

Wertigkeit der Mikro-Computertomographie für Untersuchungen
des Mittel- und Innenohres der Katze

von Tobias Benjamin Beck

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Wertigkeit der Mikro-Computertomographie für Untersuchungen
des Mittel- und Innenohres der Katze

von Tobias Benjamin Beck
aus Starnberg

München 2020

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Chirurgie der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Mitbetreuung durch:

Dr. Tim Kilchling

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Johann Maierl

Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Prof. Dr. Andrea Fischer

Tag der Promotion: 8. Februar 2020

Für meine Mama

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	- 8 -
2	LITERATURÜBERSICHT	- 10 -
2.1	Anatomie des Mittel- und Innenohres.....	- 10 -
2.1.1	Mittelohr.....	- 10 -
2.1.1.1	Paukenhöhle	- 11 -
2.1.1.2	Gehörknöchelchen.....	- 13 -
2.1.1.3	Ohrtrompete.....	- 14 -
2.1.2	Innenohr	- 15 -
2.1.2.1	Knöchernes Labyrinth	- 16 -
2.1.2.2	Häutiges Labyrinth	- 18 -
2.1.3	Small und hyperostotic tympanic bone spicules.....	- 22 -
2.2	Computertomographie	- 23 -
2.2.1	Aufbau des Computertomographen.....	- 23 -
2.2.2	Anwendung der Computertomographie.....	- 23 -
2.3	Mikro-Computertomographie	- 24 -
2.3.1	Aufbau des Mikro-Computertomographen	- 24 -
2.3.2	Anwendung der Mikro-Computertomographie	- 24 -
2.3.2.1	Präklinische Anwendung.....	- 25 -
2.3.2.2	Klinische Anwendung.....	- 27 -
2.3.2.3	Anwendung am humanen und tierischen Ohr	- 28 -
2.4	Diagnose von Mittel- und Innenohrerkrankungen mittels CT und μ CT	- 29 -
2.4.1	Diagnosemöglichkeiten mittels CT.....	- 29 -
2.4.2	Vorteile der μ CT.....	- 29 -
2.4.3	Grenzen der μ CT	- 30 -
2.5	Fixationsmethoden von Knochengewebe.....	- 30 -
2.5.1	Formalin.....	- 30 -

2.5.2	Tiefgefrieren	- 31 -
2.5.3	Tiefgefrieren und Auftauen	- 31 -
3	PUBLIKATIONEN.....	- 33 -
3.1	Differences between μ CT-imaging and conventional CT for the diagnosis of possible diseases of the middle and inner cat ear	- 33 -
3.2	Influence of storage on the quality of conventional CT and μ CT-imaging for the middle and inner cat ear.....	- 43 -
3.3	Occurrence of tympanic bone spicules and bone crests in domestic cats.....	- 56 -
4	DISKUSSION	- 63 -
5	ZUSAMMENFASSUNG	- 69 -
6	SUMMARY.....	- 71 -
7	LITERATURVERZEICHNIS	- 72 -
8	DANKSAGUNG.....	- 84 -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μCT	Mikro-Computertomographie / Mikro-Computertomograph
μm	Mikro-Meter
Abb.	Abbildung
ALARA	As Low As Reasonably Achievable
Art.	Articulatio = Gelenk
bzw.	beziehungsweise
CT	Computertomographie / Computertomograph
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
Engl.	englisch
Fa.	Firma
HE / HU	Hounsfield-Einheiten / Hounsfield-Units (engl.)
HTBS	Hyperostotic tympanic bone spicule
Lig. / Ligg.	Ligamentum = Band / Ligamenta = Bänder
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
M	Schichtanzahl
M.	Musculus
min.	Minuten
MRT	Magnetresonanztomographie
N. / Nn.	Nervus / Nervi
nm	Nano-Meter
Proc.	Processus = Fortsatz
STBS	Small tympanic bone spicule
TBC	Tympanic bone crest
TWT	Tympanic wall thickening

1 EINLEITUNG

Das Mittel- und Innenohr der Katze besteht aus einer Vielzahl hochsensibler Strukturen wie dem Trommelfell, den Gehörknöchelchen sowie dem Gleichgewichts- und Gehörorgan (Nickel et al. 2004). Mit den herkömmlich angewendeten bildgebenden Verfahren wie Röntgen können die genannten Strukturen nur unzureichend detailliert dargestellt werden und eine eventuell vorliegende Erkrankung kann nicht mit ausreichender Sicherheit diagnostiziert werden (Garosi et al. 2003). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine beim Tierarzt vorgestellte Katze unter einer Krankheit leidet, die mit dem Ohr assoziiert ist, liegt bei 6-7%. Mittel- und Innenohr sind hierbei in mehr als 50% der Fälle betroffen (Gotthelf 2008; Kraft & Dürr 2003). Am Beispiel von Untersuchungen an 27 Hundeohren konnte gezeigt werden, dass die Fehleranfälligkeit bei der Diagnose einer Otitis media im Röntgenbild mit einer Sensitivität von 67% sehr hoch ist, wohingegen die Spezifität mit 100% beschrieben wird (Love et al. 1995). Bei den modernen bildgebenden Verfahren, wie der Magnetresonanztomographie (MRT) oder der Computertomographie (CT), ist der limitierende Faktor bei der Diagnose einer möglicherweise vorliegenden Mittel- oder Innenohrerkrankung überwiegend die Größe der zu beurteilenden Struktur. Bei der CT liegt die Sensitivität mit 83% deutlich über dem Wert des Röntgenbildes, jedoch ist die Spezifität mit 89% etwas geringer (Love et al. 1995). Mittels MRT können Weichteilstrukturen wie Gefäße, Nerven oder das häutige Labyrinth gut dargestellt werden, jedoch wird dieses Verfahren in der Diagnostik bei Katzen nur vereinzelt eingesetzt (Allgoewer et al. 2000; Garosi et al. 2003). Mit der CT lassen sich knöcherne Strukturen besser darstellen, daher wird sie u.a. für die Diagnose von Osteodystrophien, Frakturen oder angeborenen Anomalien bei der Katze vermehrt eingesetzt. Um zwischen entzündlichen Prozessen und Neoplasien im Bereich des Mittel- und Innenohres unterscheiden zu können, reicht die Auflösung des CT jedoch nicht aus. Hier ist die hochauflösende Computertomographie in Dünnschichttechnik in der Auswertung im Knochenfenster der Goldstandard (Czerny et al. 1997; Garosi et al. 2003). Die Mikro-Computertomographie (μ CT) basiert auf den gleichen physikalischen Prinzipien wie die CT, die Verfahren unterscheiden sich lediglich in der technischen Umsetzung und im Geräteaufbau. Mit der μ CT wird eine höhere Ortsauflösung erreicht und Strukturen können detaillierter abgebildet werden (Engelke et al. 1999; Kalender 2006).

Sowohl die Anatomie als auch die Histomorphologie des felines Mittel- und Innenohres wurden bereits intensiv erforscht (Curthoys et al. 1977; Heitmann 2018; Kuypers et al. 2005). Die Histologie wurde in der zugänglichen Literatur bislang nur in einer Studie am Beispiel von lediglich zwei Mittel- und Innenohren einer Katze beschrieben und mit den Ergebnissen der bildgebenden Verfahren CT und μ CT verglichen (Seifert et al. 2012). Daher war ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit, die Reproduzierbarkeit

der Vergleiche von CT, μ CT und histologischer Schnitte anhand einer größeren Anzahl von Katzenohren zu untersuchen und mit den Ergebnissen der Literatur zu vergleichen.

In der experimentellen und klinischen Forschung werden als Fixationsmethoden von Knochenproben u.a. das Tiefgefrieren und die Lagerung in Formalin angewendet (Hammer et al. 2014; Lander et al. 2014; Morita et al. 2013). In der zugänglichen Literatur fehlen Studien, die sich mit dem Einfluss verschiedener Fixationsmethoden auf die Auswertung von bildgebenden Verfahren wie CT und μ CT beschäftigen und diesen Einfluss anhand von histologischen Schnitten evaluieren. Daher war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, die Einflüsse verschiedener Fixationsmethoden (Tiefgefrieren, Tiefgefrieren und mehrmaliges Wiederauftauen, Formalinfixierung) am Beispiel des felinen Mittel- und Innenohres zu untersuchen. Dazu wurden zwei bildgebende Verfahren (CT und μ CT) miteinander verglichen und histologischen Präparaten gegenübergestellt.

Im Hinblick auf anatomische Besonderheiten im Bereich des Mittelohres wurden in der Literatur small und hyperostotic tympanic bone spicules (STBS und HTBS) erstmals von Parzefall et al. (2015) beim Hund im Rahmen von pathohistologischen Untersuchungen und CT-Scans beschrieben. Heitmann et al. (2016) zeigten durch pathologische Untersuchung, dass HTBS auch bei anderen Spezies, wie z.B. Wolf, Fuchs, Löwe, Leopard und Tiger vorkommen können. Bei der Hauskatze wurden in der zugänglichen Literatur bislang keine STBS oder HTBS festgestellt. Daher war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, zu untersuchen, ob diese Strukturen auch bei der Hauskatze mittels CT und μ CT zu finden sind.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Anatomie des Mittel- und Innenohres

2.1.1 Mittelohr

Das Mittelohr befindet sich im Paukenteil (Pars tympanica) des Schläfenbeins (Os temporale). Der Paukenteil bildet zusammen mit dem Felsenteil (Pars petrosa) und dem Warzenteil (Pars mastoidea) die Felsenbeinpyramide. Durch die Ohrtrumpete (Tuba auditiva oder Eustachische Röhre) steht das Mittelohr mit der Rachenhöhle in Verbindung (Nickel et al. 2004). Das Trommelfell stellt die Begrenzung zum äußeren Ohr dar und überträgt die Schallwellen aus dem Gehörgang zu den Gehörknöchelchen. Es besteht aus drei Schichten: der äußeren Hautschicht (Stratum cutaneum), der bindegewebigen Eigenschicht (Stratum proprium) und der inneren Schleimhautschicht (Stratum mucosum). Das Stratum proprium ist über den Anulus fibrocartilagineus mit dem Anulus tympanicus verbunden. Das erste Gehörknöchelchen, der Hammer (Malleus), findet seinen Ansatz mit dem Hammerstiel (Manubrium mallei) am Trommelfellnabel (Umbo membranæ tympani) und ebenfalls im Stratum proprium. Von außen ist der Hammerstiel in Form eines hellen Streifens, der sog. Stria mallearis, sichtbar. Im dorsalen Teil des Trommelfells weist der Anulus fibrocartilagineus eine Lücke auf und der bindegewebige, lockere Verschluss wird als Pars flaccida (Shrapnell'sche Membran) bezeichnet. Der übrige, straffe Teil des Trommelfells ist die Pars tensa (König & Liebich 2015; Nickel et al. 2004) (Abb. 1). Bei der Katze besitzt das nach lateral spitz ausgezogene und sich stumpfkegelförmig gegen die Paukenhöhle vorwölbende, eher runde Trommelfell einen Flächeninhalt von etwa 42 mm² (Chole & Kodama 1989; Harvey et al. 2003; Hudson & Hamilton 2010; Nickel et al. 2004; Nummela 1995). Die Dicke variiert in den unterschiedlichen Abschnitten des Trommelfells, im Bereich des

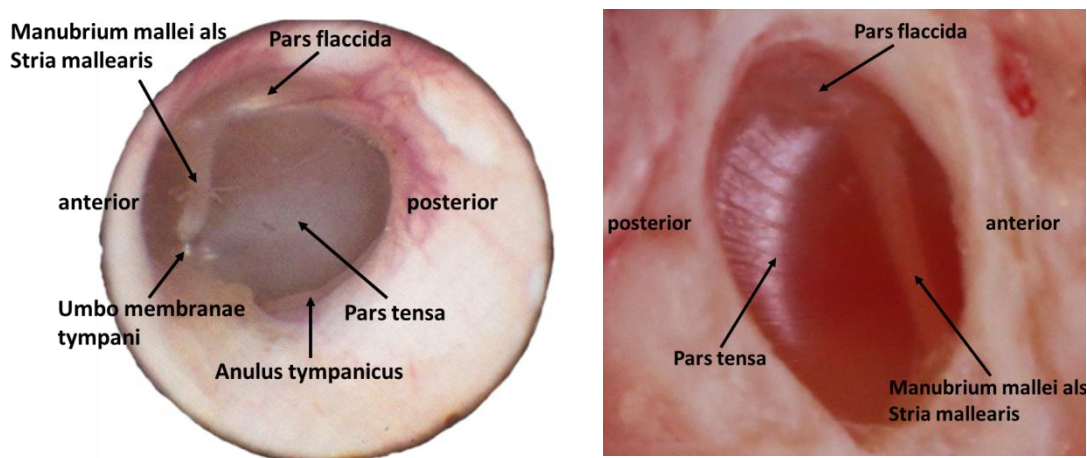


Abbildung 1: Otoskopische Sicht vom äußeren Gehörgang auf das Trommelfell der Katze. Ausschnitt aus Gotthelf (2008) (links) und eigene Aufnahme (rechts).

Hammerstiels liegt sie bei maximalen Messwerten von 60 μm im Durchschnitt bei 35 μm . Im Bereich des Anulus fibrocartilagineus ist die Dicke maximal mit 99 μm und einem Durchschnitt von 54 μm . Zum Zentrum hin verringert sie sich auf einen Minimalwert von 5,5 μm im unteren Teil. Im hinteren oberen Teil des Zentrums reicht die Dicke bis hin zu 30 μm . Im Allgemeinen konnten für den hinteren (posterioren) Abschnitt signifikant kleinere Werte festgestellt werden als für den vorderen (anterioren) (Kuypers et al. 2005).

2.1.1.1 Paukenhöhle

Die Paukenhöhle (Cavum tympani) liegt im Inneren der Felsenbeinpyramide und ist in drei Abschnitte eingeteilt: das dorsale Epitympanicum, das mittlere Mesotympanicum und das ventrale Hypotympanicum. Ausgekleidet wird sie größtenteils von einem einschichtigen Plattenepithel und teilweise von einem Flimmerepithel. Zweitgenanntes bedeckt zusätzlich sämtliche Strukturen innerhalb der Paukenhöhle wie die Gehörknöchelchen.

Die glatte, mediale Wand des Mesotympanicums wird vom Felsenteil des Schläfenbeins gebildet, enthält das in die Paukenhöhle ragende Vorgebirge (Promontorium) und wird durch zwei Fenster unterbrochen. Rostrodorsal befindet sich das von der Steigbügelplatte verschlossene, ca. 1,46 mm^2 große, ovale Fenster oder Vorhoffenster (Fenestra vestibuli) (Hemilä et al. 1995), über das die Schallwellen von den Gehörknöchelchen an das Innenohr weitergeleitet werden. Kaudoventral davon befindet sich das von der Membrana tympani secundaria verschlossene runde Fenster oder Schneckenfenster (Fenestra cochleae) (Harvey et al. 2003) (Abb. 2). Die Membran besteht wie das Trommelfell aus drei Schichten: ein äußeres Epithel zum Mittelohr hin, eine bindegewebige

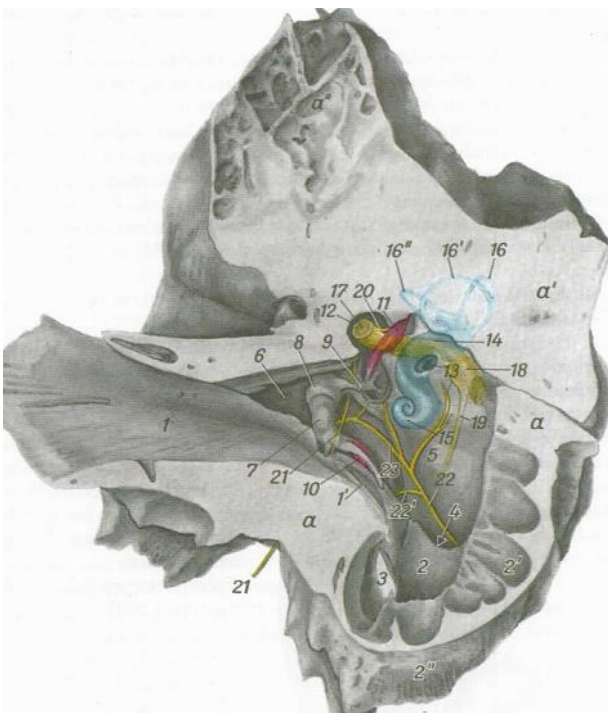


Abbildung 2: Transversalschnitt durch die Felsenbeinpyramide mit eröffneter Paukenhöhle. a Pars tympanica der Felsenbeinpyramide, a' Pars petrosa, a'' Pars mastoidea; 1 Meatus acusticus externus, 1' Anulus tympanicus, 2 Cavum tympani, 2' Hypotympanicum, 2'' Bulla tympanica, 3 Ostium tympanicum tubae auditivae, 4 Fissura petrotympanica, 5 Promontorium, 6 Recessus epitympanicus, 7 Hammer, 8 Amboss, 9 Steigbügel, 10 M. tensor tympani, 11 M. stapedius, 12 Canalis facialis, 13 Schneckenfenster, 14 Vorhof, 15 Cochlea, 16 – 16'' durchscheinende Canales semicirculares ossei, 16 Canalis semicircularis anterior, 16' Canalis semicircularis posterior, 16'' Canalis semicircularis lateralis, 14 – 16'' = knöchernes Labyrinth, 17 N. facialis, 18 durchscheinendes Ganglion geniculi, 19 durchscheinender N. petrosus major, 20 N. stapedius, 21 Chorda tympani, 22 N. tympanicus, 22' Verbindungsast des N. tympanicus zum N. petrosus major, 23 N. petrosus minor. Aus Nickel et al. (2004).

Verbindungsschicht und ein inneres Epithel zum Innenohr hin. Sie besitzt eine Dicke von 15 bis 20 μm (Goycoolea et al. 1987; Miriszlai et al. 1978). Die Hinterwand wird von der Pars mastoidea und der Pars tympanica gebildet. Die Vorderwand, auch Pars tubarius genannt, wird von der Pars tympanica gebildet und enthält die Mündung der Ohrtrumpete in die Paukenhöhle im sog. Ostium tympanicum tubae auditivae. Den Boden und den größten Teil der Seitenwand bildet die im Hypotympanicum liegende Paukenblase (Bulla tympanica). Das ist eine große, oberflächlich glatte, dünnwandige, nach ventral die Schädelbasis überragende, halbkugelige Knochenblase. Größe und Form der beiden Bullae sind je nach Rasse verschieden. Die Bullae eines Tieres besitzen ebenfalls keine einheitliche Größe (Benigni & Lamb 2006). Das Volumen beträgt bei der Katze etwa $0,9 \text{ cm}^3$ bei einem Durchmesser von immer unter 1 cm (Harvey et al. 2003; Huang et al. 1997). Die Dicke der knöchernen Paukenwand unterscheidet sich bei männlichen Katzen mit ca. 0,3 mm deutlich von weiblichen Katzen mit ca. 0,25 mm. Die maximale Höhe und maximale Länge liegt bei ca. 16 mm und ca. 19 mm (Wysocki 2006). Ausschließlich bei der Katze wird die Paukenblase durch ein horizontales Knochenseptum (Septum bullae) in eine dorsolaterale und eine ventromediale Etage geteilt, die über einen freien Raum zwischen Septum und kaudomedialer Paukenhöhlenwand miteinander in Verbindung stehen.

Im Epitympanicum mit dem darin liegenden Recessus epitympanicus befinden sich die drei Gehörknöchelchen (Ossicula auditus), die Paukensaite (Chorda tympani) und das sich in die Paukenhöhle vorwölbende Trommelfell. Die Chorda tympani ist ein dünner, vom N. facialis abzweigender Nervenstrang, der nach kurzem Verlauf im Facialiskanal (Canalis facialis) zwischen Hammerstiel und langem Ambossschenkel durch die Paukenhöhle zieht und durch die Fissura petrotympanica aus dem Felsenbein austritt (Nickel et al. 2004). Daneben durchlaufen noch der N. tympanicus, der N. stapedius und die Nn. petrosus major und minor die Paukenhöhle (Abb. 2) (Nickel et al. 2004). Der N. facialis (VII. Gehirnnerv) verläuft nach Austritt aus der Schädelhöhle zunächst zusammen mit dem N. vestibulocochlearis im inneren Gehörgang (Meatus acusticus internus). Im Anschluss verläuft er separat im Canalis facialis weiter, der von rostral durch das Felsenbein gegen die Paukenhöhle läuft und dorsal des Vorhoffensters entweder nur in diese in Form der Prominentia canalis facialis hervorragt oder sich kurz komplett in sie eröffnet (Abb. 2). Der Canalis facialis mündet nach weiterem Verlauf in caudolateraler Richtung im Foramen stylomastoideum an der Schädeloberfläche (Nickel et al. 2004).

Es befinden sich zwei Muskeln im Epitympanicum der Paukenhöhle. In einer Mulde (Fossa muscularis major) im rostromedialen Winkel entspringt der rundliche Spanner des Trommelfells (M. tensor tympani), er inseriert mit einer schlanken Sehne am Processus muscularis des Hammerstiels. Die Innervation erfolgt durch den N. tensoris tympani des N. pterygoideus des N. trigeminus. Eine Kontraktion des Muskels führt zum Spannen des Trommelfells und zur Dämpfung der übertragenen Schwingungen hin zum Innenohr (König & Liebich 2015; Nickel et al. 2004). Der Steigbügelmuskel

(M. stapedius) entspringt in der Fossa muscularis minor an der Paukenhöhlenwand zwischen dem Vorhoffenster und dem Canalis facialis und inseriert mit seiner Sehne am Steigbügelköpfchen (Abb. 2). Er wird vom N. stapedius des N. facialis innerviert und ist der kleinste quergestreifte Muskel des Körpers. Durch die Kontraktion wird die Position der Fußplatte des Steigbügels im Vorhoffenster verändert und die Übertragung höherer Schallfrequenzen zur Schnecke begünstigt. Ein normaler Muskeltonus führt zur Dämpfung der übertragenen Schwingungen (Gotthelf 2008; Nickel et al. 2004; Steinitz 1906).

2.1.1.2 Gehörknöchelchen

Es gibt drei verschiedene Gehörknöchelchen: Hammer (Malleus), Amboss (Incus) und Steigbügel (Stapes). Sie sind die kleinsten Knochen im Körper (Folowosele et al. 2004). Die drei Lamellenknochen sind beweglich miteinander verbunden und stellen eine abgewinkelte Kette zur Übertragung der Schallwellen vom Trommelfell zum Vorhoffenster dar (Abb. 3).

Der Hammer ist mit dem Hammerstiel in der Eigenschicht des Trommelfells fest verankert. Dieser ist über den Hammerhals (Collum mallei) mit dem dicken Hammerkopf (Caput mallei) verbunden. An dem Übergang von Hammerstiel zu Hammerhals befindet sich der Proc. muscularis für den Ansatz der Sehne des M. tensor tympani. Der Hammer wird durch drei Bänder befestigt. Das Lig. mallei laterale verbindet den Proc. lateralis des Hammerhalses mit dem Anulus tympanicus, das Lig. mallei rostrale verbindet den Proc. rostralis an der Vorderseite des Hammerhalses mit der Paukenhöhlenwand im Recessus epitympanicus und das Lig. mallei superficiale verbindet den Hammerkopf mit dem Dach des Recessus epitympanicus (Pariet tegmentalis). Zur Artikulation mit dem Amboss besitzt der Hammerkopf zwei Gelenkflächen, das entsprechende Gelenk wird als Art. incudomalleolaris bezeichnet (Harvey et al. 2003; König & Liebich 2015; Nickel et al. 2004).

Der Amboss liegt wie der Hammerkopf im Recessus epitympanicus, mit dem er ebenfalls

durch mehrere Bänder (Ligg. incudis) verbunden ist. Er teilt sich auf in einen Körper (Corpus incudis) und zwei ungleich lange Schenkel (Crus breve und Crus longum). Der kurze Schenkel liegt nahezu horizontal, der lange hingegen ist nach unten und leicht nach medial gekrümmt. An diesen fügt sich

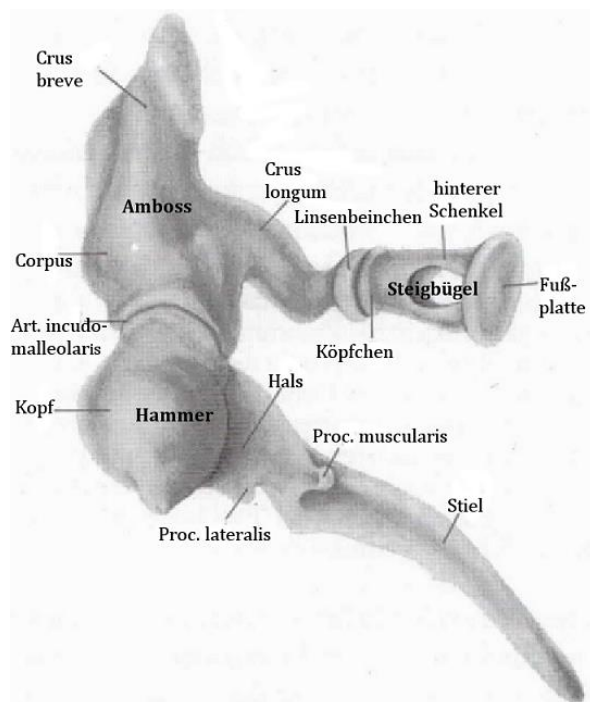


Abbildung 3: Linksseitige Darstellung der Gehörknöchelchen. Aus Nickel, Schummer et al. (2004).

über den Pedikel, einen sehr dünnen Knochen, das Linsenbeinchen (*Os lenticulare*) an. Es besteht hier keine gelenkige Verbindung, daher stellt das Linsenbeinchen kein eigenes Gehörknöchelchen dar, wie lange Zeit vermutet wurde (Funnell et al. 2005). Mit dem Steigbügelköpfchen (*Caput stapedis*) hingegen steht es über eine Gelenkfläche in gelenkiger Verbindung (*Art. incudostapedia*). Das Längenverhältnis vom Hammerstiel zum *Crus longum* des Amboss beträgt bei Katzen $3,1 \pm 0,6$ zu 1 (El-Mofty & El-Serafy 1967; Hudson & Hamilton 2010) und ist somit zwei- bis dreimal so hoch wie das entsprechende Verhältnis beim Menschen (Evans & De Lahunta 2013; Getty et al. 1956). Dadurch ist möglicherweise erklärbar, weshalb die Katze sehr leise Geräusche wahrnehmen kann und der Mensch nicht (El-Mofty & El-Serafy 1967; Harvey et al. 2003).

Der Steigbügel besteht neben dem bereits erwähnten Steigbügelköpfchen aus zwei Schenkeln (*Crus anterior* und *Crus posterior*) und einer Fußplatte (*Basis stapedis*), die über das *Lig. anulare stapedis* am Rand des Vorhoffensters befestigt sind. Zwischen den Schenkeln spannt sich die *Membrana stapedis* auf (Harvey et al. 2003; König & Liebich 2015; Nickel et al. 2004). Die Fußplatte ist eine sehr dünne Knochenplatte, die an der breitesten Stelle einen Durchmesser von 1,72 mm besitzt (Hemilä et al. 1995). Mittels μ CT-Aufnahmen konnte weiterhin festgestellt werden, dass die zum Vorhoffenster zeigende Fläche der Fußplatte konvex ist und die Kante mit einem darauf liegenden, aufrechten Rand verstärkt ist. Der Knochen im oberen Teil des Steigbügels ist deutlich dicker als im Rest, die Schenkel und der untere Teil sind ausgehöhlt und extrem dünn. Der hintere Schenkel ist etwas breiter und stärker gebogen als der vordere Schenkel (Decraemer et al. 2003).

2.1.1.3 Ohrtrompete

Die Ohr- oder Hörtrompete dient einerseits dem Druckausgleich in der Paukenhöhle, der wegen der Luftresorption durch die Schleimhaut im Mittelohr nötig ist, andererseits dem Abfluss von gebildeten Sekreten der nahe der Mündung liegenden Becherzellen im Flimmerepithel. Die Ohrtrompete verläuft im Bereich der ventrorostralen Mündung in der Paukenhöhle im *Ostium tympanicum tubae auditivae* zunächst in einer kurzen Knochenrinne, dem knöchernen Teil (*Pars ossea tubae auditivae*) (s. Abb. 2). Der folgende knorpelige Teil (*Pars cartilaginea tubae auditivae*) schließt sich bei der Katze zu einer Schleimhautröhre, die vom Tubenknorpel (*Cartilago tubae auditivae*) gestützt wird. Diese Röhre mündet im *Ostium pharyngeum tubae auditivae* im Atmungsrachen (*Pharynx respiratorius*), daher wird sie auch als *Tuba pharyngotympanica* bezeichnet (König & Liebich 2015; Nickel et al. 2004). Sie besitzt bei der Katze eine Länge von 15 bis 20 mm (Evans & De Lahunta 2013; Harvey et al. 2003; Hudson & Hamilton 2010; Rose 1978).

2.1.2 Innenohr

Das Innenohr (Auris interna) besteht aus der von der Pars petrosa der Felsenbeinpyramide, dem härtesten Knochen des Körpers, gebildeten Knochenstruktur, dem sog. knöchernen Labyrinth (Labyrinthus osseus) mit einer Größe von 15 mm (Gotthelf 2008). In diesem liegt ein membranöses Hohlorgan, das sog. häutige Labyrinth (Labyrinthus membranaceus). Zwischen den genannten Labyrinth befinden sich die mit einer wässrigen Flüssigkeit, der Perilymphe, gefüllten perilymphatischen Räume (Spatia perilymphatica). Diese stehen über den Aquaeductus vestibuli und den Aquaeductus cochleae in Verbindung mit dem Subdural- bzw. Subarachnoidalraum (Cavum leptomeningicum) der Gehirnhäute. Daneben beherbergt die Pars petrosa noch den Meatus acusticus internus und den Canalis facialis, sowie den Warzenfortsatz (Proc. mastoideus) und den N. trigeminus im Canalis nervi trigemini. Auf letztere wird nicht weiter eingegangen, da sie für das Ohr und die Studie keine direkte Rolle spielen.

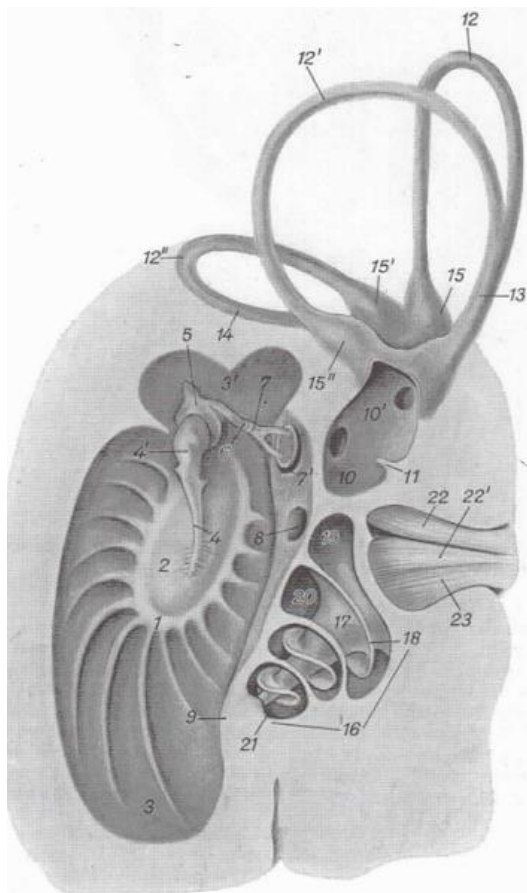


Abbildung 4: Schematische Darstellung der eröffneten Paukenhöhle und des knöchernen Labyrinths.

1 Anulus tympanicus, 2 Trommelfell, 3 Hypotympanicum, 3' Epitympanicum, 4 Hammerstiel, 4' Hammerkopf, 5 Amboss, 6 Linsenbeinchen, 7 Steigbügel, 7' Steigbügelplatte, 8 Schneckenfenster, 9 Promontorium, 10 Recessus sphaericus, 10' Recessus ellipticus, 10 & 10' Vorhof, 11 Crista vestibuli, 12 Canalis semicircularis anterior, 12' Canalis semicircularis posterior, 12'' Canalis semicircularis lateralis, 13 Crus osseum commune, 14 Crus osseum simplex, 15 Ampulla ossea anterior, 15' Ampulla ossea lateralis, 15'' Ampulla ossea posterior, 16 Cochlea, 17 Modiolus, 18 Lamina spiralis ossea, 19 Scala tympani, 20 Scala vestibuli, 21 Helicotrema, 22 Pars superior des N. vestibularis, 22' Pars inferior des N. vestibularis, 23 N. cochlearis. Aus Nickel et al. (2004).

Die Außenwand des häutigen Labyrinthes besteht aus einer Basalmembran und einem einschichtigen Plattenepithel und wird durch zarte Bindegewebsfasern an der mit Periost ausgekleideten Innenwand des knöchernen Labyrinthes befestigt (König & Liebich 2015; Nickel et al. 2004).

2.1.2.1 Knöchernes Labyrinth

Das knöcherne Labyrinth setzt sich aus vier verschiedenen Strukturen zusammen: Der zentrale Hohlraum (Vorhof oder Vestibulum) mit den caudodorsal liegenden knöchernen Bogengängen (Canales semicirculares ossei), der rostroventral gelegenen Schnecke (Cochlea) und dem schädelwärts gerichteten inneren Gehörgang, über den die Nn. facialis und vestibulocochlearis ins Innenohr gelangen (Nickel et al. 2004).

Der Vorhof grenzt mit seiner lateralen Wand an die Paukenhöhle an. Durch die an der medialen Wand liegende Knochenleiste, die Crista vestibuli, wird er in zwei unterschiedlich große Nischen aufgeteilt. Die etwas kleinere, rostral gelegene, rundliche Nische (Recessus sphaericus) beherbergt den Sacculus des häutigen Labyrinths. Die größere, caudodorsal liegende, ovale Nische (Recessus ellipticus) ist Sitz des Utriculus. Verbindungen besitzt der Vorhof über das verschlossene Vorhoffenster zur Paukenhöhle, über die Scala vestibuli zur Schnecke, über je ein medial, lateral, ventral und dorsal gelegenes Loch in seiner Hinterwand zu den knöchernen Bogengängen und über den Endolymphgang (Aquaeductus vestibuli oder Ductus endolymphaticus) zum blind endenden Endolymphsack (Saccus endolymphaticus) im Subduralraum (Ekdale 2013; König & Liebich 2015; Nickel et al. 2004) (Abb. 4).

Die knöchernen Bogengänge werden von drei nahezu senkrecht zueinanderstehenden, halbkreisförmigen Knochenkanälchen gebildet, die teilweise mit einer Erweiterung (sog. Ampulla ossea) am Vorhof beginnen. Man unterscheidet einen rostralen transversalen Gang (Canalis semicircularis anterior), einen hinteren sagittalen Gang (Canalis semicircularis posterior) und einen lateralen horizontalen Gang (Canalis semicircularis lateralis). Jeder Bogengang besteht aus zwei Schenkeln (Crura ossea), die entweder einzeln oder gemeinsam und mit oder ohne Ampullenbildung im Vorhof münden (Abb. 5 und Tab. 1).

Tabelle 1: Übersicht über die Vereinigung einzelner Schenkel und die Art ihrer Mündung im Vorhof. Nach Nickel et al. (2004).

Mit Ampullenbildung, einzeln		Lateraler Schenkel des transversalen, rostraler des horizontalen und caudaler des sagittalen Bogengangs als Crura ossea ampullaria	
Ohne Ampullenbildung	einzeln		Caudaler Schenkel des horizontalen Bogengangs als Crus osseum simplex
	Vereinigung	Rostraler Schenkel des sagittalen & medialer Schenkel des transversalen Bogengangs als Crus osseum commune	

Die Abmessungen der einzelnen Bogengänge wurden von Curthoys et al. (1977) für die Katze bestimmt. Der horizontale Bogengang besitzt einen durchschnittlichen Innendurchmesser von 0,28 - 0,32 mm, der vordere von 0,29 - 0,39 mm und der hintere von 0,28 - 0,35 mm. Die durchschnittliche Länge, Höhe und Breite der vorliegenden Ampullen beträgt 1,00 mm, 1,14 mm und 0,89 mm. Der von den

Bogengängen beschriebene virtuelle Kreis hat einen Durchmesser von ca. 3 bis 4 mm bei einem Radius von ca. 2 mm je Bogengang (Wysocki 2006).

Die Schnecke besteht aus einer säulenförmigen, schmalen Schneckenspindel (Modiolus), die die Achse für den sich spiralig darum hochwindenden, ca. 23 mm langen Schneckengang (Canalis spiralis cochleae) darstellt (Wysocki 2001). Bei der Katze weist dieser 2,75 Windungen auf, die durch knöcherne Zwischenwände voneinander getrennt sind. Die basale Windung ist S-förmig gekrümmt, hat einen Durchmesser von 4 mm und ragt in Form des Promontoriums in die mediale Wand der Paukenhöhle. Die Gesamthöhe der Spirale beträgt ca. 7 mm (Harvey et al. 2003). Die Basis des Modiolus (Basis modioli) ist nach dorsomedial und leicht nach caudal ausgerichtet, die Schneckenspitze (Cupula cochleae) folglich nach ventrolateral und leicht rostral. Der Schneckengang wird durch eine senkrecht zur Spindelachse stehende Knochenlamelle, die Lamina spiralis ossea, in zwei Treppengänge unterteilt. Die oberhalb der Knochenlamelle gelegene Vorhoftreppe, Scala vestibuli und die unterhalb gelegene Paukentreppe, Scala tympani. Die Lamina wird in ihrem Verlauf beginnend zwischen Vorhofs-

und Schneckenfenster bis hin zum Häkchen (Hamulus spiralis cochleae) an der Schneckenspitze immer schmaler. Im Bereich der basalen Windung hat die Knochenlamelle eine Dicke von ca. 40,0 µm, bei der mittleren Windung noch ca. 24,8 µm und bei der apikalen Windung ist sie nur noch ca. 10,6 µm dick (Shepherd & Colreavy 2004). Da sie weder die Außenwand noch die Spitze des Schneckengangs erreicht, kommunizieren die beiden Treppengänge in diesen Bereichen miteinander. Die Vorhoftreppe beginnt im Vorhof und die Paukentreppe steht über das von der Membrana tympani secundaria verschlossene Schneckenfenster mit der Paukenhöhle in Verbindung. Die beiden Treppen gehen im Helicotrema, einem trichterförmigen, elliptischen Hohlraum, der die Schneckenspitze bildet und parallel zur Spindelachse verläuft, ineinander über. Im Querschnitt besitzt die Scala vestibuli eine Höhe von zu Beginn ca. 1,7 mm und eine Breite von ca. 1,9 mm. Im Bereich des Helicotremas hat sich die Höhe auf 0,4 mm und die Breite auf 0,5 mm reduziert. Die Scala tympani hat an ihrem Ursprung am

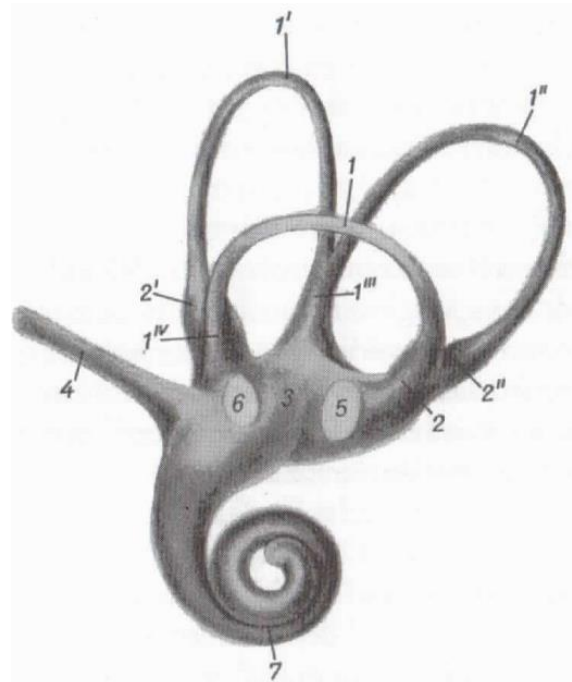


Abbildung 5: Knöchernes Labyrinth in ventrolateraler Ansicht.

1 Canalis semicircularis lateralis, 1' Canalis semicircularis posterior, 1'' Canalis semicircularis anterior, 1''' Crus osseum commune, 1'''' Crus osseum simplex, 2 Ampulla ossea lateralis, 2' Ampulla ossea posterior, 2'' Ampulla ossea anterior, 3 Vorhof, 4 Aquaeductus vestibuli, 5 Vorhoffenster, 6 Schneckenfenster, 7 Schnecke. Aus Nickel et al. (2004).

Schneckenfenster eine Höhe von ca. 0,25 mm und steigt nach 4 mm Länge auf 1,7 mm an, die Breite erhöht sich ebenfalls von anfangs 0,75 mm auf 2,2 mm. Zur Spitze hin sinkt die Höhe auf 0,4 mm und die Breite auf 0,2 mm ab (Wysocki 2001).

Das Corti'sche Organ des Gehörorgans wird mittels peripherer Nervenfortsätze aus den bipolaren Nervenzellen des Ganglion spirale cochleae innerviert. Das Ganglion liegt in einem der feinen Knochenkanälchen in der Schneckenwindung, dem Canalis spiralis modioli an der Basis der Lamina spiralis ossea. Die Knochenkanälchen besitzen basal einen Durchmesser von ca. $2,2 \pm 1,6 \mu\text{m}$, im Bereich der mittleren Windung $1,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$ und in den apikalen Windungen $1,5 \pm 1,2 \mu\text{m}$ (Shepherd & Colreavy 2004). Die zentralen Axone werden gesammelt als Fasern des N. cochlearis in den parallel zur Spindelachse verlaufenden Canales longitudinales modioli gehirnwärts geleitet (König & Liebich 2015; Nickel et al. 2004). Im bis zur Schneckenwindung verlaufenden Schneckenkanal verläuft der N. modioli. Er besitzt einen mittleren Durchmesser von ca. 1,64 mm bei einer durchschnittlichen Länge von ca. 2,50 mm (Badi et al. 2002).

Von der Scala tympani zweigt der Perilymphgang (Ductus perilymphaticus oder Aquaeductus cochleae) ab. Dieser stellt über eine Öffnung in der Pars petrosa des Felsenbeins eine Verbindung vom Perilymphraum (Spatium perilymphaticum) zum Subarachnoidalraum her (Ekdale 2013; Wicke & Firbas 1974).

2.1.2.2 Häutiges Labyrinth

Das häutige Labyrinth enthält das Gleichgewichtsorgan, Pars statica labyrinthi oder Vestibularapparat (Apparatus vestibularis), und das Gehörorgan, Pars auditiva labyrinthi oder häutige Schnecke (Ductus cochlearis) (Abb. 6). Diese legen sich an die Innenfläche des knöchernen Labyrinthes an, die freibleibenden Zwischenräume sind mit Perilymphe gefüllt. Die Hohlräume des häutigen Labyrinthes sind mit viskoser Endolymphe gefüllt (König & Liebich 2015; Nickel et al. 2004). Ausgekleidet wird die Wand mit einer Basalmembran, der dünnen, bindegewebigen Lamina propria und einem einschichtigen Plattenepithel, der Lamina epithelialis. Die Epithelzellen dienen vor allem der Produktion der Endolymphe (König & Liebich 2015; Nickel et al. 2004; Salomon et al. 2015).

2.1.2.2.1 Gleichgewichtsorgan

Das Gleichgewichtsorgan setzt sich aus den im Vorhof liegenden Vorhofsäckchen (Sacculus und Utriculus) und den drei häutigen Bogengängen (Ductus semicirculares) mit ihren häutigen Ampullen (Ampullae membranaceae) zusammen. Sacculus und Utriculus werden durch den Ductus utriculosaccularis miteinander verbunden, von ihm zweigt der Ductus endolymphaticus im Aquaeductus vestibuli ab (Abb. 6). Die drei Ductus semicirculares liegen innerhalb der Canales semicirculares ossei und verhalten sich hinsichtlich Mündung und Ampullenbildung im Vorhof entsprechend der Kanäle (s. Tab. 1) (Nickel et al. 2004). Sie werden daher auch als Ductus semicircularis lateralis, transversalis

und sagittalis bezeichnet und der laterale Schenkel des transversalen, der rostrale des horizontalen und der caudale des sagittalen häutigen Bogengangs bilden im Bereich der Mündung in den Vorhof jeweils eine häutige Ampulle, die dementsprechend als Ampulla membranacea lateralis, transversalis und sagittalis bezeichnet werden (Abb. 6). Ausgekleidet werden die Ductus semicirculares überwiegend mit einem einschichtigen Plattenepithel, nur an den Stellen mit Kontakt zu Sinneszellen liegen spezifische Neuroepithelien vor. Jede Ampullae membranaceae besitzt an der Kontaktstelle mit dem N. vestibularis eine leistenförmige Einstülpung aus einem hochprismatischen Epithel, die sog. Crista ampullaris.

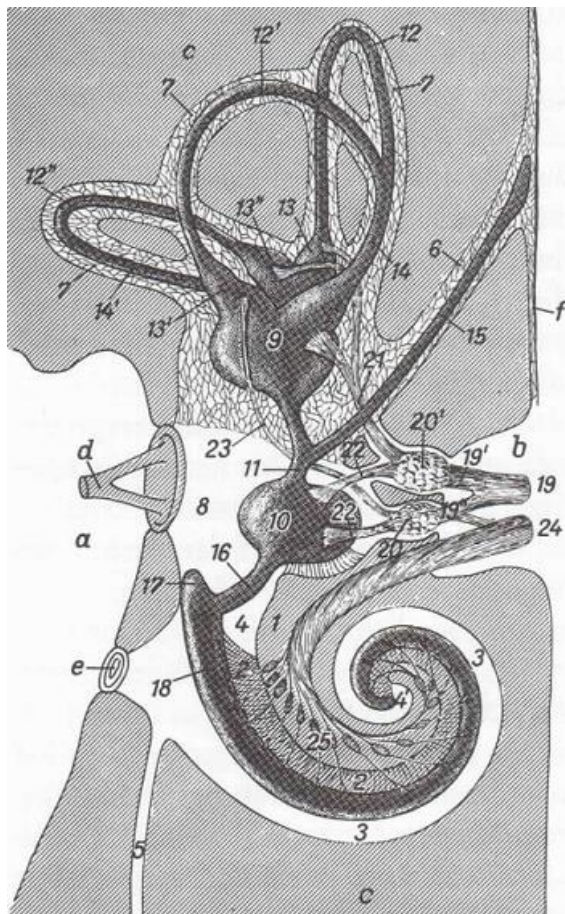


Abbildung 6: Schema des häutigen Labyrinths.

a Cavum tympani, b Meatus acusticus internus, c Knochenkapsel des häutigen Labyrinths, d Steigbügel, e Membrana tympani secundaria, f Dura mater; 1 Modiolus, 2 Lamina spiralis ossea, 3 Scala tympani, 4 Scala vestibuli, 4' Helicotrema, 5 Aquaeductus tympani, 6 Aquaeductus vestibuli, 7 Canales semicirculares ossei mit perilymphatischen Räumen, 8 Vorhof, 9 Utriculus, 10 Sacculus, 11 Ductus utriculosaccularis, 12 Ductus semicircularis anterior, 12' Ductus semicircularis posterior, 12'' Ductus semicircularis lateralis, 13 Ampulla membranacea transversalis, 13' Ampulla membranacea sagittalis, 13'' Ampulla membranacea lateralis, 14 Crus membranaceum commune, 14' Crus membranaceum simplex, 15 Ductus endolymphaticus, 9 – 15 = Vestibularapparat, 16 Ductus reuniens, 17 Caecum vestibulare, 18 Ductus cochlearis, 19 N. vestibularis, 19' Pars superior des N. vestibularis, 19'' Pars inferior, 20 Pars inferior des Ganglion vestibulare, 20' Pars superior, 21 N. utriculoampullaris, 22 N. saccularis, 23 N. ampullaris posterior, 24 N. cochlearis, 25 Ganglion spirale cochleae. Aus Nickel et al. (2004).

Das Neuroepithel besteht aus Stützzellen mit dazwischen liegenden Sinneszellen, die bis zu 100 Stereozilien und eine Kinozilie tragen. Der Crista ampullaris liegt eine ins Lumen ragende, strukturierte Gallertkappe, die Cupula, auf, in die die Stereozilien der Sinneszellen hineinreichen. Rotationsbeschleunigungen wie Kopfwenden oder Seitwärtsneigen führen aufgrund der trägen Endolymphe innerhalb der Bogengänge zu einer Auslenkung der Cupula in den Ampullen und folglich zu einer Bewegung der Stereozilien. Diese Auslenkung relativ zur Kinozilie löst letztendlich einen Reiz in den Sinneszellen aus (Abb. 7) (König & Liebich 2015; Nickel et al. 2004; Salomon et al. 2015).

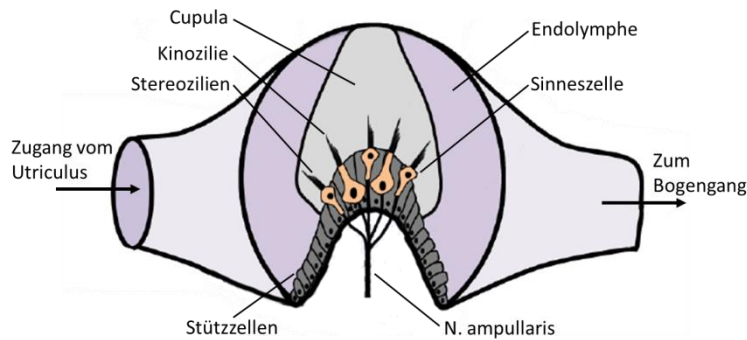


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer Ampulla membranacea. Aus Heitmann (2018).

Die Macula saccularis und die Macula utricularis stellen flache, ovale Erhebungen in der medialen Wand der Vorhofsäckchen dar und sind fast wie die Cristae ampullares aufgebaut (Abb. 7). Der einzige Unterschied ist, dass in die Gallertschicht kleine, prismatische Kalziumcarbonatkristalle (sog. Ohrsteinchen oder

Statolithen bzw. Statokonien) eingelagert sind, daher wird die hier vorliegende Membran auch als Statolithenmembran (Membrana statoconiorum) bezeichnet. Diese ist schwerer als die Endolymphe, daher können in den Maculae Translationsbeschleunigungen (Linearbewegungen) registriert werden. Die Innervation des Gleichgewichtsorgans erfolgt über die Pars superior des N. vestibularis, bestehend aus den Nn. ampullares (zur Innervation der transversalen und horizontalen Ampullen), dem N. utricularis (zum Utriculus) und dem N. saccularis (zum Sacculus) und die Pars inferior bestehend aus dem N. ampullaris posterior (zur sagittalen Ampulle). Der N. vestibularis ist ein Teil des VIII. Gehirnnervs, des N. vestibulocochlearis (Abb. 6) (König & Liebich 2015; Nickel et al. 2004; Salomon et al. 2015).

2.1.2.2.2 Gehörorgan

Der Ductus cochlearis ist ein dreieckiger Schlauch, der sich spiralig um den Modiolus windet. Der Ductus liegt zwischen den beiden Treppengängen, ist mit Endolymphe gefüllt und enthält Sinneszellen für den Gehörsinn. Er entspringt mit dem Caecum vestibulare und endet blind mit dem Caecum cupulare. Über den Ductus reuniens besteht eine Verbindung zum Sacculus.

Die ventrale Wand (Pariet tympanicus ductus cochlearis) wird von der Lamina basilaris, einer dünnen Bindegewebsplatte, gebildet (Abb. 8). Auf ihr befindet sich das Spiralorgan oder Corti'sche Organ (Organum spirale), das Schallwellen in Nervenreize umwandelt. Die dorsale Wand (Pariet vestibularis ductus cochlearis) stellt die Begrenzung zur Scala vestibuli dar und wird von der mit einschichtigem Plattenepithel ausgekleideten Reissner'schen Membran (Membrana vestibularis) gebildet. Die Außenwand (Pariet externus ductus cochlearis) wird von dem fest mit dem Periost der knöchernen Schnecke verwachsenen Spiralband (Ligamentum spirale cochleae) gebildet. Dieses besitzt ventral eine Erhebung (Prominentia spiralis) für das Vas prominens. Oberhalb dieser wird das Spiralband von einem Endolymphe bildenden, gut kapillarisierten, epithelartigen Zellverband, der Stria vascularis, bedeckt. Die Innenwand, also der freie Rand der Lamina spiralis ossea, wird durch einen Saum (Limbus laminae spiralis ossea) verstärkt. Dieser wird durch die Lamina basilaris in einen oberen und in einen unteren Ausläufer aufgeteilt, das Labium limbi vestibulare und tympanicum. Das mit einem einschichtigem,

iso- bis hochprismatischem Epithel ausgestattete Labium limbi vestibulare dient dem Ansatz der Membrana tectoria und begrenzt zusammen mit dieser den Sulcus spiralis internus. Die gallertige Membrana tectoria überdeckt darüber hinaus die Sinneszellen des Corti'schen Organs und spielt bei der Übertragung der Schwingungen hin zu wahrnehmbaren Sinnesreizen eine entscheidende Rolle (Abb. 8). Das Corti'sche Organ besteht aus Stereozilien tragenden inneren und äußeren Haar- oder Hörzellen, die durch Tonofibrillen verstärkte innere und äußere Stützzellen (sog. Phalangen- oder Deiters'sche Zellen) in ihrer Position gehalten werden. Die Hörzellen sitzen axial und peripher vom inneren Tunnel, der unterhalb der Membrana tectoria durch zwei Stützpfiler aus modifizierten Stützzellen, den sog. Pfeilerzellen gebildet wird. In ihrer Gesamtheit laufen die Hörzellen entlang des Schneckengangs in spiralförmig angeordneten Reihen mit einer axialen und drei bis fünf peripheren Hörzellen. Zum Spiralband hin besteht das Spiralorgan aus hochprismatischen Hensen'schen Zellen und den an sie anschließenden kubischen Claudius'schen Zellen, die gemeinsam den Grund des Sulcus spiralis externus bilden (Nickel et al. 2004; Salomon et al. 2015) (Abb. 8).

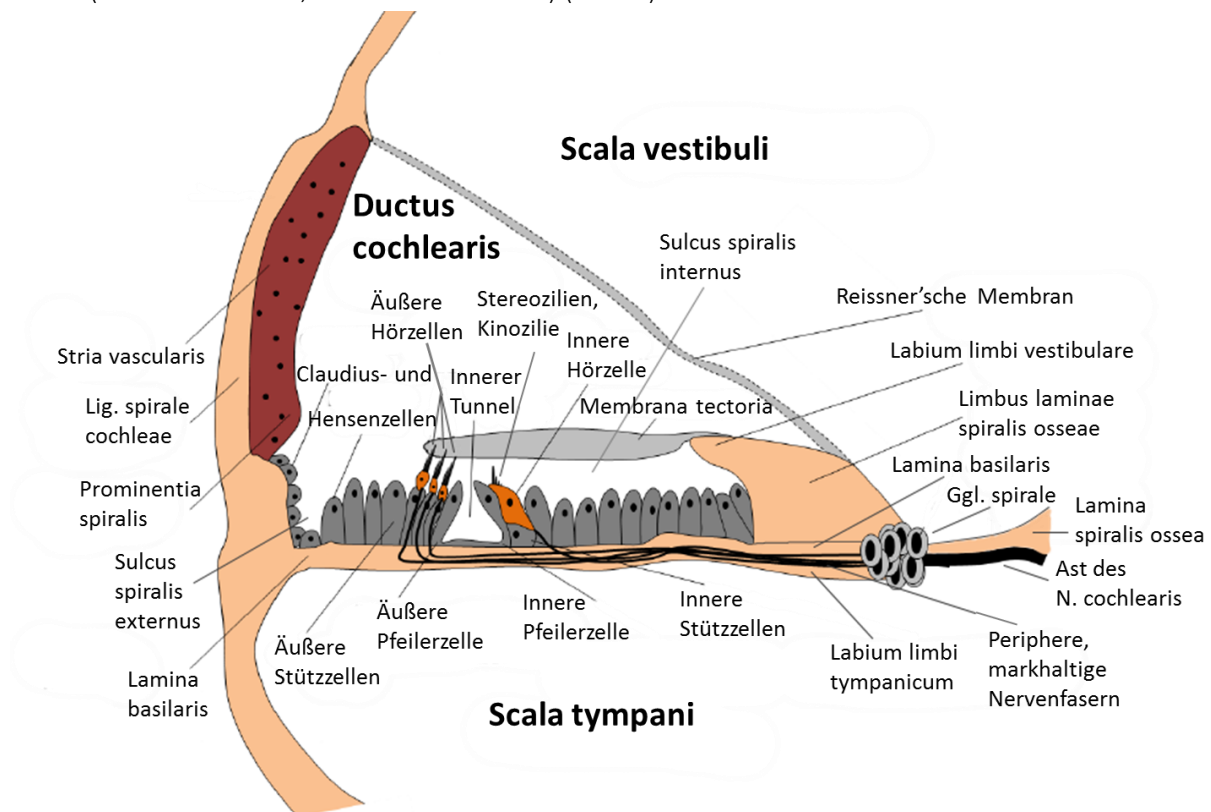


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Schneckengangs im Querschnitt. Aus Heitmann (2018).

Die durch Schallwellen entstandenen Schwingungen entsprechen Wellenbewegungen der nahezu inkompressiblen Perilymphe in der Scala vestibuli. Diese werden auf die Lamina vestibularis, die Lamina basilaris und den Ductus cochlearis übertragen. Dadurch erfolgt eine relative Verlagerung dieser Strukturen zur Membrana tectoria, wodurch es zu einer Ablenkung der Stereozilien auf den Hörzellen kommt. Die Lamina spiralis ossea wird zur Schneckenspitze hin dünner, daher werden hochfrequente Töne (Frequenz f) mit einer entsprechend niedrigen Wellenlänge λ (erklärbar durch die Formel für die

Schallgeschwindigkeit c : $c = \lambda * f$ (Böge 1970)) von basalen Hörzellen registriert, niederfrequente Töne mit großer Wellenlänge hingegen durch weiter apikal gelegene Hörzellen.

Die Innervation erfolgt durch den N. cochlearis des N. vestibulocochlearis. Dieser tritt am Grund des Modiolus axial in selbigen ein und teilt sich entsprechend dem Verlauf der Lamina spiralis ossea in einzelne, markhaltige Fasern bzw. Faserbündel (zentrale Axone bipolarer Nervenzellen), die im Canalis spiralis modioli liegen und in ihrer Einheit das Ganglion spirale cochleae darstellen. Von diesem treten bis zur Unterseite der Lamina spiralis ossea zunächst ebenfalls markhaltige Nervenfasern fächerförmig aus, die dann nach Durchquerung des inneren Tunnels die Hörzellen umspinnen (König & Liebich 2015; Nickel et al. 2004; Salomon et al. 2015) (Abb. 8).

2.1.3 Small und hyperostotic tympanic bone spicules

Unter small und hyperostotic tympanic bone spicules (STBS bzw. HTBS) versteht man kleine bzw. hyperostotische, gestielte, trommelschlegelartige Knochenstrukturen, die in die Paukenhöhle hineinragen (Parzefall et al. 2015). Es wird von STBS gesprochen, wenn die eventuell vorhandene, auf dem Ende des Stiels sitzende, runde Knochenstruktur einen Durchmesser von weniger als 1 mm besitzt. Die Länge des Stiels spielt für die Unterscheidung zwischen STBS und HTBS keine Rolle. Als HTBS werden entsprechende Strukturen mit einem Kopfdurchmesser von ≥ 1 mm bezeichnet. STBS und die Stiele der HTBS bestehen aus kompaktem Knochen mit Bindegewebe und einem Platten- oder Flimmerepithel. Die runden, als Köpfe bezeichneten Spitzen der HTBS bestehen aus lebendem, vaskularisiertem Lamellenknochen (Parzefall et al. 2015). Es liegen keinerlei Anzeichen für entzündliche Reaktionen oder Nekrosen vor (Novales et al. 2015; Parzefall et al. 2015).

In den ersten Beschreibungen wurden STBS und HTBS noch als Otolithen bezeichnet und mit einer Otolithiasis in Verbindung gebracht (Drees 2011; Farrow 1992; Ziemer et al. 2003). Parzefall et al. (2015) stellten keinen Zusammenhang zwischen der Entwicklung von TBS und einer Entzündung fest, jedoch kann eine entzündliche Ursache auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden (Heitmann et al. 2016). TBS wurden von Novales et al. (2015) erstmals als knöcherne Strukturen („Mucoperiosteal Exostoses, MpEs“) beschrieben. Die Bezeichnung mukoperiosteale Exostose wird als Synonym für die von Parzefall et al. (2015) eingeführte Benennung der S- oder HTBS verwendet. HTBS wurden schon bei vielen verschiedenen Tierarten festgestellt und untersucht. Novales et al. (2015) untersuchten an acht afrikanischen Löwen Auftreten, Anzahl, Form, Größe und Lage von MpEs mittels Röntgen, CT, pathologischer Adspektion und histologischer Untersuchung. Bei allen Löwen lagen MpEs in mindestens einer Paukenhöhle vor, bei vier sogar bilateral. Heitmann et al. (2016) untersuchten in Routinesektionen 78 verschiedene Wirbeltierspezies (domestizierte, wilde oder im Zoo lebende Tiere) auf das Vorliegen von STBS und HTBS. Diese wurden lediglich bei großen felinen (u.a. beim sibirischen Tiger oder dem afrikanischen Löwen) sowie bei mehreren großen caniden Arten (u.a. beim Rotfuchs oder beim Wolf)

entdeckt. Bei jeglichen anderen Arten wie kleineren Feliden (u.a. 205 domestizierte Hauskatzen), anderen Carnivoren (Weißbrustmarder, Europäischer Dachshund, Waschbär), Equiden (u.a. über 50 Pferde), Paarhufern (u.a. über 20 Alpacas, jeweils über 30 domestizierte Schafe, Ziegen sowie Rinder, über 50 Schweine sowie 15 Rehe), Lagomorphen (über 50 europäische Hasen) oder Nagetieren (u.a. über 50 Hausmäuse und Minischweine, 25 große Pampashasen sowie 10 Langschwanz-Chinchillas) lagen weder STBS noch HTBS vor. Bei Hauskatzen gibt es zum Vorliegen von STBS und HTBS in der zugänglichen Literatur bisher ebenfalls keine Beschreibungen.

2.2 Computertomographie

2.2.1 Aufbau des Computertomographen

Die heutzutage meistangewandte Technik der CT basiert auf den 1975 entwickelten Geräten der dritten Generation. Eingesetzt wird hierbei ein Fächer- oder Kegelstrahl und ein mitrotierender Detektor, das Untersuchungsobjekt bleibt unbewegt auf dem Patiententisch. Dieser verändert seine Position nur entlang der z-Achse (Kalender 2006). Geräte der vierten Generation besitzen anstelle des mitrotierenden Detektorbogens einen feststehenden Detektorring über 360° (Schultz & Felix 1980). Abhängig von der Schichtanzahl M wird ein Fächerstrahl mit 2D-Rekonstruktion ($M=4$) oder ein Kegelstrahl mit 3D-Rekonstruktion ($M>4$) verwendet. Ein Szintillator wandelt die Röntgenstrahlen in sichtbares Licht um, das anschließend mittels Linsen- oder Glasfaseroptik zum Detektor weitergeleitet wird. Dort erfolgt die Umwandlung in ein elektrisches Signal (Kalender 2006).

2.2.2 Anwendung der Computertomographie

Die CT wird in der Humanmedizin heutzutage vielfältig eingesetzt. U.a. bei der Planung und Diagnostik operativer Eingriffe jeder Art (Von Schulthess 2017), im Rahmen der Osteoporosediagnostik postmenopausaler Frauen (Brasileiro et al. 2017) oder zur Diagnose von Brustkrebs (Alcantara et al. 2014; Jafari et al. 2018). Des Weiteren wird die CT als beste Technik zur Untersuchung von Frakturen, angeborenen Missbildungen und Osteodystrophien des Innenohres beschrieben (Casselmann & Bensimon 1997).

Die CT ist bei Hunden und Katzen gut dafür geeignet, knöcherne Strukturen des Mittel- und Innenohres darzustellen (Garosi et al. 2003). Bei der Diagnose einer möglichen Otitis media wird die CT ebenfalls sowohl bei Katzen (Shanaman et al. 2012) als auch bei Hunden eingesetzt (Rohleder et al. 2006). Die CT ist dabei präziser und zuverlässiger als Röntgenaufnahmen (Rohleder et al. 2006).

2.3 Mikro-Computertomographie

2.3.1 Aufbau des Mikro-Computertomographen

μ CT können anwendungsbedingt verschieden aufgebaut sein. Die erstentwickelten μ CT-Geräte wurden zunächst ausschließlich in der Präklinik (ex vivo und in vitro) eingesetzt. Die Apparatur bestand aus einem um die eigene Achse rotierenden Objektstisch und einer stationären Multifokusröntgenröhre mit Fächerstrahl (Burstein et al. 1984; Kujooory et al. 1980). Der heute immer noch meist angewendete Kegelstrahl-Algorithmus zur Erzeugung von dreidimensionalen Bildern wurde von Feldkamp et al. (1984) entwickelt und danach von vielen Forschern überarbeitet und verbessert (Feldkamp et al. 1988; Johnson et al. 1998; Ritman 2004; Ritman 2011). I.d.R. werden bei in vivo- μ CT-Untersuchungen Geräte eingesetzt, die dem Grundaufbau von CT der 3. Generation sehr ähnlich sind. Auch hier rotiert ein Röntgenröhren-Detektor-System um einen lebenden Körper (z.B. die menschliche Tibia o.ä.). Allerdings werden auch u.a. Biopsien oder andere Proben mit in vivo- μ CT untersucht (Kalender 2006). Der Durchbruch der in vivo- μ CT gelang mit dem Entwurf des ersten vollautomatischen Desktop- μ CT (Rüegsegger et al. 1996).

Bei Untersuchungen lebender Körper kann aufgrund der Strahlenbelastung nicht mit einer unbegrenzt hohen Strahlendosis gearbeitet werden, es wird nach dem ALARA-Prinzip (As Low As Reasonably Achievable) vorgegangen (Kalender 2006). Die Scanzeiten und somit die Narkosezeit der Patienten sollte ebenfalls so kurz wie möglich sein (Figueroa et al. 2008).

Die Ortsauflösung der μ CT ist mit üblicherweise maximal erreichbaren Werten zwischen 5 und 50 μ m gegenüber der CT deutlich erhöht. Von μ CT wird i.d.R. ab einer erreichten Ortsauflösung von unter 100 μ m gesprochen (Engelke et al. 1999; Kalender 2006). Geräte, die Ortsauflösungen unter 1 μ m erreichen, werden als nano-CT bezeichnet (Stock 2008). Der sehr kleine Röntgenröhrenfokus der μ CT wird durch den Einsatz von Mikrofokusröntgenröhren erzielt (Kalender 2006).

2.3.2 Anwendung der Mikro-Computertomographie

Die μ CT ist ein sehr vielseitig einsetzbares Verfahren mit der Möglichkeit einer nicht-destruktiven Analyse von u.a. Knochen und Materialien aller Art in sehr hoher Auflösung. Aufgrund dessen wird die μ CT neben medizinischen Bereichen auch in einer Vielzahl nicht-medizinischer Gebiete angewendet. Darunter fallen u.a. die Archäologie (Untersuchungen an Fossilien und Knochen (Tate & Cann 1982)), Pedologie, Holzindustrie (Steppe et al. 2004), Biologie (z.B. Untersuchungen über die biologische Verwitterung von Stein und Beton (De Graef et al. 2005), Einfluss von Frost-Tau-Zyklen auf die Porosität von Stein (De Kock et al. 2015) oder Analysen historischer Steinbohrungen, Echtheitsprüfung von Jade (Yang et al. 2011)) und die Industrie (van Kaick & Delorme 2005). Zusätzlich wurden verschiedene Forschungsprojekte durchgeführt, u.a. die Charakterisierung der Porenstruktur in Sandsteinen sowie

der Mikrostruktur von Lebensmitteln, dreidimensionale Gewebeanalysen von Polyester und Mumienanalysen (Scanco Medical AG 2017).

Kommerziell werden μ CT-Geräte von unterschiedlichen Firmen angeboten, u.a. Siemens, GE Health Care, Skyscan, Emosystems oder Scanco. Die μ CT erreichen herstellerabhängig Ortsauflösungen von 0,7 μ m (EMO Systems GmbH 2017) bis hin zu 0,35 μ m (ultra-hochauflösendes μ CT-Gerät von Micro Photonics (Micro Photonics Incorporation 2017)). In der Medizin wird bei der μ CT zwischen präklinischer und klinischer Anwendung unterschieden.

2.3.2.1 Präklinische Anwendung

Nach der Entwicklung erster μ CT-Geräte kamen diese zunächst in der biomedizinischen Forschung zum Einsatz. Hier wurden sowohl ex vivo-als auch in vitro-Untersuchungen von Biopsiematerial, Gewebeproben oder an ganzen Organen durchgeführt. Das Spektrum erweiterte sich schnell und die Kleintierbildgebung und in vivo- μ CT erlangte eine immer größere Bedeutung (Ford et al. 2003; Paulus et al. 2001; Paulus et al. 2000; Vasquez et al. 2013).

2.3.2.1.1 In vitro-Untersuchungen

Feldkamp et al. (1989) untersuchten mittels in vitro- μ CT erstmalig die 3-dimensionale Knochenstruktur menschlicher Spongiosa. Ito (1998) beschrieben die μ CT als die bis dato beste Methode zur 3-dimensionalen Analyse von Kleintierknochen in vitro.

Bei Menschen wurden Zahnwurzelfüllungen und Versiegelungen mit Blick auf Hohlrumbildungen und Lücken getestet (Celikten et al. 2016; Gandolfi et al. 2013; Keles et al. 2014).

2.3.2.1.2 Ex vivo-Untersuchungen

Bei ex vivo-Untersuchungen spielt die auf die Probe bzw. das Versuchsobjekt einfallende Strahlendosis keine große Rolle, da es sich nicht um lebende Objekte handelt. Somit kann mit einem sehr kleinen Fokus und langer Scanzeit gearbeitet werden, wodurch Bilder mit einer sehr hohen Auflösung von bis zu 0,5 μ m rekonstruiert werden können.

Die ex vivo- μ CT wird sowohl bei Tieren als auch bei Menschen vielfältig eingesetzt. Sowohl bei Tiermodellen (Barou et al. 2002; Kapadia et al. 1998; Laib et al. 2000; Layton et al. 1988; Wachsmuth & Engelke 2004) als auch bei menschlichen Knochenproben (Ding et al. 2003; Muller & Ruegsegger 1997) im Rahmen der Forschung bezüglich Osteoporose und Osteoarthritis. Zusätzlich wird in der Biomedizin noch genauer auf die Makro- und Mikrostruktur des Knochens eingegangen. So wird u.a. die Knochenvolumendichte, Knochentrabekeldicke, -Struktur, und -Abstand sowie die Mineralkonzentration in spongiösem und kortikalem Knochen bei Proben von Tierknochen (Balto et al. 2000; Kuhn et al. 1990; Wang et al. 2007) und Menschenknochen (Ding et al. 1999; Kuhn et al. 1990; Muller & Ruegsegger 1997; Muller et al. 1998) bestimmt. Tumorinduzierte Osteolysevorgänge und

antiosteolytische Therapien wurden an Ratten untersucht und durchgeführt (Kurth et al. 2000; Kurth & Muller 2001).

Weiterhin dient v.a. die Ratte als Versuchstier für vaskuläre Grundlagenforschung mit der μ CT. Mittels Injektionen röntgendichter Detergenzien/Kontrastmittel wurden verschiedenste Gefäße dargestellt: Die Portalvenenaufzweigungen in der Leber (Kline et al. 2011; Op Den Buijs et al. 2006), die Gefäße innerhalb der Gallenblase (Kline et al. 2011), die Gefäße der Niere (Garcia-Sanz et al. 1998; Jorgensen et al. 1998) sowie das Skelettmuskelgefäßsystem der Hintergliedmaßen (Jorgensen et al. 1998).

Ein weiteres Einsatzgebiet der ex vivo- μ CT ist die Unbedenklichkeitsprüfung von Medikamenten vor der klinischen Anwendung. Hu et al. (2002) verabreichten Hunden oral über zwölf Wochen Alendronsäure. Anschließend wurden Knochenproben aus den ersten beiden Lendenwirbeln und den proximalen Humeri genommen und mittels μ CT untersucht, um die anabolische Wirkung auf die Knochentrabekel zu testen. Day et al. (2004) verabreichten Beagles 1 Jahr lang Alendronsäure in der 5-6-fachen klinischen Dosierung für die Behandlung von Osteoporose. Untersucht wurden ebenfalls Knochenproben des ersten Lendenwirbels. Die mechanischen Eigenschaften verbesserten sich durch die Alendronsäure-Gabe ebenso wie die Struktur der Knochentrabekel. Am Beispiel von Rattenunterkiefern wurde nachgewiesen, dass Alendronsäure- β -Cyclodextrin-Konjugate eine anabolische Wirkung auf den Knochen haben und somit zur Osteoporose-Therapie verwendet werden können (Liu et al. 2008).

2.3.2.1.3 In vivo-Untersuchungen

In vivo-Untersuchungen wurden sowohl beim Menschen als auch beim Tier durchgeführt.

Zunächst wird auf die Anwendungen beim Menschen eingegangen. Ding et al. (2003) verglichen zehn post-mortem Tibiae mit früher Osteoarthritis mit zehn physiologischen Tibiae. Das Hauptaugenmerk lag auf der 3-dimensionalen Mikrostruktur der osteoarthritisch veränderten Spongiosa und der mechanischen Eigenschaften. Die Spongiosa war signifikant verdickt wohingegen die mechanischen Eigenschaften gegenüber normalem Knochen verringert waren. Des Weiteren wurde viel über die Knochenmikrostruktur verschiedener Knochen unterschiedlicher Zielgruppen geforscht. U.a. Radius und Tibia osteoporöser Patienten (Durand & Ruegsegger 1991; Oei et al. 2016), die Knochenmikrostruktur der Tibiae von Jugendlichen (Burrows et al. 2010) oder contra-laterale Radii postmenopausaler Frauen nach distaler Radiusfraktur (De Jong et al. 2017). Ozan et al. (2017) untersuchte Unterschiede zwischen älteren osteoporösen und osteopenen Patienten bezogen auf die trabekuläre Morphologie und biomechanischen Eigenschaften von Femora nach vorausgehender proximaler Fraktur.

Die Anwendungsbereiche der in vivo- μ CT bei Tieren sind ebenso vielfältig wie ex vivo- und in vitro- μ CT Untersuchungen. Osteoarthritische Veränderungen im trabekulären, subchondralen Knochen bei myektomierten Hintergliedmaßen von Meerschweinchen wurden von Dedrick et al. (1991) untersucht. Bei Mäusen konnten Lungentumore mittels eines in vivo- μ CT mit einer Auflösung von 15 μ m erkannt

sowie deren genaues Ausmaß und Fortschreiten festgestellt werden (De Clerck et al. 2004). Vergleichbare Untersuchungen wurden von Kennel et al. (2000) durchgeführt, wobei mit einer Schichtdicke von 300 μm gearbeitet wurde. Die μCT ist demzufolge ein effektives, nichtinvasives diagnostisches bildgebendes Verfahren zur Erkennung von frühen sowie fortgeschrittenen Lungentumoren bei Mäusen. Somit kann die μCT bei Langzeitstudien zur Untersuchung von Wachstum, Entwicklung sowie medikamenteller Behandlung von Lungentumoren eingesetzt werden und ermöglicht eine Reduktion der Versuchstierzahl bei karzinogenen Studien. Johnson (2007) untersuchte Rattenlungen mit dem Ergebnis, dass in vivo- μCT Informationen über die Lungenfunktion sowie Veränderungen der Gewebeeigenschaften liefert. Ebenfalls wird auf den Einsatz der μCT bei Langzeitstudien hingewiesen. Weiterhin wurden Mäuse u.a. dafür verwendet, die trabekuläre sowie kortikale Knochenmikrostruktur zu quantifizieren (Jiang et al. 2000) oder die Kallusbildung bei Frakturheilung detaillierter zu untersuchen (Morgan et al. 2009; O'Neill et al. 2012). Die μCT stellt zusätzlich ein Verfahren zur Beurteilung von angeborenen sowie entstehenden Skelettanomalien bei Nagern dar (Ford-Hutchinson et al. 2003). Osteoporose-Forschung und der Einsatz von Bisphosphonaten wurde ebenfalls an Tiermodellen untersucht, meist wurde dabei mit ovariektomierten Ratten gearbeitet (Boyd et al. 2006; Brouwers et al. 2008; Campbell et al. 2008). An Meerschweinchen wurde der Einfluss von Bitterrezeptor-Agonisten auf die nasale sowie bronchiale mukoziliäre Reinigung untersucht (Ortiz et al. 2016). Beim Menschen wurde dieser Einfluss lediglich in vitro und ex vivo untersucht. Badea et al. (2004) entwickelten erstmals eine Apparatur, die in vivo- μCT -Untersuchungen des kardiopulmonalen Systems bei Mäusen ermöglichte. Des Weiteren konnten Badea et al. (2005) damit die Struktur sowie Funktion von Mäuseherzen charakterisieren. Almajdub et al. (2008) zeigten, dass mittels Kontrastmittel präzise in vivo- μCT -Messungen des Nierenvolumens-, der Länge- und der Dicke bei Mäusen möglich sind. Mit Hilfe dieser Technik können Mäusenieren phänotypisiert werden und Studien über Nierenerkrankungen durchgeführt werden. Die Wirkung des gebräuchlich verwendeten Antidepressivums Fluoxetin auf die Knochenstruktur wurde anhand von Wirbeln und Oberschenkeln von Mäusen getestet. Erzielte Ergebnisse der Medikation sind u.a. eine Erhöhung der Knochentrabekelanzahl sowie eine verstärkte Trabekelverbindung (Battaglino et al. 2007).

2.3.2.2 Klinische Anwendung

μCT werden bislang nur beim Menschen klinisch eingesetzt. Wang et al. (2005) beschrieben erstmals ein klinisches μCT -System für das Schläfenbein. Dabei wurden die Stärken der klinischen CT mit denen der μCT kombiniert. Ihre Analysen und Simulationen zeigten, dass dieses klinische μCT -System sowohl bei der Bildgebung des Innenohres als auch bei anderen klinischen Fragestellungen praktikabel ist, genannt wird u.a. die Erhöhung der Sicherheit beim Einsatz von Cochleaimplantaten.

Die μ CT wird u.a. im Bereich der Osteoporose und zur Beurteilung der 3-dimensionalen Mikroarchitektur von Knochen eingesetzt. Hier wird die μ CT bereits als der Goldstandard beschrieben (Mys et al. 2018). Klinisch werden neben der Osteoporose-Diagnostik auch die Knochenmikrostrukturen sowie die mechanischen Eigenschaften beurteilt. Die Untersuchungen werden meist an postmenopausalen Frauen durchgeführt, die ein hohes Osteoporose-Risiko haben. Aufgrund der gerätetechnischen Limitationen können ausschließlich kleinere Extremitäten wie der distale Radius oder die distale Tibia mit der μ CT untersucht werden (Boutroy et al. 2005; Boutroy et al. 2008; Kazakia et al. 2008; Mys et al. 2018; Vilayphiou et al. 2010). Dabei werden spezielle in vivo- μ CT-Geräte eingesetzt (High-Resolution peripheral Quantitative Computed Tomography-Geräte, zu Deutsch: hochauflösende periphere quantitative Computertomographen) (Micro Photonics Incorporation 2017; Scanco Medical AG 2017). De Jong et al. (2017) beschäftigten sich mit der Veränderung der Mikroarchitektur und der Stärke des Radius nach einem Bruch des kontralateralen, distalen Radius bei postmenopausalen Frauen. Es wurde u.a. ein signifikanter Rückgang an kortikaler Knochendichte gemessen. Kazakia et al. (2014) untersuchten den Einfluss der Nichtnutzung der Tibia auf die trabekuläre und kortikale Mikroarchitektur sowie eine mögliche Veränderung der Biomechanik. Folgen des Nichtgebrauchs sind u.a. eine herabgesetzte Steifigkeit sowie eine erhöhte Porösität. Diese Ergebnisse können eine große Rolle bei der Frakturprävention aufgrund des Nichtgebrauchs von Knochen spielen. Zusätzlich konnte von Oei et al. (2016) eine erhöhte Knochenporösität und in diesem Zusammenhang eine gesteigerte Frakturneigung bei Menschen mit inadäquat behandeltem Typ 2 Diabetes festgestellt werden. Ein weiteres klinisches Anwendungsgebiet ist die Zahnmedizin. Hier kann mit Hilfe der μ CT eine erfolgreiche Platzierung von Zahnimplantaten gewährleistet werden und eine langfristige Kontrolle erfolgen. Das ergab die retrospektive Auswertung des Nutzens der in vivo- μ CT gegenüber intraoralen Röntgenaufnahmen (Suomalainen et al. 2007).

2.3.2.3 Anwendung am humanen und tierischen Ohr

Untersuchungen in der Literatur befassen sich überwiegend mit der genauen Abbildung der Anatomie des Mittel- und Innenohres. In der Humanmedizin wurden ex vivo- μ CT-Untersuchungen eingesetzt um u.a. die Cochlea (Braun et al. 2012; Vogel 1999), das Schläfenbein mit Mittel- und Innenohr (Lee, Chan, et al. 2010; Postnov et al. 2006) und die Bogengänge (Lee et al. 2013) detailliert darzustellen. Diese anatomischen Kenntnisse sind die Voraussetzung für mathematische Simulationen der Schallwellenausbreitung oder für mechanische Cochleamodelle des Menschen (Braun et al. 2012). Im Bereich des Einsatzes von Cochleaimplantaten beim Menschen spielt die ex vivo- μ CT ebenfalls eine tragende Rolle. Das Potenzial für einen klinischen Einsatz bei der Cochleaimplantat-Chirurgie wird bereits erwähnt (Zou et al. 2015). Mittels μ CT kann u.a. der korrekte Sitz der Implantate überprüft werden (Postnov et al. 2006; Zou et al. 2015).

Am tierischen Ohr wurden verschiedene Strukturen mit der ex vivo- μ CT genauer dargestellt, u.a. die Cochlea und das häutige Labyrinth von Meerschweinchen (Poznyakovskiy et al. 2008; Uzun et al. 2007). Des Weiteren konnten verschiedene 3-dimensionale geometrische Modelle hergestellt werden: Lee, Li, et al. (2010) entwickelten ein präzises Modell des ganzen Ohres von Meerschweinchen, Buytaert et al. (2011) bildeten die knöchernen Strukturen eines Gerbil-Modells ab (die Weichteilstrukturen wurden hier mittels eines hochauflösenden Fluoreszenzmikroskops abgebildet) und Sun et al. (2013) stellten ein Mittel- und Innenohrmodell von Mäusen her. Mechanismen und Typen des Hörverlustes aufgrund von Cochlea-Implantationen über das runde Fenster wurden an Ratten nachvollzogen (Attias et al. 2016). Veränderungen der Mechanismen innerhalb des Innenohres sind dabei höchstwahrscheinlich verantwortlich für den konduktiven Hörverlust, da durch den Hörverlust keine deutlichen Veränderungen der Innenohrhistologie entstanden.

2.4 Diagnose von Mittel- und Innenohrerkrankungen mittels CT und μ CT

2.4.1 Diagnosemöglichkeiten mittels CT

Bei ca. 6-7% aller beim Tierarzt vorgestellten Katzen liegt eine Problematik des Ohres zu Grunde, wobei das Mittel- oder Innenohr bei über 50% dieser Katzen Ausgangspunkt der Erkrankung sind. Somit ergibt sich eine Gesamtzahl von 3-3,5% für Mittel- oder Innenohrerkrankungen bei der Katze (Gotthelf 2008; Kraft & Dürr 2003). Bei vielen Patienten reichen adspektorische Untersuchung und Röntgen nicht aus, um die Krankheit zu diagnostizieren, folglich müssen weiterführende bildgebende Verfahren wie die CT oder die MRT angewandt werden. Mit der CT können knöcherne Strukturen besser beurteilt werden als mit der MRT (Garosi et al. 2003). Deswegen können mit der CT viele Erkrankungen des Mittel- und Innenohres diagnostiziert werden, zu nennen sind hier u.a. nasopharyngeale Polypen (Oliveira et al. 2012; Seitz et al. 1996), Entzündungen/Cholesteatome oder Neoplasien des Mittelohres sowie Missbildungen/Entzündungen/Frakturen oder Osteodystrophien des Innenohres (Bischoff & Kneller 2004; Casselman & Bensimon 1997; Garosi et al. 2003; King et al. 2007).

2.4.2 Vorteile der μ CT

Die μ CT ermöglicht Untersuchungen mit einer höheren Ortsauflösung als bei der konventionellen CT (Holdsworth & Thornton 2002; Kalender 2006). Das ist auch im Hinblick auf die Beurteilbarkeit von Strukturen, die bei Erkrankungen des Mittel- und Innenohres der Katze betroffen sein können, der wichtigste Vorteil der μ CT. Seifert et al. (2012) zeigte auf, dass einige Strukturen wie die Bogengänge, das Paukenhöhlenseptum oder die Gehörknöchelchen mit dem μ CT detaillierter dargestellt werden

können als mit dem CT. Andere Strukturen wie dünne Knochenlamellen oder das Trommelfell können nur mit dem μ CT dargestellt werden.

2.4.3 Grenzen der μ CT

Die Grenzen der Beurteilbarkeit der μ CT des Mittel- und Innenohres der Katze wurden von Seifert et al. (2012) ermittelt, indem histologische Schnitte mit den entsprechenden μ CT-Bildebenen verglichen wurden. Es zeigte sich, dass sämtliche knöcherne Strukturen wie die Paukenhöhlenwand, die Gehörknöchelchen und das knöcherne Labyrinth gut abgebildet werden. Ebenso konnten die Autoren Hohlräume wie das Paukenhöhlenlumen und den Aquaeductus vestibuli sowie vereinzelt Nervenkanäle (u.a. den Kanal des N. facialis) gut abgrenzen. Hingegen war es nur eingeschränkt möglich, verschiedene Weichteilgewebe wie das häutige Labyrinth, das Trommelfell oder Mukosaauskleidungen zu differenzieren und zu bewerten.

2.5 Fixationsmethoden von Knochengewebe

2.5.1 Formalin

Formalin ist ein Fixationsmittel, das sowohl in der Forschung als auch im klinischen Bereich standardmäßig eingesetzt wird (Schuknecht 1993). Die meist verwendeten, kommerziellen Formaldehyde-Lösungen, die bei Studien zur Untersuchung des Einflusses einer Formalinfixation angewendet werden, enthalten 4-10% Formaldehyde. Morita et al. (2013) untersuchten den Einfluss von Formalinfixierung auf die mechanische Festigkeit bei Kaninchentibiae mittels eines Dreipunktbiegeversuchs. Die total absorbierte Energie der für 4 Stunden in 10% Formalin fixierten Proben war signifikant geringer verglichen mit der Kontrollgruppe. Zhang et al. (2016) untersuchten die mechanischen Eigenschaften von kortikalem Knochen bei fünf Rinderoberschenkeln. Der Youngsche Modul (=Elastizitätskoeffizient) der für 30 Tage in 4% Formalin fixierten Proben war 12% geringer verglichen mit frisch-gefrorenen Proben. Formalin reduziert folglich die viskoelastischen Eigenschaften in Knochen. Erste Untersuchungen über die antiseptischen Eigenschaften von Formaldehyd wurden bereits 1892 durch Ferdinand Blum durchgeführt (Fox et al. 1985). Der Einfluss der Temperatur und der Formalinkonzentration wurde ebenso analysiert wie die Gewebeschrumpfung und mögliche Kontamination durch Methansäure. Die Zellkernanzahl erhöhte sich pro Flächeneinheit signifikant für Temperaturen von 37°C verglichen mit 4°C. Der Einfluss der Formalinkonzentration auf die Zellkerngröße und das Zytoplasmavolumen war für den Konzentrationsbereich von 1% - 20% gering. Gewebeschrumpfungen traten ebenfalls nur in minimalem Umfang auf (Fox et al. 1985). Fiedler et al. (2018) untersuchten den Einfluss der Kurzzeitformalinfixierung (12 Stunden in 4% Paraformaldehydlösung) von Mäusefemora auf die Mikroarchitektur des Knochengewebes und auf die Knochenzusammensetzung. Der Kollagenverfall der fixierten Proben war um 3,8% geringer

verglichen mit den unfixierten Proben. Die Knochenzusammensetzung der Formalin-fixierten Proben wurde nur minimal beeinflusst.

2.5.2 Tiefgefrieren

In der Forschung werden verschiedene Methoden des Tiefgefrierens angewandt. Zhang et al. (2019) untersuchten u.a. die Mikrostruktur von 3cm-dicken Koteletts des Musculus longissimus lumborum von Schweinen mittels Luftgefrieren, Immersionsgefrieren und ultraschallgestütztem Immersionsgefrieren. Die Proben wurden zwischen 0 und 180 Tagen bei $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die ultraschallgestützt immersionsgefrorenen Koteletts erschienen einerseits kompakter und dichter, andererseits war die Eiskristallgröße deutlich geringer als bei den anderen Proben. Die Größe der Eiskristalle nahm bei allen Tiefgefrieremethoden mit zunehmender Dauer erheblich zu.

Eine weitere angewandte Tiefgefrieremethode ist das Tiefgefrieren und Lagern in der Tiefgefriertruhe bei einer Standard-Temperatur von -20°C (Lander et al. 2014). Die Autoren untersuchten u.a. die Effekte von 21-tägigem Tiefgefrieren bei -20°C auf die Mikrostruktur von Knochenproben der menschlichen Tibia. Der maximale Durchmesser und die mittlere Fläche der Havers'schen Kanäle zeigte keine signifikanten Unterschiede, jedoch stellten sich die Risse auf der Knochenoberfläche der tiefgefrorenen Proben ausgeprägter dar.

Hochdruckgefrierverfahren wurden u.a. an Mäusen, Gerbils und Meerschweinchen angewandt, um eine bessere Erhaltung der Zellstrukturen des Innenohres zu erhalten (Bullen et al. 2014). Slepecky & Ligotti (1992) verglichen die sensorischen Haarzellen des Innenohres bei Meerschweinchen nach Kryokonservierung und folgender Gefriersubstitution mit konventionell fixierten Proben (u.a. 2% Glutaraldehyd gefolgt von Osmiumsäure und verschiedenen Pufferlösungen (Slepecky et al. 1990)). Das Zytoplasma der äußeren Haarzellen war dicht mit Filamenten gefüllt und eine Konturveränderung der Zellmembranen wurde verhindert.

2.5.3 Tiefgefrieren und Auftauen

Lee & Jasiuk (2014) verglichen den Youngschen Modul und die Druckfestigkeit von Schweinefemora, die für ein bzw. fünf Jahre bei -20°C eingefroren wurden und anschließend für 24 Stunden bei 4°C aufgetaut wurden mit frischen Femora. Der Mittelwert des Youngschen Moduls der gefrorenen Femora lag signifikant unter dem Wert der frischen Proben, wohingegen die Dauer des Tiergefrierens keine deutlichen Unterschiede zeigte. Bei der Druckfestigkeit zeigte sich nur für die fünf Jahre eingefrorenen Femora ein signifikanter Rückgang verglichen mit den anderen Femora. Veränderungen der Matrixkomponenten in kortikalem Knochen von Mäusefemora durch vierfaches Einfrieren und Auftauen untersuchten McElderry et al. (2011) mittels Raman-Spektroskopie. Die Proben wurden bei -23°C für mindestens 12 Stunden eingefroren, anschließend bei Raumtemperatur in einer Salzlösung aufgetaut, untersucht und erneut eingefroren. Es zeigten sich u.a. deutliche Gesamtrückgänge der

Amid 1- und Amid 3-Banden (-21% und -11%), die auf einen Zerfall der sekundären Proteinstruktur oder eine Denaturierung hindeuten. Des Weiteren verglichen Torimitsu et al. (2014) die Bruchlast von menschlichen Schädelknochenproben nach Tiefgefrieren mit frischen Knochen. Dafür wurden die Knochenproben für einen Tag, einen Monat oder drei Monate in der Gefriertruhe bei -20°C gelagert und anschließend bei 37°C für eine Stunde aufgetaut. Die Autoren stellten unabhängig von der Dauer des Tiefgefrierens keinen deutlichen Unterschied der Bruchlast fest. Klop et al. (2017) untersuchten die Effekte von vierfachem Einfrieren und Auftauen auf die menschliche Muskulatur der oberen Extremitäten in Abhängigkeit von der Auftautemperatur mittels CT. Je fünf Extremitäten wurden für 48 Stunden bei 2°C bzw. für 24 Stunden bei 19°C aufgetaut, mit CT untersucht und anschließend für 5 bzw. 6 Tage bei -20°C tiefgefroren; dieser Zyklus wurde insgesamt viermal wiederholt. Die Auftautemperatur hatte einen signifikanten Einfluss auf die Veränderung der Hounsfield-Einheiten (HE) während jedem Zyklus. Bei einer Auftautemperatur von 19°C stiegen die HE nach dem ersten Zyklus stark an und blieben danach nahezu unverändert, wohingegen sich die HE in der 2°C-Auftaugruppe nach dem Anstieg im Verlauf des ersten Zyklus bis nach dem dritten Zyklus verringerten.

3 PUBLIKATIONEN

3.1 Differences between μ CT-imaging and conventional CT for the diagnosis of possible diseases of the middle and inner cat ear

Tobias Beck¹, med. vet.

Tim Patrick Kilchling¹, Dr. med. vet.

Andrea Meyer-Lindenberg¹, Prof. Dr. med. vet.

¹Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Veterinärstraße 13, 80539 Munich, Germany

Accepted, 20th of February, 2019, Anatomia, Histologia, Embryologia

Received: 15 February 2019 | Accepted: 20 February 2019

DOI: 10.1111/ahc.12438

ORIGINAL ARTICLE

WILEY ANATOMIA HISTOLOGIA EMBRYOLOGIA
JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE

Differences between μ CT-imaging and conventional CT for the diagnosis of possible diseases of the middle and inner cat ear

Tobias Beck  | Tim P. Kilchling | Andrea Meyer-Lindenberg

Clinic for small animal surgery and reproduction, Ludwig-Maximilians-University Munich, München, Germany

Correspondence

Andrea Meyer-Lindenberg, Clinic for small animal surgery and reproduction, Ludwig-Maximilians-University Munich, München, Germany.
Email: ameylin@lmu.de

Abstract

The aim of this study was to check the relevance of using in-vivo micro computed tomography ($\hat{\mu}$ CT) for the diagnosis of possible diseases of the middle and inner ear of the cat. Therefore, on the one hand, differences of the detail detectability between the two imaging methods conventional computed tomography (cCT) and in-vivo $\hat{\mu}$ CT were analyzed. Six healthy cat ears were dissected and scanned several times and the obtained images were compared with each other. On the other hand, histological slices of all ears were prepared and pictures of defined anatomical structures were taken and compared with the identical sectional plane of the $\hat{\mu}$ CT-images. This way it was possible to evaluate the quality and clinical limitations of the in-vivo $\hat{\mu}$ CT. The results show that an in-vivo $\hat{\mu}$ CT is suitable to analyze even the smallest osseous structures, such as the semicircular ducts, the spiral osseous lamina or the ossicles whereas with the help of cCT it is not possible to identify such small osseous structures because of their blurred and less detailed representation. Delicate soft tissue structures as the membranous labyrinth including hearing and vestibular organ cannot be differentiated with as well in-vivo $\hat{\mu}$ CT- as with cCT-images. In-vivo $\hat{\mu}$ CT represent a good possibility for more detailed diagnosis of extremely fine structures which cannot be detected with cCT. Histological slices can nonetheless not be replaced by in-vivo $\hat{\mu}$ CT due to a too low spatial resolution and the limitations of the in-vivo $\hat{\mu}$ CT with regard to the evaluation of soft tissue dense structures.

KEYWORDS

cat ear, computed tomography-images, histological slices, microcomputed tomography-images

1 | INTRODUCTION

Ear diseases in cats are not seldom, 6%–7% of all cats presented to veterinarians have diseases associated with the ear and more than 50% of these cats have problems with the middle or inner ear (Gotthelf, 2008; Kraft & Dürr, 2003). If the clinical investigation does not deliver a valid diagnosis, further use of imaging methods is necessary. Radiographs help to diagnose diseases such as otitis media, neoplasia or polyps but are limited in sensitivity (Garosi,

Dennis, & Schwarz, 2003; Love, Kramer, Spodnick, & Thrall, 1995). Conventional computed tomography (cCT) is additionally used for more detailed information or to diagnose inter alia otitis interna or nasopharyngeal polyps (Ackermann, Lenz, May, & Frank, 2017; Garosi et al., 2003; Oliveira, O'Brien, Matheson, & Carrera, 2012; Seitz, Losonsky, & Marretta, 1996). Nonetheless, cCT has a lower specificity diagnosing otitis media compared to radiography (0% false positive results (Love et al., 1995)) and probable present volume average artefacts in cCT can only be

reduced using a lower slice thickness (Barthez, Koblik, Hornof, Wisner, & Seibert, 1996).

Diseases such as deafness and the appearance of the vestibular syndrome are diagnosed by clinical examinations, present symptoms such as nausea, head tilt or Horner's syndrome and ancillary diagnostic tests such as brainstem auditory evoked response, magnetic resonance imaging (MRI) or cCT (Bodenhamer, Hunter, & Luttgén, 1985; Luttgén, 1994). But the cause of the diseases cannot be determined as the affected structures such as the hair cells of the cochlea or the maculae are too small to be detected with current available imaging methods such as radiography, MRI or cCT (Harvey, Harari, & Delauche, 2003; Strain, 1996; Thomas, 2000).

Microcomputed tomography (μ CT) offers a higher spatial resolution compared to cCT, but *in vivo* μ CT is not yet used for diagnosing ear diseases in cats or other species (Holdsworth & Thornton, 2002; Kalender, 2006). Seifert et al. (2012) optimized μ CT-imaging of the middle and inner cat ear and compared cCT- with μ CT-images of one cat head. The aim of the present study was to find out whether causes for *inter alia* deafness or the vestibular syndrome and underlying symptoms such as nystagmus, strabismus, head tilt or circle movements can be explained by means of representing affected structures/cells with *in vivo* μ CT. Moreover, the significance of *in vivo* μ CT and cCT was compared focusing on the diagnosis of possible middle and inner ear diseases. Histological specimens serve as base for the comparison with cCT- and μ CT-images. Therefore, the present study uses considerably more sample animals and a clinical *in vivo* μ CT with a higher spatial resolution compared to the performed study from Seifert et al. (2012) who used only one cat head and a preclinical μ CT.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Ear preparations and examinations

Three cats free from diseases of the head and ear were investigated in this study. All cats were euthanized due to other reasons such as kidney failure or hyperthyreosis. The heads were separated from the body in the atlanto-occipital joint and cut in the median plane.

Following all bony structures surrounding the middle and inner ear were removed, and the ears were isolated from all attached soft tissue structures. The meatus acusticus externus was cut as short as possible behind the tympanic membrane. The isolated ears were examined with cCT and *in vivo* μ CT and following stored in a 10% formaldehyde solution in order to prepare histological specimens later on.

2.2 | cCT-investigations

A standard 64 slice cCT (Somatom Definition AS, Fa. Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany) was carried out for the CT-Scans. The x-ray tube of the machine is a 0 MHU Straton™ tube, the maximal tube voltage is 140 kV and the general power 100 kW. The highest reachable spatial resolution is 0.33 mm, and the maximal size of the reconstruction field of view is 50 cm. The maximal scan length is stated with 144 cm in 80 s, and the detector contains 512 × 512 pixels.

The utilized scan parameters in this study are routine settings applied for detecting possible ear diseases in cats. A spatial resolution of 330 μ m with a special inner ear window and a very sharp convolution kernel, 140 kV tube voltage, 275 effective mA tube current and a slice thickness of 0.6 mm were chosen resulting in 30–40 slices for each scan.

2.3 | *In vivo* μ CT-investigations

The utilized μ CT is the *in vivo* XtremeCT II (XtremeCT II, Fa. Scanco Medical AG, Brüttisellen, Switzerland). The machine x-ray tube is a microfocus x-ray tube with a focus size of 60 μ m; the tube voltage is 68 kV with a tube current of 20 mA. A 0.2 mm thick copper and a 1 mm thick aluminium filter are used, and the maximal isotropic spatial resolution is 61 μ m. The maximal size of the field of view is 140 mm, and the maximal scan length is stated with 200 mm. The integrated detector contains 4,608 × 400 elements.

The variable scan parameters were chosen in adaptation to the results of the study from Seifert et al. (2012) performed with the preclinical XtremeCT (Fa. Scanco Medical AG, Brüttisellen,



FIGURE 1 Left cat ear on the cCT-table, caudolateral view (a). Right cat ear on the μ CT-table, caudal view (b and c)

Switzerland). In the present study, the lowest possible slice thickness (30.3 μ m), the highest number of projections per 180° (1,250 projections) and the longest possible integration time (300 ms) were applied resulting in 500–600 slices for each scan.

2.4 | Positioning technique for cCT- and μ CT-examinations

The ears were positioned identically in cCT as in in vivo μ CT. Each ear was scanned separately, orientated as well as possible corresponding to the position in the head of a living patient. The only deviation was a rotation of around 25 degrees to dorsomedial (Figure 1). The scan length of the samples was always the same for cCT as well as for in vivo μ CT, starting at the cranial opening of the tympanic bulla and ending at the caudal merger of the same.

2.5 | Comparison of cCT- and μ CT-images

The evaluation of the cCT- and μ CT-images was performed with the RadiAnt DICOM Viewer (Fa. Medixant, Poznan, Poland) on a LCD Monitor (LCD Monitor B 193, Acer Computer GmbH, Ahrensburg, Germany). The scans were observed simultaneously on two separate screens and compared with each other, windowing and

TABLE 1 Six-point scale including detailed explanations for each criterion

1	Very good	Even the smallest details are detectable and recognisable very sharply
2	Good	The majority of the details are detectable and recognisable sharply
3	Moderate	The total structure but no details are detectable and recognisable
4	Poor	The total structure is fuzzy detectable and recognisable
5	Very poor	The total structure is very fuzzy detectable and recognisable
6	Not at all	The total structure is not detectable

magnification could be varied. Particularly, attention was given inter alia to following anatomical structures with high clinical relevance: tympanic membrane, ossicles, tympanic cavity including its wall, mucosal lining, lumen and bony septum, tensor tympani muscle, temporal bone, oval and round window, facial and vestibulocochlear nerves, osseous labyrinth including its semicircular ducts and spiral osseous lamina and membranous labyrinth including all cells and structures of its hearing and vestibular organs. The recognizability of inter alia mentioned structures was verified in cCT- and μ CT-images

Structure in the Middle Ear	Presentability in cCT/ μ CT	Structure in the Inner Ear	Presentability in cCT/ μ CT
Auditory tube	3/1	Vestibule, utricle	4/3
Tympanic membrane	6/3	Contour of the osseous and membranous labyrinths	5/5
Ossicles	3–6/1	Semicircular ducts	6/1
Ligaments of the ossicles	6/4	Cochlea	3/1
Tensor tympani muscle	3/3	Osseous spiral lamina	4/2
Tympanic cavity wall and lumen	3/1	Demarcation of vestibule and tympanic scale	5/2
Mucosal lining of the tympanic cavity	6/6	Organ of Cortí	6/6
Bony septum in the tympanic cavity	3/1	Internal auditory canal	2/1
Conjunction of the tympanic cavity chambers	5/1	Demarcation of facial, vestibular and cochlear nerve	6/5
Canal for facial nerve	3/1	Temporal bone	3/1
Facial nerve	5/3–5		
Conjunction of the facial canal with the tympanic cavity	3/1		
Bony borderline of the round window	3/1		
Secondary tympanic membrane	6/3		
Footplate of stirrup	6/2		

TABLE 2 Relevant clinical anatomical structures of the cat middle and inner ear with the descriptive evaluation results for their presentability in cCT- and μ CT-images

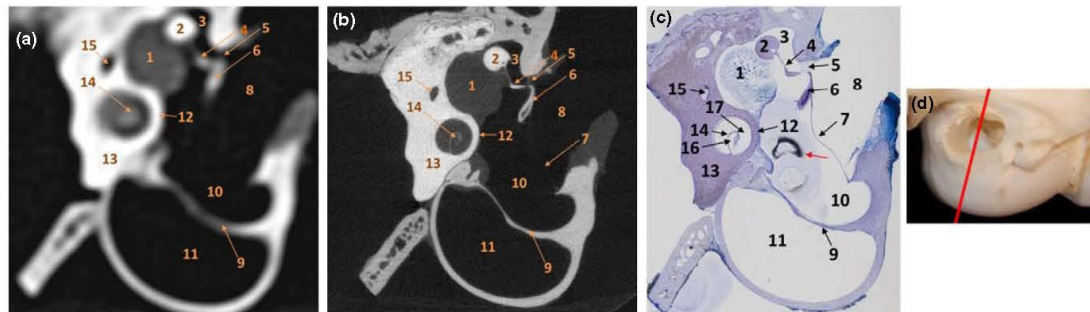


FIGURE 2 Overview of the right middle and inner ear. cCT-image (a) and μ CT-image (b) from fresh ears and histological slice (c) after being stored for one week in formaldehyde. Equivalent plane of the cat head (d). 1-Tensor tympanic muscle, 2-Hammer head, 3-Epitympanic recess (ER), 4-Hammer neck, 5-Lateral hammer ligament, 6-Hammer shaft, 7-Tympanic membrane, 8-External ear canal, 9-Septum bullae, 10-Dorsolateral tympanic cavity, 11-Ventromedial tympanic cavity, 12-Promontorium, 13-Temporal bone, 14-Spiral osseous lamina, 15-Canal for facial nerve, 16-Tympanic scale, 17-Vestibule scale, red arrow-Artefacts

and descriptively rated in a six-point scale according to the level of the perceptibility (Tables 1 and 2).

2.6 | Comparison of μ CT-images with histological slices

The histological compounds were analysed with a special imaging software (Zen 2, Fa. Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany) and a microscope (Axio Imager.Z2, Fa. Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany). The photographs of all ears were compared with the μ CT-images of the equivalent sectional plane. The recognizability of selected structures was verified in the μ CT-images, and the grade of the perceptibility was described (Tables 1 and 2).

3 | RESULTS

3.1 | Comparison of cCT-images with in vivo μ CT-images

All osseous structures including hollow spaces in the bones show a moderate presentability in cCT and a very good presentability in in vivo μ CT. Soft tissues can be differentiated very poorly or not at all with cCT and poorly with in vivo μ CT (Table 2).

The osseous margin of the auditory tube can be presented but fuzzy with cCT and very good with in vivo μ CT, but the content itself cannot be differentiated as it is presented as a soft tissue dense mass with both methods (Figure 4). The evaluation of the

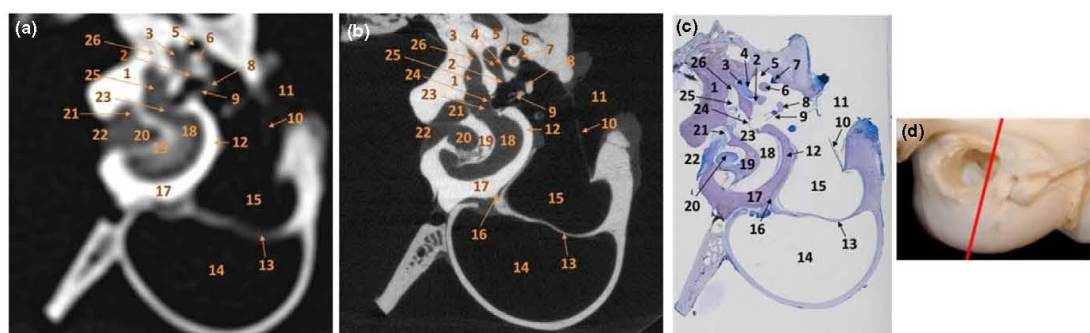


FIGURE 3 Overview of the right middle and inner ear. cCT-image (a) and μ CT-image (b) from fresh ears and histological slice (c) after stored for one week in formaldehyde. Equivalent plane of the cat head (d). 1-Temporal bone, 2-Conjunction of facial canal to tympanic cavity, 3-Facial nerve, 4-Bone lamella between facial canal and RE, 5-ER, 6-Crus breve of incus, 7-Ligament of incus, 8-Crus longum of incus, 9-Crura of Stapes, 10-Tympanic membrane, 11-External ear canal, 12-Promontorium, 13-Septum bullae, 14-Ventromedial tympanic cavity, 15-Dorsolateral tympanic cavity, 16-Conjunction between the tympanic cavities, 17-Tympanic part of the temporal bone, 18-Vestibule scale, 19-Spiral osseous lamina, 20-Cochlear nerve, 21-Vestibular nerve, 22-Internal auditory canal, 23-Vestibule, 24-Footplate of Stapes, 25-Sacculle/Utricule, 26-Beginning of the transversal semicircular duct

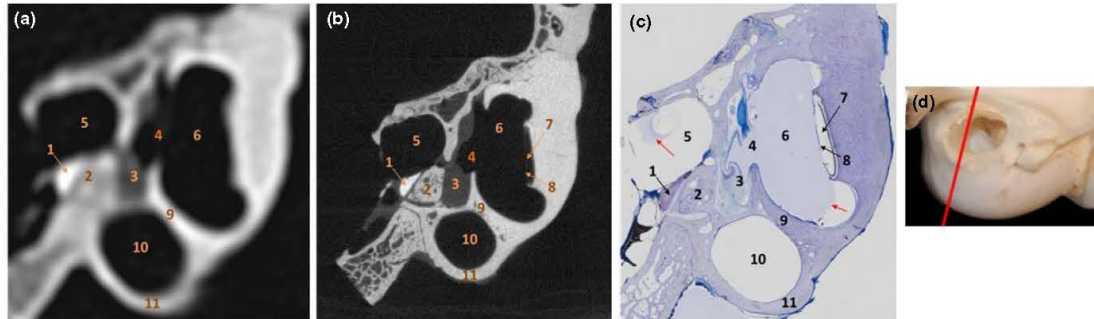


FIGURE 4 Overview of the right middle ear. cCT-image (a) and μ CT-image (b) from fresh ears and histological slice (c) after stored for one week in formaldehyde. Equivalent plane of the cat head (d). 1-Temporal bone, 2-Occipital bone, 3-Lumen of Eustachian tube, 4-Conjunction to the tympanic cavity, 5-Canal of trigeminus nerve, 6-Dorsolateral tympanic cavity, 7-External ear canal, 8-Tympanic membrane, 9-Septum bullae, 10-Ventromedial tympanic cavity, 11-Tympanic bulla, red arrow-Artefacts

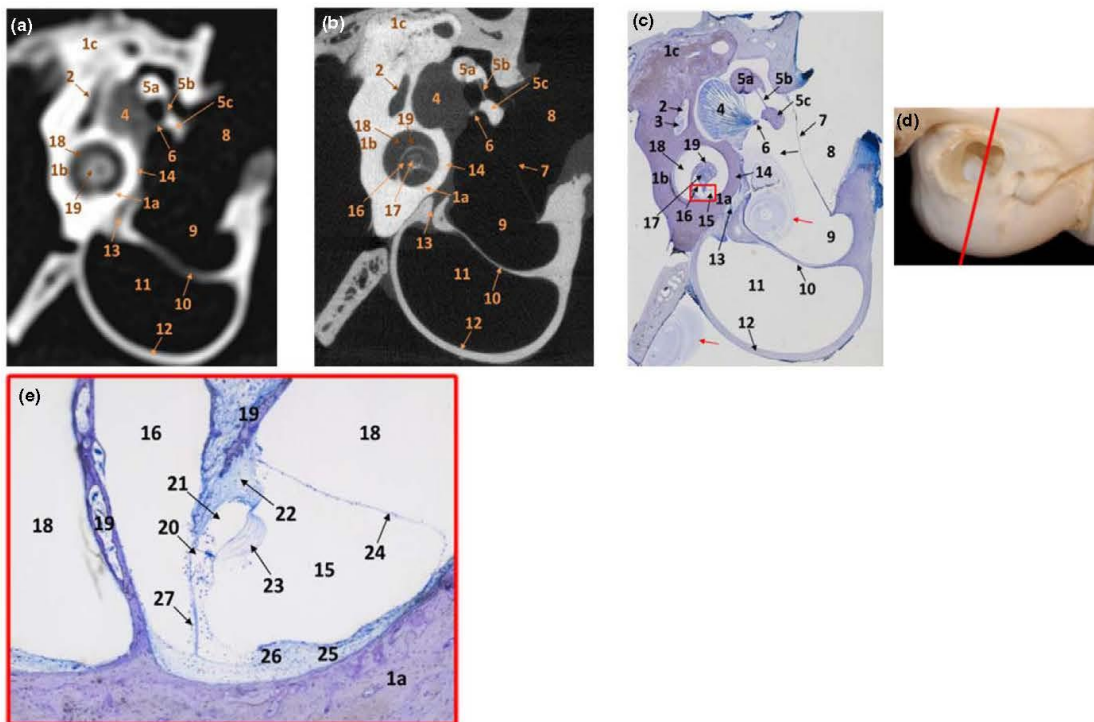


FIGURE 5 Overview of the right middle and inner ear. cCT-image (a) and μ CT-image (b) from fresh ears and histological slice (c) after stored for one week in formaldehyde. Equivalent plane of the cat head (d). (e) presents the organ of Corti with 20 times zoom (red square in picture c). 1-Temporal bone, 1a-Tympanic part, 1b-Petrous part, 1c-Squamous part, 2-Facial canal, 3-Facial nerve, 4-Tensor tympanic muscle, 5-Hammer, 5a-Hammer head, 5b-Hammer neck, 5c-Hammer shaft, 6-Tendon of tensor tympanic muscle, 7-Tympanic membrane, 8-External ear canal, 9-Dorsolateral tympanic cavity, 10-Septum bullae, 11-Ventromedial tympanic cavity, 12-Tympanic bulla, 13-Conjunction between the tympanic cavities, 14-Promontorium, 15-Media scale, 16-Tympanic scale, 17-Modiolus, 18-Vestibule scale, 19-Spiral osseous lamina, 20-Inner tunnel, 21-Internal spiral sulcus, 22-Limbus of spiral osseous lamina, 23-Tectorial membrane, 24-Reissner membrane, 25-Stria vascularis, 26-Prominentia spiralis, 27-Basilar lamina, red arrow-Artefacts

tympanic cavity wall and lumen results in high limitations for the cCT. Because of the blurred image, osseous contours cannot be differentiated from probable present liquid accumulations; this is worse at the beginning and closing of the tympanic lumen. Same structures are whereas well presented with *in vivo* μ CT (Figures 2-6). The osseous septum bullae are recognizable with cCT as well as with *in vivo* μ CT, but only the *in vivo* μ CT provides a very sharp reproduction and offers the possibility for a good evaluation. The same conditions exist for the hollow space between the septum bulla and the tympanic part of the temporal bone which constitutes the connection between the tympanic compartments; the bony septum seems to be fused with the temporal bone. Detecting the connection is only possible in the caudal parts whereas this is always the case for the *in vivo* μ CT-images (Figures 2-6). The visibility of the physiological tympanic membrane is not given with cCT (Figure 5a). It can only be recognized in case of unphysiological liquid accumulations (in the present study formaldehyde residue artefacts), but an adequate evaluation is not recommended. In contrast, with *in vivo* μ CT, it is possible to moderately evaluate the tympanic membrane at least at its boundary regions (Figures 2-5). The three ossicles forming the ossicular chain were evaluated separately; the contours of hammer shaft and head as well as the incus whereas hammer neck and the stirrup with its crura and the footplate cannot be detected and evaluated as single osseous structures (Figure 3a). With *in vivo* μ CT, all rims of the ossicles including the crura of the stirrup and its footplate are presented very well (Figures 2, 3 and 5). The ligaments connecting the ossicles with the temporal bone and the joints connecting the ossicles with each other are not at all visible with cCT and poorly with *in vivo* μ CT (Figures 2 and 3), but an adequate evaluation remains impossible.

The tensor tympani muscle is moderately recognizable in cCT- as well as in *in vivo* μ CT-images as a soft tissue thick structure, but it is not possible for both imaging methods to differentiate the muscle from other soft tissues such as liquids or nerves (Figures 2 and 5). The bony facial canal as well as thin bony lamellae can be evaluated only limited with cCT-images as the detectability is poor to very poor (Figures 2, 3, 5 and 6). The impression of the facial canal being connected to mentioned spaces is created (Figures 3 and 6). The connection of the facial canal to the tympanic cavity is hardly recognizable with cCT in the cranial parts (Figure 3a) and recognizable but fuzzy in the caudal parts (Figure 6a) whereas it can be detected sharply replicable all the way with *in vivo* μ CT (Figures 3b and 6b). The facial nerve itself cannot be detected in cCT because the diameter of the bony canal is too small so the margins seem to overlap and the content cannot be evaluated. *In vivo* μ CT-images present the content of the facial canal as a not any further differentiable soft tissue dense mass. The bony boundaries of the oval window are moderate visible with cCT and very good with *in vivo* μ CT (Figure 3). The round window evaluation is separated into two parts; its bony boundaries conform to the results for the oval window. The membrane itself cannot be detected and evaluated with cCT as well as with *in vivo* μ CT. Solely, the pathway of the transition from the perilymphatic space/membrane of the oval window to the air-filled tympanic cavity can be recognized but fuzzy with cCT whereas it can be moderately evaluated with *in vivo* μ CT. The presentability of the semicircular ducts is not possible in cCT-images (Figures 3 and 6) as the boundaries seem to overlap for the small mean diameter size. Consequently, the semicircular ducts could be equally diagnosed *inter alia* as artefacts or fractures of the bone. In *in vivo* μ CT-images, the entire course of all three semicircular ducts can be followed very sharp and its bony boundaries can be comprehended very sharply

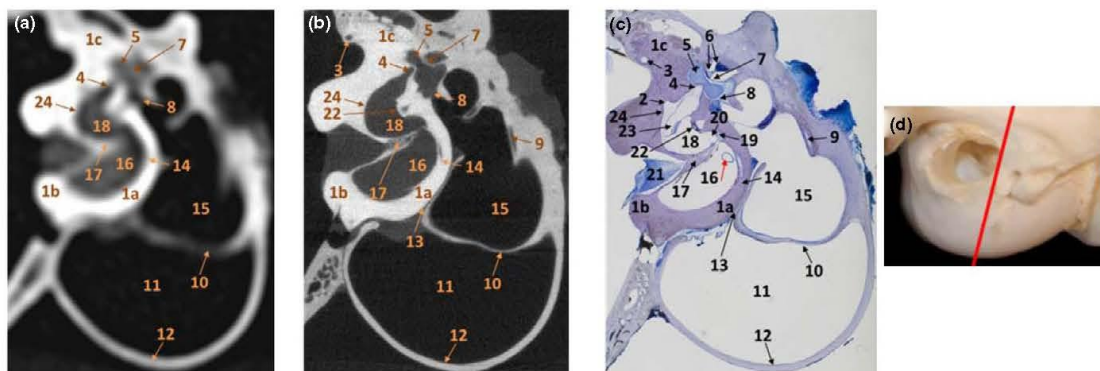


FIGURE 6 Overview of the right middle and inner ear. cCT-image (a) and μ CT-image (b) from fresh ears and histological slice (c) after stored for one week in formaldehyde. Equivalent plane of the cat head (d). 1-Temporal bone, 1a-Tympanic part, 1b-Petrous part, 1c-Squamous part, 2-Mouth of transversal semicircular duct into the utricle, 3-Transversal semicircular duct, 4-Beginning of lateral semicircular duct, 5-Facial nerve in the facial canal, 6-Ligaments of the incus, 7-Bone lamella between ER and facial nerve, 8-Conjunction of facial canal to tympanic cavity, 9-External ear canal, 10-Septum bullae, 11-Ventromedial tympanic cavity, 12-Tympanic bulla, 13-Conjunction between the tympanic cavities, 14-Promontorium, 15-Dorsolateral tympanic cavity, 16-Tympanic scale, 17-Spiral osseous lamina, 18-Vestibule/Beginning of vestibule scale, 19-Stria vascularis, 20-Media scale, 21-Cochlear nerve, 22-Footplate of stirrup, 23-Membranous labyrinth with macula of the utricle, 24-Osseous labyrinth, red arrow-Artefact

all the way (Figures 3 and 6). The bony surrounding of the internal auditory canal and the cochlea including the spiral osseous lamina can be evaluated similarly to other bony structures. In cCT-images, the lamina is presented only as a grey mass and it is scarcely possible to follow the pathway of the formed coils. In contrast, the spiral osseous lamina is presented pretty sharp in μ CT-images including the pathway of the formed coils and all canals inter alia for the passage of the cochlear nerve (Figures 2, 3, 5 and 6).

3.2 | Comparison of in vivo μ CT-images with histological slices

All in the following mentioned structures can be visualized and analysed very well by means of histology whereas the same does not count for in vivo μ CT-images. In vivo μ CT-images can replace histological slices with regard to the evaluation of osseous structures. But regarding soft tissue dense structures, in vivo μ CT-images cannot replace histological slices as inter alia following structures cannot be adequately differentiated and evaluated or visualized at all.

The mucosal lining of the tympanic cavity is independent of the magnification not detectable; the same counts for inter alia the membranous labyrinth including the organ of Corti, the crista ampullaris or the maculae of saccule and utricle and the differentiation of vestibule, utricle and saccule itself. The last mentioned structures are filled with the same dense fluids and the separating bone lamellae are too thin making a demarcation between the different compartments in in vivo μ CT-images impossible (Figures 3 and 6) whereas the osseous labyrinth can be evaluated very well with in vivo μ CT-images. The tympanic membrane can be sometimes detected at its inferior and central regions (Figures 3-5) and a reliable diagnosis of a possible interrupted eardrum is accordingly very hard to justify. The facial nerve within the facial canal is visible as an undefined soft tissue dense mass, but a detailed evaluation is not possible with in vivo μ CT-images (Figures 2 and 5). The same result exists for the facial, vestibular and cochlear nerve within the internal auditory canal that cannot be differentiated with in vivo μ CT-images (Figures 3 and 6). The bony canals of all nerves serve as very good spatial orientations for the course of the nerves, and the canals diameter and width can be evaluated very well with in vivo μ CT. Comparable results were obtained for the three semicircular ducts; the content can just be identified as a soft tissue dense mass (Figures 3 and 6). The connection between the footplate of the stirrup and the temporal bone can be detected, but an adequate evaluation of the structures forming the conjunction is not possible (Figure 3).

4 | DISCUSSION

Seifert et al. (2012) already described the differences between cCT, μ CT and histology at the example of one cat head with regard to the general recognizability of anatomical relevant structures without focusing on the diagnosis of diseases such as deafness or the vestibular

syndrome and the possibility to detect its underlying cause. With μ CT small soft tissue structures such as the tympanic membrane, nerves or the membranous labyrinth are not more than partially recognizable whereas all osseous structures are well depicted. The present study confirms the results using more sample animals and an in vivo μ CT with a higher spatial resolution. Furthermore, the outcomes from Ackermann et al. (2017) and Garosi et al. (2003) can be confirmed with the present study; the tympanic cavity wall, lumen and content can be evaluated; and fluid fillings, bony proliferations and osteolysis of the tympanic wall can be detected with cCT. The present investigation shows that the exact extents can only be evaluated by means of in vivo μ CT. It is moreover important to take into account that volume average artefacts can only be reduced with a slice thickness as low as possible (Barthez et al., 1996), which is given in the present study by using an in vivo μ CT. Love et al. (1995) compared the surgical diagnosis of otitis media in canine species with the results obtained by means of radiographs and cCT. cCT offers a higher sensitivity, but a slightly less specificity compared to radiography. In vivo μ CT could increase both values for being able to clearly recognize inter alia the borders or the lumen of the tympanic cavity. New bone formations arising into the tympanic cavity have been mistakenly diagnosed as otoliths or otolithiasis in many cases (Farrow, 1992; Heitmann et al., 2016; Ziemer, Schwarz, & Sullivan, 2003). The present study shows that mentioned bone formations can be better differentiated by means of in vivo μ CT, and consequently, inter alia small or hyperostotic tympanic bone spicules can be identified as such.

Hypacusis and conductive hearing loss can be a result of a pathological ossicular chain (Ryugo & Menotti-Raymond, 2012). The present study shows that the tympanic membrane and the ossicular chain including its ligamentous connections can be recognized and evaluated only by means of in vivo μ CT and not with cCT which entails that in vivo μ CT is necessary to evaluate the causes of conductive hearing loss. The evaluation of the tympanic membrane is even restricted with in vivo μ CT as merely its boundary regions are always detectable. This outcome corresponds to the results for the recognizability of the eardrum by means of cCT and μ CT from Seifert et al. (2012) and for the thickness distribution of eardrums measured with confocal laser scanning microscopy from Kuypers, Decraemer, Dirckx, and Timmermans (2005). The last mentioned study describes the thickness of the tympanic membrane with $\sim 7 \mu\text{m}$ in the inferior central part and $\sim 20 \mu\text{m}$ in the superior part between the manubrium and the annulus. Moreover, it could be determined that the thickness increases towards the annulus and the manubrium to values of 54, and $34.7 \mu\text{m}$, respectively. In the present study, could be shown that a visible tympanic membrane in cCT is the consequence of inter alia liquid accumulations. Its origin can be pathologies or diseases of the external or middle ear such as otitis externa or media, infections or increased cerumen production. The secondary tympanic membrane is also not detectable for being only $15\text{--}20 \mu\text{m}$ thick and the perilymph inside the tympanic scale having the same density as the membrane. Seifert et al. (2012) showed that soft tissue dense structures such as the hearing and

vestibular organs, the content in the membranous labyrinth and in the auditory tube cannot be evaluated with as well cCT as with μ CT. Even though the in the present study used in-vivo μ CT offers a higher spatial resolution, it is not possible to differentiate the cells forming mentioned structures such as inter alia inner and outer hair cells, the basilar and tectorial membrane, the stria vascularis, single neurons or maculae of sacculae and utricle. Consequently, the cause of inter alia sensorineural hearing loss or the appearance of the vestibular syndrome cannot be determined by means of the applied cCT or in vivo μ CT. With regard to the diagnosis of the possible cause of inter alia deafness or vestibular disorders, in vivo μ CT cannot replace histological specimens. Only ex vivo lab-based μ CT makes a representation of mentioned structures possible as it could be shown by detecting single neurons and hair cells at the example of mice (Glueckert et al., 2018). Following these results, it may be possible in the future to detect the same as well in cat ears with better developed in vivo μ CTs.

But nonetheless, in vivo μ CT is able to replace histological specimens with regard to measurements of size and extent of detectable osseous structures. This could be shown at the example of the mean diameter of the semicircular ducts of cats measured with 284 μ m by means of in vivo μ CT in the present study and measured with 300 μ m by means of histological slices by Curthoys, Markham, and Curthoys (1977). Furthermore, the present study shows that in vivo μ CT allows the investigator the evaluation of the width and the contours of the osseous ducts serving as spatial orientations for inter alia the vestibulocochlear or the facial nerve.

5 | CONCLUSIONS AND OUTLOOK

Several possibly by diseases affected structures such as the spiral osseous lamina, the ossicles, nerves within their bony canals or exostoses causing inter alia hypacusis, disorientation, head tilt or itching are too fine to be detected and adequately evaluated by means of cCT. In vivo μ CT offers the possibility to evaluate all bony structures within the middle and inner cat ear without any limitations; therefore, it should be considered to perform in vivo μ CT-examinations as complementary imaging methods in the future. In vivo μ CT-images can replace histological specimens with regard to the evaluation of all osseous structures. It still has to be examined whether changes in the width of osseous ducts affect the nerves running in these ducts and relates in any way to inter alia neurological symptoms or malformations.

cCT is constituted as the method of choice diagnosing nasopharyngeal polyps, and its visibility can be significantly improved by contrast medium administration (Oliveira et al., 2012; Seitz et al., 1996). It has to be investigated in future studies whether the extent and location of the inflammatory polyps can be evaluated just as well by means of in vivo μ CT without contrast medium administration. Furthermore, it should be investigated whether contrast medium administration enables a differentiation between soft tissues such as the fluid within the membranous labyrinth, the hearing

and vestibular organs, nerves and blood vessels running through the tympanic cavity that could not be evaluated so far with in vivo μ CT. With current available in vivo imaging methods, it is not possible to make a valid diagnosis because of the lack of appropriate convolution kernels for soft tissue dense structures and the so far too low spatial resolution. But it should be taken into consideration for the future that better developed in vivo μ CT could make an evaluation of mentioned structures possible.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks go to the team in the laboratory in the area of research of the veterinary faculty of the Ludwig-Maximilians-University of Munich who supported and guided the author on how to operate with the in vivo μ CT and the machines to prepare the histological slices.

CONFLICT OF INTEREST

The authors report no conflict of interests. The authors alone are responsible for the content and writing of the manuscript.

ORCID

Tobias Beck  <https://orcid.org/0000-0002-1214-5093>

REFERENCES

- Ackermann, A. L., Lenz, J. A., May, E. R., & Frank, L. A. (2017). Mycoplasma infection of the middle ear in three cats. *Veterinary Dermatology*, 28, 417–e102. <https://doi.org/10.1111/vde.12437>
- Barthez, P. Y., Koblík, P. D., Hornof, W. J., Wisner, E. R., & Seibert, J. (1996). Apparent wall thickening in fluid filled versus air filled tympanic bulla in computed tomography. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 37, 95–98. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.1996.tb01201.x>
- Bodenhamer, R., Hunter, J., & Luttgén, P. (1985). Brain stem auditory-evoked responses in the dog. *American Journal of Veterinary Research*, 46, 1787–1792.
- Curthoys, I. S., Markham, C. H., & Curthoys, E. J. (1977). Semicircular duct and ampulla dimensions in cat, guinea pig and man. *Journal of Morphology*, 151, 17–34. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051510103>
- Farrow, C. (1992). Known case conference. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 33, 262–263.
- Garosi, L. S., Dennis, R., & Schwarz, T. (2003). Review of diagnostic imaging of ear diseases in the dog and cat. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 44, 137–146. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2003.tb01262.x>
- Glueckert, R., Johnson Chacko, L., Schmidbauer, D., Potrusil, T., Pechriggl, E. J., Hoermann, R., ... Handschuh, S. (2018). Visualization of the membranous labyrinth and nerve fiber pathways in human and animal inner ears using MicroCT imaging. *Front Neuroscience*, 12, 501. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00501>
- Gotthelf, L. N. (2008). *Ohrerkrankungen der Kleintiere*, 1st ed. München, Germany: Urban & Fischer Verlag.
- Harvey, R. G., Harari, J., & Delauche, A. J. (2003). *Ohrerkrankheiten bei Hund und Katze: Grundlagen - Diagnostik - Behandlung*, 1st ed. Stuttgart, Germany: Schattauer Verlag.
- Heitmann, A., Parzefall, B., Zollner, M., Bruhschwein, A., Hermanns, W., & Blutke, A. (2016). Hyperostotic tympanic bone spicules in domestic

- and wild animal species. *Veterinárni Medicina*, 187–194. <https://doi.org/10.17221/8819-VETMED>
- Holdsworth, D. W., & Thornton, M. M. (2002). Micro-CT in small animal and specimen imaging. *Trends in Biotechnology*, 20, 34–39. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02004-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02004-8)
- Kalender, W. (2006). *Präklinische Bildgebung mit CT (Mikro-CT)*. In W. Kalender (Ed.), *Computertomographie* (pp. 237–245). Erlangen, Germany: Publicis Corporate Publishing.
- Kraft, W. R., & Dürr, U. M. (2003). *Katzenkrankheiten - Klinik und Therapie*, Bd. 1. 5. Auflage. Hannover, Germany: Schaper Verlag.
- Kuypers, L. C., Decraemer, W. F., Dirckx, J. J., & Timmermans, J. P. (2005). Thickness distribution of fresh eardrums of cat obtained with confocal microscopy. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 6, 223–233. <https://doi.org/10.1007/s10162-005-0001-z>
- Love, N. E., Kramer, R. W., Spodnick, G. J., & Thrall, D. E. (1995). Radiographic and computed tomographic evaluation of otitis media in the dog. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 36, 375–379. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.1995.tb00279.x>
- Luttgen, P. J. (1994). Deafness in the dog and cat. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 24, 981–989. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(94\)50112-8](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(94)50112-8)
- Oliveira, C. R., O'Brien, R. T., Matheson, J. S., & Carrera, I. (2012). Computed tomographic features of feline nasopharyngeal polyps. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 53, 406–411. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2012.01931.x>
- Ryugo, D. K., & Menotti-Raymond, M. (2012). Feline deafness. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 42, 1179–1207. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.08.008>
- Seifert, H., Röher, U., Staszyc, C., Angrisani, N., Dziuba, D., & Meyer-Lindenberg, A. (2012). Optimising μ CT Imaging of the Middle and Inner Cat Ear. *Anatomia Histologia and Embryologia*, 41, 113–121. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2011.01110.x>
- Seitz, S. E., Losonsky, J. M., & Marretta, S. M. (1996). Computed tomographic appearance of inflammatory polyps in three cats. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 37, 99–104. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.1996.tb01202.x>
- Strain, G. M. (1996). Aetiology, prevalence and diagnosis of deafness in dogs and cats. *British Veterinary Journal*, 152, 17–36. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(96\)80083-2](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(96)80083-2)
- Thomas, W. B. (2000). Vestibular Dysfunction. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 30, 227–249. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(00\)50011-4](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(00)50011-4)
- Ziemer, L. S., Schwarz, T., & Sullivan, M. (2003). Otolithiasis in three dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 44, 28–31. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2003.tb01444.x>

How to cite this article: Beck T, Kilchling TP, Meyer-Lindenberg A. Differences between μ CT-imaging and conventional CT for the diagnosis of possible diseases of the middle and inner cat ear. *Anat Histol Embryol*. 2019;48:268–276. <https://doi.org/10.1111/ahel.12438>

3.2 Influence of storage on the quality of conventional CT and μ CT-imaging for the middle and inner cat ear

Tobias Beck¹, med. vet.

Tim Patrick Kilchling¹, Dr. med. vet.

Sven Reese², PD, Dr. med. vet.

Andreas Brühshwein¹, Dr. med. vet.

Andrea Meyer-Lindenberg¹, Prof. Dr. med. vet.

¹Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Veterinärstraße 13, 80539 Munich, Germany

²Veterinary Department, Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Ludwig-Maximilians-University Munich, Veterinärstraße 13, 80539 Munich, Germany

Accepted, 4th of November, 2019, Anatomical Science International

The final publication is available at link.springer.com:

<http://link.springer.com/article/10.1007/s12565-019-00509-y>

Link to the full-text view-only version:

<https://rdcu.be/b1y00>



Influence of storage on the quality of conventional CT and μ CT-imaging for the middle and inner cat ear

Tobias Beck^{1,2} · T. Kilchling^{1,3} · S. Reese⁴ · A. Brühnschwein¹ · Andrea Meyer-Lindenberg¹

Received: 10 May 2019 / Accepted: 4 November 2019 / Published online: 14 November 2019
© Japanese Association of Anatomists 2019

Abstract

The aim of this study was to analyze whether different fixation methods such as freezing or formaldehyde storage for different periods of time have an influence on the recognition of anatomical relevant structures in the middle and inner ear of the cat with conventional computed tomography (cCT) and micro-computed tomography (μ CT). Besides, effects of freeze–thaw cycles on determined structures of the ear were investigated by means of histological slices. Three veterinarians with different radiologic expertise evaluated the scans of 30 dissected cat ears anonymously and scored predefined structures in a five-point scale with reference to visually sharp reproducibility and perfect image quality. The total scores of the different fixation groups as well as the ears within a group were compared with each other. Furthermore, an intra-reader examination including an evaluation of the identifiability of specified structures was performed for both imaging methods. cCT as well as μ CT-scans have a very low variation coefficient of 1.6% and 2.3%, respectively. The results for the alterations between the different fixation methods show that the changes for cCT-scans are negligible, as the percentage alteration compared to fresh samples ranges in a very small interval with values from 1.0% better to 1.2% worse. μ CT-scans are more influenced by the fixation method with a range from 1.3% better to 6.9% worse values. The scans mostly deteriorated after two freeze–thaw cycles (1.8% worse) and after storing the samples for 1 (2.4% worse), respectively, and 3 weeks in formaldehyde (6.9% worse).

Keywords Cat ear · Formaldehyde · Freeze–thaw cycles · Computed tomography images · Micro-computed tomography images

Introduction

Cats are common model animals for humans, e.g., for hearing research, research considering acoustic coupling (Peake et al. 1992), developing and improving cochlear implants (CI) (Fallon et al. 2014; George et al. 2014), and ossicular replacements (Middlebrooks and Snyder 2007). The knowledge of the anatomy, the acoustic behavior and the auditory system is very high; furthermore, central and peripheral auditory pathways as well as the neuronal system have been investigated extensively (Kim et al. 2008; Smith and Delgutte 2007; Tirko and Ryugo 2012).

Freezing and storing in formaldehyde are two standard fixation methods used as well in research as in clinical topics (Schuknecht 1993). Formaldehyde was analyzed and used as storage medium in many different studies such as Wei et al. (2017) evaluated its influence on the stability of methamidophos in post-mortem livers of three dogs. In addition, Hammer et al. (2014) examined the effects of formaldehyde storage to bony structures of fresh unfixed and macerated

✉ Tobias Beck

S. Reese
sven.reese@lmu.de

A. Brühnschwein
andreas.bruehnschwein@chir.vetmed.uni-muenchen.de

Andrea Meyer-Lindenberg
ameylin@lmu.de

¹ Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians-University Munich, Veterinärstraße 13, 80539 Munich, Germany

² Wolfratshausen, Germany

³ Baden-Baden, Germany

⁴ Veterinary Department, Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Ludwig-Maximilians-University Munich, Veterinärstraße 13, 80539 Munich, Germany

human coxal bones and Morita et al. (2013) discovered at the example of dog mandibles and rabbit tibiae the effects of formalin fixation to the implant stability quotient and the bone mechanical characteristics. Freezing was also performed in many studies evaluating completely different structures. Lander et al. (2014) analyzed inter alia the effects of freezing to the microstructure of bone by means of human tibiae, Scruggs et al. (2014) evaluated the effects of different freezing temperatures and periods of time on the human recombinant tissue factor activity in a thromboelastography assay and Bullen et al. (2014) developed a progressive rapid-freezing method for preservation of inner ear tissue at the example of guinea pigs, mice and newts. Freeze–thaw cycles and its consequences on structure–property relations of the trabecular bone were already analyzed by means of micro-computed tomography (μ CT), whereas femoral heads of 6-month-old pigs were used (Lee and Jasiuk 2014).

Many other studies evaluated the entire ear or parts of the ear of different animals with μ CT. However, none of these studies dealt with the problem of discovering whether fixation in a freezer or in formaldehyde results in better imaging qualities by means of conventional computed tomography (cCT) and μ CT (Beck et al. 2019; Decraemer et al. 2003; Lane et al. 2004; Poznyakovskiy et al. 2008; Uzun et al. 2007). The aim of this study is the analyzation of the influence of multiple freeze–thaw cycles and storage in formaldehyde or in the freezer for different periods of time based on the descriptive evaluation of the imaging methods cCT and μ CT. Special attention

is given to all relevant anatomical structures and organs within the middle and inner cat ear that can be representative for other body parts or organs. Visible effects will be confirmed and evaluated in greater detail with histological slices.

Materials and methods

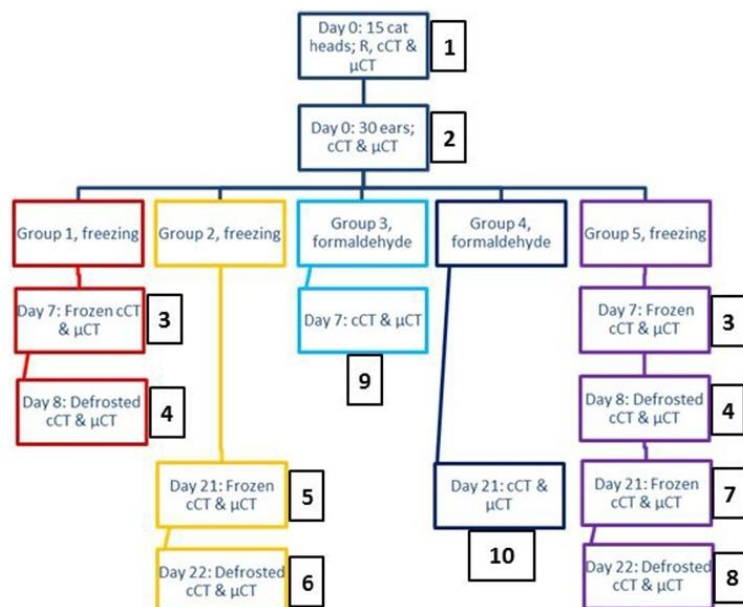
Head and ear preparations

The head and ear preparation steps in the present study correspond to the ear preparation steps performed by Beck et al. (2019). The only differences are that 15 cats are used in the present study and that the isolated ears were fixated by means of different fixation methods as mentioned in the following paragraph and in Fig. 1.

Statement for the use of experimental animals

With this statement, we declare that we did not obtain prior approval for the animal experiments from any animal experimentation ethics committee. All cats used in this study were already dead due to other reasons and the responsible veterinarians had the permit from the previous owner to provide the dead cats for research.

Fig. 1 Overview of the different groups, the fixation methods, the periods of time, and the performed examinations. *R*radiographs, *cCT*cCT-scan, *μ CT* μ CT-scan, in the black squares: number of the equivalent method



Fixation methods and periods of time

Freeze–thaw cycles and the storage in formaldehyde were compared with each other varying the number of freeze–thaw cycles and the freezing/fixation time. Those are the main criteria to determine the different groups which contain six ears from the heads of three cats for each group (Fig. 1). Groups 1 and 2 were stored for 1, respectively, and 3 weeks in the freezer at $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Afterwards, the ears were defrosted for 1 day at room temperature. Groups 3 and 4 were kept for 1, respectively, and 3 weeks in 10% formaldehyde. Group 5 was fixated for 1 week in the freezer ($-21\text{ }^{\circ}\text{C}$), defrosted for 1 day at room temperature, refrozen for another 2 weeks ($-21\text{ }^{\circ}\text{C}$), and defrosted the second time afterwards (Fig. 1).

cCT investigations, μ CT investigations, and positioning technique for the cCT- and μ CT examinations

Both investigation methods and the positioning technique comply to the procedures performed in the study from Beck et al. (2019). The heads were positioned corresponding to the examination of the head in a living cat with the lower jaw on the table and the nose forwards.

Produced scans

First, the entire head was examined with radiographs in three different planes (dorsoventral, laterolateral and rostro 30° -ventral—caudodorsal open mouth oblique) to detect obvious ear diseases. Physiological adjudged heads could

be part of the study and were examined with cCT and μ CT (method 1). Right after dissecting the ears, they were examined with cCT and μ CT again (method 2; corresponding to native fresh ear scans which serve as comparison to all other scans). Following these examinations, the ears were divided into five different groups and handled appropriately (Fig. 1).

Evaluation

Three independent veterinarians carried out the anonymous evaluation. Basis of the evaluation was image quality criteria from the European guidelines for quality criteria for computed tomography in human medicine (Bongartz et al. 1998). The observer’s task was to state his opinion in a rating scale from 1 to 5 whether a certain criterion is fulfilled or not [Criterion 1: visually sharp reproducibility of selected, diagnostically relevant anatomical structures (evaluated structures are listed in the first and second columns of Table 1); Criterion 2: excellent image quality without limitations (third column of Table 1); rating scale: 1—clearly confident that the criterion is fulfilled; 2—somewhat confident that the criterion is fulfilled; 3—indecisive whether the criterion is fulfilled or not; 4—somewhat confident that the criterion is not fulfilled; and 5—clearly confident that the criterion is not fulfilled]. The evaluation of the cCT- and μ CT images occurred with the program RadiAnt DICOM Viewer (Medixant, Poznan, Poland). Windowing and magnification could be varied by the observer. The single scores for the 34 characteristics were summed up and the scans were ranked and interpreted with regard to the total sum score. The observers scored cCT- and μ CT-scans of 90 isolated ears and 15 entire heads, whereby the left and right

Table 1 Evaluated anatomical structures of the middle- and inner ear of the cat and image quality criteria

Structure in the middle ear	Structure in the inner ear	Image quality criteria
Auditory tube	Temporal bone	Noise is negligible
Visibility of the tympanic membrane	Vestibule	High spatial resolution
Integrity of the tympanic membrane	Demarcation of vestibule and saccule	Artefacts are negligible
Hammer handle	Demarcation of saccule and utricle	High diagnostic use
Hammer neck	Cochlea with spiral osseous lamina	
Hammer head	Demarcation of vestibule and tympanic scales	
Incus	Internal auditory canal	
Stirrup	Demarcation of facial, vestibular and cochlear nerves	
Tensor tympanic muscle	Anterior semicircular duct	
Tympanic cavity wall	Lateral semicircular duct	
Tympanic cavity lumen	Posterior semicircular duct	
Bony septum in the tympanic cavity	Transition of semicircular ducts to the utricle	
Conjunction of the tympanic cavity chambers	Cochlear aqueduct	
Canal for facial nerve	Vestibular aqueduct	
Footplate of stirrup		
Bony limitation of the round window		

ear were evaluated separately. High scores indicate that a cCT- or μ CT-scan was evaluated as poor, whereas low scores indicate a good scan quality.

Intra-reader reliability for cCT- and μ CT images

One investigator evaluated all 120 cCT- and μ CT-scans twice. The evaluations were performed under equal conditions with a break of at least 10 days between the two analyzing cycles. This way the observer was not capable to remember the individual scans.

Statistical comparison of evaluated cCT- and μ CT-scans

One point of the evaluation is the comparison of the total scores of method 1 with the same scores of method 2. The ears in the head were scored separately for each side. Another point is the comparison of the total scores of cCT with μ CT for method 1 as well as method 2 (calculation: $cCT M1 - \mu CT M1 / \mu CT M1$; for all investigators separately and the sum divided by 4). The percentage mean

value of the individual evaluators was taken for methods 1 and 2 for both imaging methods. Furthermore, the mean total scores after each fixation step were compared to the correspondent value for method 2. Care has to be taken that the values in Table 2 are correctly interpreted. A negative mean difference as well as a negative percentage indicates that the selected method is better than the equivalent method 2. Consequently, positive mean differences and positive percentages indicate a worse evaluation of the selected method compared to method 2 (Table 2). The variance for the worst value based on the 95% confidence interval was also analyzed (Table 2). Another item is the comparison of the sum scores of the individual groups within the group itself after each fixation step and with selected other groups. The average sum scores for the single methods of each group are base of the statistical calculations. In this manner, changes caused by the freeze-thaw process, by formaldehyde or by the fixation time will be revealed.

Basis for the evaluation is the obtained cCT- and μ CT images after each fixation step. Sample images with detailed anatomical markings are presented in Figs. 2, 3, 4, and 5.

Table 2 Mean values for methods 2–10 for all investigators for as well cCT as μ CT are presented

Equivalent method X					N	Mean difference (M X – M2)	Mean dif./mean M2 in %	95% conf. interval/mean M2 in %	
	Method 2		Method X						
	Mean	SD	Mean	SD					
3	cCT	130.35	8.10	129.42	8.22	48	- 0.94	- 0.72	- 1.41
	μ CT	61.94	5.33	61.23	5.39		- 0.71	- 1.14	- 2.66
4	cCT	130.35	8.10	129.33	7.81	48	- 1.02	- 0.78	- 1.46
	μ CT	61.94	5.33	61.15	5.11		- 0.79	- 1.28	- 3.02
5	cCT	129.13	6.97	129.42	7.29	24	0.29	0.23	0.96
	μ CT	58.92	4.25	59.04	4.71		0.13	0.21	2.92
6	cCT	129.13	6.97	129.46	6.94	24	0.33	0.26	0.81
	μ CT	58.92	4.25	59.33	3.76		0.42	0.71	3.40
7	cCT	130.25	9.23	129.00	8.35	24	- 1.25	- 0.96	- 1.77
	μ CT	62.88	6.57	64.17	8.65*		1.29	2.06	5.52
8	cCT	130.25	9.23	129.04	8.15	24	- 1.21	- 0.93	- 1.69
	μ CT	62.88	6.57	64.00	9.06*		1.13	1.79	4.94
9	cCT	130.13	5.92	130.29	5.60	24	0.17	0.13	0.94
	μ CT	57.21	5.78	58.58	5.79		1.38	2.40	5.64
10	cCT	130.00	7.87	131.50	8.44	24	1.50	1.15	2.43
	μ CT	58.33	5.68	62.38	8.65*		4.04	6.93	10.73

The standard deviation (SD), the total number of scans (N), the mean difference between the to be assessed method compared with method two, the percentage of the mean difference divided through the mean value of method two and the percentage of the quotient of the worst value of the 95%-conf. (confidence) interval of the difference and the mean value of method two are shown. Positive percentages indicate that method X was evaluated worse (higher score) than method two and negative percentages indicate that method X was evaluated better (lower score) than method two. Note: sometimes the values show a deviation caused by the fact that the exact values are given rounded off to the second decimal place, but the calculation occurred with the exact values

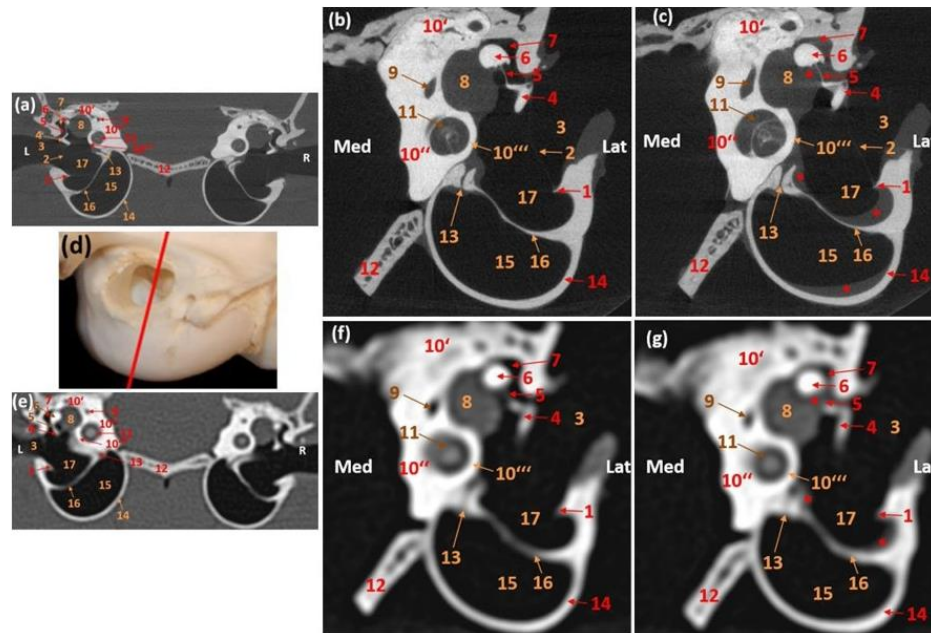


Fig. 2 Scan images of Group 3: entire head (a/e), isolated fresh right ear (b/f), isolated right ear after being stored for 1 week in formaldehyde (c/g). μ CT images (a–c) and cCT images (e–g). Equivalent plane of the cat head (d). 1—Tympanic ring, 2—tympanic membrane, 3—external ear canal, 4—hammer shaft, 5—hammer neck, 6—hammer head, 7—epitympanic recess, 8—tensor tympanic mus-

cle, 9—facial canal with facial nerve, 10—temporal bone, 10'—squamous part, 10''—petrous part, 10'''—tympanic part, 11—cochlea, 12—basilar part of the occipital bone, 13—junction between the tympanic cavities, 14—tympanic bulla, 15—ventromedial tympanic cavity, 16—septum bullae, 17—dorsolateral tympanic cavity, stars—formaldehyde artefacts, red line—section plane

Comparison of histological slices from different fixation methods

Histological slices of the different fixated ears were compared with each other to evaluate possible changes due to the fixation process and the duration of the fixation (Figs. 6, 7, 8, 9).

Results

Intra-reader reliability for cCT- and μ CT-scans

The average score for the cCT-scans was 137.8 with a standard deviation of 2.2 and a variation coefficient of 1.6%. The average score for the μ CT-scans was 63.9 (53.6% better compared to the cCT-scans) with a standard deviation of 1.5 and a variation coefficient of 2.3%. These results stand for a very high reproducibility with a very low variation coefficient for both imaging methods.

Statistical comparison of evaluated cCT- and μ CT-scans

The comparison of methods 1 and 2 shows the following outcomes: the ears in the entire head were evaluated 4.8% worse for cCT and 34.0% worse for μ CT compared to the dissected ears. This demonstrates that μ CT is affected more by surrounding structures in a descriptive evaluation compared to cCT. cCT-scans were evaluated 70.8% worse than μ CT-scans for method 1 and 119.0% worse for method 2. As a result, the differences between the imaging methods are directly proportional to the amount of perceptible details in the scans.

The main changes comparing the mean total sum scores relate to the formaldehyde fixated groups and the group with multiple freeze–thaw cycles. Within group 5, most effects are created due to the second freeze–thaw cycle. The evaluation for method 7/8 is 2.1%/1.8% worse for μ CT and 1.0%/0.9% better for cCT (Table 2; note again that positive/negative percentages in Table 2 indicate that the selected method is worse/better than method 2). Storing the samples

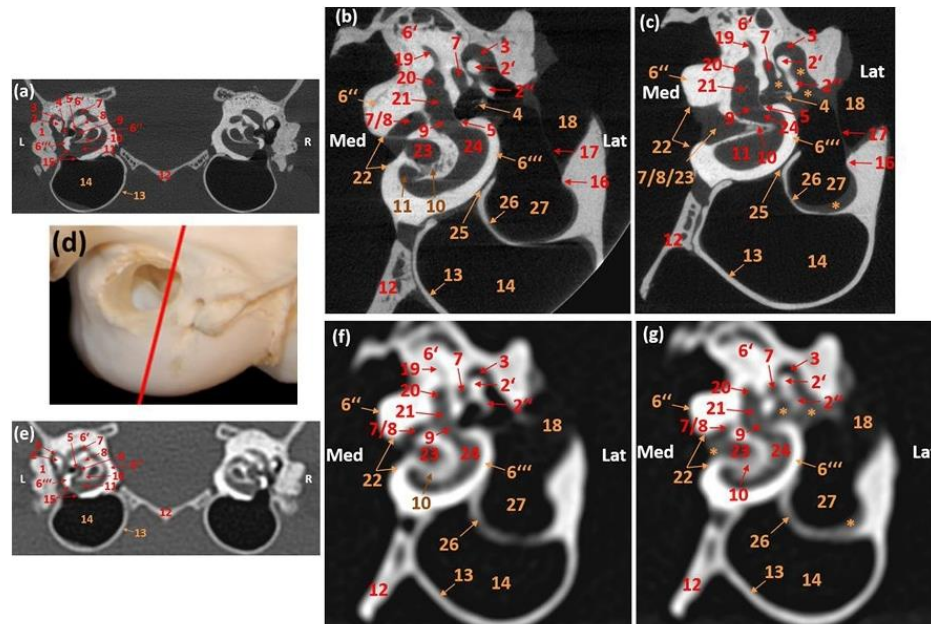


Fig. 3 Scan images of Group 4: entire head (a/e), isolated fresh right ear (b/f), isolated right ear after being stored for 3 weeks in formaldehyde (c/g). μ CT images (a-c) and cCT images (e-g). Equivalent plane of the cat head (d). 1—Mastoid process, 2—incus, 2'—short leg, 2''—long leg, 3—epitympanic recess, 4—stirrup, 5—footplate of stirrup, 6—temporal bone, 6'—squamous part, 6''—petrous part, 6'''—tymppanic part, 7—facial canal with facial nerve, 8—vestibular nerve, 9—vestibule, 10—spiral osseous lamina, 11—tymppanic scale,

12—basilar part of the occipital bone, 13—tymppanic bulla, 14—ventromedial tympanic cavity, 15—bony limitation of the round window, 16—tymppanic ring, 17—tymppanic membrane, 18—external ear canal, 19—transversal semicircular duct, 20—utricle, 21—sacculle, 22—bony limitation of the internal ear canal, 23—cochlear nerve, 24—vestibular scale, 25—conjunction between the tymppanic cavities, 26—septum bullae, 27—dorsolateral tymppanic cavity, stars—formaldehyde artefacts, red line—section plane

for 1 week in formaldehyde (method 9) deteriorates the evaluation by means of μ CT of 2.4%, whereas the evaluation of cCT remains almost unchanged (deterioration of 0.1%). The degradation after being stored for 3 weeks in formaldehyde (method 10) is even more considerable as well for μ CT with 6.9% as for cCT with 1.2%. The other fixation steps (methods 3–6) do not create a relevant influence to the imaging methods as the range of the evaluation stays in a very small interval with a maximal shift-interval for μ CT from 1.3% better (method 4) to 0.7% worse (method 6) and for cCT from 0.8% better (method 4) to 0.3% worse (method 6). These results show that the fixation method is affecting the μ CT-scans in general to a greater extent than the cCT-scans. μ CT is negatively influenced by the freeze–thaw cycles as well as the fixation in formaldehyde. cCT-scans are only slightly affected by the freeze–thaw process (maximal change is an upgrade of 1.0% for method 7 in group 5) as well as the storage in formaldehyde (maximal change is a degradation of 1.2% for method 10).

The standard deviation (SD) for the mean scores of μ CT were clearly higher for the methods 7, 8, and 10 (marked with

* in Table 2) with an average SD of 13.8% of the mean scores compared to an average SD of 8.3% of the mean scores of the other groups. This high measure of dispersion for the groups with significant differences between cCT and μ CT shows that a reproducible subjective evaluation of scans with notable changes is more difficult for investigators compared to an evaluation of scans without significant alterations (Table 2). It can be said generally that μ CT is more affected by the fixation method than cCT. Comparing 3 weeks to 1 week in formaldehyde-stored samples shows that μ CT is evaluated 6.5% worse and cCT 0.9% worse. Defrosting does not result in a significant change for both μ CT and cCT. The maximal alteration in cCT-scans between the freezing groups is 0.4%, showing that changes due to the freeze–thaw process are not notable in a subjective evaluation. The cCT-scans of the frozen samples were, nevertheless, rated slightly better than the equivalent formaldehyde-stored samples after the same fixation time. The ears that had been frozen for 1 week were scored 0.7% better compared to 1 week in formaldehyde-stored ears. The ears that had been frozen for 3 weeks and defrosted were scored 1.6% better compared to the ears that had been

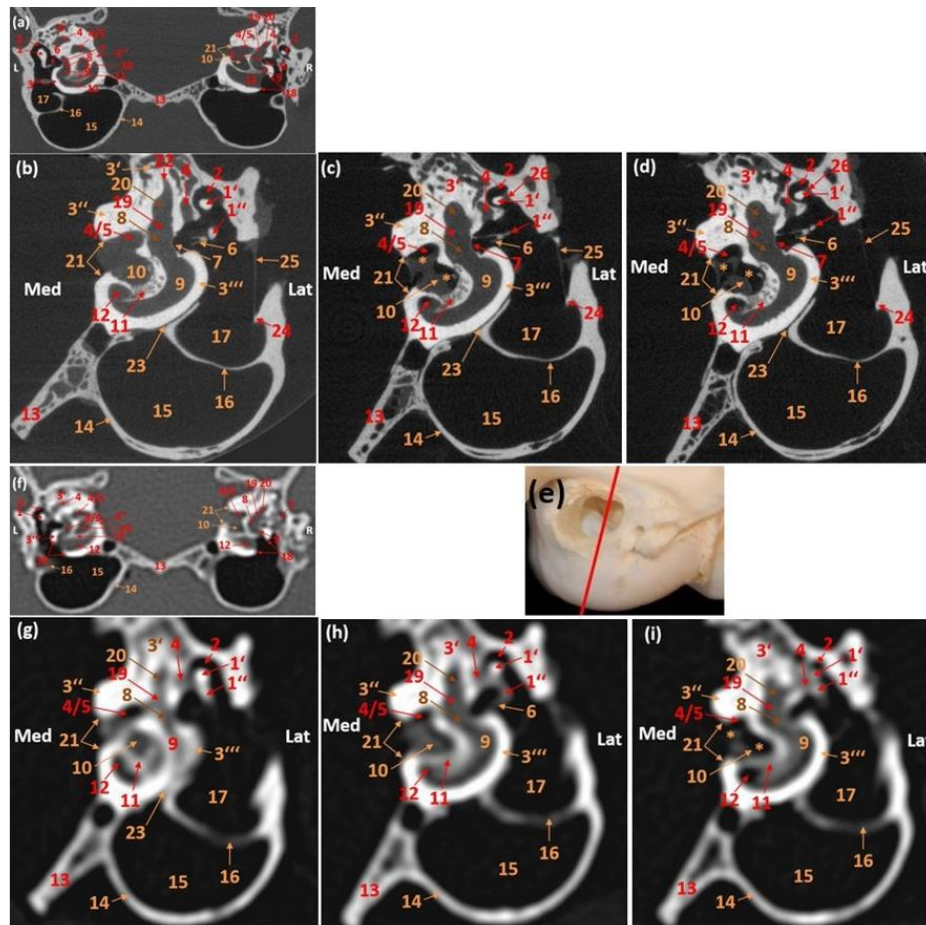


Fig. 4 Scan images of Group 2: entire head (a/f), isolated fresh right ear (b/g), isolated right ear after being frozen for 3 weeks (c/h), isolated right ear after being defrosted (d/i). μ CT images (a–d) and cCT images (f–i). Equivalent plane of the cat head (e). 1—Incus, 1'—short leg, 1''—long leg, 2—epitympanic recess, 3—temporal bone, 3'—squamous part, 3''—petrous part, 3'''—tympenic part, 4—facial canal with facial nerve, 5—canal for vestibular nerve, 6—stirrup, 7—footplate of stirrup, 8—vestibule, 9—vestibular scale, 10—cochlear

nerve, 11—spiral osseous lamina, 12—tympenic scale, 13—basilar part of the occipital bone, 14—tympenic bulla, 15—ventromedial tympenic cavity, 16—septum bullae, 17—dorsolateral tympenic cavity, 18—bony limitation of the round window, 19—sacculle, 20—utricle, 21—bony limitation of the internal ear canal, 22—transversal semicircular duct, 23—conjunction between the tympenic cavities, 24—tympenic ring, 25—tympenic membrane, 26—ligament of the incus, stars—shrinking artefacts, red line—section plane

stored in formaldehyde for 3 weeks. Further changes between the fixation methods in cCT-scans could not be detected. Relevant alterations within the fixation steps are whereas notable in μ CT-scans. The ears that had been frozen for 3 weeks were scored 3.8% better compared to the ears that had been frozen for 1 week and 8.1% better compared to the ears that had been frozen twice after 3 weeks. The ears that had been frozen twice were rated 4.9% worse compared to those that had been defrosted once within group 5. The ears that had been frozen once/twice for 3 weeks were rated 5.4% better/2.9% worse

compared to those being stored for 3 weeks in formaldehyde. The ears that had been frozen for 1 week were rated 4.6% worse compared to those that had been stored for 1 week in formaldehyde.

Comparison of histological slices from different fixation methods

Histological preserved specimens do not show any difference with regard to the duration in the freezer or the fixation

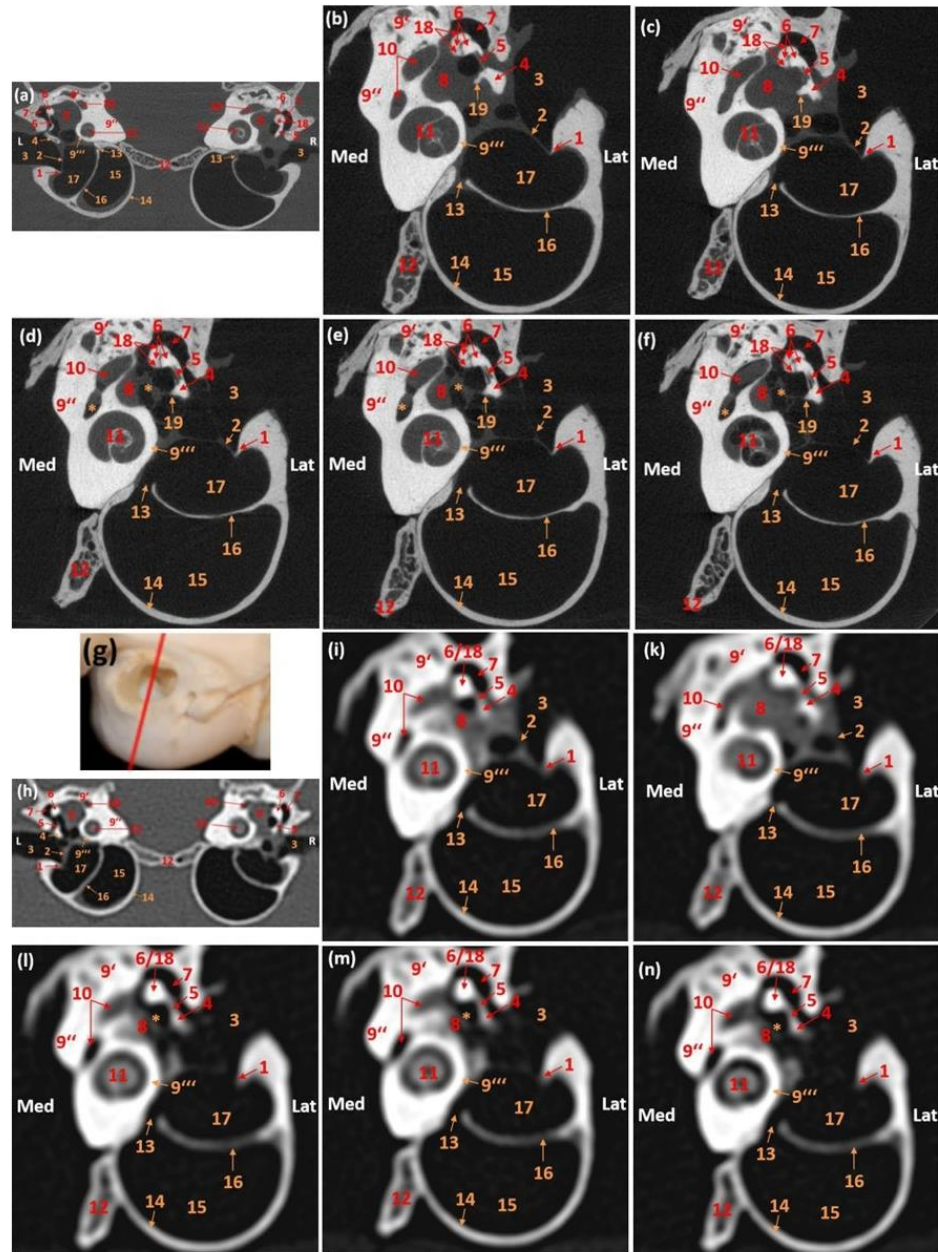


Fig. 5 Scan images of Groups 5, respectively, and 1: entire head (a/h), isolated fresh right ear (b/i), isolated right ear after being frozen for 1 week (c/k), isolated right ear after being defrosted (d/l), isolated right ear after frozen for another 2 weeks (e/m), isolated right ear after second defrosting (f/n). μ CT images (a–f) and cCT images (h–n). Equivalent plane of the cat head (g). 1—Tympanic ring incus, 5—hammer neck, 6—hammer head, 7—epitympanic recess, 8—ten-

sor tympanic muscle, 9—temporal bone, 9'—squamous part, 9''—petrous part, 9'''—tympanic part, 10—facial canal with facial nerve, 11—cochlea, 12—basilar part of the occipital bone, 13—junction between the tympanic cavities, 14—tympanic bulla, 15—ventromedial tympanic cavity, 16—septum bullae, 17—dorsolateral tympanic cavity, 18—incus, 19—muscular process of the hammer shaft, stars—shrinking artefacts, red line—section plane

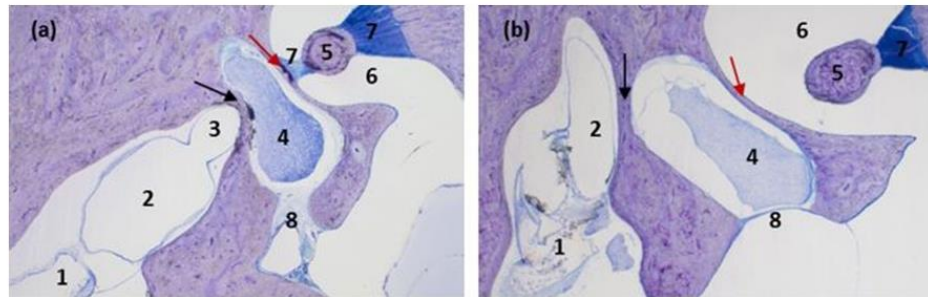


Fig. 6 Overview of the epitympanic recess and adjacent regions. After being stored for 1 week in formaldehyde (a) and after being defrosted the second time (b)

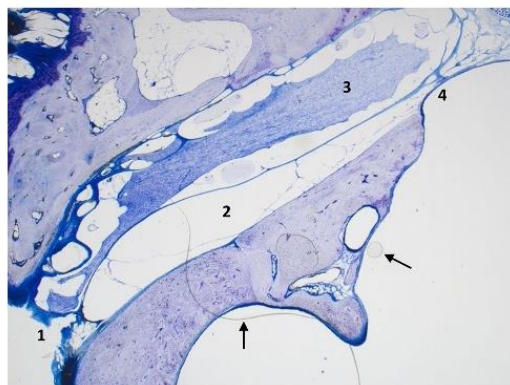


Fig. 7 Aperture of the facial nerve into the brain. After being defrosted the second time. 1—Aperture to the brain, 2—facial canal, 3—facial nerve, 4—conjunction to the epitympanic recess, black arrows—artefacts

in formaldehyde. Differences are only presented for the fixation methods compared with each other and the amount of freeze–thaw cycles.

Freeze–thaw processes result in shrinking of soft-tissue dense structures such as the tensor tympanic muscle or the facial, vestibular, or cochlear nerves (Figs. 6, 7). This effect is strengthened with increasing amount of freeze–thaw cycles. The shrinking process presents the size of the structures as artefacts. An accurate evaluation is aggravated which is applicable especially for the structures mentioned above. Considering the organ of Corti, only the basilar lamina and the Reissner’s membrane appear normal and can be evaluated. The cells within the organ of Corti such as inner and outer hair cells, tunnel fibers, or phalangeal cells and the inner tunnel itself are not detectable after multiple freeze–thaw cycles (Fig. 9). The same can be said about the vestibular organ, particularly the maculae of saccule and

utricle and the crista ampullaris. These structures are almost unrecognizable after the second freeze–thaw cycle (Fig. 8). In addition, the pathway of the membranous labyrinth cannot be recognized due to lack of definition (Fig. 6).

The samples fixated in formaldehyde show all bony structures (e.g., the ossicles) as well as soft-tissue structures (e.g., hearing and vestibular organ) very well (Figs. 6, 7, 8, 9).

Discussion

Intra-reader reliability for cCT- and μ CT-scans

The high reproducibility and the very low variation coefficient for both imaging methods show that as well cCT as μ CT are suitable imaging methods for a descriptive evaluation of the middle and inner cat ear.

Statistical comparison of evaluated cCT- and μ CT-scans

Delicate structures such as the stirrup or the semicircular ducts are just barely visible by means of cCT regardless of being surrounded by other structures or not. The results described by Beck et al. (2019) can be confirmed. The number of artefacts and the signal-to-noise ratio can be reduced with less present structures. The isolated ears were scored way better than the ears in the head by means of μ CT. Following this, μ CT is more influenced by surrounding structures in a descriptive evaluation compared to cCT. The difference between μ CT and cCT is directly proportional to the amount of perceptible details in the scans; thus, it is higher for the isolated ears compared to the ears in the head.

Thawing reactivates the processes of autolysis and putrefaction that are inhibited by low temperatures (Levy et al. 2010) resulting in an interruption of cell-to-cell connections in any sort of tissue (van der Made et al. 2013).

Fig. 8 Overview of parts of the membranous labyrinth with the vestibular organ. After being stored for 3 weeks in formaldehyde (a) and after being defrosted the second time (b). 1—Sacculle, 2—utricle, 3—membranous labyrinth, 4—osseous labyrinth, 5—macula of saccule, 6—crista ampullaris, 7—vestibular nerve, 8—facial nerve, 9—footplate of stirrup, 10—lateral semicircular duct, black arrow—artefacts, red arrow—bone lamella between utricle and facial canal

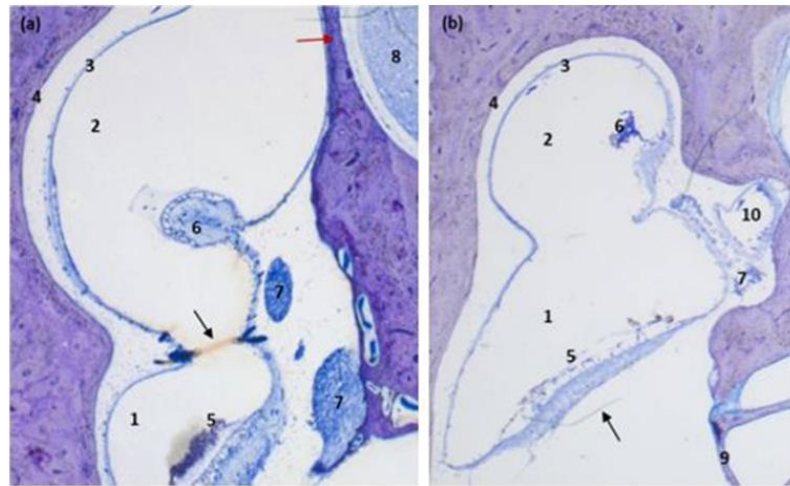
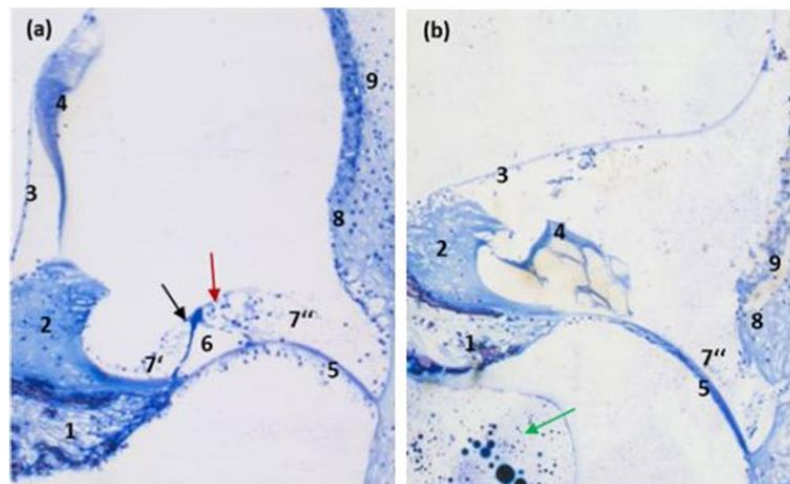


Fig. 9 Overview of the organ of Corti. After being stored for 1 week in formaldehyde (a) and after being defrosted once after 3 weeks (b). 1—Spiral osseous lamina, 2—vestibular lip, 3—Reissner membrane, 4—tectorial membrane, 5—basilar lamina, 6—inner tunnel, 7/7'—inner/outer phalangeal cells, 8—spiral prominetia, 9—stria vascularis, black arrow—inner hair cell, red arrow—outer hair cells, green arrow—artefacts



Multiple freeze–thaw cycles increase the number of disrupted cells and following the size of the extracellular area increases as well. This was shown by Klop et al. (2017) for the example of the alteration of Hounsfield Unit values of human muscle tissue. HU values from under 19 °C thawed samples increased more compared to samples thawed under 2 °C. Therefore, for a progressive loss of structural integrity in biological specimens, studies with multiple freeze–thaw cycles should not be performed (Maran et al. 2003; McElderry et al. 2011). Furthermore, freeze–thaw cycles lead to artefacts as distinct, non-confluent tiny bubbles that are visible by means of cCT- and MRI-scans in cerebral tissue of pigs which was shown in

a study performed by Bolliger et al. (2018). The samples within this study were treated similar to the samples in the present study with a mean frozen time of 46 days at – 20 °C and a following thawing process at either room temperature or in a cooling cell. Freezing, moreover, leads to changes of the microstructure and the structure–property relations of bone (Lander et al. 2014; Scruggs et al. 2014). As the effects mentioned above are on a cellular level, they are not recognizable in a descriptive evaluation of cCT- and μ CT images (Maran et al. 2003). These results can be confirmed with the present study. Nonetheless, a valid evaluation of freeze–thaw-treated samples compared to original fresh samples is not given. The evaluation of

multiple freeze–thaw-treated samples is affected more by artefacts, explaining the worse evaluation of group 5 in the present study.

Formalin fixation does not affect the accuracy of three-dimensional human lower jaw models generated based on cone beam and multi-slice CT images (Seidel et al. 2018). Consequently, formalin does not affect the size of bony structures which corresponds to the present study, where the worse evaluation of the formaldehyde-stored groups results from a reduced identifiability of soft-tissue dense structures. This coincides with the fact that soft tissue is influenced by histologic fixatives. Among other things, neutrally buffered formaldehyde leads to shrinkage of murine brain tissue measurable by means of imaging methods such as cCT and MRI (Wehrl et al. 2015). The longer samples are stored in formaldehyde the better the immersion is, and consequently, less formaldehyde can be removed prior to the performed imaging scans. As a result, more artefacts are created and soft-tissue dense structures are more difficult to identify. This could explain why the ear samples that had been stored for 3 weeks in formaldehyde were evaluated as worse compared to the samples that had been stored for 1 week in formaldehyde.

Comparison of histological slices from different fixation methods

The quality of microgrinding is not influenced by the fixation time in formalin as the quality of 20 formalin-fixed human temporal bones appears to be as good as for fresh or fresh-frozen samples (Hasepass et al. 2014). These results correspond to the present study, where all delicate structures such as the hearing or vestibular organs could be depicted in detail regardless of fixation in formaldehyde for 1 or 3 weeks. Multiple freezing processes and longer freezing periods influence the quality of microgrinding of temporal bones as could be shown by Cisneros et al. (2017). Fresh-frozen bones (processed with less than 24 h of freezing) were compared to bones frozen for 6 months. The micro-anatomical quality of fresh, respectively, and fresh-frozen bones is flawless compared to fresh bones, and consequently, it was believed that the freezing process does not affect the micro-anatomical structures directly. On the contrary, the same structures of the bones frozen for 6 months showed a worse quality in microgrinding; therefore, it was determined that the longer period of freezing does cause the degradation of micro-anatomical structures. This corresponds to the results of the present study, where hearing and vestibular organs appeared worse after being frozen for 3 weeks. Furthermore, the organs mentioned above could be identified worse or not at all after each freezing cycle. Regarding the identifiability of the connection between the tympanic cavities, a fixation with formaldehyde is worse than freezing

because of possible liquid residue artefacts. In contrast, the subjective evaluation of the tensor tympanic muscle obtains better results in μ CT images for the fixation in formaldehyde as for the fixation in the freezer. It must be considered that a differentiation between liquid artefacts and muscle tissue is not possible without comparing the images to histological slices (Figs. 2, 4).

Conclusions and outlook

Formaldehyde should not be used as a fixative if the observer wants to evaluate soft-tissue dense structures by means of imaging methods such as cCT or μ CT. If, nevertheless, formaldehyde was chosen as the appropriate fixative, the fixation time should be as short as possible to minimize artefact formation. Freezing constitutes the preferred fixation method being less affected by the formation of artefacts. However, it cannot be avoided completely. Multiple freeze–thaw cycles should not be performed, as the number of artefact creations increases clearly. Possibilities to reduce the number of artefact formations due to freezing have to be tested using lower freezing temperatures, shorter freezing times or modifying the freezing process. Shock frosting or high-pressure freezing is possible modifications that could improve the descriptive evaluation of the imaging methods used; appropriate studies have to be performed in the future.

In summary, a fixation in formaldehyde should be performed in case of histological examinations; otherwise, only fresh or fresh-frozen samples should be used. For descriptive evaluations by means of imaging methods such as cCT or μ CT freezing should be preferred over formalin as the appropriate fixation method.

Acknowledgements Thanks go to the team in the laboratory in the area of research of the veterinary faculty of the Ludwig-Maximilians-University of Munich who supported and guided the author on how to operate with the μ CT and the machines to prepare the histological slices.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Beck T, Kilchling TP, Meyer-Lindenberg A (2019) Differences between μ CT-imaging and conventional CT for the diagnosis of possible diseases of the middle and inner cat ear. *Anat Histol Embryol* 48:268–276
- Bolliger SA, Tomasin D, Heimer J, Richter H, Thali MJ, Gascho D (2018) Rapid and reliable detection of previous freezing of cerebral tissue by computed tomography and magnetic resonance imaging. *Forensic Sci Med Pathol* 14:85–94

- Bongartz G, Golding S, Jurik A, Leonardi van Meerten E, Geleijns J, Jessen K, Panzer W, Shrimpton P, Tosi G (1998) European guidelines on quality criteria for computed tomography. *EUR* 16262 EN, 1–23
- Bullen A, Taylor RR, Kachar B, Moores C, Fleck RA, Forge A (2014) Inner ear tissue preservation by rapid freezing: improving fixation by high-pressure freezing and hybrid methods. *Hear Res* 315:49–60
- Cisneros JC, Brito R, Martins GS, Candido N, Ferraz R, Bento R (2017) Evaluation of the microgrinding procedure for the microscopic analysis of temporal bones. *Cochlear Implants Int* 18:106–115
- Decraemer WF, Dirckx JJ, Funnell WR (2003) Three-dimensional modelling of the middle-ear ossicular chain using a commercial high-resolution X-ray CT scanner. *J Assoc Res Otolaryngol* 4:250–263
- Fallon JB, Shepherd RK, Nayagam DA, Wise AK, Heffer LF, Landry TG, Irvine DR (2014) Effects of deafness and cochlear implant use on temporal response characteristics in cat primary auditory cortex. *Hear Res* 315:1–9
- George SS, Wise AK, Shivdasani MN, Shepherd RK, Fallon JB (2014) Evaluation of focused multipolar stimulation for cochlear implants in acutely deafened cats. *J Neural Eng* 11:065003
- Hammer N, Voigt C, Werner M, Hoffmann F, Bente K, Kunze H, Scholz R, Steinke H (2014) Ethanol and formaldehyde fixation irreversibly alter bones' organic matrix. *J Mech Behav Biomed Mater* 29:252–258
- Hassepass F, Bulla S, Maier W, Laszig R, Arndt S, Beck R, Traser L, Aschendorff A (2014) The new mid-scala electrode array: a radiologic and histologic study in human temporal bones. *Otol Neurotol* 35:1415–1420
- Kim JS, Lee JS, Park M-H, Kang H, Lee JJ, Lee H-J, Im KC, Moon DH, Lim S-M, Oh S-H (2008) Assessment of cerebral glucose metabolism in cat deafness model: strategies for improving the voxel-based statistical analysis for animal PET studies. *Mol Imaging Biol* 10:154–161
- Klop AC, Vester MEM, Colman KL, Ruijter JM, Van Rijn RR, Oostra RJ (2017) The effect of repeated freeze-thaw cycles on human muscle tissue visualized by postmortem computed tomography (PMCT). *Clin Anat* 30:799–804
- Lander SL, Brits D, Hosie M (2014) The effects of freezing, boiling and degreasing on the microstructure of bone. *Homo* 65:131–142
- Lane JJ, Witte RJ, Driscoll CL, Camp JJ, Robb RA (2004) Imaging microscopy of the middle and inner ear: Part I: CT microscopy. *Clin Anat* 17:607–612
- Lee W, Jasiuk I (2014) Effects of freeze-thaw and micro-computed tomography irradiation on structure-property relations of porcine trabecular bone. *J Biomech* 47:1495–1498
- Levy AD, Harcke HT, Mallak CT (2010) Postmortem imaging: MDCT features of postmortem change and decomposition. *Am J Forensic Med Pathol* 31:12–17
- Maran A, Khosla S, Riggs BL, Zhang M, Ritman EL, Turner RT (2003) Measurement of gene expression following cryogenic μ -CT scanning of human iliac crest biopsies. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 3:83–88
- McElderry JD, Kole MR, Morris MD (2011) Repeated freeze-thawing of bone tissue affects Raman bone quality measurements. *J Biomed Opt* 16:071407
- Middlebrooks JC, Snyder RL (2007) Auditory prosthesis with a penetrating nerve array. *J Assoc Res Otolaryngol* 8:258–279
- Morita K, Doi K, Oue H, Kajihara S, Hayashi K, Akagawa Y (2013) Influence of formalin fixation on the implant stability quotient and mechanical characteristics of bone. *Br J Oral Maxillofac Surg* 51:550–554
- Peake WT, Rosowski JJ, Lynch TJ (1992) Middle-ear transmission: acoustic versus ossicular coupling in cat and human. *Hear Res* 57:245–268
- Poznyakovskiy AA, Zahnert T, Kalaidzidis Y, Schmidt R, Fischer B, Baumgart J, Yarin YM (2008) The creation of geometric three-dimensional models of the inner ear based on micro computer tomography data. *Hear Res* 243:95–104
- Schuknecht H (1993) Pathology of the inner ear, 2nd edn. Lea & Febiger, Philadelphia
- Scruggs JL, Flatland B, Reed A (2014) Effects of freezing on tissue factor activity in a thromboelastography assay. *Vet Clin Pathol* 43:322–325
- Seidel A, Bergauer B, Lell M, Buder T, von Wilmowsky C, Dach E, Wichmann M, Matta RE (2018) Does formalin fixation influence MSCT/CBCT accuracy? *Surg Radiol Anat* 40:31–37
- Smith ZM, Delgutte B (2007) Using evoked potentials to match interaural electrode pairs with bilateral cochlear implants. *J Assoc Res Otolaryngol* 8:134–151
- Tirko NN, Ryugo DK (2012) Synaptic plasticity in the medial superior olive of hearing, deaf, and cochlear-implanted cats. *J Comp Neurol* 520:2202–2217
- Uzun H, Curthoys IS, Jones AS (2007) A new approach to visualizing the membranous structures of the inner ear—high resolution X-ray micro-tomography. *Acta Otolaryngol* 127:568–573
- van der Made AD, Maas M, Beenen LF, Oostra RJ, Kerkhoffs GM (2013) Postmortem imaging exposed: an aid in MR imaging of musculoskeletal structures. *Skelet Radiol* 42:467–472
- Wehrl HF, Bezrukov I, Wiehr S, Lehnhoff M, Fuchs K, Mannheim JG, Quintanilla-Martinez L, Kohlhofer U, Kneilling M, Pichler BJ, Sauter AW (2015) Assessment of murine brain tissue shrinkage caused by different histological fixatives using magnetic resonance and computed tomography imaging. *Histol Histopathol* 30:601–613
- Wei Z, Niu Q, Zhang F, Xiao K, Liu L, Wang Y, Jia J, Cao J, Fu S, Yun K (2017) The effect of sodium fluoride, formaldehyde, and storage temperature on the stability of methamidophos in post-mortem blood and liver. *Int J Legal Med* 131:667–675

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3.3 Occurrence of tympanic bone spicules and bone crests in domestic cats

Tobias Beck¹, med. vet.

Andreas Brühschwein¹, Dr. med. vet.

Andrea Meyer-Lindenberg¹, Prof. Dr. med. vet.

¹Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Veterinärstraße 13, 80539 Munich, Germany

Accepted, 21st of October, 2019, Anatomia, Histologia, Embryologia

Received: 21 August 2019 | Revised: 15 October 2019 | Accepted: 21 October 2019

DOI: 10.1111/ah.12515

ORIGINAL ARTICLE

ANATOMIA HISTOLOGIA EMBRYOLOGIA
WILEY

Occurrence of tympanic bone spicules and bone crests in domestic cats

Tobias Beck  | Andreas Brühshwein | Andrea Meyer-Lindenberg

Clinic for Small Animal Surgery and
Reproduction, Ludwig Maximilians
University Munich, München, Germany

Correspondence

Andrea Meyer-Lindenberg, Clinic for
Small Animal Surgery and Reproduction,
Ludwig Maximilians University Munich,
Veterinärstraße 13, 80539 München,
Germany.
Email: ameylin@lmu.de

Present address

Tobias Beck, Wasenweg 3, Wolfratshausen,
82515, Germany

Abstract

Small and hyperostotic tympanic bone spicules (STBS and HTBS) extending from the tympanic wall or from the septum bullae into the tympanic cavity have been described in large feline species such as Siberian tigers or African lions and in canids such as dogs, red foxes and wolves. Detailed descriptions of prevalence, location and orientation were performed for dogs and African lions by means of necropsy and conventional computed tomography (cCT). Aims of the current study were to describe same characteristics for domestic cats by means of microcomputed tomography (μ CT) and cCT. A total of 15 cats or rather 30 ears were examined. Furthermore, new bone formations extending into the tympanic cavity shaped like small lamellae were found and named “tympanic bone crests” (TBCs). The registered phenomenon of a thickened tympanic wall in some cats was named “tympanic wall thickening” (TWT). STBS appeared in 43% of the ears being bilateral in 44% of the cases, whereas HTBS appeared in one ear. TBC was present in 33% of the ears with a bilateral prevalence of 67%, and TWT could be detected in 13% of the ears. The mentioned structures are just barely or not at all detectable with cCT; therefore, μ CT is necessary for an identification and detailed description. The origin and the factors inducing the development of examined phenomena are unknown, and it is hypothesized that the occurrence can be assessed as anatomical norm variations.

KEYWORDS

cat ear, microcomputed tomography-images, tympanic bone crest, tympanic bone spicule, tympanic wall thickening

1 | INTRODUCTION

Small tympanic bone spicules (STBS) and hyperostotic tympanic bone spicules (HTBS) are new bone formations extending from the mucoperiosteum into the cavity of the tympanic bulla (Parzefall et al., 2015). They have been mistakenly referred to as “otoliths” or “otolithiasis” in dogs (Drees, 2011; Farrow, 1992; Ziemer, Schwarz, & Sullivan, 2003), which are stone-like calcium carbonate concretions of necrotic material. STBS and the stalks of the HTBS whereas consist of osseous bone covered by a vascularized connective tissue

and a squamous or ciliated epithelium. STBS are maximal 1-mm-long needle-like structures with a pointed or clubbed tip with a diameter of <1 mm. If the extent increases, they are called HTBS or mucoperiosteal exostoses (MpEs), characterized as generally stalked, drumstick-like, smooth and globular bony structures (Novales et al., 2015; Parzefall et al., 2015). The “heads” had a diameter over 1 mm and consisted of normal lamellar bone tissue, sometimes with a medullary central channel, covered by the normal middle ear mucoperiosteum and a mostly flat, partially ciliated epithelium (Heitmann et al., 2016; Novales et al., 2015; Parzefall et al., 2015; Sula, Njaa, &

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2019 The Authors. *Anatomia, Histologia, Embryologia* published by Blackwell Verlag GmbH

Anat Histol Embryol. 2019;00:1–6.

wileyonlinelibrary.com/journal/ah | 1

TABLE 1 Characteristics of all 15 cats that were used in the present study

Age (years)	Sex	Breed	Body weight (kg)	Cause of euthanasia
14	♀	European Shorthair (ESH)	4.2	Liver tumour
8	♂	Bengal	6.2	Aortic thrombosis
12	♂	ESH	3.8	Kidney failure
1,5	♂	ESH	3.7	Clamped in bottom hung window
11	♂	ESH	3.7	Hypertrophic cardiomyopathy
20	♂	ESH	2.0	Kidney failure
4	♂	ESH	4.0	Car accident
13	♂	ESH	3.4	Hyperthyreosis
14	♀	ESH	4.2	Body weight loss
18	♀	ESH	3.0	Chronic renal insufficiency
18	♂	ESH	3.3	Hyperthyreosis
14	♂	ESH	3.4	Chronic renal insufficiency
8	♂	ESH	4.1	Intestinal tumour
3	♂	Maine Coon	5.0	Thorax effusion
13	♀	Maine Coon	7.5	Fibrosarcoma

Payton, 2014). Just a few studies were performed evaluating the prevalence and the occurrence of these "otolith-like" bone structures. They could be detected in canids (e.g., dogs, wolves, foxes) and in large feline species (e.g., lion, tiger, leopard, cheetah). They could not be detected in primates, small carnivorous species (e.g., domestic cat, white breasted marten) and domestic or farm animals (e.g., horse, alpaca, goat, sheep, cattle, pig, rabbit, mouse, rat; Heitmann et al., 2016). A detailed description of HTBS is only present for dogs and African lions. Parzefall et al. (2015) examined 50 dogs within the scope of routine necropsy and another 144 skulls from a skull collection, and Novales et al. (2015) examined eight African lions.

The only difference between canids and large felids was the location of STBS and HTBS. In canids, they were mainly located at the free margin of the incomplete septum bullae and only a few at the ventrocaudal wall or the roof of the hypotympanic cavity (Parzefall et al., 2015), whereas in large felids they appeared mostly on the ventromedial aspect of the tympanic bulla wall and only a few in the epitympanic cavity (Novales et al., 2015). The (patho-) genesis of tympanic bone spicules (TBS) is still unknown, and different theories exist but they are just speculations. In African lions, the most probable cause was a response to a chronic injury as an otitis media (Novales et al., 2015), while in canids on the one hand mostly no

connection between an inflammatory process in the external ear canal or in the middle ear with the appearance of TBS could be detected whereby on the other hand an inflammation cannot be ruled out (Parzefall et al., 2015). Other hypotheses are "own independent functions, such as increasing the surface of the tympanic cavity or mediating the perception of low-frequency sounds via bone conduction into the inner ear" (Parzefall et al., 2015).

The mentioned studies detected and described TBS by means of radiographs, conventional computed tomography (CT), visual inspection and histology. In the present study, we use besides of CT additionally μ CT to describe the occurrence and the location of TBS in domestic cats for the first time in research. A comparison of CT and μ CT will show the differences between the two imaging methods in detecting and identifying inter-alia TBS. Additionally, special anatomical structures were analysed and described in detail such as new bony structures similar to lamellae extending into the hypotympanic cavity which are named tympanic bone crests (TBCs). Another part of the present study is the evaluation of the consistency of the thickness of the tympanic wall. Thicker wall parts were found, and this phenomenon was described as tympanic wall thickening (TWT).

2 | MATERIALS AND METHODS

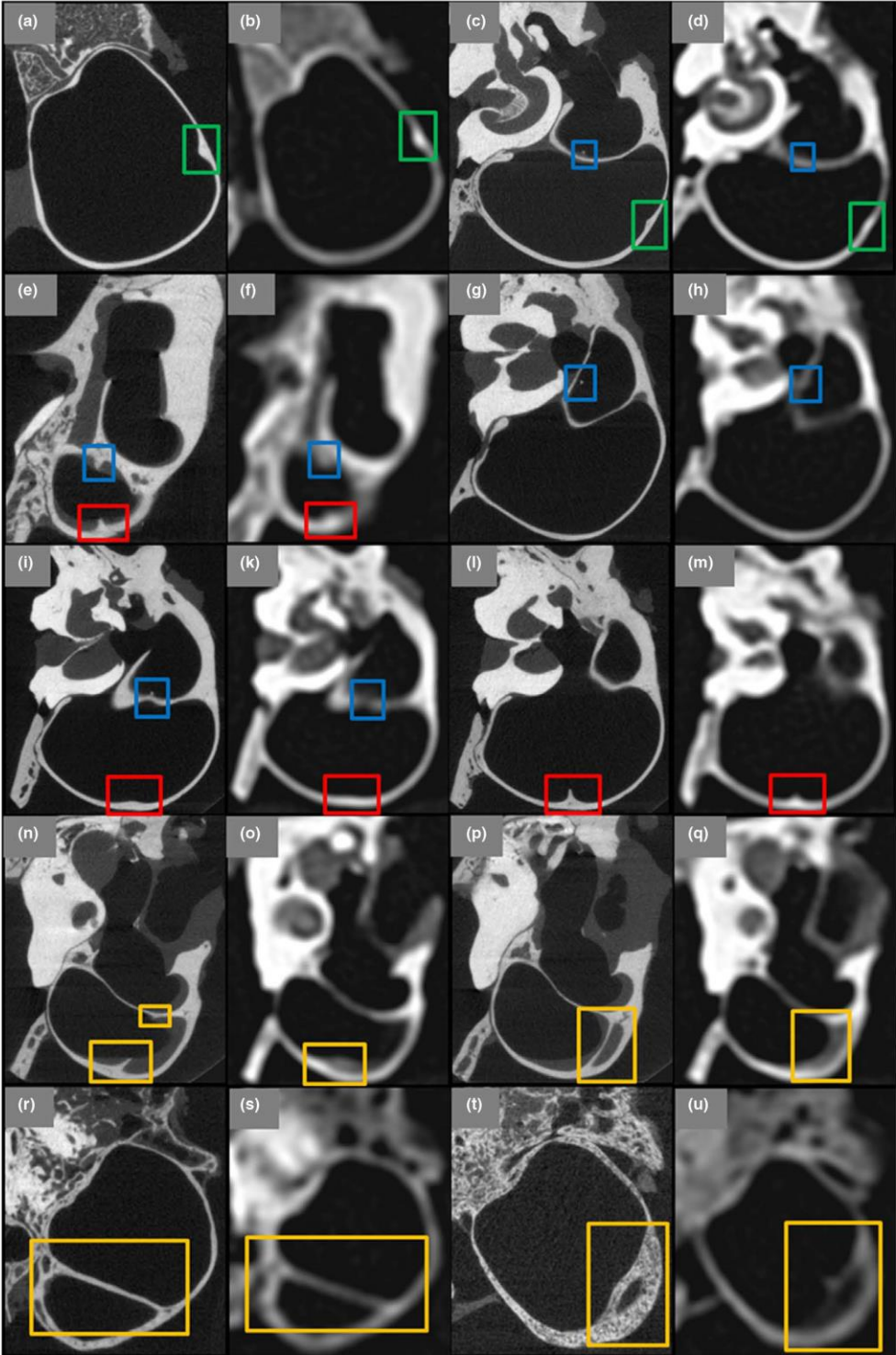
2.1 | Cat ears and preparation steps

Thirty fresh ears of 15 euthanized cats were used in the present study, and the characteristics of the cats are shown in Table 1. All cats were free from diseases of the head as could be confirmed with radiographs and conventional CT. Ears with fluid fillings were excluded from the study. The results of the present study are incidental findings of the unrelated study of Beck, Kilchling, and Meyer-Lindenberg (2019). The authors analysed differences between μ CT imaging and cCT for the diagnosis of possible diseases of the middle and inner ear of the cat. Consequently, the ear samples and the preparation steps of the present study are equal to the procedures performed by Beck et al. (2019).

2.2 | cCT investigations, μ CT investigations and positioning technique for the cCT and μ CT scans

Both investigation methods and the positioning technique comply with the procedures in the study of Beck et al. (2019). The utilized scan parameters in this study were the same as in the study of Beck et al. (2019) and as follows for conventional CT: spatial resolution of 330 μ m with special inner ear window, very sharp convolution kernel, 140 kV tube voltage, 275 effective mAs tube current and 600 μ m slice thickness. The variable scan parameters of the μ CT were chosen as follows: 30.3 μ m slice thickness, 1,250 projections per 180° and 300-ms integration time. Overall 30 cCT and μ CT scans were produced and evaluated.

FIGURE 1 Detected STBS extending from the tympanic wall (red squares) or from the septum bullae (blue squares). TWT is shown within the green and TBC within the yellow squares. The first and third raw present μ CT images, and second and fourth raw present equivalent cCT images



2.3 | Evaluation of cCT and μ CT scans

The evaluation of the cCT and μ CT scans occurred with the program RadiAnt DICOM Viewer 4.2.1 (64 bit version; Medixant). The images were taken with a screenshot tool (Greenshot). Multiplanar reconstructions (transversal, sagittal and coronal planes) were used for a better understanding of the course and the spatial extent of the analysed structures. The base of the images was always the transversal plane with the tympanic membrane orientated to the right and dorsal to the top independent of the ear side. In the sagittal plane, cranial was located to the left and dorsal to the top, and in the coronal plane, lateral was located to the right and cranial to the top.

The observers reviewed all μ CT scans searching for STBS or HTBS, TBC or TWT. If certain structures were found, the equivalent cCT scan was seen through as well and pictures of both imaging methods were taken and compared. Additionally, based on the μ CT scans, extent and location of mentioned formations were recorded.

3 | RESULTS

3.1 | Occurrence of STBS, HTBS, TBC and TWT

Figure 1 shows μ CT and cCT images of detected STBS, TBC and TWT. The detected HTBS is presented in Figure 2. cCT and μ CT images of the HTBS are compared with histological findings in Figure 3. A summary of the characteristics (inter-alia appearance, location and place of origin) of detected STBS, HTBS, TBC and TWT is presented in Table 2. Figure 2 The detected HTBS presented in a series of μ CT images (a–c) and cCT image (d). Presentation of the head (red arrow), the stalk (green arrow) and the base (yellow arrow)

TWTs were apparent in 13% of the ears (Figure 1a–d) being located mostly in the caudal third, and none was found in the cranial third. A thickness from 0.74 to 1.1 mm was measured. The TWTs could be detected in cCT images as well but they were less discrete and mainly evident due to focally increased density and not due to thickening of the wall (Figure 1d). The part of the tympanic wall that was dorsal in the image in relation to the location of the TWT appeared less dense in cCT images, whereas it was only

less thick in reality as could be shown by means of μ CT images (Figure 1c,d).

STBS were found in 13 ears of nine cats, four of them bilaterally. The number of STBS per affected ear was one to four or 1.7 in average (Figure 1c–m). Seventeen STBS extended from the tympanic wall into the hypotympanum (Figure 1e,f,i,m), and only five extended from the septum bullae into the dorsolateral compartment of the tympanic cavity (Figure 1c,d,g–k). The point of their origin was mainly ventromedial (17/22) independently of the bulla compartment that they were extending into. Nine STBS were located in the cranial as well as in the medial third, and only four appeared in the caudal third of the tympanic cavity. The length was measured from 0.5 to 2.8 mm with a stalk thickness from 0.1 to 0.4 mm. STBS were inconsistently detected with cCT, and only the larger STBS were identified (Figure 1c,d,g–k). Its identification as STBS was, nevertheless, hard to justify as their appearance in the cCT scans was very similar to the occurrence of TWT (Figure 1f,m). By means of μ CT scans, an identification of these hyperattenuating structures could be made without any concerns (Figure 1e,i); it was even possible to identify the smallest ones (Figure 1c,g,i).

TBC was found by means of μ CT in 10 ears of six cats, four of them bilaterally. In nine ears, only one TBC was present, whereas one ear had 3 TBCs (average number of 1.2 TBC per affected ear; Figure 1n–u). TBC was only apparent in the posterior two-thirds of the hypotympanic cavity. The length varied very much from 1.7 to 9.7 mm with a thickness of 0.2–0.6 mm. The height (longest distance extending into the tympanic cavity) ranged from 1.3 mm to 2.7 mm. By means of cCT, TBCs were best identifiable when having a high height (Figure 1s). Otherwise or when being surrounded by soft tissue, the TBCs could not be identified anymore as the cCT scans represented only the average density values of bone and soft tissue (Figure 1o,q). The TBC in Figure 1u was identifiable thanks to the comparison with the μ CT image. Without this comparison, the TBC itself was hard to identify as a bony structure because its density seems to be less than the comparable density of the tympanic wall. In a few cases, the TBCs were represented as TWT or as STBS in cCT images due to a low height and length.

A HTBS were present in only one ear (Figure 2). It was located in the middle third part of the hypotympanic cavity being ventromedial.

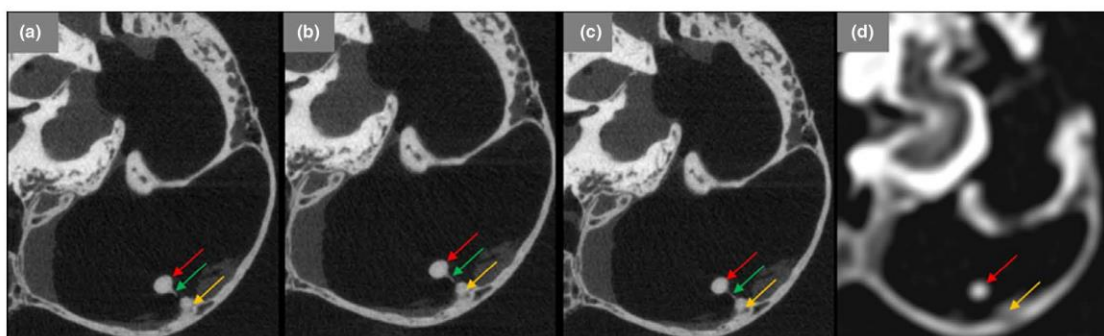


FIGURE 2 The detected HTBS presented in a series of μ CT images (a–c) and cCT image (d). Presentation of the head (red arrow), the stalk (green arrow) and the base (yellow arrow)

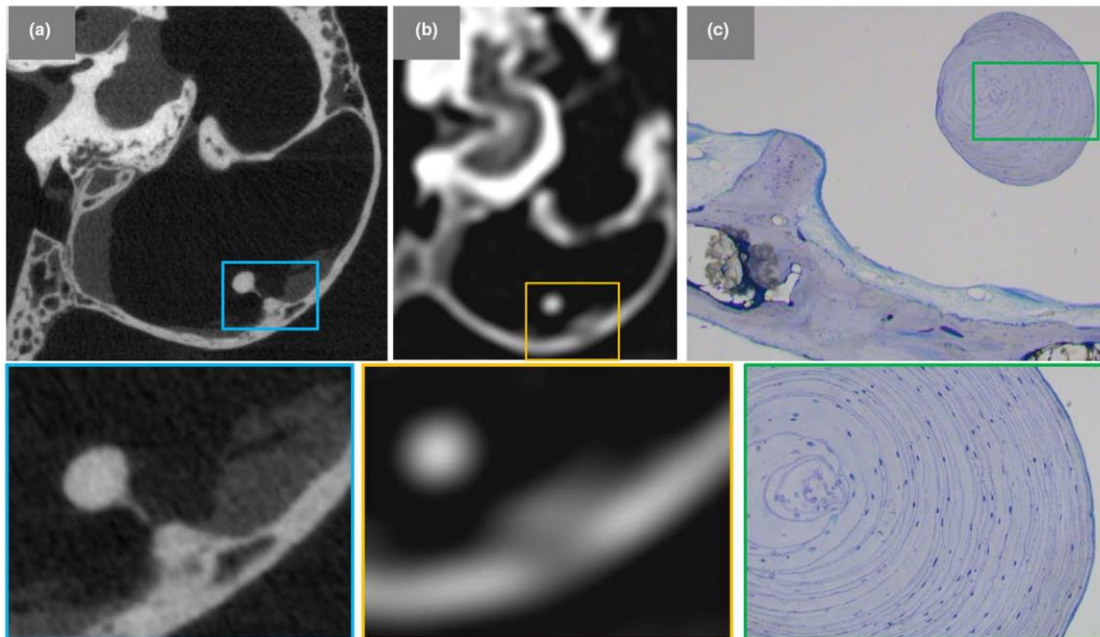


FIGURE 3 Comparison of μ CT image (a), cCT image (b) and histological slice (c) of the detected HTBS

Its stalk is 0.6 mm long and 60 μ m width extending from a 1 mm width and 0.6 mm thick base. The smooth globular swelling ("head") at the top of the stalk had a diameter of 1.1 mm. Its identification was fairly difficult with cCT as the stalk is not represented, and the head seemed to float in the tympanic cavity (Figure 2d), whereas by means of μ CT the entire pathway and the total extent were clearly recognizable and measurable (Figure 2a-c).

4 | DISCUSSION

4.1 | Occurrence of STBS, HTBS, TBC and TWT

HTBS had been found in previous studies only in large felids (e.g., Siberian tigers or African lions) and canids (e.g., dogs, wolves or foxes; Heitmann et al., 2016; Novalés et al., 2015; Parzefall et al.,

2015). The present study showed that STBS as well as HTBS occur in domestic cats even if the occurrence was less frequent compared with the other species. Furthermore, TWT and TBC could be detected in the middle ear of the cat. The formation process of all mentioned structures is unknown, and histological examination and the evaluation of cCT and μ CT did not show any signs of inflammatory alterations of the middle ear. The same could be said about STBS and HTBS; the origin and the developmental process remain unknown, corresponding to the results of Parzefall et al. (2015). In the present study, this is shown for the detected HTBS (Figure 3).

TWT as well as TBC mostly appeared in the caudal parts of the tympanic cavity/wall, and a correct identification was only given using μ CT. STBS and HTBS were mostly present on the ventromedial aspect of the tympanic wall, the same location as described for African lions by Novalés et al. (2015). The same could be said for the

TABLE 2 Summary of the results obtained for STBS, HTBS, TBC and TWT

		STBS	HTBS	TBC	TWT
Affected ears		43%, 13/30	13%, 1/30	33%, 10/30	13%, 4/30
Totally found structures		22	1	12	4
Bilaterally affected cats		4 out of 9	—	4 out of 6	1 out of 3
Location	Cranial	9	0	0	0
	Centred	9	1	4	1
	Caudal	4	0	8	3
Place of origin	Septum bullae	5	0	—	—
	Tympanic wall	17	1	—	—

Abbreviations: HTBS, hyperostotic tympanic bone spicules; STBS, small tympanic bone spicules; TBC, tympanic bone crest; TWT, tympanic wall thickening.

probability of bilateral TBS, which is similar for domestic cats (44%) and African lions (50%; Novales et al., 2015).

To measure the extent and to describe location and orientation of the structures, a fixed multiplanar reconstruction tool was used in the present study. The measured values were taken at the points with the highest and most realistic extensions, and consequently, the results can only be used as orientation values. More precise results could be obtained using a free MPR tool. By means of cCT, it was not possible to safely detect the found phenomena as its spatial resolution was too low to detect, for example the entire pathway of the stalks of S/HTBS. This might lead to misdiagnosis of otoliths with cCT. Therefore, the use of an in vivo μ CT with the advantage of a higher spatial resolution (Holdsworth & Thornton, 2002; Kalender, 2006) is necessary to detect mentioned structures. As all cats in the present study were free from diseases, it is not sure whether found anatomical norm variations are also visible in cats with present ear diseases such as otitis media or inflammatory polyps.

5 | CONCLUSIONS AND OUTLOOK

HTBS and STBS also exist in domestic cats but its occurrence is difficult to detect with the usually used in vivo imaging methods like cCT; the same can be said about TBC and TWT. All mentioned structures and phenomena are only safely detectable using μ CTs, which are not yet used for in vivo examinations of the cat although it would be possible. TBC, TWT, STBS and HTBS appear in middle ears without any signs for inflammatory alterations, and the development remains unknown. Consequently, it can be hypothesized that they constitute anatomical norm variations. Studies with sick cats should be performed to evaluate differences in healthy cats with regard to the detectability of mentioned anatomical norm variations.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks go to the team in the laboratory in the area of research of the veterinary faculty of the Ludwig Maximilians University of Munich who supported and guided the author on how to operate with the in vivo μ CT and the machines to prepare the histological slices.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

T. Beck: involved in protocol and project development, data collection and management, data analysis, manuscript writing and editing. A. Brühshwein: collected and analysed the data and management. A. Meyer-Lindenberg: developed the project and wrote and edited the manuscript.

ETHICAL APPROVAL

With this statement, we declare that we did not obtain prior approval for the animal experiments from any animal experimentation ethics committee. All cats used in this study were already dead due to other reasons, and the responsible veterinarians had the permit from the previous owner to provide the dead cats for research. All applicable international, national and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

ORCID

Tobias Beck  <https://orcid.org/0000-0002-1214-5093>

REFERENCES

- Beck, T., Kilchling, T. P., & Meyer-Lindenberg, A. (2019). Differences between μ CT-imaging and conventional CT for the diagnosis of possible diseases of the middle and inner cat ear. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 48(3), 268–276.
- Drees, R. (2011). External, middle and inner ear. In T. Schwarz, J. Saunders (Eds.), *Veterinary computed tomography* (pp. 153–160). Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- Farrow, C. (1992). Known case conference. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 33, 262–263.
- Heitmann, A., Parzefall, B., Zollner, M., Brühshwein, A., Hermanns, W., & Blutke, A. (2016). Hyperostotic tympanic bone spicules in domestic and wild animal species. *Veterinärmedizin*, 61, 187–194. <https://doi.org/10.17221/8819-VETMED>
- Holdsworth, D. W., & Thornton, M. M. (2002). Micro-CT in small animal and specimen imaging. *Trends in Biotechnology*, 20, 34–39. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02004-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02004-8)
- Kalender, W. (2006). Präklinische Bildgebung mit CT (Mikro-CT). In W. Kalender (Ed.), *Computertomographie* (pp. 237–245). Erlangen, Germany: Publicis Corporate Publishing.
- Novales, M., Ginel, P. J., Diz, A., Blanco, B., Zafra, R., Guerra, R., & Mozos, E. (2015). Mucoperiosteal exostoses in the tympanic bulla of African lions (*Panthera leo*). *Veterinary Pathology*, 52, 377–383.
- Parzefall, B., Rieger, A., Volk, H. A., Maierl, J., Brühshwein, A., & Blutke, A. (2015). Prevalence and characterization of small tympanic bone spicules and drumstick-like hyperostotic tympanic bone spicules in the middle ear cavity of dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 56, 25–32. <https://doi.org/10.1111/vru.12197>
- Sula, M. M., Njaa, B. L., & Payton, M. E. (2014). Histologic characterization of the cat middle ear: In sickness and in health. *Veterinary Pathology*, 51, 951–967. <https://doi.org/10.1177/0300985813511125>
- Ziemer, L. S., Schwarz, T., & Sullivan, M. (2003). Otolithiasis in three dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 44, 28–31. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2003.tb01444.x>

How to cite this article: Beck T, Brühshwein A, Meyer-Lindenberg A. Occurrence of tympanic bone spicules and bone crests in domestic cats. *Anat Histol Embryol*. 2019;00:1–6. <https://doi.org/10.1111/ahel.12515>

4 DISKUSSION

Mit der ersten Publikation wurde gezeigt, welche Strukturen des Mittel- und Innenohres der Katze mittels eines in vivo- μ CT dargestellt werden können. Weiterhin wurden die Vorteile der μ CT gegenüber der klinischen CT bei der Diagnose möglicher Erkrankungen des Mittel- und Innenohres ermittelt. Die bildgebenden Verfahren wurden mit histologischen Schnittpräparaten verglichen um die Grenzen der Bildgebung zu verdeutlichen. In der zweiten Publikation wurde der Einfluss verschiedener Fixationsmethoden über unterschiedlich lange Zeiträume auf das Mittel- und Innenohr der Katze, sowohl mit CT- und μ CT, als auch mit histologischen Schnittpräparaten, erarbeitet. Anatomische Besonderheiten im Bereich des Mittelohres der Katze wurden in der dritten Publikation beschrieben und mit CT und μ CT dargestellt.

Grundlage der ersten Arbeit waren drei ohrgesunde Katzen. Mit diesen wurden alle theoretisch abbildbaren Strukturen des Mittel- und Innenohres dargestellt. Die Ergebnisse von Seifert et al. (2012) zu den Vorteilen der μ CT konnten bestätigt werden. Die μ CT stellte knöcherne Strukturen im Detail dar und ermöglichte deren genaue Bewertung. Weichteilgewebe waren hingegen nur eingeschränkt differenzierbar und bewertbar. Für die CT galten grundsätzlich die gleichen Erkenntnisse, jedoch wurden die Strukturen aufgrund der geringeren Auflösung deutlich unschärfer abgebildet. Das Augenmerk lag bei Seifert et al. (2012) auf der Erkennbarkeit von diagnostisch relevanten anatomischen Strukturen des Mittel- und Innenohres, ohne diese gezielt auf die Ursache möglicher Erkrankungen wie Taubheit, Auftreten des Vestibularsyndroms, Osteodystrophien oder Entzündungen hin zu bewerten, was in der vorliegenden Arbeit geschah. Seifert et al. (2012) verwendeten für ihre Untersuchungen nur einen Katzenkopf (2 Mittel- und Innenohren), wodurch eine Reproduzierbarkeit nicht gegeben ist. In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 6 Mittel- und Innenohren untersucht, was die Reproduzierbarkeit verbessert. Ein weiterer Unterschied war die Verwendung des in vivo-Xreme CT II (Scanco Medical AG 2017), dem Nachfolgermodell des von Seifert et al. (2012) genutzten Xtreme CT I, der eine geringere Auflösung erreicht (Scanco Medical AG 2017). Daher sind die Ergebnisse der Detailerkennbarkeit der vorliegenden Studie für Strukturen im Grenzbereich der maximal möglichen Auflösung teilweise abweichend zu den Ergebnissen von Seifert et al. (2012). U.a. war die Darstellung des Verlaufs der Bogengänge und ihrer Mündung detaillierter. Dünnscheiben Knochenlamellen (z.B. zwischen dem Epitympanicum und dem Canalis facialis), der Steigbügel mit dem ovalen Fenster und die feine Verbindung zwischen den beiden Paukenhöhlenkompartimenten konnten bewertet werden.

Mit dem CT können Knochenstrukturen und Hohlräume erkannt und bewertet werden, die weitestgehend frei von anderen knöchernen Strukturen liegen: die Paukenhöhlenwand und das knöcherne Paukenhöhlenseptum, Teile von Hammer und Amboss, das Lumen der Paukenhöhle mitsamt

möglichem Inhalt (z.B. pathologisch vorhandene Flüssigkeit als Folge einer Entzündung) oder Knochenproliferationen der Paukenhöhlenwand (Ackermann et al. 2017; Garosi et al. 2003; Seifert et al. 2012). Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit weitestgehend bestätigt. Andere Knochenstrukturen und Hohlräume, wie der Steigbügel oder die Bogengänge, waren für eine Beurteilung mit dem CT zu klein. Des Weiteren müssen beim CT mögliche Volumenartefakte in Form einer verdickten Paukenhöhlenwand bei vorliegender Flüssigkeitsfüllung bei zu gering eingestellten HE beachtet werden (Barthez et al. 1996). Artefakte dieser Art konnten in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden. Um einer falschen Diagnose der Knochenentzündung der Paukenhöhlenwand vorzubeugen, müssen entweder die HE erheblich erhöht, ein Knochenfenster angewendet oder eine möglichst geringe Schichtdicke für die Untersuchung ausgewählt werden (Barthez et al. 1996). Die Ergebnisse der durchgeführten Studie zeigten, dass die Auflösung des CT hier an ihre Grenzen stößt und dass die μ CT vorteilhaft für die Analyse einer Entzündung oder eines Volumenartefaktes ist.

Für die korrekte Diagnose einer Mittelohrentzündung müssen feine Flüssigkeitsfilme erkannt und von der Paukenhöhlenwand bzw. deren Schleimhautauskleidung differenziert werden können (Love et al. 1995). Die Autoren konnten am Beispiel von Hundeohren zeigen, dass das beim CT nicht immer der Fall ist. Spezifität und Sensitivität lagen bei der Diagnose einer Otitis media nur bei 89 bzw. 83%. Diese für eine korrekte Diagnose relevanten Werte könnten durch Anwendung der hochauflösenden μ CT gesteigert und die Wahrscheinlichkeit für Falschdiagnosen verringert werden, da zumindest Flüssigkeitsfilme und die Paukenhöhlenwand in der vorliegenden Studie einwandfrei unterschieden werden konnten. Allerdings war die Auflösung des μ CT nicht hoch genug, um die Schleimhaut selbst zu identifizieren. Folglich können Entzündungen im Anfangsstadium oder Epitheldefekte nicht diagnostiziert werden. Eine weitere Falschdiagnose aufgrund der geringeren Auflösung des CT gegenüber dem μ CT liegt bei nicht pathogenen Knochenproliferationen vor, die in das Paukenhöhlenlumen hineinragen. In der Literatur wurden diese früher als Otolithen bezeichnet, inzwischen werden sie je nach Größe small oder hyperostotic tympanic bone spicules genannt (Farrow 1992; Heitmann et al. 2016; Parzefall et al. 2015; Ziemer et al. 2003). In der eigenen Studie wurden die oft unter 600 μ m dünnen STBS im CT nur in einem Bild erfasst und erschienen somit als frei schwebende knochendichte Strukturen im Paukenhöhlenlumen, die als Artefakt gedeutet wurden. Eine korrekte Interpretation war bei alleiniger Betrachtung der CT-Aufnahmen somit nicht möglich. Erst durch die Ansicht der μ CT-Aufnahmen wurden Verlauf und Ausmaß eindeutig nachvollziehbar.

Die Paukenhöhle der Katze wird durch das knöcherne Paukenhöhlenseptum in ein ventromediales und ein dorsolaterales Kompartiment unterteilt. Die Verbindung der Kompartimente verläuft zwischen dem freien Rand des Septums und dem Paukenteil des Schläfenbeins (Nickel et al. 2004). In der eigenen Studie war diese Verbindung mit Hilfe des CT in den kranialen und kaudalen Bereichen zu erkennen, da der Abstand der knöchernen Strukturen dort ausreichend groß ist. Ansonsten stellte sich die Verbindung

lediglich als eine Aufhellung mit geringerer HE-Zahl dar. Septum und Paukenteil des Schläfenbeins waren ebenfalls nur eingeschränkt differenzierbar. Im μ CT-Scan hingegen war der gesamte Verlauf der Verbindung zu erkennen und sowohl Schläfenbein als auch Paukenhöhlenseptum waren deutlich voneinander abgrenzbar. Des Weiteren konnte mit dem CT das Paukenhöhlenseptum selbst nicht gut bewertet werden. Eventuell vorliegende Frakturen oder Fissuren wären unmöglich zu diagnostizieren, hierfür muss eine μ CT-Untersuchung erfolgen. Diese stellte das Paukenhöhlenseptum in der eigenen Studie detailliert dar und ermöglichte eine adäquate Bewertung.

Mit Hilfe des CT kann ein physiologisches Trommelfell nicht dargestellt werden, da die Dicke zu gering ist. Kuypers et al. (2005) beschrieben die Dickenverteilung von frischen Trommelfellen bei Katzen. Es wurden Minimalwerte von 5,5 μ m im Zentrum und Maximalwerte von 99 μ m im Bereich des Anulus fibrocartilagineus ermittelt. Im hinteren oberen Teil des Zentrums reichte die Dicke bis hin zu 30 μ m. Im Allgemeinen wurden von Kuypers et al. (2005) für den posterioren Abschnitt signifikant kleinere Werte als für den anterioren Abschnitt festgestellt. Das Trommelfell war in der eigenen Studie im CT nur dann sichtbar, wenn es durch Flüssigkeitsauflagerungen verdickt abgebildet wurde. Flüssigkeitsauflagerungen oder Verdickungen aufgrund einer möglichen Entzündung können jedoch mit dem CT nicht von Schmutz oder vermehrtem Ohrschmalz unterschieden werden. Mit dem μ CT ließ sich das Trommelfell in der eigenen Studie nur in den knochennahen Teilen darstellen. Von einer Bewertung des Trommelfells sollte daher abgesehen werden, da die dafür nötige Präzision nicht gegeben war. Die Gehörknöchelchen mitsamt den anheftenden Bändern konnten mit dem CT nicht auf mögliche Frakturen oder Zusammenhangstrennung bewertet werden, da sie zu unscharf (Hammer und Amboss) bzw. gar nicht dargestellt wurden (Steigbügel und Bänder). Veränderungen der Gehörknöchelchen stellen allerdings eine mögliche Ursache der konduktiven Form der Taubheit dar (Harvey et al. 2003), die mit dem CT nicht ermittelt werden kann. Hierfür ist, wie die eigene Studie zeigte, eine μ CT-Untersuchung durchzuführen. Mit dieser wurden alle Gehörknöchelchen detailliert dargestellt, eine Beurteilung der Bandverbindungen war jedoch auch mit dem μ CT nur eingeschränkt möglich. Eine Diagnose konduktiven Hörverlusts verursacht durch Schäden an den Gehörknöchelchen könnte somit mit dem μ CT gestellt werden. Die sensorische Form der Taubheit hat unterschiedliche mögliche Ursachen, u.a. eine Cochlea- oder Sacculusdegeneration (sekundär entstanden durch einen Haarzellverlust infolge der Degeneration der Stria vascularis aufgrund eines Melanozytenmangels), eine primäre oder sekundäre Schädigung der Haarzellen (entstanden durch neuroepitheliale Degeneration oder ototoxische Substanzen, v.a. Aminoglykosid-Antibiotika wie Neomycin oder Gentamycin) oder den Bruch von Haarzellen durch zu hohe Lärmbelastung (Flottorp 1991; Harvey et al. 2003; Strain 1991; Strain 1996). Genannte Strukturen konnten in den eigenen Untersuchungen weder mit dem CT noch mit dem in vivo- μ CT dargestellt werden. Mögliche Ursachen einer sensorischen Taubheit oder des Auftretens eines Vestibularsyndroms können somit durch die angewandten bildgebenden Verfahren

nicht ermittelt werden, die Ergebnisse von Seifert et al. (2012) wurden bestätigt. Einzelne Neurone und Haarzellen konnten bislang nur am Beispiel von Mäusen mit zu Forschungszwecken eingesetzten *ex vivo*- μ CTs dargestellt werden (Glueckert et al. 2018).

Die eigene Studie zeigte, dass μ CT-Untersuchungen histologische Schnitte ersetzen können, wenn das Hauptaugenmerk auf knöchernen Strukturen oder luftgefüllten Hohlräumen bzw. Kanälen lag. Bei Bewertungen von Weichteilgeweben war die μ CT nicht präzise genug, um histologische Schnitte zu ersetzen, da diese Strukturen nur unscharf (u.a. Teile des Trommelfells, Nerven oder Muskeln) oder aufgrund ihrer Größe gar nicht abgebildet wurden (u.a. das Gehör- und Gleichgewichtsorgan). Durch die Gabe von Kontrastmittel kann die Darstellbarkeit von Weichteilgeweben mit dem μ CT verbessert werden (Rohani et al. 2016). Es muss hierbei beachtet werden, dass die Autoren nur *ex vivo*-Untersuchungen an Mittelohren von Menschenkadavern durchführten.

Die Folgen mehrfachen Einfrierens und Auftauens wurden bereits u.a. in Studien über menschliches Muskelgewebe (Klop et al. 2017) oder das Gehirn von Schweinen (Bolliger et al. 2018) erforscht. Die Verschlechterung der Qualität und der Aussagekraft der Proben konnte mittels CT-Untersuchungen (Klop et al. 2017) sowie zusätzlich durch histologische Schnitte (Bolliger et al. 2018) beurteilt werden. So wurden deutliche HE-Veränderungen der Muskulatur festgestellt und es traten ausgeprägte, säulenförmige, blasenartige Artefakte im Gehirn der aufgetauten Proben auf. Die Qualität der Weichteilgewebe der histologischen Schnitte verschlechterte sich in der eigenen Studie ebenfalls durch (mehrfaches) Einfrieren und Auftauen und es traten vermehrt Blasenartefakte auf. Veränderungen auf zellulärer Ebene konnten mit bildgebenden Verfahren nicht dargestellt werden, dafür bedarf es den Einsatz spezieller Verfahren wie der Raman-Spektroskopie (McElderry et al. 2011) oder der Elektronenmikroskopie (Lander et al. 2014). Mit diesen stellten die Autoren den Kollagenzerfall bei Mäusefemora fest bzw. zeigten, dass sich Risse auf der Knochenoberfläche menschlicher Tibiae-Proben nach 21-tägigem Tiefgefrieren ausgeprägter darstellten, als bei der Kontrollgruppe. Mit histologischen Schnittpräparaten konnten auftretende Veränderungen auf zellulärer Ebene ebenfalls dargestellt werden (Cisneros et al. 2017). Die Autoren untersuchten menschliche Schläfenbeine, die für 24 Stunden bzw. 6 Monate bei -20°C eingefroren, anschließend aufgetaut und zur Herstellung histologischer Schnitte verwendet wurden. Die histologischen Schnitte der 6 Monate gefrorenen Proben zeigte eine deutlich geringere Qualität der Mikroanatomie des Innenohres, wohingegen die für 24 Stunden gefrorenen Proben keine Unterschiede gegenüber frischen Präparaten zeigten. Cisneros et al. (2017) folgerten daraus, dass nicht das Tiefgefrieren selbst den Qualitätsverlust nach sich zieht, sondern nur die Dauer des Tiefgefrierens ausschlaggebend war. Diese Schlussfolgerung konnte mit der eigenen Studie insofern bestätigt werden, dass die Proben nach 3-wöchigem Tiefgefrieren eine schlechtere Qualität aufwiesen verglichen mit den für eine Woche tiefgefrorenen Proben.

Die eigene Studie zeigte, dass durch die Anwendung von Formalin als Fixativ das Auftreten von makroskopisch sichtbaren Veränderungen und von Veränderungen auf zellulärer Ebene verhindert bzw. deutlich reduziert werden konnte. Jegliche Knochenstrukturen waren unabhängig von der Formalinfixierung und Fixationsdauer sowohl im CT- als auch im μ CT-Bild gut darstellbar. In den histologischen Schnittpräparaten wurde das gleiche Ergebnis für Gehör- und Gleichgewichtsorgan erzielt: sämtliche sensible Strukturen und Zellen waren klar zu erkennen, ohne dass der Lagerungsprozess einen Einfluss hatte. Somit konnten die Ergebnisse der Studien von Seidel et al. (2018) und Umstattd et al. (2017) bestätigt werden. Seidel et al. (2018) untersuchten den Einfluss der Formalinfixierung auf die Genauigkeit 3-dimensionaler Modelle mittels Kegelstrahl-CT und Mehrzeilen-CT am Beispiel eines Menschenkopfes. Von den Autoren wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Umstattd et al. (2017) bewerteten u.a. die Gewebeschrumpfung von bei Menschen resezierten oralen Plattenepithelkarzinomen durch Formalinfixierung. Die Tumorgroße nach der Formalinfixierung war nur gering reduziert verglichen mit der Größe nach Exzision. Folglich spielt eine Gewebeschrumpfung auf formalinfixierte Proben keine große Rolle. Allerdings ist zu beachten, dass bei einer Evaluation von Weichteilstrukturen formalinfixierter Mittel- und Innenohren mittels CT und μ CT Flüssigkeitsartefakte durch das Formalin auftreten können, was durch die eigene Studie belegt wurde. Somit war eine Unterscheidung zwischen Formalinartefakten und tatsächlich vorhandenen Weichteilstrukturen wie Muskeln, Nerven o.ä. nur eingeschränkt möglich.

Die erwähnten STBS und HTBS wurden in der Literatur früher als Otolithen bezeichnet und mit einer Otolithiasis in Verbindung gebracht (Drees 2011; Farrow 1992; Ziemer et al. 2003). Novales et al. (2015) stellten die Hypothese auf, dass eine chronische Otitis media die meistwahrscheinliche Entstehungsursache von MpEs bei Löwen ist. Parzefall et al. (2015) konnten pathologische Entstehungsprozesse wie Entzündungen, Nekrosen oder Verkalkungen nicht bestätigen, jedoch konnten diese Prozesse auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. In der eigenen Studie waren ebenfalls keine pathologischen Entstehungsprozesse zu erkennen. Die Entstehung von STBS und HTBS bleibt somit offen.

Heitmann et al. (2016) konnte bei über 200 Hauskatzen in der pathologischen Untersuchung keine HTBS vorfinden. Die Möglichkeit des Vorliegens von HTBS wurde allerdings nicht ausgeschlossen. In der eigenen Studie gelang der zweifelsfreie Nachweis eines HTBS bei der Katze.

Tympanic bone crests (TBC) wurden nach derzeitigem Stand in der Literatur noch nicht beschrieben. Es handelt sich hierbei um in das Hypotympanicum der Paukenhöhle ragende Knochenlamellen. In der eigenen Studie konnte die Entstehung nicht mit pathologischen Prozessen in Verbindung gebracht werden, ausgeschlossen werden können sie jedoch nicht. TBC können als anatomische Normvariante des Mittelohres der Katze angesehen werden und sollten nicht mit dem knöchernen Paukenhöhlenseptum verwechselt werden.

Zu dem Phänomen der tympanic wall thickening (TWT, zu Deutsch Paukenhöhlenwandverdickung), zufällig auftretenden Verdickungen der Paukenhöhlenwand der Katze, liegen in der Literatur nach derzeitigem Stand keine Beschreibungen vor. Anhand von μ CT-Studien mit Tibiae von Menschen (Christen et al. 2014) und Mäusen (Sugiyama et al. 2012) wurde festgestellt, dass sich kortikale Knochendicke, Knochenmasse und lokaler Stress direkt proportional zueinander verändern. Norman et al. (2017) zeigten am Beispiel von μ CT-Untersuchungen von menschlichen Kniekadavern, dass sich die kortikale Knochendicke der lateralen Femurkondylen in den Bereichen des Ansatzes des vorderen Kreuzbandes bis zu verdreifachte. In der eigenen Studie wurde allerdings keine Einwirkung von Stressoren auf die Paukenhöhlenwände der betroffenen Tiere beobachtet. Das Phänomen der TWT kann als anatomische Normvariante angesehen werden, ein pathologischer Entstehungsprozess ist jedoch möglich.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Moderne bildgebende Verfahren wie die CT werden bei Erkrankungen des Mittel- und Innenohres der Katze standardmäßig im Rahmen der klinischen Diagnostik eingesetzt, wohingegen die hochauflösende μ CT bislang noch nicht in vivo eingesetzt wird. Mit der ersten durchgeführten Arbeit wurde anhand von sechs Mittel- und Innenohren der Katze gezeigt, welche Vorteile die μ CT bei der Diagnose möglicher Erkrankungen gegenüber der CT hat. Knöcherne Strukturen wie die Gehörknöchelchen, die Bogengänge, das Paukenhöhlenseptum, die Paukenhöhlenwand oder die Cochlea konnten besser beurteilt werden. Eventuell bestehende Frakturen/Fissuren, Zusammenhangstrennungen oder Entzündungen können mit einer höheren Sensitivität festgestellt werden. Eine adäquate Beurteilung von Weichteilstrukturen wie dem Spanner des Trommelfells, dem Trommelfell selbst oder dem Fazialisnerv war auch mit dem μ CT nur eingeschränkt möglich. Auflösung und Bildqualität der μ CT-Scans waren nicht ausreichend hoch, um auf die Anfertigung histologischer Schnitte zu verzichten. Nur bei der Beurteilung knöcherner Strukturen war die Qualität der μ CT-Bilder ausreichend hoch. Es war nicht möglich, zelluläre Strukturen wie das Gehör- oder Gleichgewichtsorgan genauso gut wie mit histologischen Präparaten zu beurteilen.

Die zweite Studie befasst sich mit den Fixationsmethoden Tiefgefrieren, Tiefgefrieren nebst Auftauen und Formalinfixierung. Untersucht wurde deren Einfluss auf die bildgebenden Verfahren CT und μ CT sowie auf die Histologie. Die Fixationsdauer (eine bzw. drei Wochen tiefgefroren/formalinfixiert) und die Anzahl der Einfrier-Auftau-Vorgänge (ein bzw. zwei) wurden variiert. Die Bildqualität nahm mit jedem Einfrier-Auftau-Zyklus ab und die Anzahl auftretender Artefakte erhöhte sich. Des Weiteren nahm die Qualität der Proben mit zunehmender Dauer im tiefgefrorenen Zustand ab. Histologische Schnitte konnten nach dem Auftauen nicht mehr adäquat beurteilt werden, da sich die zellulären Strukturen deutlich verändert darstellten. Unabhängig von der Dauer der Formalinfixierung konnten die histologischen Schnitte einwandfrei beurteilt werden. In der rein subjektiven Evaluation mit CT und μ CT wurden tiefgefrorene Proben besser bewertet als formalinfixierte Proben. Formalinfixierte Präparate wurden mit zunehmender Fixationsdauer schlechter beurteilt. Die intra-reader Auswertung ergab eine hohe Reproduzierbarkeit der subjektiven Bewertung von Mittel- und Innenohr der Katze mittels CT und μ CT.

Mit der dritten Arbeit wurde gezeigt, dass bei der Katze anatomische Normvarianten im Bereich des Lumens und der Wand der Paukenhöhle auftreten können. Entdeckt wurden small bzw. hyperostotic tympanic bone spicules, tympanic bone crests und tympanic wall thickenings. Genannte Normvarianten waren lediglich mit der μ CT eindeutig zu identifizieren. Mit der CT wurden sie entweder gar nicht erkannt oder eine korrekte Identifikation war schwer möglich. Die Wahrscheinlichkeit für das

mindestens unilaterale Auftreten von STBS lag bei 43%, für TBC bei 33%. TWT (13%) und HTBS (6,7%; bei einem Mittelohr) lagen nur vereinzelt vor. Die für die Entstehung der Normvarianten verantwortlichen Faktoren konnten noch nicht eindeutig geklärt werden.

6 SUMMARY

Modern imaging techniques such as CT are commonly used in clinical diagnostics for middle and inner ear diseases of the cat, whereas high-resolution μ CT has not yet been used in vivo. With the first performed study it could be shown at the example of six middle and inner ears of the cat which advantages μ CT has in the diagnosis of possible diseases compared to CT. Bony structures such as amongst others the auditory ossicles, the semicircular ducts, the tympanic septum, the tympanic cavity wall or the cochlea could be assessed better. Possible fractures/fissures, separations or inflammations can be detected with greater sensitivity. An adequate assessment of soft tissue structures such as amongst others the tensor tympanic muscle, the tympanic membrane itself or the facial nerve was also with μ CT only limited possible. Both the resolution and the image quality of μ CT were not sufficiently high to replace histological sections. Only in the evaluation of bony structures the quality of μ CT-scans was sufficiently high. It was not possible to assess cellular structures such as amongst others the auditory or vestibular organ just as well as with histological specimens.

The second study deals with the fixation methods deep freezing / deep freezing followed by thawing and formaldehyde fixation. Investigated was their influence on the imaging techniques CT and μ CT and on the histology. The fixation periods (one or three weeks deep-frozen/fixated with formaldehyde) and the number of freeze-thaw cycles (one or two) were varied. The image quality decreased with each freeze-thaw cycle and the number of artifacts increased. Furthermore, the quality of the deep-frozen samples decreased with increasing freezing time. Histological sections could no longer be adequately assessed after thawing since the cellular structures were presented notable changed. Independent of the duration of formalin storage, histological sections could be evaluated flawless. For purely subjective viewing with CT and μ CT, deep-frozen fixated samples were evaluated better than formalin fixated samples. Formalin fixated samples were evaluated worse with increasing fixation time. An intra-reader comparison showed a high reproducibility for the subjective evaluation of the middle and inner ear of the cat by means of CT and μ CT.

With the third study it was shown that in the cat anatomic norm variations can occur in the area of the lumen and the wall of the tympanic cavity. Detected could be small or hyperostotic tympanic bone spicules, tympanic bone crests and tympanic wall thickenings. Named norm variations could only be identified unambiguously with μ CT. They were either not recognized with CT or a correct identification was hardly possible. The probability for the occurrence of STBS unilateral at least was 43% and 33% for TBC. TWT (13%) and HTBS (6.7%; one middle ear) were only sporadic. The responsible factors for the emergence of the norm variations had not yet been conclusively explored.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Ackermann A. L., Lenz J. A., May E. R., Frank L. A. (2017). Mycoplasma infection of the middle ear in three cats. *Vet Dermatol*, 28, 417-e102.

Alcantara D., Leal M. P., Garcia-Bocanegra I., Garcia-Martin M. L. (2014). Molecular imaging of breast cancer: present and future directions. *Front Chem*, 2, 112.

Allgoewer I., Lucas S., Schmitz S. A. (2000). Magnetic resonance imaging of the normal and diseased feline middle ear. *Vet Radiol Ultrasound*, 41, 413-418.

Almajdub M., Magnier L., Juillard L., Janier M. (2008). Kidney volume quantification using contrast-enhanced in vivo X-ray micro-CT in mice. *Contrast Media Mol Imaging*, 3, 120-126.

Attias J., Hod R., Raveh E., et al. (2016). Hearing loss patterns after cochlear implantation via the round window in an animal model. *Am J Otolaryngol*, 37, 162-168.

Badea C., Hedlund L. W., Johnson G. A. (2004). Micro-CT with respiratory and cardiac gating. *Med Phys*, 31, 3324-3329.

Badea C. T., Fubara B., Hedlund L. W., Johnson G. A. (2005). 4-D micro-CT of the mouse heart. *Mol Imaging*, 4, 110-116.

Badi A. N., Hillman T., Shelton C., Normann R. A. (2002). A technique for implantation of a 3-dimensional penetrating electrode array in the modiolar nerve of cats and humans. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 128, 1019-1025.

Balto K., Muller R., Carrington D. C., Dobeck J., Stashenko P. (2000). Quantification of periapical bone destruction in mice by micro-computed tomography. *J Dent Res*, 79, 35-40.

Barou O., Valentin D., Vico L., et al. (2002). High-resolution three-dimensional micro-computed tomography detects bone loss and changes in trabecular architecture early: comparison with DEXA and bone histomorphometry in a rat model of disuse osteoporosis. *Invest Radiol*, 37, 40-46.

Barthez P. Y., Koblik P. D., Hornof W. J., Wisner E. R., Seibert J. (1996). Apparent wall thickening in fluid filled versus air filled tympanic bulla in computed tomography. *Vet Radiol Ultrasound*, 37, 95-98.

Battaglino R., Vokes M., Schulze-Spate U., et al. (2007). Fluoxetine treatment increases trabecular bone formation in mice. *J Cell Biochem*, 100, 1387-1394.

Benigni L., Lamb C. (2006). Diagnostic imaging of ear disease in the dog and cat. *In practice*, 28, 122.

Bischoff M. G., Kneller S. K. (2004). Diagnostic imaging of the canine and feline ear. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 34, 437-458.

Böge A. (1970). *Physik: Grundlagen · Versuche · Aufgaben*. Springer Verlag, Wiesbaden, 133-142.

Bolliger S. A., Tomasin D., Heimer J., et al. (2018). Rapid and reliable detection of previous freezing of cerebral tissue by computed tomography and magnetic resonance imaging. *Forensic Sci Med Pathol*, 14, 85-94.

Boutroy S., Bouxsein M. L., Munoz F., Delmas P. D. (2005). In Vivo Assessment of Trabecular Bone Microarchitecture by High-Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90, 6508-6515.

Boutroy S., Van Rietbergen B., Sornay-Rendu E., et al. (2008). Finite element analysis based on in vivo HR-pQCT images of the distal radius is associated with wrist fracture in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*, 23, 392-399.

Boyd S. K., Davison P., Muller R., Gasser J. A. (2006). Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by in vivo micro-computed tomography. *Bone*, 39, 854-862.

Brasileiro C. B., Chalub L., Abreu M., et al. (2017). Use of cone beam computed tomography in identifying postmenopausal women with osteoporosis. *Arch Osteoporos*, 12, 26.

Braun K., Bohnke F., Stark T. (2012). Three-dimensional representation of the human cochlea using micro-computed tomography data: presenting an anatomical model for further numerical calculations. *Acta Otolaryngol*, 132, 603-613.

Brouwers J. E., Lambers F. M., Gasser J. A., van Rietbergen B., Huiskes R. (2008). Bone degeneration and recovery after early and late bisphosphonate treatment of ovariectomized wistar rats assessed by in vivo micro-computed tomography. *Calcif Tissue Int*, 82, 202-211.

Bullen A., Taylor R. R., Kachar B., et al. (2014). Inner ear tissue preservation by rapid freezing: improving fixation by high-pressure freezing and hybrid methods. *Hear Res*, 315, 49-60.

Burrows M., Liu D., McKay H. (2010). High-resolution peripheral QCT imaging of bone micro-structure in adolescents. *Osteoporos Int*, 21, 515-520.

Burstein P., Bjorkholm P. J., Chase R. C., Seguin F. H. (1984). The largest and smallest X-ray computed tomography systems. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 221, 207-212.

Buytaert J. A., Salih W. H., Dierick M., Jacobs P., Dirckx J. J. (2011). Realistic 3D computer model of the gerbil middle ear, featuring accurate morphology of bone and soft tissue structures. *J Assoc Res Otolaryngol*, 12, 681-696.

Campbell G. M., Buie H. R., Boyd S. K. (2008). Signs of irreversible architectural changes occur early in the development of experimental osteoporosis as assessed by in vivo micro-CT. *Osteoporos Int*, 19, 1409-1419.

Casselmann J. W., Bensimon J.-L. (1997). Imaging of the inner ear. *Der Radiologe*, 37, 954-963.

Celikten B., Uzuntas C. F., Orhan A. I., et al. (2016). Evaluation of root canal sealer filling quality using a single-cone technique in oval shaped canals: An In vitro Micro-CT study. *Scanning*, 38, 133-140.

Chole R. A., Kodama K. (1989). Comparative histology of the tympanic membrane and its relationship to cholesteatoma. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 98, 761-766.

Christen P., Ito K., Ellouz R., et al. (2014). Bone remodelling in humans is load-driven but not lazy. *Nature Communications*, 5, 4855.

Cisneros J. C., Brito R., Martins G. S., et al. (2017). Evaluation of the microgrinding procedure for the microscopic analysis of temporal bones. *Cochlear Implants Int*, 18, 106-115.

Curthoys I. S., Markham C. H., Curthoys E. J. (1977). Semicircular duct and ampulla dimensions in cat, guinea pig and man. *J Morphol*, 151, 17-34.

Czerny C., Turetschek K., Duman M., Imhof H. (1997). CT and MRI of the middle ear. *Radiologe*, 37, 945-953.

Day J. S., Ding M., Bednarz P., et al. (2004). Bisphosphonate treatment affects trabecular bone apparent modulus through micro-architecture rather than matrix properties. *J Orthop Res*, 22, 465-471.

De Clerck N. M., Meurrens K., Weiler H., et al. (2004). High-resolution X-ray microtomography for the detection of lung tumors in living mice. *Neoplasia*, 6, 374-379.

De Graef B., Cnudde V., Dick J., et al. (2005). A sensitivity study for the visualisation of bacterial weathering of concrete and stone with computerised X-ray microtomography. *Sci Total Environ*, 341, 173-183.

De Jong J. J. A., Arts J. J. C., Willems P. C., et al. (2017). Contra-lateral bone loss at the distal radius in postmenopausal women after a distal radius fracture: A two-year follow-up HRpQCT study. *Bone*, 101, 245-251.

De Kock T., Boone M. A., De Schryver T., et al. (2015). A pore-scale study of fracture dynamics in rock using X-ray micro-CT under ambient freeze-thaw cycling. *Environ Sci Technol*, 49, 2867-2874.

Decraemer W. F., Dirckx J. J., Funnell W. R. (2003). Three-dimensional modelling of the middle-ear ossicular chain using a commercial high-resolution X-ray CT scanner. *J Assoc Res Otolaryngol*, 4, 250-263.

Dedrick D. K., Goulet R., Huston L., Goldstein S. A., Bole G. G. (1991). Early bone changes in experimental osteoarthritis using microscopic computed tomography. *The Journal of rheumatology. Supplement*, 27, 44-45.

Ding M., Odgaard A., Hvid I. (1999). Accuracy of cancellous bone volume fraction measured by micro-CT scanning. *J Biomech*, 32, 323-326.

Ding M., Odgaard A., Hvid I. (2003). Changes in the three-dimensional microstructure of human tibial cancellous bone in early osteoarthritis. *J Bone Joint Surg Br*, 85, 906-912.

Drees R. (2011). External, middle and inner ear. *Veterinary computed tomography*, 153-160.

Durand E. P., Ruegsegger P. (1991). Cancellous bone structure: analysis of high-resolution CT images with the run-length method. *J Comput Assist Tomogr*, 15, 133-139.

Ekdale E. G. (2013). Comparative Anatomy of the Bony Labyrinth (Inner Ear) of Placental Mammals. *PLOS ONE*, 8, e66624.

El-Mofty A., El-Serafy S. (1967). The Ossicular Chain in Mammals. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 76, 903-909.

EMO Systems GmbH, Berlin, 2017

<http://www.emosystems.de/engineering/micro-ct-und-reverse-engineering/>.

Engelke K., Karolczak M., Lutz A., et al. (1999). Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure. *Radiologe*, 39, 203-212.

Evans H. E., De Lahunta A. (2013). *Miller's Anatomy of the Dog*. 4. Auflage, Elsevier Health Sciences Verlag, St. Louis, Missouri.

Farrow C. (1992). Known case conference. *Vet Radiol Ultrasound*, 33, 262-263.

Feldkamp L. A., Davis L. C., Kress J. W. (1984). Practical cone-beam algorithm. *Journal of the Optical Society of America A*, 1, 612-619.

Feldkamp L. A., Davis L. C., Webb S. (1988). Comments with reply on tomographic reconstruction from experimentally obtained cone-beam projections'. *IEEE transactions on medical imaging*, 7, 73-74.

Feldkamp L. A., Goldstein S. A., Parfitt A. M., Jesion G., Kleerekoper M. (1989). The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 4, 3-11.

Fiedler I. A. K., Casanova M., Keplinger T., Busse B., Muller R. (2018). Effect of short-term formaldehyde fixation on Raman spectral parameters of bone quality. *J Biomed Opt*, 23, 1-6.

Figueroa S. D., Winkelmann C. T., Miller H. W., Volkert W. A., Hoffman T. J. (2008). TLD assessment of mouse dosimetry during microCT imaging. *Med Phys*, 35, 3866-3874.

Flottorp G. (1991). Treatment of noise induced hearing loss. *Scandinavian audiology. Supplementum*, 34, 123-130.

Folowosele F. O., Camp J. J., Brey R. H., Lane J. I., Robb R. A. 3D imaging and modeling of the middle and inner ear. *Proc. of SPIE Vol*, 2004.

Ford-Hutchinson A. F., Cooper D. M., Hallgrímsson B., Jirik F. R. (2003). Imaging skeletal pathology in mutant mice by microcomputed tomography. *J Rheumatol*, 30, 2659-2665.

Ford N. L., Thornton M. M., Holdsworth D. W. (2003). Fundamental image quality limits for microcomputed tomography in small animals. *Med Phys*, 30, 2869-2877.

Fox C. H., Johnson F. B., Whiting J., Roller P. P. (1985). Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem*, 33, 845-853.

Funnell W. R., Heng Siah T., McKee M. D., Daniel S. J., Decraemer W. F. (2005). On the coupling between the incus and the stapes in the cat. *J Assoc Res Otolaryngol*, 6, 9-18.

Gandolfi M. G., Parrilli A. P., Fini M., Prati C., Dummer P. M. (2013). 3D micro-CT analysis of the interface voids associated with Thermafil root fillings used with AH Plus or a flowable MTA sealer. *Int Endod J*, 46, 253-263.

Garcia-Sanz A., Rodriguez-Barbero A., Bentley M. D., Ritman E. L., Romero J. C. (1998). Three-dimensional microcomputed tomography of renal vasculature in rats. *Hypertension*, 31, 440-444.

- Garosi L. S., Dennis R., Schwarz T. (2003). Review of diagnostic imaging of ear diseases in the dog and cat. *Vet Radiol Ultrasound*, 44, 137-146.
- Getty R., Foust H., Presley E., Miller M. (1956). Macroscopic anatomy of the ear of the dog. *American journal of veterinary research*, 17, 364-375.
- Glueckert R., Johnson Chacko L., Schmidbauer D., et al. (2018). Visualization of the Membranous Labyrinth and Nerve Fiber Pathways in Human and Animal Inner Ears Using MicroCT Imaging. *Front Neurosci*, 12, 501.
- Gotthelf L. N. (2008). *Ohrerkrankungen der Kleintiere*. 1. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München.
- Goycoolea M. V., Carpenter A.-M., Muchow D. (1987). Ultrastructural studies of the round-window membrane of the cat. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 113, 617-624.
- Hammer N., Voigt C., Werner M., et al. (2014). Ethanol and formaldehyde fixation irreversibly alter bones' organic matrix. *J Mech Behav Biomed Mater*, 29, 252-258.
- Harvey R. G., Harari J., Delauche A. J. (2003). *Ohrkrankheiten bei Hund und Katze: Grundlagen - Diagnostik - Behandlung*. 1. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart.
- Heitmann A., (2018). *Charakterisierung der histologischen Morphologie des gesunden und des erkrankten felines Mittel- und Innenohres*. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Heitmann A., Parzefall B., Zollner M., et al. (2016). Hyperostotic tympanic bone spicules in domestic and wild animal species. *Vet Med (Praha)*, 187-194.
- Hemilä S., Nummela S., Reuter T. (1995). What middle ear parameters tell about impedance matching and high frequency hearing. *Hearing Research*, 85, 31-44.
- Holdsworth D. W., Thornton M. M. (2002). Micro-CT in small animal and specimen imaging. *Trends Biotechnol*, 20, 34-39.
- Hu J. H., Ding M., Soballe K., et al. (2002). Effects of short-term alendronate treatment on the three-dimensional microstructural, physical, and mechanical properties of dog trabecular bone. *Bone*, 31, 591-597.
- Huang G. T., Rosowski J. J., Flandermeyer D. T., Lynch III T. J., Peake W. T. (1997). The middle ear of a lion: comparison of structure and function to domestic cat. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 101, 1532-1549.
- Hudson L. C., Hamilton W. P. (2010). *Atlas of feline anatomy for veterinarians*. Teton NewMedia, Jackson.
- Ito M. (1998). Analysis of trabecular microstructure using micro-computed tomography. *Nihon Rinsho*, 56, 1484-1490.
- Jafari S. H., Saadatpour Z., Salmaninejad A., et al. (2018). Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers. *J Cell Physiol*, 233, 5200-5213.
- Jiang Y., Zhao J., White D. L., Genant H. K. (2000). Micro CT and Micro MR imaging of 3D architecture of animal skeleton. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 1, 45-51.

- Johnson K. A. (2007). Imaging techniques for small animal imaging models of pulmonary disease: micro-CT. *Toxicol Pathol*, 35, 59-64.
- Johnson R. H., Hu H., Haworth S. T., et al. (1998). Feldkamp and circle-and-line cone-beam reconstruction for 3D micro-CT of vascular networks. *Phys Med Biol*, 43, 929-940.
- Jorgensen S. M., Demirkaya O., Ritman E. L. (1998). Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT. *Am J Physiol*, 275, 03-14.
- Kalender W. (2006). Computertomographie - Grundlagen, Gerätetechnologie, Bildqualität, Anwendungen. 2. Auflage, Publicis Verlag, Erlangen, 14-64.
- Kalender W. (2006). Präklinische Bildgebung mit CT (Mikro-CT). *Computertomographie*. Kalender W., Publicis Corporate Publishing, Erlangen, 237-245.
- Kapadia R. D., Stroup G. B., Badger A. M., et al. (1998). Applications of micro-CT and MR microscopy to study pre-clinical models of osteoporosis and osteoarthritis. *Technol Health Care*, 6, 361-372.
- Kazakia G. J., Hyun B., Burghardt A. J., et al. (2008). In vivo determination of bone structure in postmenopausal women: a comparison of HR-pQCT and high-field MR imaging. *J Bone Miner Res*, 23, 463-474.
- Kazakia G. J., Tjong W., Nirody J. A., et al. (2014). The influence of disuse on bone microstructure and mechanics assessed by HR-pQCT. *Bone*, 63, 132-140.
- Keles A., Alcin H., Kamalak A., Versiani M. A. (2014). Micro-CT evaluation of root filling quality in oval-shaped canals. *Int Endod J*, 47, 1177-1184.
- Kennel S. J., Davis I. A., Branning J., et al. (2000). High resolution computed tomography and MRI for monitoring lung tumor growth in mice undergoing radioimmunotherapy: Correlation with histology. *Medical Physics*, 27, 1101-1107.
- King A. M., Weinrauch S. A., Doust R., et al. (2007). Comparison of ultrasonography, radiography and a single computed tomography slice for fluid identification within the feline tympanic bulla. *Vet J*, 173, 638-644.
- Kline T. L., Zamir M., Ritman E. L. (2011). Relating function to branching geometry: a micro-CT study of the hepatic artery, portal vein, and biliary tree. *Cells Tissues Organs*, 194, 431-442.
- Klop A. C., Vester M. E. M., Colman K. L., et al. (2017). The effect of repeated freeze-thaw cycles on human muscle tissue visualized by postmortem computed tomography (PMCT). *Clin Anat*, 30, 799-804.
- König H. E., Liebich H. G. (2015). *Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. 6. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart, pp. 595 - 609.
- Kraft W. R., Dürr U. M. (2003). *Katzenkrankheiten - Klinik und Therapie* Bd. 1. 5. Auflage, Schaper Verlag, Hannover.
- Kuhn J. L., Goldstein S. A., Feldkamp L. A., Goulet R. W., Jesion G. (1990). Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 8, 833-842.

Kujoory M. A., Hillman B. J., Barrett H. H. (1980). High-resolution computed tomography of the normal rat nephrogram. *Investigative radiology*, 15, 148-154.

Kurth A. A., Kim S. Z., Bauss F., Muller R., Hovy L. (2000). Anti-osteolytic therapy preserves trabecular structure and mechanical properties of bone in tumor osteolysis. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 138, 146-151.

Kurth A. A., Muller R. (2001). The effect of an osteolytic tumor on the three-dimensional trabecular bone morphology in an animal model. *Skeletal Radiol*, 30, 94-98.

Kuypers L. C., Decraemer W. F., Dirckx J. J., Timmermans J. P. (2005). Thickness distribution of fresh eardrums of cat obtained with confocal microscopy. *J Assoc Res Otolaryngol*, 6, 223-233.

Laib A., Barou O., Vico L., et al. (2000). 3D micro-computed tomography of trabecular and cortical bone architecture with application to a rat model of immobilisation osteoporosis. *Med Biol Eng Comput*, 38, 326-332.

Lander S. L., Brits D., Hosie M. (2014). The effects of freezing, boiling and degreasing on the microstructure of bone. *Homo*, 65, 131-142.

Layton M. W., Goldstein S. A., Goulet R. W., et al. (1988). Examination of subchondral bone architecture in experimental osteoarthritis by microscopic computed axial tomography. *Arthritis and Rheumatism*, 31, 1400-1405.

Lee C. F., Li G. J., Wan S. Y., et al. (2010). Registration of micro-computed tomography and histological images of the guinea pig cochlea to construct an ear model using an iterative closest point algorithm. *Ann Biomed Eng*, 38, 1719-1727.

Lee D. H., Chan S., Salisbury C., et al. (2010). Reconstruction and exploration of virtual middle-ear models derived from micro-CT datasets. *Hear Res*, 263, 198-203.

Lee J. Y., Shin K. J., Kim J. N., et al. (2013). A morphometric study of the semicircular canals using micro-CT images in three-dimensional reconstruction. *Anat Rec (Hoboken)*, 296, 834-839.

Lee W., Jasiuk I. (2014). Effects of freeze-thaw and micro-computed tomography irradiation on structure-property relations of porcine trabecular bone. *J Biomech*, 47, 1495-1498.

Liu X. M., Wiswall A. T., Rutledge J. E., et al. (2008). Osteotropic beta-cyclodextrin for local bone regeneration. *Biomaterials*, 29, 1686-1692.

Love N. E., Kramer R. W., Spodnick G. J., Thrall D. E. (1995). Radiographic and computed tomographic evaluation of otitis media in the dog. *Vet Radiol Ultrasound*, 36, 375-379.

McElderry J. D., Kole M. R., Morris M. D. (2011). Repeated freeze-thawing of bone tissue affects Raman bone quality measurements. *J Biomed Opt*, 16, 071407.

Micro Photonics Incorporation, Allentown, PA, 2017

<https://www.microphotonics.com/products/micro-ct/skyscan-2211-multi-scale-x-ray-nano-ct/>

<https://www.microphotonics.com/products/micro-ct/skyscan-1272-high-resolution-micro-ct/>

<https://www.microphotonics.com/assets/base/images/prod/skyscan/SkyScanmicroCTsupportproductsDistributorsPLSno-price.pdf>

<https://www.bruker.com/products/microtomography/in-vivo-micro/skyscan-1276/overview.html>.

- Miriszlai E., Benedeczky I., Csapo S., Bodanszky H. (1978). The ultrastructure of the round window membrane of the cat. *ORL*, 40, 111-119.
- Morgan E. F., Mason Z. D., Chien K. B., et al. (2009). Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone*, 44, 335-344.
- Morita K., Doi K., Oue H., et al. (2013). Influence of formalin fixation on the implant stability quotient and mechanical characteristics of bone. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 51, 550-554.
- Muller R., Ruegsegger P. (1997). Micro-tomographic imaging for the nondestructive evaluation of trabecular bone architecture. *Stud Health Technol Inform*, 40, 61-79.
- Muller R., Van Campenhout H., Van Damme B., et al. (1998). Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone*, 23, 59-66.
- Mys K., Stockmans F., Vereecke E., van Lenthe G. H. (2018). Quantification of bone microstructure in the wrist using cone-beam computed tomography. *Bone*, 114, 206-214.
- Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (2004). *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band IV: Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen*. 4. Auflage, Parey Verlag, Berlin, 444 - 473.
- Norman D., Metcalfe A. J., Barlow T., et al. (2017). Cortical Bony Thickening of the Lateral Intercondylar Wall: The Functional Attachment of the Anterior Cruciate Ligament. *Am J Sports Med*, 45, 394-402.
- Novalés M., Ginel P. J., Diz A., et al. (2015). Mucoperiosteal exostoses in the tympanic bulla of African lions (*Panthera leo*). *Vet Pathol*, 52, 377-383.
- Nummela S. (1995). Scaling of the mammalian middle ear. *Hearing Research*, 85, 18-30.
- O'Neill K. R., Stutz C. M., Mignemi N. A., et al. (2012). Micro-computed tomography assessment of the progression of fracture healing in mice. *Bone*, 50, 1357-1367.
- Oei L., Koromani F., Rivadeneira F., Zillikens M. C., Oei E. H. (2016). Quantitative imaging methods in osteoporosis. *Quant Imaging Med Surg*, 6, 680-698.
- Oliveira C. R., O'Brien R. T., Matheson J. S., Carrera I. (2012). Computed tomographic features of feline nasopharyngeal polyps. *Vet Radiol Ultrasound*, 53, 406-411.
- Op Den Buijs J., Bajzer Z., Ritman E. L. (2006). Branching morphology of the rat hepatic portal vein tree: a micro-CT study. *Ann Biomed Eng*, 34, 1420-1428.
- Ortiz J. L., Ortiz A., Milara J., et al. (2016). Evaluation of Mucociliary Clearance by Three Dimension Micro-CT-SPECT in Guinea Pig: Role of Bitter Taste Agonists. *PLoS One*, 11.
- Ozan F., Pekedis M., Koyuncu S., et al. (2017). Micro-computed tomography and mechanical evaluation of trabecular bone structure in osteopenic and osteoporotic fractures. *J Orthop Surg (Hong Kong)*, 25.

Parzefall B., Rieger A., Volk H. A., et al. (2015). Prevalence and characterization of small tympanic bone spicules and drumstick-like hyperostotic tympanic bone spicules in the middle ear cavity of dogs. *Vet Radiol Ultrasound*, 56, 25-32.

Paulus M. J., Gleason S. S., Easterly M. E., Foltz C. J. (2001). A review of high-resolution X-ray computed tomography and other imaging modalities for small animal research. *Lab Anim (NY)*, 30, 36-45.

Paulus M. J., Gleason S. S., Kennel S. J., Hunsicker P. R., Johnson D. K. (2000). High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research. *Neoplasia*, 2, 62-70.

Postnov A., Zarowski A., De Clerck N., et al. (2006). High resolution micro-CT scanning as an innovative tool for evaluation of the surgical positioning of cochlear implant electrodes. *Acta Otolaryngol*, 126, 467-474.

Poznyakovskiy A. A., Zahnert T., Kalaidzidis Y., et al. (2008). The creation of geometric three-dimensional models of the inner ear based on micro computer tomography data. *Hear Res*, 243, 95-104.

Ritman E. L. (2004). Micro-computed tomography-current status and developments. *Annu Rev Biomed Eng*, 6, 185-208.

Ritman E. L. (2011). Current status of developments and applications of micro-CT. *Annu Rev Biomed Eng*, 13, 531-552.

Rohani S. A., Ghomashchi S., Umoh J., et al. (2016). Iodine potassium iodide improves the contrast-to-noise ratio of micro-computed tomography images of the human middle ear. *J Microsc*, 264, 334-338.

Rohleder J. J., Jones J. C., Duncan R. B., et al. (2006). Comparative performance of radiography and computed tomography in the diagnosis of middle ear disease in 31 dogs. *Vet Radiol Ultrasound*, 47, 45-52.

Rose W. R. (1978). Small animal clinical otology. The eustachian tube--1: General considerations. *Veterinary medicine, small animal clinician : VM, SAC*, 73, 882-887.

Rüeggsegger P., Koller B., Müller R. (1996). A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcified Tissue International*, 58, 24-29.

Salomon F.-V., Geyer H., Gille U. (2015). *Anatomie für die Tiermedizin*. 3. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart.

Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz, 2017

www.scanco.ch

<http://www.scanco.ch/en/systems-solutions/specimen/microct50.html>

http://www.scanco.ch/fileadmin/webmaster_img/Applications/AN-sandstone_ed.pdf

http://www.scanco.ch/fileadmin/webmaster_img/Applications/AN-PolyesterTissue-newlayout.pdf

http://www.scanco.ch/fileadmin/webmaster_img/Applications/AN_mummy.pdf

http://www.scanco.ch/fileadmin/webmaster_img/Applications/Scanco_poster_LF_Food_red.pdf.

Schuknecht H. (1993). *Pathology of the inner ear*. 2nd edition, Lea & Febiger, Philadelphia.

Schultz E., Felix R. (1980). Fan-beam computerized tomography systems with rotating and with stationary detector arrays ('third' and 'fourth' generation). *Med Prog Technol*, 7, 169-181.

- Seidel A., Bergauer B., Lell M., et al. (2018). Does formalin fixation influence MSCT/CBCT accuracy? *Surg Radiol Anat*, 40, 31-37.
- Seifert H., Röher U., Staszyc C., et al. (2012). Optimising μ CT Imaging of the Middle and Inner Cat Ear. *Anat Histol Embryol*, 41, 113-121.
- Seitz S. E., Losonsky J. M., Marretta S. M. (1996). Computed tomographic appearance of inflammatory polyps in three cats. *Vet Radiol Ultrasound*, 37, 99-104.
- Shanaman M., Seiler G., Holt D. E. (2012). Prevalence of clinical and subclinical middle ear disease in cats undergoing computed tomographic scans of the head. *Vet Radiol Ultrasound*, 53, 76-79.
- Shepherd R. K., Colreavy M. P. (2004). Surface microstructure of the perilymphatic space: Implications for cochlear implants and cell- or drug-based therapies. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 130, 518-523.
- Slepecky N. B., Hozza M. J., Cefaratti L. (1990). Intracellular distribution of actin in cells of the organ of Corti: a structural basis for cell shape and motility. *J Electron Microscop Tech*, 15, 280-292.
- Slepecky N. B., Ligotti P. J. (1992). Characterization of inner ear sensory hair cells after rapid-freezing and freeze-substitution. *J Neurocytol*, 21, 374-381.
- Steinitz W. (1906). Beiträge zur Anatomie des musculus stapedius. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 70, 45-50.
- Steppe K., Cnudde V., Girard C., et al. (2004). Use of X-ray computed microtomography for non-invasive determination of wood anatomical characteristics. *J Struct Biol*, 148, 11-21.
- Stock S. R. (2008). Recent advances in X-ray microtomography applied to materials. *International Materials Reviews*, 53, 129-181.
- Strain G. M. (1991). Congenital deafness in dogs and cats. *Compend Contin Educ Pract Vet*, 13, 245.
- Strain G. M. (1996). Aetiology, prevalence and diagnosis of deafness in dogs and cats. *Br Vet J*, 152, 17-36.
- Sugiyama T., Meakin L. B., Browne W. J., et al. (2012). Bones' adaptive response to mechanical loading is essentially linear between the low strains associated with disuse and the high strains associated with the lamellar/woven bone transition. *J Bone Miner Res*, 27, 1784-1793.
- Sun C. C., Jiang Z. D., Zhang K. (2013). Micro-CT imaging research of acoustic capsule in mice. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 48, 673-676.
- Suomalainen A. K., Salo A., Robinson S., Peltola J. S. (2007). The 3DX multi image micro-CT device in clinical dental practice. *Dentomaxillofac Radiol*, 36, 80-85.
- Tate J. R., Cann C. E. (1982). High-resolution computed tomography for the comparative study of fossil and extant bone. *American journal of physical anthropology*, 58, 67-73.
- Torimitsu S., Nishida Y., Takano T., et al. (2014). Effects of the freezing and thawing process on biomechanical properties of the human skull. *Leg Med (Tokyo)*, 16, 102-105.

- Umstattd L. A., Mills J. C., Critchlow W. A., Renner G. J., Zitsch R. P. (2017). Shrinkage in oral squamous cell carcinoma: An analysis of tumor and margin measurements in vivo, post-resection, and post-formalin fixation. *American Journal of Otolaryngology*, 38, 660-662.
- Uzun H., Curthoys I. S., Jones A. S. (2007). A new approach to visualizing the membranous structures of the inner ear - high resolution X-ray micro-tomography. *Acta Otolaryngol*, 127, 568-573.
- van Kaick G., Delorme S. (2005). Computed tomography in various fields outside medicine. *Eur Radiol*, 15 Suppl 4, 74-81.
- Vasquez S. X., Shah N., Hoberman A. M. (2013). Small animal imaging and examination by micro-CT. *Methods Mol Biol*, 947, 223-231.
- Vilayphiou N., Boutroy S., Sornay-rendu E., et al. (2010). Finite element analysis performed on radius and tibia HR-pQCT images and fragility fractures at all sites in postmenopausal women. *Bone*, 46, 1030-1037.
- Vogel U. (1999). New approach for 3D imaging and geometry modeling of the human inner ear. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 61, 259-267.
- Von Schulthess G. K. (2017). *Röntgen, Computertomografie & Co. - Wie funktioniert medizinische Bildgebung? ; 1. Auflage*, Springer Verlag, Zürich, pp. 65-69.
- Wachsmuth L., Engelke K. (2004). High-resolution imaging of osteoarthritis using microcomputed tomography. *Methods Mol Med*, 101, 231-248.
- Wang G., Zhao S., Yu H., et al. (2005). Design, analysis and simulation for development of the first clinical micro-CT scanner. *Acad Radiol*, 12, 511-525.
- Wang X., Masse D. B., Leng H., et al. (2007). Detection of trabecular bone microdamage by micro-computed tomography. *J Biomech*, 40, 3397-3403.
- Wicke W., Firbas W. (1974). Experimental investigation of the perilymphatic communication routes in the cat (author's transl). *Archives of oto-rhino-laryngology*, 208, 267-276.
- Wysocki J. (2001). Dimensions of the vestibular and tympanic scalae of the cochlea in selected mammals. *Hear Res*, 161, 1-9.
- Wysocki J. (2006). Topographical anatomy of the cat's temporal bone. *Medycyna Weterynaryjna*, 62, 432-436.
- Yang M., Yang Y., Wang C. (2011). A new 3D information acquisition method of micro-drilling marks on ancient perforated stone bead through micro-CT. *J Xray Sci Technol*, 19, 333-343.
- Zhang G. J., Yang J., Guan F. J., et al. (2016). Quantifying the Effects of Formalin Fixation on the Mechanical Properties of Cortical Bone Using Beam Theory and Optimization Methodology With Specimen-Specific Finite Element Models. *J Biomech Eng*, 138.
- Zhang M., Xia X., Liu Q., Chen Q., Kong B. (2019). Changes in microstructure, quality and water distribution of porcine longissimus muscles subjected to ultrasound-assisted immersion freezing during frozen storage. *Meat Science*, 151, 24-32.

Ziemer L. S., Schwarz T., Sullivan M. (2003). Otolithiasis in three dogs. *Vet Radiol Ultrasound*, 44, 28-31.

Zou J., Lahelma J., Koivisto J., et al. (2015). Imaging cochlear implantation with round window insertion in human temporal bones and cochlear morphological variation using high-resolution cone beam CT. *Acta Otolaryngol*, 135, 466-472.

8 DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg dafür bedanken, dass ich die Promotion am Lehrstuhl für Chirurgie der Kleintiere der veterinärmedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München unter ihrer Betreuung schreiben durfte.

Des Weiteren gilt ein großer Dank meinem direkten Betreuer Dr. Tim Kilchling. Du hast meine Fragen beantwortet, mit ausgewertet und mich stets bestens unterstützt, danke dafür!

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Andreas Brühschwein, für die Unterstützung bei der Auswertung der CT- und μ CT-Scans.

Mein Dank geht auch an Herrn Dr. Sven Reese für die Aufstellung der Statistik.

Die Arbeiten im Labor, die Bedienung des μ CT, der Schleif- und Poliergeräte sowie vieler weiterer Gerätschaften bereitete mir zu Beginn Schwierigkeiten. Ohne die Hilfe von Lisa Wurm und Bea Limmer wäre mir alles deutlich schwerer gefallen. Von ganzem Herzen vielen Dank an Euch beide!

Ein großes Dankeschön an das gesamte Team der Radiologie für die Unterstützung bei der Durchführung der CT-Untersuchungen. Insbesondere sind hier Dr. Andreas Brühschwein, Dr. Martin Zöllner und Thomas Bauer zu nennen.

Eine gute Doktorarbeit bzw. Forschung ist nur möglich, wenn man auch die nötige Probenzahl zur Verfügung gestellt bekommt. Daher liegt es mir ganz besonders am Herzen, allen Kollegen zu danken, die mir Katzen zur Verfügung gestellt haben. Namentlich sind u.a. folgende Kollegen zu nennen: Dr. Christian Krolopp, Dr. Brigitte Ballauf und Dr. Max Hildenbrand.

Vielen Dank an alle meine Freunde! Ihr habt immer an mich geglaubt und standet sowohl in guten als auch in schwierigen Phasen hinter mir und habt mich unterstützt.

Meine Brüder Felix und Philipp konnte ich zu jeder Zeit um Rat fragen und mich auf ihre Hilfe verlassen. Danke Euch!

Abschließend liegt es mir besonders am Herzen, ein riesengroßes Dankeschön an meine Mutter auszusprechen. Ohne Deine wertvollen Tipps, aufbauenden Worte und unterstützenden Taten wäre mir die Doktorarbeit deutlich schwerer gefallen. Du warst immer für mich da. Danke Mama!