

Microvascular Imaging with Super-Resolution Ultrasound

Mikrovaskuläre Bildgebung mittels Superresolution-Ultraschall



Sofie Bech Andersen



Charlotte Mehlin Sørensen



Jørgen Arendt Jensen



Michael Bachmann Nielsen

Correspondence

Dr. Sofie Bech Andersen

Department of Diagnostic Radiology, University Hospital
Rigshospitalet, 2100 Copenhagen, Denmark
posttilsofiebeck@gmail.com

Bibliography

Ultraschall in Med 2022; 43: 543–547

DOI 10.1055/a-1937-6868

ISSN 0172-4614

© 2022. Thieme. All rights reserved.

Georg Thieme Verlag KG, Rüdigerstraße 14,
70469 Stuttgart, Germany

Super-resolution ultrasound imaging (SRUS) is a branch of ultrasound techniques aiming to image and quantify the vasculature beyond the diffraction limit [1]. Going beyond the diffraction limit of conventional ultrasound entails the possibility of imaging the microvasculature, namely arterioles, venules, and maybe even the smallest vessels in the body: the capillaries. In one of the main SRUS techniques, also called ultrasound localization microscopy, isolated microbubbles from ultrasound contrast agents are used to acquire data for SRUS image formation. Super-resolution ultrasound imaging using isolated microbubbles was inspired by one of the Nobel prize-winning approaches for super-resolution microscopy [2]. In one of these approaches, the ability to turn the fluorescence of single molecules on and off was used. By capturing numerous images of the same object, each image with a different group of molecules fluorescently turned on and superposing the resultant image stack, a super-resolved microscopy image, i. e., an image showing structures below the diffraction limit of light, could be created. Likewise, the SRUS images are created by superposing thousands of successive ultrasound images of isolated microbubbles as they move through the vasculature. More specifically, the SRUS images are created using a series of post-processing steps. After scanning the organ or tissue of interest, the sparsely distributed intravascular microbubbles must be detected. Detection can be done with, e. g., contrast-enhancing sequences, such as pulse inversion or amplitude modulation, or with singular value decomposition (SVD) techniques [3]. Next, the single microbubbles are isolated and localized [4]. The precision of this localization is a critical step in obtaining super-resolu-

tion [5]. Instead of merely superposing each of the microbubble localizations, as done in super-resolution microscopy, the movements of the microbubbles as they follow the bloodstream between frames are used to create trajectories that can reveal microbubble velocity and direction [6–10]. Lastly, another essential difference between super-resolved microscopy and ultrasound is motion. In order to localize the microbubbles precisely, it is necessary to compensate for the motion that stems from, e. g., breathing and heart beating during scanning [11, 12].

The resulting trajectory-based images, created from localizing and tracking the isolated microbubbles, are used to reveal physiological or pathological changes in the vasculature. The majority of studies that have been published are preclinical studies, many of which have investigated technical feasibilities and developments. As microvascular disease can occur anywhere in the body, SRUS has been applied to various anatomical structures, from the eyes to the heart to the prostate [13–15]. However, the largest areas of interest have been the vasculature of the brain, the kidneys, and malignant tumors. In the brain, SRUS has been used to evaluate age-related vascular alterations, which revealed that microbubble velocities were slower and vessels more tortuous in old mouse brains compared with younger ones [16]. It has also been used to measure cerebral arterial pulsatility in mice to improve our understanding of the effects of increased pulse pressure on the brain's microvasculature [17]. As a last example, SRUS has been acquired through an intact human skull at the temporal acoustic window [18], demonstrating cerebrovascular hemodynamics, including turbulent flow in an aneurism and chaotic flow

in collateral arteries in a person with Moya Moya-like disease. As for the kidneys, a number of studies have demonstrated renal vascular changes related to disease. For example, unlike sham-operated mice, mice with unilateral ischemia-reperfusion-induced chronic kidney disease had decreased vascular density and increased tortuosity in the renal cortex [19]. In another study, a vasodilator-induced decrease in microbubble velocity was found in the cortex and the deeper-lying medulla of rat kidneys [20], and lastly, increased microbubble velocity was found in the cortical radial arteries of hypertensive rats [21]. The cortical vessels of a human kidney have also been visualized with SRUS [22]. In that study, the various human organs and lesions were imaged, including the liver in a healthy state and during liver failure, a pancreatic tumor, and a breast tumor. As for cancer, a higher number of studies have investigated the vasculature of tumors, including using different vascular parameters to distinguish malignant tumors with different vascular phenotypes from each other [23] or to distinguish tumor vessels from healthy ones [24]. Additionally, the effect of treatment on the tumor vessels has been investigated as an early marker for treatment response [25]. Besides primary tumor vasculature, a recently published study investigated whether lymph nodes with metastasis could be distinguished from reactive ones using SRUS in humans [26]. The study showed that metastatic lymph nodes had a more irregular blood flow, measured as the variance in flow direction in a given area, compared with the reactive lymph nodes.

The studies mentioned above comprise only a small selection of the many studies that have been published with SRUS since the first journal papers with *in vivo* studies were published in 2015 [6, 7]. The technique is promising, but there are some major challenges to solve before SRUS can be implemented clinically [27]. Firstly, time is an important issue. In order to acquire a sufficient number of image frames that allow us to localize enough microbubbles to get a reliable and sufficient representation of the vasculature, each scan session will inevitably last from several seconds to minutes, depending on the area of interest, equipment, and scan technique [28]. Time is a challenge because the microscopic vascular structures move during the long acquisitions, especially in larger animals and humans. Several groups have been and are still working on ways to make scan time faster, including imaging overlying microbubbles [8], scanning without contrast agents [29], or using deep learning [30]. Basing vascular evaluations on microbubble trajectories is also uncertain, as the number of microbubbles can vary substantially between scans, naturally affecting the estimated parameters such as vessel density [31]. Another big hurdle is imaging detailed and complex vascular structures in 2D. Not only is out-of-plane motion a challenge as it cannot be compensated for, but all the vessels that naturally wind and twine in the elevational direction of the ultrasound beam should be considered in the acquisition and interpretation of SRUS [32]. The out-of-plane-vessels are projected into 2D in the SRUS images, which may result in underestimated velocities and incorrect estimations of vascular parameters such as tortuosity. Introduction of 3D SRUS may alleviate some of these challenges [33, 34]. Lastly, SRUS allows imaging of very small blood vessels but not necessary at the capillary level nor even at the arteriolar/venular level, depending for example on the vascular

density and complexity. Therefore, defining the level of the vasculature that is possible to image and how to improve it is another important challenge.

Conclusively, with continuous improvements in scanning equipment and optimized processing algorithms, the next natural question is where and how SRUS will have a clinical impact. Research-wise, there are many unanswered questions to pursue. However, in the clinic, it will be interesting to see where SRUS can make a difference: In the person with diabetes whose renal vasculature is starting to get affected by the disease and early treatment initiation is critical, or in the crucial early evaluation of advanced cancer treatment effect as an add-on to the normally used RESIST criteria?

Mikrovaskuläre Bildgebung mittels Superresolution-Ultraschall

Der Superresolution-Ultraschall (SRUS) ist eine spezielle sonografische Technik, die darauf abzielt, das Gefäßsystem über die Beugungsgrenze hinaus abzubilden und zu quantifizieren [1]. Das Überschreiten der Beugungsgrenze des konventionellen Ultraschalls bietet die Möglichkeit, die Mikrovaskulatur abzubilden, d. h. Arteriolen, Venolen und vielleicht sogar die aller kleinsten Gefäße des Körpers: die Kapillaren. Bei einer der wichtigsten SRUS-Techniken, der Ultraschall-Lokalisierungsmikroskopie, werden isolierte Mikrobläschen aus Ultraschallkontrastmitteln verwendet, um Daten für die SRUS-Bilderzeugung zu gewinnen. Die Superresolution-Ultraschall-Bildgebung mit isolierten Mikrobläschen wurde durch Ansätze aus der supraauflösenden Mikroskopie inspiriert, die mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde [2].

Bei einem dieser Ansätze wurde die Fähigkeit genutzt, die Fluoreszenz einzelner Moleküle an- und auszuschalten. Durch die Aufnahme zahlreicher Bilder desselben Objekts, wobei in jedem Bild eine andere Gruppe von Molekülen fluoreszierend eingeschaltet wurde, und durch die Überlagerung des resultierenden Bildstapels konnte ein supraauflöstes Mikroskopie-Bild erstellt werden, d. h. ein Bild, das Strukturen unterhalb der Beugungsgrenze des Lichts zeigt. Ebenso werden die SRUS-Bilder erzeugt, indem man Tausende aufeinanderfolgende Ultraschallbilder von isolierten Mikrobläschen überlagert, während sich diese durch das Gefäßsystem bewegen. Genau genommen werden die SRUS-Bilder in einer Reihe von Nachbearbeitungsschritten erzeugt. Nach dem Scannen des zu untersuchenden Organs oder Gewebes müssen die spärlich verteilten intravaskulären Mikrobläschen erkannt werden. Die Detektion kann z. B. mit kontrastverstärkenden Sequenzen wie der Puls-Inversion oder der Amplitudenmodulation oder mit Singular-Value-Decomposition-(SVD)-Techniken erfolgen [3]. Anschließend werden die einzelnen Mikrobläschen isoliert und lokalisiert [4]. Die Präzision dieser Lokalisierung ist ein entscheidender Schritt zur Erzielung der Superresolution [5]. Anstatt wie bei der Superresolution-Mikroskopie jede einzelne Lokalisierung der Mikrobläschen zu überlagern, werden die Bewegungen der Mikrobläschen, während sie zwischen den Bildern dem Blutstrom folgen, verwendet, um Trajektorien zu erstellen, die die Geschwindigkeit und Richtung der Mikrobläschen aufzeigen können

[6–10]. Schließlich ist die Bewegung ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen der Superresolution-Mikroskopie und dem -Ultraschall. Um die Mikrobläschen genau zu lokalisieren, ist es notwendig, die Bewegung zu kompensieren, die z. B. durch die Atmung und den Herzschlag während der Untersuchung entsteht [11, 12].

Die resultierenden, auf den Trajektorien basierten Bilder, die durch die Lokalisierung und das Tracking der isolierten Mikrobläschen entstehen, werden verwendet, um physiologische oder pathologische Veränderungen im Gefäßsystem aufzuzeigen. Bei der Mehrzahl der veröffentlichten Arbeiten handelt es sich um präklinische Studien, von denen viele die technische Durchführbarkeit sowie Weiterentwicklungen untersucht haben. Da mikrovaskuläre Erkrankungen überall im Körper auftreten können, wurde SRUS an verschiedenen anatomischen Strukturen angewandt – von den Augen über das Herz bis zur Prostata [13–15]. Das größte Interesse galt jedoch dem Gefäßsystem des Gehirns, der Nieren und malignen Tumoren. Im Gehirn wurde SRUS zur Bewertung altersbedingter Gefäßveränderungen eingesetzt, wobei sich zeigte, dass die Geschwindigkeiten der Mikrobläschen in alten Mäusegehirnen langsamer ist und die Gefäße gewundener waren als in jüngeren [16]. SRUS wurde auch zur Messung der zerebralen arteriellen Pulsatilität bei Mäusen eingesetzt, um die Auswirkungen eines erhöhten Pulsdrucks auf die Mikrogefäße des Gehirns besser zu verstehen [17]. Schließlich wurde SRUS zum Beispiel durch einen intakten menschlichen Schädel am temporalen akustischen Fenster [18] aufgenommen, um die zerebrovaskuläre Hämodynamik zu demonstrieren, unter anderem den turbulenten Fluss in einem Aneurysma und den chaotischen Fluss in den kollateralen Arterien bei einer Person mit Moyamoya-ähnlicher Erkrankung. Was die Nieren betrifft, so wurden in einer Reihe von Studien krankheitsbedingte Veränderungen der Nierengefäße nachgewiesen. So wiesen Mäuse mit einseitiger, durch Ischämie-Reperfusion induzierter, chronischer Nierenerkrankung im Gegensatz zu scheinoperierten Mäusen eine verringerte Gefäßdichte und erhöhte Tortuosität in der Nierenrinde auf [19]. In einer anderen Studie wurde eine durch Vasodilatoren induzierte Abnahme der Geschwindigkeit von Mikrobläschen im Cortex und im tiefer liegenden Mark von Rattennieren festgestellt [20]. Schließlich wurde eine erhöhte Geschwindigkeit von Mikrobläschen in der kortikalen A. radialis hypertensiver Ratten gefunden [21]. Die kortikalen Gefäße einer menschlichen Niere wurden ebenfalls mit SRUS visualisiert [22]. In dieser Studie wurden verschiedene menschliche Organe und Läsionen abgebildet, darunter die Leber im gesunden Zustand und bei Leberversagen, ein Pankreaskarzinom und ein Brusttumor. Im Hinblick auf Krebserkrankungen wurde das Gefäßsystem von Tumoren in einer größeren Zahl von Studien untersucht. Dabei wurden verschiedene Gefäßparameter verwendet, um maligne Tumore mit unterschiedlichen vaskulären Phänotypen voneinander zu unterscheiden [23] oder um Tumorgefäße von gesunden Gefäßen zu unterscheiden [24]. Darüber hinaus wurde die Auswirkung der Behandlung auf die Tumorgefäße als früher Marker für das Therapieansprechen untersucht [25]. Neben dem primären Tumorgefäßsystem wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie untersucht, ob beim Menschen mittels SRUS metastatische von reaktiven Lymphknoten unterschieden werden

können [26]. Die Studie zeigte, dass metastatische Lymphknoten im Vergleich zu reaktiven Lymphknoten einen unregelmäßigeren Blutfluss aufweisen – gemessen als Varianz der Flussrichtung in einem bestimmten Bereich.

Die oben genannten Studien sind nur eine kleine Auswahl der vielen Artikel, die über SRUS veröffentlicht wurden, seit 2015 die ersten Arbeiten mit In-vivo-Studien in den Fachzeitschriften erschienen sind [6, 7]. Die Technik ist vielversprechend, aber es gibt noch einige große Herausforderungen zu lösen, bevor SRUS klinisch eingesetzt werden kann [27]. Erstens ist der Zeitfaktor ein wichtiger Aspekt. Um eine ausreichende Anzahl an Bildern zu erfassen, die es uns für eine zuverlässige und ausreichende Darstellung des Gefäßsystems ermöglicht, genügend Mikrobläschen zu lokalisieren, dauert jede Aufnahme zwangsläufig mehrere Sekunden bis Minuten, je nach Interessengebiet, Ausrüstung und Aufnahme-Technik [28]. Die Zeitdauer ist eine Herausforderung, weil sich die mikroskopischen Gefäßstrukturen während der langen Aufnahmen bewegen, insbesondere bei größeren Tieren und Menschen. Nach wie vor arbeiten mehrere Gruppen an Möglichkeiten, die Aufnahmezeit zu verkürzen, z. B. durch Abbildung sich überlagernder Mikrobläschen [8], durch Scannen ohne Kontrastmittel [29] oder durch die Verwendung von Deep Learning [30]. Die Bewertung von Gefäßen anhand der Trajektorien der Mikrobläschen ist ebenfalls unsicher, da die Anzahl der Mikrobläschen von Scan zu Scan stark variieren kann, was sich natürlich auf die geschätzten Parameter wie die Gefäßdichte auswirkt [31]. Eine weitere große Schwierigkeit ist die Abbildung detaillierter und komplexer Gefäßstrukturen in 2 D. Nicht nur die Out-of-Plane-Bewegung ist eine Herausforderung, da sie nicht kompensiert werden kann, sondern auch alle Gefäße, die sich natürlicherweise in der Elevationsrichtung des Ultraschallstrahls winden und schlängeln, sollten bei der Erfassung und Interpretation des SRUS berücksichtigt werden [32]. Die nicht in der Ebene liegenden Gefäße werden in den SRUS-Bildern in 2 D projiziert, was zu unterschätzten Geschwindigkeiten und falschen Schätzungen von Gefäßparametern wie der Tortuosität führen kann. Die Einführung von 3D-SRUS kann einige dieser Probleme lösen [33, 34]. Schließlich ermöglicht SRUS die Darstellung sehr kleiner Blutgefäße, aber nicht unbedingt auf Kapillar- oder sogar auf Ebene der Arteriolen/Venolen, was zum Beispiel von der Gefäßdichte und -komplexität abhängt. Daher ist es eine weitere wichtige Aufgabe zu definieren, welche Ebene des Gefäßsystems abgebildet werden kann und sich zu fragen, wie dies verbessert werden kann.

Angesichts der kontinuierlichen Verbesserungen bei der Geräteausrüstung und den optimierten Verarbeitungsalgorithmen stellt sich natürlich die Frage, wo und wie SRUS Auswirkungen auf die klinische Praxis haben wird. In der Forschung gibt es noch viele unbeantwortete Fragen zu klären. In der klinischen Anwendung wird es jedoch interessant sein zu sehen, wo SRUS etwas bewirken kann: Bei Diabetikern, deren Nierengefäße durch die Krankheit beeinträchtigt werden und bei denen ein frühzeitiger Behandlungsbeginn von entscheidender Bedeutung ist, oder bei der entscheidenden frühzeitigen Bewertung des Behandlungserfolgs bei fortgeschrittener Krebserkrankung, als Ergänzung zu den üblicherweise verwendeten RESIST-Kriterien?

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] Christensen-Jeffries K, Couture O, Dayton PA et al. Super-resolution Ultrasound Imaging. *Ultrasound Med. Biol.* 2020; 46: 865–891. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2019.11.013
- [2] Möckl L, Lamb DC, Bräuchle C. Super-resolved Fluorescence Microscopy: Nobel Prize in Chemistry 2014 for Eric Betzig, Stefan Hell, and William E. Moerner. *Angew. Chemie Int. Ed.* 2014; 53: 13972–13977. doi:10.1002/anie.201410265
- [3] Brown J, Christensen-Jeffries K, Harput S et al. Investigation of Microbubble Detection Methods for Super-Resolution Imaging of Microvasculature. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 2019; 66: 676–691. doi:10.1109/TUFFC.2019.2894755
- [4] Heiles B, Chavignon A, Hingot V et al. Performance benchmarking of microbubble-localization algorithms for ultrasound localization microscopy. *Nat. Biomed. Eng.* 2022; 6: 605–616. doi:10.1038/s41551-021-00824-8
- [5] Hingot V, Chavignon A, Heiles B et al. Measuring Image Resolution in Ultrasound Localization Microscopy. *IEEE Trans. Med. Imaging* 2021; 40: 3812–3819. doi:10.1109/TMI.2021.3097150
- [6] Errico C, Pierre J, Pezet S et al. Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature* 2015; 527: 499–502. doi:10.1038/nature16066
- [7] Christensen-Jeffries K, Browning RJ, Tang MX et al. In Vivo Acoustic Super-Resolution and Super-Resolved Velocity Mapping Using Microbubbles. *IEEE Trans. Med. Imaging* 2015; 34: 433–440. doi:10.1109/TMI.2014.2359650
- [8] Huang C, Lowerison MR, Trzasko JD et al. Short Acquisition Time Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging via Microbubble Separation. *Sci. Rep.* 2020; 10: 1–13. doi:10.1038/s41598-020-62898-9
- [9] Song P, Trzasko JD, Manduca A et al. Improved Super-Resolution Ultrasound Microvessel Imaging With Spatiotemporal Nonlocal Means Filtering and Bipartite Graph-Based Microbubble Tracking. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 2018; 65: 149–167. doi:10.1109/TUFFC.2017.2778941
- [10] Kim J, Lowerison MR, Sekaran NC et al. Improved Ultrasound Localization Microscopy based on Microbubble Uncoupling via Transmit Excitation (MUTE). *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 2022; PP: 1–1. doi:10.1109/tuffc.2022.3143864
- [11] Taghavi I, Andersen SB, Hoyos CAV et al. In vivo Motion Correction in Super Resolution Imaging of Rat Kidneys. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 2021; 68: 3082–3093. doi:10.1109/TUFFC.2021.3086983
- [12] Harput S, Christensen-Jeffries K, Brown J et al. Two-Stage Motion Correction for Super-Resolution Ultrasound Imaging in Human Lower Limb. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 2018; 65: 803–814. doi:10.1109/TUFFC.2018.2824846
- [13] Qian X, Huang C, Li R et al. Super-resolution Ultrasound Localization Microscopy for Visualization of the Ocular Blood Flow. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2021. doi:10.1109/TBME.2021.3120368
- [14] Demeulenaere O, Bertolo A, Pezet S et al. In vivo whole brain microvascular imaging in mice using transcranial 3D Ultrasound Localization Microscopy. *EBioMedicine* 2022; 79. doi:10.1016/j.ebiom.2022.103995
- [15] Kanoulas E, Butler M, Rowley C et al. Super-Resolution Contrast-Enhanced Ultrasound Methodology for the Identification of In Vivo Vascular Dynamics in 2D. *Invest. Radiol.* 2019; 54: 500–516. doi:10.1097/RLI.0000000000000565
- [16] Lowerison MR, Sekaran NVC, Zhang W et al. Aging-related cerebral microvascular changes visualized using ultrasound localization microscopy in the living mouse. *Sci. Rep.* 2022; 12: 1–11. doi:10.1038/s41598-021-04712-8
- [17] Bourquin C, Poree J, Lesage F et al. In vivo pulsatility measurement of cerebral microcirculation in rodents using Dynamic Ultrasound Localization Microscopy. *IEEE Trans. Med. Imaging* 2021. doi:10.1109/tmi.2021.3123912
- [18] Demeulé C, Robin J, Dizeux A et al. Transcranial ultrafast ultrasound localization microscopy of brain vasculature in patients. *Nat. Biomed. Eng.* 2021; 5: 219–228. doi:10.1038/s41551-021-00697-x
- [19] Chen Q, Yu J, Rush BM et al. Ultrasound super-resolution imaging provides a noninvasive assessment of renal microvasculature changes during mouse acute kidney injury. *Kidney Int.* 2020; 98: 355–365. doi:10.1016/j.kint.2020.02.011
- [20] Andersen SB, Taghavi I, Søgaard SB et al. Super-Resolution Ultrasound Imaging Can Quantify Alterations in Microbubble Velocities in the Renal Vasculature of Rats. *Diagnostics* 2022; 12. doi:10.3390/diagnostics12051111
- [21] Qiu L, Zhang J, Yang Y et al. In vivo assessment of hypertensive nephrosclerosis using ultrasound localization microscopy. *Med. Phys.* 2022. doi:10.1002/mp.15583
- [22] Huang C, Zhang W, Gong P et al. Super-resolution ultrasound localization microscopy based on a high frame-rate clinical ultrasound scanner: An in-human feasibility study. *Phys. Med. Biol.* 2021; 66. doi:10.1088/1361-6560/abef45
- [23] Opacic T, Dencks S, Theek B et al. Motion model ultrasound localization microscopy for preclinical and clinical multiparametric tumor characterization. *Nat. Commun* 2018; 9: 1527. doi:10.1038/s41467-018-03973-8
- [24] Lin F, Shelton SE, Espindola D et al. 3-D Ultrasound Localization Microscopy for Identifying Microvascular Morphology Features of Tumor Angiogenesis at a Resolution Beyond the Diffraction Limit of Conventional Ultrasound. *Theranostics* 2017; 7: 196–204
- [25] Lowerison M, Zhang W, Chen X et al. Characterization of Anti-angiogenic Chemo-sensitization via Longitudinal Ultrasound Localization Microscopy in Colorectal Carcinoma Tumor Xenografts. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2021; PP. doi:10.1109/TBME.2021.3119280
- [26] Zhu J, Zhang C, Christensen-Jeffries K et al. Super-resolution ultrasound localization microscopy of microvascular structure and flow for distinguishing metastatic lymph nodes – an initial human study. *Ultraschall in Med* 2022; 43: 592–598. doi:10.1055/a-1917-0016
- [27] Couture O, Hingot V, Heiles B et al. Ultrasound localization microscopy and super-resolution: a state-of-the-art. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 2018; 1–1. doi:10.1109/TUFFC.2018.2850811
- [28] Hingot V, Errico C, Heiles B et al. Microvascular flow dictates the compromise between spatial resolution and acquisition time in Ultrasound Localization Microscopy. *Sci. Rep.* 2019; 9: 2456. doi:10.1038/s41598-018-38349-x
- [29] Jensen JA, Schou M, Andersen SB et al. Fast super resolution ultrasound imaging using the erythrocytes. In *Proceedings of the Medical Imaging 2022: Ultrasonic Imaging and Tomography*; SPIE. Vol. 12038 2022: 35
- [30] Chen X, Lowerison MR, Dong Z et al. Deep Learning-based Microbubble Localization for Ultrasound Localization Microscopy. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 2022. doi:10.1109/tuffc.2022.3152225

- [31] Søgaard SB, Andersen SB, Taghavi I et al. Super-Resolution Ultrasound Imaging Provides Quantification of the Renal Cortical and Medullary Vasculature in Obese Zucker Rats: A Pilot Study. *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 2022; 12: 1626. doi:10.3390/DIAGNOSTICS12071626
- [32] Andersen SB, Taghavi I, Kjer HM et al. Evaluation of 2D super-resolution ultrasound imaging of the rat renal vasculature using ex vivo micro-computed tomography. *Sci. Rep.* 2021; 11: 24335. doi:10.1038/s41598-021-03726-6
- [33] Chavignon A, Heiles B, Hingot V et al. 3D Transcranial Ultrasound Localization Microscopy in the Rat Brain with a Multiplexed Matrix Probe. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2021; PP. doi:10.1109/TBME.2021.3137265
- [34] Jensen JA, Tomov BG, Ommen ML et al. Three-Dimensional Super-Resolution Imaging Using a Row-Column Array. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 2020; 67: 538–546. doi:10.1109/TUFFC.2019.2948563