

Aus dem
Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Institut für Radiologie
Universitätsmedizin Charité
der Humboldt und Freien Universität Berlin

**Nachweis einer Arthritis im Sprunggelenk der Ratte mittels
NIR-Bildgebung unter Verwendung des Farbstoffes KC 45
und deren Korrelation mit der MRT und histologischen
Untersuchung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dorothee von Stieglitz
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 2004

Journal Nr.: 2841

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: **Herr Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg**

Erster Gutachter: **Frau Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl**

Zweiter Gutachter: **Herr Univ.-Prof. Dr. Bernd Hamm**

Dritter Prüfer: **Herr Prof. Dr. Rolf Berg**

Tag der Promotion: **26. 11.2004**

1	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	1
2	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	3
3	GRUNDLAGEN UND LITERATURÜBERSICHT	5
3.1	Rheumatoide Arthritis	5
3.2	Tiermodell	6
3.2.1	Kollagen-induzierte Arthritis	7
3.3	Gelenkaufbau	9
3.4	Pathologische Anatomie der rheumatoiden Arthritis	11
3.4.1	Gelenkerguss	11
3.4.2	Synovialitis	12
3.4.3	Zerstörung durch Pannusgewebe	13
3.4.4	Destruktion des Gelenkknorpels	13
3.5	Pathologische Anatomie der Kollagen-induzierten Arthritis	14
3.6	Diagnostik mit bildgebenden Verfahren	14
3.7	Grundlagen der MR-Tomographie in der Gelenkdiagnostik	15
3.8	NIR-Bildgebung	17
3.8.1	Geschichtlicher Überblick	19
3.8.2	Physikalische Grundlagen	19
3.9	Fluoreszenzfarbstoffe	22
3.9.1	Endogene Farbstoffe	22
3.9.2	Exogene Farbstoffe	22
3.9.3	Cyaninfarbstoffe	24
3.9.4	Modifizierte Cyaninfarbstoffe	25
3.9.5	Spezifisch bindende Cyaninfarbstoffe	28
4	MATERIAL UND METHODEN	29
4.1	Untersuchte Tiere	29
4.1.1	Einteilung der Tiere	29
4.1.2	Haltung der Tiere	29
4.2	Kollagen-induzierte Arthritis	29
4.2.1	Aufbereitung des Kollagens	29
4.2.2	Kollageninjektion	30
4.2.3	Klinische Beurteilung	30
4.3	NIR-Bildgebung der Arthritis der Ratte	31
4.3.1	Experimentelle Grundlagen und Aufbauten	31
4.3.2	Fluoreszenzfarbstoff	33
4.4	Versuchsablauf	33
4.4.1	NIR-Messung	33
4.4.2	Narkose	33
4.4.3	Farbstoff-Applikation	34

4.4.4 Messdaten	34
4.4.5 MRT-Messung	34
4.5 Sektion und Vorbereitung für die histologische Untersuchung	35
4.6 Auswertung der Untersuchungen	36
4.6.1 NIR-Messung	36
4.6.2 MRT-Messung	36
4.6.3 Histologie	37
4.7 Statistische Auswertung	37
5 ERGEBNISSE	39
5.1 NIR-Messungen	39
5.2 MRT-Messungen	44
5.3 Histologie	47
5.3.1 Beispiele histologischer Schnitte von Kontrollgelenken	48
5.3.2 Beispiele histologischer Schnitte von arthritischen Gelenken	50
5.4 Korrelationen zwischen der histologischen Untersuchung und den einzelnen Messmethoden	53
5.4.1 NIR-Bildgebung – Histologische Untersuchung	54
5.4.2 MRT – Histologische Untersuchung	55
5.4.3 NIR-Bildgebung – MRT	56
6 DISKUSSION	57
6.1 Arthritisinduktion	59
6.1.1 Abhängigkeit vom Geschlecht	59
6.1.2 Abhängigkeit vom genetischen Muster eines Organismus	59
6.2 NIR-Messungen	60
6.2.1 Abhängigkeit der NIR-Signalintensität von der Dosis	60
6.2.2 NIR-Signalintensitäten der Sprunggelenke im Verlauf der Zeit	60
6.2.3 NIR-Signalintensitäten der Sprunggelenke abhängig vom Entzündungsgrad	61
6.2.4 Abhängigkeit der NIR-Signalintensitäten vom applizierten Farbstoff	63
6.3 MRT-Messungen	64
6.3.1 MRT-Signalintensitäten der Sprunggelenke abhängig vom Entzündungsgrad	65
6.3.2 MRT-Signalintensitäten nach Kontrastmittelgabe	66
6.4 Histologische Auswertung	66
6.4.1 Ergebnisse der histologischen Score-Auswertung	67
6.5 Korrelationen	69
6.5.1 Korrelation: NIR-Bildgebung – Histologische Untersuchung	69
6.5.2 Korrelation: MRT – Histologische Untersuchung	70
6.5.3 Korrelation: NIR-Bildgebung – MRT	70
6.6 Ausblick	71
7 ZUSAMMENFASSUNG	73

8	SUMMARY	75
9	LITERATURVERZEICHNIS	77
10	MESSDATEN	87
11	DANKSAGUNG	93
12	LEBENS LAUF	94

1 Verwendete Abkürzungen

CCD	charge coupled device
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis (collagen-induced arthritis)
CT	Computertomographie
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
evtl.	eventuell
FOV	field of view
FS	Fettsättigung
Gd	Gadolinium
g	Gramm
ggr.	geringgradig
h	Stunde
HE	Hämatoxylin- Eosin
HF	Hochfrequenz
hgr.	hochgradig
IL-1	Interleukin-1
khz	Kiloherz
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KM	Kontrastmittel
mg	Milligramm
mgr.	mittelgradig
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MMP	Matrixmetalloproteinasen
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
MWU	Mann-Whitney-U-Test
NaCl	Natriumchlorid
NIR	Nahinfrarot
ns	Nanosekunden
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PpIX	Protoporphyrin IX

PTB	Physikalisch Technische Bundesanstalt
RA	rheumatoide Arthritis
s	Sekunde
SI	Signalintensität
sog.	sogenannt
SNR	Signal zu Rauschen-Verhältnis (signal-noise-ratio)
T1	longitudinale Relaxationszeit
TE	Echozeit
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TR	Repetitionszeit
µm	Micrometer
µmol	Micromol
v.a.	vor allem

7 Zusammenfassung

Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Methode der NIR-Bildgebung unter Einsatz des i.v. applizierten Cyaninfarbstoffes KC 45 für die Detektion rheumatoider Arthritiden am Modelltier Ratte zu erproben. Vergleichende MRT-Untersuchungen und histopathologische Beurteilungen dienten der Objektivierung der NIR-Messergebnisse.

Material und Methoden

Für den Versuch wurden 22 weibliche Ratten des Wistar-Lewis- Stammes eingesetzt. Sieben Ratten dienten als Kontrolltiere, bei den übrigen 15 wurde, nach dem Modell der Kollagen-induzierten Arthritis, eine Gelenkentzündung erzeugt. Von den 15 Tieren erkrankten 13, teilweise unilateral. Untersucht wurden jeweils die Sprunggelenke.

Die SI der Gelenke wurde sowohl vor als auch während 10 und nach 30, 60 und 120 min nach intravenöser Verabreichung des wässrig gelösten Farbstoffes in einer Dosierung von 1 µmol pro kg KGW gemessen. Durch die Bestrahlung mit Laserlicht, mithilfe eines Festkörperlaser-systems, wurden die exogen zugeführten wie auch endogenen Farbstoffmoleküle zur Fluoreszenz angeregt. Diese wurde von einer im NIR-Bereich empfindlichen CCD- (charge coupled device) Kamera erfasst und zur bildlichen Darstellung der beleuchteten Areale genutzt. In ausgewählten „regions of interest“, die im jeweiligen Sprunggelenk platziert wurden, konnte der arithmetische Mittelwert der Fluoreszenzintensität aller Pixel im auszuwertenden Bereich bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte mithilfe einer speziell entwickelten Windows-basierten Visual-basic-Auswertsoftware.

Die vergleichenden MRT-Untersuchungen fanden bei 1,5 Tesla an einem Ganzkörpertomographen, unter Verwendung einer standardmäßigen Extremitätenspule, statt. Die Messungen erfolgten mit T1-gewichteter Spinechosequenz in coronarer Schichtorientierung mit Fettsättigung vor und nach Kontrastmittelgabe. Als KM wurde das Gd-haltige OmniscanTM in einer Dosis von 0,2 mmol pro kg KGW verwendet. Die Auswertung der MRT-Bilder erfolgte mit dem Programm NIH Image.

Die von den Gelenken angefertigten histologischen HE- gefärbten Schnittpräparate wurden anhand eines murinen Scores für Arthritiden beurteilt.

Ergebnisse

Die Einteilung der Gelenke in Gruppen, die den Grad der Entzündung wiedergeben, erfolgte anhand des histologischen Score-Ergebnisses. Die Gruppe A mit geringgradigen Entzündungszeichen umfasst 12 Gelenke, Gruppe B mit mittelgradiger Arthritis 11 und die Gruppe C mit hochgradiger Arthritis 7 Gelenke. Die 14 Gelenke der Kontrolltiere wurden in

eine eigene Gruppe eingeteilt.

Anhand der NIR- wie auch der MRT- Messungen können die Gelenke der Gruppe A von den Kontrollgelenken nicht signifikant unterschieden werden ($p > 0,5$). In diese Gruppe fallen jedoch aufgrund der Einteilung auch Gelenke, die keinerlei histologische Veränderungen aufwiesen, so dass dieses Ergebnis kritisch beurteilt werden muss. Für die Gruppen B und C weisen beide bildgebenden Verfahren signifikante Unterschiede zu den Messergebnissen der Kontrollgruppe auf ($p < 0,5$). Die Messungen zu den diversen Zeitpunkten haben ergeben, dass sich mit dem Farbstoff KC 45 die deutlichsten Kontraste zwischen gesunden und entzündeten Gelenken nach fünf Minuten, bei einigen Tieren erst nach zehn Minuten zeigen. Durch eine erhöhte Vaskularisation und gesteigerte Permeabilität der entzündeten Synovialmembran extravasiert der Farbstoff und sorgt für eine verstärkte Signalgebung. Anschließend sinkt die Farbstoffkonzentration im Körper schnell ab, da aufgrund der Proteinbindung der Farbstoffmoleküle (40%) eine schnelle Elimination erfolgt. Bis zu 60 min unterscheiden sich die NIR-SI der Gruppen B ($p < 0,01$) und C ($p < 0,05$) noch signifikant von der Gruppe A, nach 120 min sind die SI der Gruppe B ($p = 0,018$) noch signifikant erhöht.

Die Korrelationsberechnungen verdeutlichen, dass arthritische Veränderungen, die auch histologisch nachweisbar sind, mithilfe der NIR-Bildgebung unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes KC 45 sensitiv erfasst werden. Es ergibt sich eine hohe Korrelation dieses Verfahrens zur histologischen Untersuchung ($r_s = 0.74$). Die Ergebnisse der MRT-Untersuchung, die auch hoch mit den histologischen Veränderungen der Gelenkstrukturen korrelieren ($r_s = 0.76$), bestätigen die Angaben in der Literatur. Die MRT zeichnet sich durch eine sehr gute Gewebedifferenzierung aus. Eine ebenfalls hohe Korrelation der NIR-Messungen zu den Ergebnissen der MRT-Untersuchung ($r_s = 0.71$) deutet auf eine gute Vergleichbarkeit beider Verfahren bezüglich der Detektion von Arthritiden hin.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die Methode der NIR-Bildgebung in Zukunft eine gute Ergänzung der bisherigen radiologischen Verfahren für die Diagnose einer rheumatoiden Arthritis darstellen kann. Insbesondere in der Frühdiagnostik, die bisher nur mit der zeitaufwendigen Sonographie oder der MRT möglich ist, könnte dieses Verfahren, das sich durch eine leichte Handhabung wie auch durch einen geringen Kostenaufwand auszeichnet, wertvolle Dienste leisten. Besonders als Screening-Methode, zur Beurteilung der Entzündungsaktivität in den Gelenken, ist der Einsatz dieses Verfahrens in naher Zukunft realistisch. Für die dreidimensionale Auflösung, in Form einer Tomographie, gibt es bereits erste Ergebnisse (Ntziachristos *et al.*, 2002). Somit ist denkbar, dass die NIR-Bildgebung die MRT zum Teil ersetzen kann.

8 Summary

Near infrared (NIR) imaging with cyanine dye KC 45 for the detection of rheumatoid arthritis in the rat model - correlation with MRI and histopathology.

Aim

The aim of the present study was to investigate the usefulness of near infrared (NIR) imaging after intravenous administration of the cyanine dye KC 45 for the detection of rheumatoid arthritis in the rat model. The NIR measurements were compared with the findings of magnetic resonance imaging (MRI) and histopathology.

Material and Methods

The experiments were performed in 22 female Wistar-Lewis rats. Seven rats served as controls while inflammation of the ankle joints was induced in the other 15 rats using the technique of collagen-induced arthritis. 13 of the 15 animals developed arthritis, some of them unilaterally.

The signal intensity (SI) of the ankle joints was measured before, during 10, 30, 60, and 120 min after intravenous injection of the dye in aqueous solution at a dose of 1 μmol per kg of body weight. Both the exogenous and endogenous dye molecules were excited by exposure to laser light using a solid-state laser system. Images were generated by recording the excitation energy reflected by the fluorescent molecules with a CCD (charge-coupled device) camera sensitive in the NIR range. The arithmetic means of fluorescence intensity of all pixels were determined in regions of interest placed in each ankle joint. The findings were analyzed using a specially developed Windows-based visual basic software.

The MRI examinations were performed on a 1.5-Tesla body scanner using a T1-weighted spin-echo sequence in coronal slice orientation with fat saturation before and after contrast medium administration. The contrast medium used was an established Gd-based contrast medium for diagnostic evaluation of arthritis (OmniscanTM) administered at a dose of 0.2 mmol per kg BW. The MR images were analyzed using the NIH Image software.

The histologic specimens of the joints were stained with hematoxylin & eosin (H&E) and evaluated using a score for the assessment of murine arthritis.

Results

The joints were assigned to either of three groups reflecting the grade of inflammation according to the histologic scores. Group A with mild signs of inflammation comprised 12 ankle joints, group B with moderate arthritis 11 joints, and group C with severe arthritis 7 joints. Fourteen joints of 7 animals without arthritis served as controls.

Neither NIR imaging nor MRI allowed for differentiating the joints of group A from those of the

control animals. However, this result must be interpreted with caution as group A also comprises joints without any histologic changes. For groups B and C, both imaging modalities show significant differences compared to the control group. Measurements at different time points after injection of the dye demonstrate that KC 45 yields the most pronounced differences between normal and inflammatory joints after 5 minutes, in some animals after 10 minutes. Inflammation of the synovial membrane is associated with an increased vascularization and permeability, resulting in extravasation of the dye and an enhanced signal. Subsequently there is rapid elimination of the dye from the body due to protein binding of the dye molecules (40%).

Calculation of correlations confirms that arthritis-induced changes that can be demonstrated histologically are sensitively depicted by NIR imaging using the fluorescence dye KC 45. There is a high correlation between NIR imaging and histology ($r_s = 0.74$). The MRI findings, which likewise correlate strongly with the histologically demonstrated changes of the joint structures ($r_s = 0.76$), confirm data reported in the literature. MRI is characterized by an excellent tissue differentiation. There is likewise a high correlation between MRI and NIR imaging ($r_s = 0.71$), suggesting a good comparability of both modalities in the detection of arthritis.

Conclusion

The results of these experiments show that the method of NIR imaging has the potential to be in future a useful supplement to established radiologic procedures in the diagnosis of rheumatoid arthritis. NIR imaging may in particular be useful in evaluating early arthritis because it is inexpensive and easy to handle as opposed to established modalities like time-consuming ultrasonography and MRI. NIR imaging has a potential for being used as a screening method in evaluating the inflammatory activity of joints in the near future. Performed as a tomographic procedure with three-dimensional resolution, NIR imaging may in part replace MRI.

11 Danksagung

Bei Frau Professor Dr. J. Plendl und Herrn Professor Dr. B. Hamm möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Schnorr sowie Frau Dr. S. Wagner, die mich bei der Durchführung und Auswertung der Experimente fachlich sehr kompetent unterstützt haben und immer wieder neue Ideenansätze beisteuerten, die dieser Schrift ihren endgültigen Rahmen verliehen.

Frau Dr. H. Hünigen danke ich besonders für die herzliche und offene Betreuung meiner Arbeit und für die rasanten Korrekturen, die es mir ermöglichten, den Abschluss dieser Dissertation im nötigen Maße zu beschleunigen.

Ganz herzlich möchte ich Herrn Dr. B. Ebert für die gute fachliche Betreuung und Geduld während der zahlreichen Messtage in der PTB danken. Auch durch immer wiederkehrende Überraschungen seitens unserer Tiere, die die physikalische Genauigkeit ins Wanken zu bringen drohten, ließ er sich niemals aus der Ruhe bringen.

Herrn Dr. D. Petzelt danke ich für die Hilfestellung bei der Auswertung der Messergebnisse der NIR-Bildgebung.

Herrn Professor Dr. Bräutigam, Herrn Dr. M. Schirner, und Herrn Dr. K. Licha von der Schering AG danke ich sehr für die Bereitstellung der finanziellen Mittel und der Farbstoffe für dieses Projekt.

Herrn Professor Dr. V. Krenn und Dr. L. Morawietz vom Institut für Pathologie der Charité gilt mein Dank für die Unterstützung bei der histologischen Auswertung.

Für die geduldige Hilfe bei der Auswertung des statistischen Datenmaterials danke ich Frau Dr. T. Schink.

Ebenso möchte ich mich bei R. Korn und Dr. D. Prochnow für die Stunden danken, in denen sie meine Computerprobleme professionell und unermüdlich lösten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Kollegin Ines Wojner für ihre Offenherzigkeit bedanken, durch die unsere Zusammenarbeit vom ersten bis zum letzten Tag äußerst angenehm war. Außerdem konnte ich von ihren Erfahrungen sehr profitieren, so dass die Versuche relativ zügig abgeschlossen werden konnten.

Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen danken, dass sie mir einen Studienweg mit Umwegen ermöglichten, der mich am Ende doch zur Veterinärmedizin und somit auch zur Anfertigung dieser Arbeit führte.

Für die liebevolle, tatkräftige und anspornende Unterstützung im Endspurt der Arbeit und während des Wartens auf unseren Nachwuchs danke ich herzlichst meinem Liebsten Ralf.

12 Lebenslauf

Zur Person

Name	Dorothee von Stieglitz
Geburtsdatum	30.03.1969
Geburtsort	Hamburg

Schule

1973 - 1979	Grundschule in Mettmann und Wüstring
1979 - 1981	Orientierungsstufe Marschweg in Oldenburg
1981 - 1989	Schillergymnasium Hameln
	Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

1990 - 1992	Agrarwissenschaften an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
1992 - 1993	Pharmazie an der FU Berlin
1993 - 1996	Veterinärmedizin an der FU Berlin
1996 - 1997	École Nationale Vétérinaire de Toulouse
1997 - 1999	Veterinärmedizin an der FU Berlin
April 1999	Approbation als Tierärztin

Berufliche Tätigkeiten

1999 - 2000	Assistentin in der Pferdeklinik Dr. W. Jahn/ V. Sill, Bargteheide
2000 - 2002	Assistentin an der Tierklinik Wusterhausen, Dr. M. Köhler/ S. Kuhse, Wusterhausen
2002 - 2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Radiologie, Charité, Berlin

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Dorothee von Stieglitz
Berlin , den 04.05.2004