTPinj (s)	8,36	1,12
PI (a.u)	11,39	4,82
TTPinr (s)	3,72	1,12
W_i (a.u./s)	3,53	0,99
W_o (a.u./s)	- 1,52	0,69

TABELLA 3: Risultati (media e deviazione standard) dei dati quantitativi dell'esame CEUS sull'intestino di gatti affetti da linfoma gastrointestinale.

AT, arrival time; BI, baseline intensity; TTPinj, time to peak from injection; PI, peak intensity; TTPinr, time to peak from initial rise; W_i , wash-in rate; W_o , wash-out rate. S, seconds, a.u., arbitrary units.

4.2.3 DISCUSSIONE

L'ecografia in modalità B-mode non è sufficiente per giungere ad una diagnosi di linfoma gastrointestinale, ma fornisce comunque informazioni necessarie alla diagnosi e permette di effettuare eventualmente delle agoaspirazioni sotto guida ecografica delle lesioni individuate. Nel nostro studio è stato possibile classificare le alterazioni ecografiche secondo lo schema precedentemente pubblicato da Penninck et al. Anche nel nostro studio, come dimostrato da Zwingenberger et al. nel 2010, il linfoma gastrointestinale si è manifestato in 5 soggetti con una ipertrofia della tonaca muscolare focale o diffusa. Tre soggetti su 13 hanno mostrato caratteristiche ecografiche miste, implicando più classificazioni per un unico paziente. Nel caso in cui l'ITMI sia stata associata ad altre lesioni focali intestinali neoplastiche, è possibile che essa sia secondaria ad un quadro sub-occlusivo e non conseguente alla diretta infiltrazione neoplastica dell'ansa intestinale (Diana et al., 2003).

L'angiogenesi è un importante processo controllato da numerosi fattori endogeni proangiogenetici positivi come il *vascular endothelial growth factor-2* (VEGF) e da fattori endogeni inibitori come il *trombospondin-1*, l'angiostatina e l'endostatina (Folkman, 1996). Sebbene studi abbiano dimostrato che la malignità di una neoplasia può essere legata anche ad una via non-angiogenetica (Ribatti et al., 2003), l'angiogenesi gioca comunque un ruolo fondamentale nell'aggressività del tumore.

Nello studio di Ranieri et al. del 2005 si dimostra che anche il linfoma non-Hodgkin di cane, come altre patologie neoplastiche, ha una malignità proporzionale alla densità microvascolare e all'area endoteliale. In modo particolare i linfomi ad alto grado

mostrano una densità microvascolare e un'area endoteliale maggiore rispetto i linfomi a basso grado.

Nel nostro studio, nei soggetti sani non è stato possibile individuare tramite esame Color Doppler dei segnali di vascolarizzazione intramurale. Al contrario, nei gatti con linfoma gastrointestinale, è stata rilevata in tutti i soggetti la presenza di un intenso segnale intramurale, con presenza di vasi ad andamento tortuoso centripeto e con differenti direzioni. Allo stesso modo, nell'esame ecocontrastografico qualitativo, si nota un aumento diffuso della vascolarizzazione di parete con perdita delle fasi vascolari descritte nei soggetti normali e con presenza di vasi tortuosi ben visibili in fase di Wi.

La presenza di un infiltrato neoplastico a carico della parete intestinale può portare a ulcere e perforazioni di parete con conseguente risposta infiammatoria. L'incremento della vascolarizzazione di parete può quindi, in questi casi, essere conseguente anche ad uno stato infiammatorio acuto/cronico che può influenzare sia la valutazione qualitativa che quantitativa all'esame ecocontrastografico. Questo è un limite di questo studio e ulteriori lavori sono necessari per indagare questo aspetto.

Per quanto riguarda i dati quantitativi, l'AT e il TTPinj dei soggetti affetti da linfoma gastrointestinale sono inferiori rispetto quelli dei soggetti sani. Questo dato è secondo noi conseguente all'aumento del metabolismo tissutale neoplastico che richiede un apporto sanguigno arterioso maggiore per unità di tempo rispetto la parete intestinale normale. Questo aspetto è già stato dimostrato ad esempio nei tumori epatici maligni, dove le lesioni neoplastiche presentano un parenchima ipervascolare in fase di *wash in*. La presenza di numerosi vasi neoformati contribuisce alla variazione dei dati quantitativi, ma, come dimostrato in altri studi, il calcolo del volume sanguigno nel

tessuto per unità di tempo non dipende solamente dal letto vascolare, ma anche dal flusso.

Il PI dei gatti con linfoma è maggiore rispetto quello dei gatti normali. Anche questo dato può essere spiegato con l'arrivo di una quantità superiore di sangue nell'unità di tempo rispetto la parete intestinale dei soggetti sani (e quindi di un numero maggiore di microbolle e un aumento dell'intensità del segnale).

Per valutare meglio la perfusione vascolare dei tessuti, alcuni studi utilizzano l'ecografia a intermittenza con mezzo di contrasto (Forsberg et al., 2002). Questa tecnica sembra dare risultati migliori rispetto la normale tecnica "*pulsed-inversion*" utilizzata in questo studio, permettendo di visualizzare meglio la vascolarizzazione e di descrivere il comportamento dinamico del sangue nel tessuto. Altri limiti dello studio sono la mancanza di un monitoraggio cardiocircolatorio (pressione, frequenza cardiaca, elettrocardiogramma) sia nei soggetti sani che in quelli affetti da linfoma gastrointestinale e l'assenza di uno studio statistico comparativo tra soggetti sani e patologici.

4.3 CONCLUSIONI

Questo studio apporta nuove conoscenze nell'ambito dell'ecografia con mezzo di contrasto finalizzata all'indagine dell'apparato gastroenterico.

Sulla base di questo studio la tecnica ecocontrastografica si è infatti dimostrata uno strumento utile per valutare i vasi intramurali dell'intestino normale del gatto e definire quindi il *pattern* di perfusione normale della parete intestinale. Sono altresì stati identificati alcuni *pattern* di perfusione parietale in gatti affetti da linfoma gastrointestinale. Nella nostra conoscenza nessuno studio in precedenza ha descritto le modalità di perfusione di un'ansa intestinale affetta da linfoma.

L'ampliamento della casistica permetterà di confermare la presenza dei pattern descritti, individuarne eventualmente altri e consentirà di rapportare il quadro ecocontrastografico con la diagnosi immunoistochimica di linfoma.

Abbiamo inoltre fornito dati quantitativi relativi alla perfusione delle anse intestinali con mezzo di contrasto ecografico in gatti normali e gatti affetti da linfoma intestinale contribuendo all'ampliamento delle conoscenze sino ad oggi scarse in ambito medico sia umano che veterinario. Sono tuttavia necessari ulteriori studi per descrivere eventuali differenze tra la tecnica ecografica ad intermittenza e la tecnica "*pulsed-inversion*" utilizzata in questo studio e per indagare il ruolo del CEUS nel monitoraggio non invasivo della risposta alla terapia chemioterapica in gatti con linfoma intestinale.

BIBLIOGRAFIA

1. Barone R. Anatomie comparée des mammifères domestiques - Tome 5 Angiologie. Paris: Editions Vigot, 1996.
2. Bauer A, Schlieff R, Zomack M, Urbank A, Niendorf HP. Acoustically stimulated microbubbles in diagnostic ultrasound: properties and implications for diagnostic use. In Nanda NC Schlieff R, Goldbrg BB: *Advances in echo imaging using contrast enhancement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 669-684, 1993.
3. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's Disease activity index: National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*, 70: 439-444, 1976.
4. Bokor D, Imperatori L. Mezzi di contrasto per ecografia. Generalità. In Rabbia C, Matricardi L. *Eco-Color-Doppler vascolare*. Minervia Medica, Torino, 79-89, 2006.
5. Bokor D, Maggioni F. I mezzi di contrasto ecografici intravascolari. In Arienti V. *Ecografia clinica del tratto gastroenterico*. Unimedia, Monterotondo, 49-62, 2006.
6. Bokor D. Diagnostic efficacy of Sonovue. *Am J Cardiol*, 86: 19-24, 2000.
7. Brown MJ, McCarthy TJ, Bennett BT. Long term anesthesia using a continuous infusion of guaifenesin, ketamine and xylazine in cats. *Lab Anim Sci*, 41: 46-50, 1991.

8. Browne JE, Watson AJ, Hoskins PR, Elliot AT. Validation of a sensitivity performance index test protocol and evaluation of color Doppler sensitivity for a range of ultrasound scanners. *Ultrasound Med Biol*, 30: 1475-1483, 2004.
9. Correas JM, Bridal L, Lesavre A, Méjean A., Claudon M, Hélénon O. Ultrasound contrast agents: proprieties, principles of action, tolerance and artefacts. *Eur. Radiol.* 11: 1316-1328, 2001.
10. Delorme S, Weisser G, Zuna I, Fein M, Lorenz A, van Kaick G. Quantitative characterization of color Doppler images: reproducibility, accuracy, and limitations. *J Clin Ultrasound*, 23:537-550, 1993.
11. Denis F, Bougnoux P, de Poncheville L, Prat M, Catroux R, Tranquart F. *In vivo* quantitation of tumour vascularisation assessed by Doppler sonography in rat mammary tumours. *Ultrasound Med Biol*, 28; 431-437, 2002.
12. Di Sabatino A, Fulle I, Ciccocioppo R, Ricevuti L, Tinozzi, FP, Tinozzi S, Campani R, Corazza GR. Doppler enhancement after intravenous levovist injection in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 8: 251-7, 2002.
13. Diana A, Pietra M, Guglielmini C, Boari A, Bettini G, Cipone M. Ultrasonographic and pathological features of intestinal smooth muscle hypertrophy in four cats. *Vet Radiol Ultrasound*, 44; 566-569, 2003.
14. Elpek G, Gelen T, Aksoy NH, Erdoğan A, Dertsiz L, Demircan A, Keleş N. The prognostic relevance of angiogenesis and mast cell in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *J Clin Pathol* 54: 940-944, 2001.
15. Esteban JM, Maldonado I, Sanchiz V, Minguez M, Benages A. Activity of Crohn's disease assessed by colour Doppler ultrasound analysis of the affected loops. *Eur Radiol* 11: 1423-8, 2001.

16. Fein M, Delorme S, Weisser G, Zuna I, van Kaick G. Quantification of color Doppler for the evaluation of tissue vascularization. *Ultrasound Med Biol* 28: 445-451, 2002.
17. Fleischer AC, Wojcicki WE, Donnelly EF, Pickens DR, Thirsk G, Thurman GB, Hellerqvist CG. Quantification Color Doppler sonography of tumour vascularity in an animal model. *J Ultrasound Med*, 18; 547-551, 1999.
18. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. *Nat Med* 1: 27-31, 1995.
19. Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nat Med*, 2: 209-215, 1996.
20. Forsberg F, Dicker AP, Thakur ML, Rawool NM, Liu JB, Shi WT, Nazarian LN. Comparing contrast enhanced ultrasound to immunohistochemical markers of angiogenesis in a human melanoma xenograft model: preliminary results. *Ultrasound Med Biol*, 28; 445-451, 2002.
21. Foster FS, Burns PN, Simpson DH, Wilson SR, Christopher DA, Goertz DE. Ultrasound for the visualization and quantification of tumor microcirculation. *Cancer Metastasis Rev* 19: 131-138, 2000.
22. Frinking PJA, Bouakaz A, Kirkhorn J, Cate FJT, Jong N. Ultrasound contrast imaging: current and new potential methods. *Ultrasound Med. Biol.* 26 (6): 965-975, 2000.
23. Gaschen L, Kircher P, Stüssi A, Allenspach K, Gaschen F, Doherr M, Gröne . Comparison of Ultrasonographic Findings with Clinical Activity Index (CIBDAI) and Diagnosis in Dogs with Chronic Enteropathies. *Vet Radiol Ultrasound*, 49: 56-64, 2008.

24. Gaschen L, Kircher P. Two-dimensional grayscale ultrasound and spectral Doppler waveform evaluation of dogs with chronic enteropathies. *Clin Tech Small Anim Pract*, 22: 122-127, 2007.
25. Giraud GD, Sahn DJ. Behavior of echocontrast microbubbles in the microvasculature. In Nanda NC, Schlieff R, Goldbrg BB. *Advances in echo imaging using contrast enhancement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 133-137, 1993.
26. Goertz DE, Christopher DA, Yu JL, Kerbel RS, Burns PN, Foster F. High frequency color flow imaging of the microcirculation. *Ultrasound Med Biol* 26: 63-71, 2000.
27. Granger DN, Taylor AE. Volumetric assessment of the capillary filtration coefficient in the cat small intestine. *Pfluegers Arch Eur J Phy* 1979; 381: 25-33
28. Greis C. Technology overview: Sonovue (Bracco, Milan). *Eur Radiol. Suppl.* 14 (8): 11-15, 2004.
29. Heimann R, Ferguson D, Gray S, Hellman S. Assessment of intratumoral vascularization (angiogenesis) in breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 52: 147-158, 1998.
30. Imperatori L. Mezzi di contrasto per ecografia. In Rossi S., Calliada F., Martegnani A. *Mezzi di contrasto per ecografia*. Poletto, Milano, 21-26, 2004.
31. Iordanescu I, Becker C, Zetter B, Dunning P, Taylor GA. Tumor vascularity: evaluation in a murine model with contrast enhanced color Doppler US – effects of angiogenesis inhibitors. *Radiology* 222; 460-467, 2002.

32. Jiménez DA, O'Brien R, Wallace JD, Klocke E. Intraoperative contrast-enhanced ultrasonography of normal canine jejunum. *Vet Radiol Ultrasound*, doi: 10.1111/j.1740-8261.2010.01767.x; 2011.
33. Jin-Mei G, Shao-Shan T, Wei F, Rong F. Signet-ring cell carcinoma of ampulla of Vater: contrast-enhanced ultrasound findings. *World J Gastroenterol*, 21; 888-891, 2009.
34. Kampp M, Lundgren O. Blood flow and flow distribution in the small intestine of the cat as analysed by the Kr85 wash-out technique. *Acta Physiol Scand* 1968; 72: 282-297.
35. Koster J, Schlosser T, Pohl C, Lentz C, Lohmaier S, Veltmann C, Kuntz-Hehner S, Omran H, Lüderitz B, Becher H, Tiemann K. Blood flow assessment by ultrasound-induced destruction of echocontrast agents using harmonic power Doppler imaging: which parameters determine contrast replenishment curves? *Echocardiography*, 18; 1-8, 2001.
36. Leinonen MR, Raekallio MR, Vainio OM, Ruohoniemi MO, O'Brien RT. Effect of anaesthesia on contrast-enhanced ultrasound of the feline spleen. *Vet Radiol Ultrasound*, 52: 82-87, 2010.
37. Leinonen MR, Raekallio MR, Vainio OM, Ruohoniemi MO, Biller DS, O'Brien RT. Quantitative contrast-enhanced ultrasonographic analysis of perfusion in the kidneys, liver, pancreas, small intestine, and mesenteric lymph nodes in healthy cats. *Am J Vet Res*, 71:1305–1311, 2010.
38. Li J, Dong B, Yu X, et al. Grey-scale contrast enhancement in rabbit liver with SonoVue at different doses. *Ultrasound Med Biol*, 31: 185–190, 2005.

39. Linka AZ, Sklenar J, Wei K, Jayaweera AR, Skyba DM, Kaul S. Assessment of transmural distribution of myocardial perfusion with contrast echocardiography. *Circulation*, 98; 1912-1920, 2008.
40. Lundgren O. Studies on blood flow distribution and counter current exchange in the small intestine. *Acta Physiol Scand*, 303: 5-42, 1967.
41. Lundgren O. Studies on blood flow distribution and counter current exchange in the small intestine. *Acta Physiol Scand*, 303: 5-42, 1967.
42. Lundgren O. The circulation of the small bowel mucosa. *Gut* 15: 1005-1013, 1974.
43. Maconi G, Sampietro GM, Russo A, Bollani S, Cristaldi M, Parente F, et all. The vascularity of internal fistulae in Crohn's disease: an in vivo power Doppler ultrasonography assessment. *Gut* 50: 496-500, 2002.
44. Magoon KE, Hsu WH, Hembrough FB. The influence of atropine on the cardiopulmonary effects of a xylazine-ketamine combination in dogs. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 293: 143-153, 1988.
45. Masugata H, Peters B, Lafitte S, Strachan GM, Ohmori K, DeMaria AN. Quantitative assessment of myocardial perfusion during graded coronary stenosis by real-time myocardial contrast echo refilling curves. *J Am Coll Cardiol*, 37; 262-269, 2001.
46. Meerbaum S. Microbubble fluid dynamics of echocontrast. In Nanda NC Schlieff R., Goldbrg BB. *Advances in echo imaging using contrast enhancement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 11-38, 1993.

47. Mule S, De Cesare A, Lucidarme O, Frouin F, Herment A. Regularized estimation of contrast agent attenuation to improve the imaging of microbubbles in small animal studies. *Ultrasound Med Biol*, 34: 938–948, 2008.
48. Parente F, Greco S, Molteni M, Anderloni A, Bianchi Porro G. Imaging Inflammatory Bowel Disease using bowel ultrasound. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17: 283-91, 2005.
49. Park KS, Choi BI, Won HJ, Seo JB, Kim SH, Kim TK, Han JK, Yeon KM. Intratumoral vascularity of experimentally induced VX2 carcinoma: comparison of color Doppler sonography, power Doppler sonography, and microangiography. *Invest Radiol* 33: 39-44, 1998.
50. Penninck D. Gastrointestinal tract. In: Penninck D, d'Anjou MA: Atlas of small animal ultrasonography. Iowa: Blackwell publishing, 2008; 281-318.
51. Piasecki C, Wyatt C. Patterns of blood supply to the gastric mucosa. A comparative study revealing an end-artery model. *J Anat*, 149: 21-39, 1986.
52. Powers JE, Burns PN, Souquet J. Imaging instrumentation for ultrasound contrast agents. In Nanda NC Schlieff R., Goldbrg BB. *Advances in echo imaging using contrast enhancement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 11-38, 1993.
53. Premen AJ, Banchs V, Womack WA, Kvietys PR, Granger DN. Importance of collateral circulation in the vascularly occluded feline intestine. *Gastroenterology* 1987; 92: 1215-1219.
54. Quaia E. Contrast-specific ultrasound techniques. *Radiol. Med.* 112 (4):473-490, 2007.

55. Ranieri G, Patruno R, Lionetti A, Di Summa A, Mattioli E, Bufo P, Pellecchia A, Ribatti D, Zizzo N. Endothelial area and microvascular density in a canine non-Hodgkin's lymphoma: an interspecies model of tumor angiogenesis. *Leuk Lymphoma*, 46; 1639-1643, 2005.
56. Ribatti D, Vacca A, Dammacco F. New non-angiogenesis dependent pathways for tumor progression. *Eur J Cancer*, 39: 1835-1841, 2003.
57. Schlief R. Echo enhancing agents: their physics and pharmacology. In Nanda NC Schlief R., Goldbrg BB. *Advances in echo imaging using contrast enhancement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 11-38, 1993.
58. Schlosser T, Pohl C, Veltmann C, Lohmaier S, Goenechea J, Ehlggen A, Köster J, Bimmel D, Kuntz-Hehner S, Becher H, Tiemann K. Feasibility of the flash-replenishment concept in renal tissue: which parameters affect the assessment of the contrast replenishment? *Ultrasound Med Biol*, 27; 937-944, 2001.
59. Scholbach T, Herrero I, Scholbach J. Dynamic color Doppler sonography of intestinal wall in patients with Crohn disease compared with healthy subjects. *J Pediatr Gastr Nutr*, 39: 524-528, 2004.
60. Schroeder R, Hauff P, Bartels T, Vogel K, Jeschke J, Hidajat N, Maeurer J. Tumor vascularization in experimental melanomas: correlation between unenhanced power Doppler imaging and histological findings. *Ultrasound Med Biol*, 27; 761-771, 2001.
61. Serra C, Menozzi G, Labate AMM, Giangregorio F, Gionchetti P, Beltrami M, Robotti D, Fornari F, Cammarota T. Ultrasound assessment of vascularization of the thickened terminal ileum wall in Crohn's disease patients using a low-

- mechanical index real-time scanning technique with a second generation ultrasound contrast agent. *Eur J Radiol*,62: 114-121, 2007.
62. Sonne C, Xie F, Lof J, Oberdorfer J, Phillips P, Carr Everbach E, Porter TR. Differences in definity and optison microbubble destruction rates at a similar mechanical index with different real-time perfusion systems. *J Am Soc Echocardiogr*,16: 1178-1185, 2003.
63. Spalinger J, Patriquin H, Miron M, Marx G, Herzog D, Dubois J, Dubinsky M, Seidman EG. Doppler US in patients with Crohn's disease: vessel density in the diseased bowel reflects disease activity. *Radiology*, 217: 787-791, 2000.
64. Tarjan Z, Toth G, Gyorke T Mester A, Karlinger K, Makó EK. Ultrasound in Crohn's Disease of the small bowel. *Eur J Radiol*, 35:176-82, 2000.
65. Ushijima C, Tsukamoto S, Yamazaki K, Yoshino I, Sugio K, Sugimachi. High vascularity in the peripheral region of non-small cell lung cancer tissue is associated with tumor progression. *Lung Cancer* 34: 233-241, 2001.
66. Wakefield AJ, Sawyer AM, Dhillon AP, Pittilo RM, Rowles PM, Lewis AA, Pounder RE. Pathogenesis of Crohn's disease: multifocal gastrointestinal infarction. *Lancet* 2: 1057-62, 1989.
67. Wei K, Jayaweera AR, Firoozan S, Linka A, Skyba DM, Kaul S. Quantification of myocardial blood flow with ultrasound-induced destruction of microbubbles administered as a constant venous infusion. *Circulation*, 97, 473-483, 1998.
68. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8, 1991.

69. Worlicek H, Lutz H, Heyder H, Matek W. Ultrasound findings in Crohn's disease and ulcerative colitis: a prospective study. *J Clin Ultrasound* 15: 153-163, 1987.
70. Zwingenberger AL, Marks SL, Baker TW, Moore PF. Ultrasonographic evaluation of the muscularis propria in cats with diffuse small intestinal lymphoma or inflammatory bowel disease. *J Vet Intern Med*, 24; 289-292, 2010.