

5 Ergebnisse

Alle Tiere befanden sich sowohl vor als auch während der Arthritis-Induktion, bei täglich durchgeführten Kontrollen, in einem guten Allgemeinzustand.

Von den insgesamt 22 verwendeten Tieren dienten sieben als Kontrolltiere. Den übrigen 15 Ratten wurde wie beschrieben, Kollagen injiziert. Jedoch entwickelten manche dieser Tiere keine klinisch erkennbare bzw. nur einseitige Arthritiden der Tibiotarsalgelenke. Somit wurde eine Einteilung bezüglich der Gelenke vorgenommen, die sich nach dem Ergebnis der histologischen Auswertung richtete.

Tab. 1 Einteilung der untersuchten Tiere

Gruppe		Anzahl der Gelenke	histologischer Score
Kontrollgelenke	K	14	unabhängig v. histologischen Score
geringgradige Arthritis	A	12	0-5 Punkte
mittelgradige Arthritis	B	11	6-10 Punkte
hochgradige Arthritis	C	7	11-15 Punkte

5.1 NIR-Messungen

Die folgenden Abbildungen zeigen die gemessenen Fluoreszenzsignale während der gewählten Messzeitpunkte von zwei Ratten im Vergleich.

Die histologischen Abbildungen zeigen in der linken Bildreihe ein Tier mit beidseits hochgradiger Arthritis der Sprunggelenke, im Vergleich ist auf der rechten Bildseite ein Kontrolltier zu sehen. Es ist jeweils eine Aufnahme vor Farbstoffapplikation (0 min) wie auch zu den festgelegten Zeitpunkten nach KM-Gabe gezeigt.

Die roten Areale zeigen Entzündungen an. Die hohen Signalintensitäten in der Rückenregion sind auf die Rasur wie auch auf die Entzündung der Haut durch die intradermale Injektion zurückzuführen. Bei den Ratten, denen Kollagen injiziert wurde, ist die Entzündung wesentlich ausgeprägter als bei den Kontrolltieren die eine NaCl-Injektion erhalten hatten. Somit fluoresziert in diesen Abbildungen die Rückenregion des Arthritistieres stärker als die des Kontrolltieres.

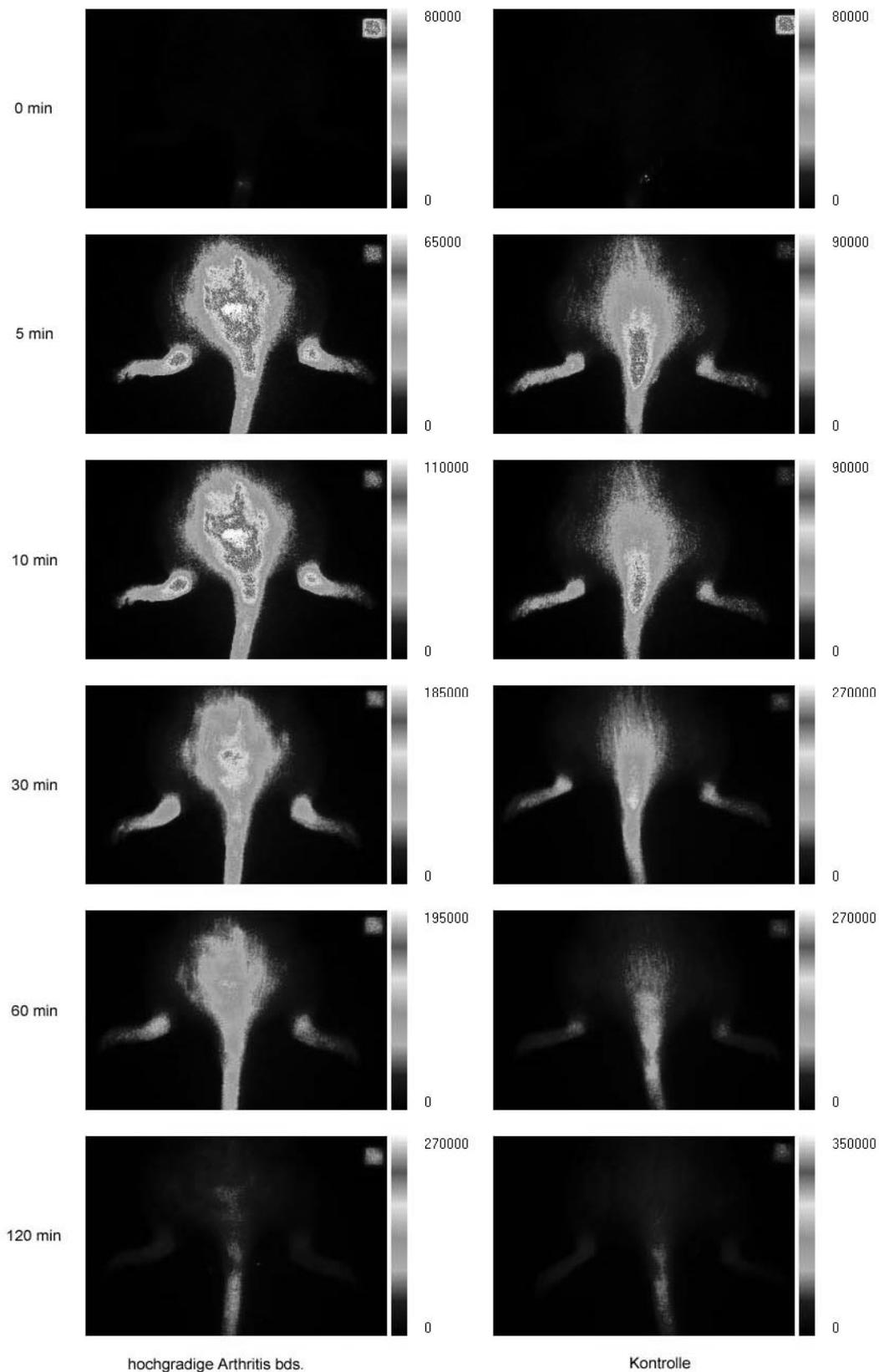


Abb. 7 Darstellung der Fluoreszenzintensität mit der NIR-Bildgebung vor und nach Injektion von 1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ KGW des NIR-Farbstoffes KC 45. Vergleich eines Tieres mit Kollagen-induzierter Arthritis und eines Kontrolltieres zu verschiedenen Zeitpunkten.

Hingegen verdeutlichen die hotspots in den Sprunggelenken des Tieres links auf Abbildung 7 bei 5 und 10 Minuten die Arthritis, während die Gelenke des Kontrolltieres homogen abgebildet sind. Mit fortschreitender Zeit nehmen die SI wieder ab. Nach zwei Stunden ist die Fluoreszenz nur noch sehr schwach und gleichmäßig verteilt.

Das im rechten oberen Bildbereich sichtbare helle Rechteck ist die bereits erwähnte Referenz.

Tab. 2: Mediane der normierten SI der NIR-Messung zu den unterschiedlichen Zeitpunkten

SI	0 min	5 min	10 min	30 min	60 min	120 min
Kontrolle	0,05	2,70	2,58	1,85	1,22	0,72
geringgradige. Arthritis	0,05	2,97	2,79	2,18	1,44	0,85
mittelgradige Arthritis	0,06	5,39	5,52	3,55	2,38	1,09
hochgradige Arthritis	0,03	5,59	5,49	3,60	1,82	0,73

Für alle Berechnungen und Diagramme wurden immer die normierten SI eingesetzt, um Schwankungen in der Ausleuchtung zu nivellieren.

Die Berechnung der Mediane der SI aus der Fluoreszenzmessung zeigt, dass die Ergebnisse der jeweiligen Gruppen Parallelen für die einzelnen Zeitpunkte aufweisen. Zwischen dem 0 min-Wert, der vor Farbstoffapplikation gemessen wurde und somit der Autofluoreszenz des Gelenkes entspricht, und dem 5 min-Wert zeigen alle Gruppen einen Anstieg um ein Vielfaches. Bis auf die Gelenke der Gruppe B mit mittelgradigen Entzündungszeichen ist der Median der SI zu diesem Zeitpunkt am höchsten. Gegenüber dem Leerwert steigt die gemessene Fluoreszenz in der Kontrollgruppe um das 54-fache, in der Gruppe A um das 66-fache. Hingegen steigt sie in der Gruppe B um das 90-fache und in der Gruppe C sogar um das 186-fache.

Die SI nach 10 min unterscheiden sich nur wenig von denjenigen nach 5 min. Nach 30 min ist für alle Gruppen bereits ein deutlicher Signalabfall zu sehen, der sich bis zu 120 min deutlich ausprägt. Nach zwei Stunden ist im Durchschnitt nur noch rund 19-mal soviel Fluoreszenz zu messen wie vor KM-Gabe (siehe Tabelle 2).

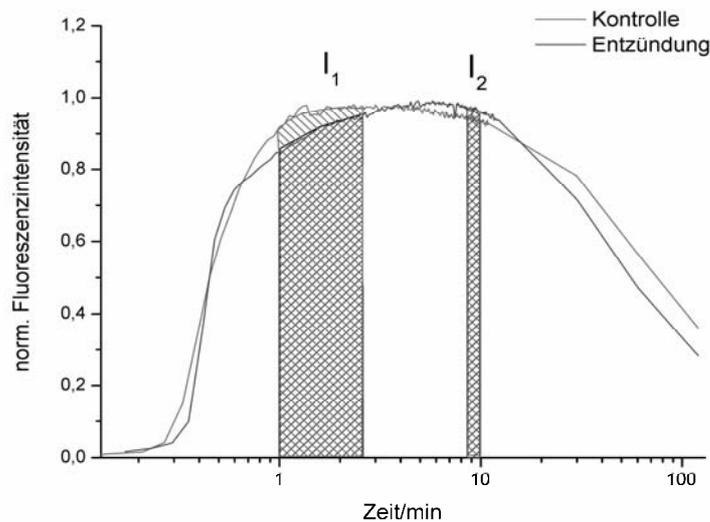


Abb. 8 Darstellung der unterschiedlichen Kurvenverläufe der Signalintensität über die Zeit. Die Fluoreszenz von 20 Gelenken (Kontrollen und alle Arthritisgrade) wurden auf den Wert 1 normiert.

Der Kurvenverlauf in Abbildung 8 bestätigt die Ergebnisse aus der Median-Berechnung. Es wurden die Werte von zehn zufällig gewählten Tieren (20 Gelenke aller Gruppen) verwendet. Die Fluoreszenzintensitäten wurden auf eine SI von 1 normiert und im Verlauf über die Zeit aufgetragen. Es wurden für diese Graphik nur zwei Gruppen unterschieden, nämlich diejenigen der Kontrolltiere von der Gruppe der Tiere mit CIA.

Zu Beginn der Messung ist der Anstieg der Fluoreszenz sehr steil und fällt dann spätestens nach 10 min wieder ab. Der Verlauf der beiden Kurven unterscheidet sich in ihrem An- und Abflutungsverhalten. Während die Gelenke der Kontrollgruppe eine schnelle Farbstoffanflutung binnen einer Minute aufweisen, ist die höchste SI etwa bei 2,5 min erreicht. Die Intensität des Fluoreszenzsignals fällt über einen Zeitraum von zwei Stunden langsamer ab als bei den entzündeten Gelenken. Für die Tiere mit CIA zeigt sich eine langsamere Anflutung des Farbstoffes. Ein Plateau mit den höchsten Signalintensitäten liegt zwischen 7 und 8 min. Die Flächen unter der Kurve I_1 und I_2 verdeutlichen, dass die Differenz der beiden Kurven zwischen 1 und 2,5 min am größten ist.

Signalintensitäten der Fluoreszenzmessung

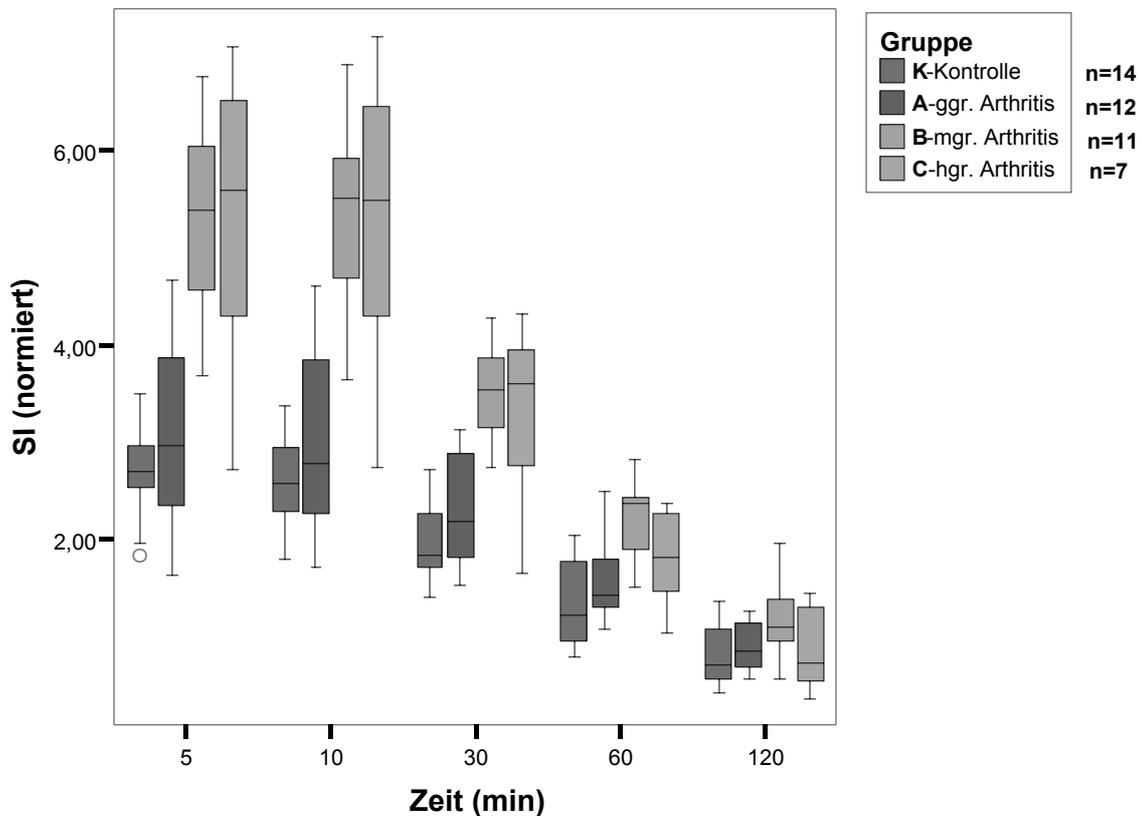


Abb. 9 Signalintensität (SI) der Fluoreszenzmessung aller Gruppen in Abhängigkeit von der Zeit, jeweils auf den Referenzwert normiert

In Abbildung 9 sind die normierten Signalintensitäten der NIR-Bildgebung der vier Gruppen in Abhängigkeit von der Zeit in Form von Boxplots dargestellt.

Fünf Minuten nach i.v.-Injektion von 1 µmol/ kg KGW das Farbstoffes KC 45 liegt der Median der Kontrollgruppe mit einem Wert von 2,70 nur wenig niedriger als der Median der Gruppe A mit 2,97. Die Messwerte der Kontrollgruppe und der Gelenke der Gruppe A unterscheiden sich somit nicht signifikant ($p = 0,494$; Mann-Whitney-U-Test). Der Median der Gruppe B ist hingegen mit einem Wert von 5,39 fast doppelt so hoch wie derjenige der Kontrollgruppe. Der Median der Gruppe C ist mit einem Wert von 5,59 auf etwa demselben Niveau. Die Signalintensitäten der Gruppen B und C unterscheiden sich von denen der Kontrollgruppe jeweils hoch signifikant. Die p-Werte betragen $< 0,01$ bzw. $0,02$ (Mann-Whitney-U-Test).

Nach 10 min sind die Ergebnisse ähnlich. Die Mediane der Kontrollgruppe (2,58) und der Gelenke der Gruppe A (2,79) sind vergleichbar mit den 5 min-Werten. Die Signalintensitäten dieser Gruppen zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied. Der p-Wert beträgt $0,595$

(Mann-Whitney-U-Test). Der Vergleich der medianen x-Werte der Kontrollgruppe (2,58) und der Gruppe B (5,52) zeigt eine signifikante Differenz, ebenfalls mit einem p-Wert von $< 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test). Die Messwerte der Gruppe C unterscheiden sich mit einem Medianwert von 5,49 von den Werten der Kontrollgruppe mit einem p-Wert von 0,01 signifikant (Mann-Whitney-U-Test).

Nach 30 min ist für alle Gruppen ein deutlicher Abfall der SI erkennbar. Die Medianwerte der Fluoreszenzsignale der Gruppe A und K betragen 1,85 und 2,18 und unterscheiden sich abermals nicht signifikant ($p = 0,252$; Mann-Whitney-U-Test). Hingegen ist die Differenz der SI für die Gruppen B und C mit einem medianen x-Wert von 3,55 und 3,60 im Vergleich zur Gruppe K signifikant (Mann-Whitney-U-Test). Der p-Wert für die Gruppe B ist $< 0,01$ derjenige der Gruppe C 0,016.

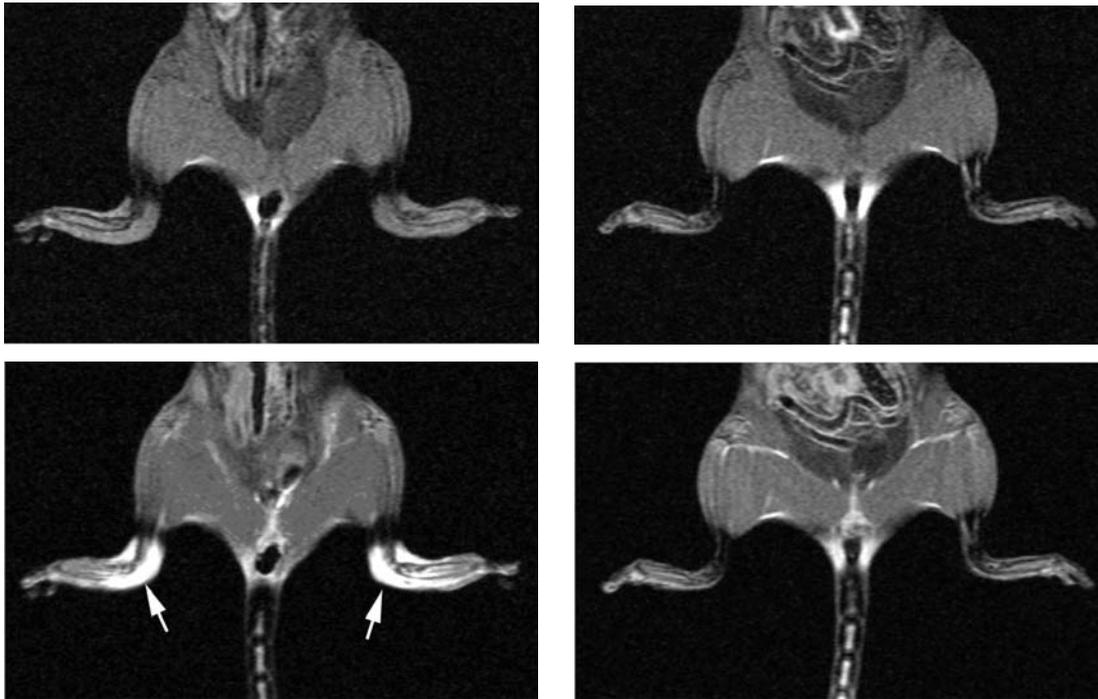
Nach 60 min unterscheiden sich die Mediane der Gruppe K und A mit Werten von 1,22 und 1,44 nur wenig, deren Differenz ist nicht signifikant ($p=0,118$; Mann-Whitney-U-Test). Der mediane x-Wert der Gruppe B beträgt 2,38 und unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe. Der p-Wert ist $< 0,01$. Der Median der Gruppe C ist mit 1,82 geringer, unterscheidet sich aber mit einem p-Wert von 0,046 ebenfalls signifikant von der Gruppe K (Mann-Whitney-U-Test).

Nach 120 min befinden sich die Boxplots in etwa auf einer Höhe und zeigen, dass sich nur noch die Messergebnisse der Gelenke der Gruppe B von der Kontrollgruppe signifikant abheben (Mann-Whitney-U-Test), der p-Wert beträgt 0,018. Die SI der übrigen Gruppen unterscheiden sich nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe. Der p-Wert der Gruppe A beträgt 0,403 und der Gruppe C 0,743 (Mann-Whitney-U-Test). Die Medianwerte befinden sich mit 0,72 bzw. 0,85 bzw. 1,09 und 0,73 in etwa auf demselben Niveau.

5.2 MRT-Messungen

Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils eine Leeraufnahme und eine Messung nach KM-Gabe in der MRT bei einer Ratte mit CIA sowie einer Kontrollratte.

Deutlich zu erkennen ist die Anreicherung des KM in den Sprunggelenken des Tieres mit hochgradiger Arthritis, während die Sprunggelenke des Kontrolltieres keinen offensichtlichen Signalanstieg nach KM-Gabe zeigen.



Tier mit beidseits hgr. Arthritis

Kontrolltier

Abb. 10 Vergleichende Darstellung der Sprunggelenke eines Tieres mit massiver beidseitiger Gelenkentzündung (Pfeile) sowie eines Kontrolltieres in einer T₁-gewichteten Spinechosequenz. Obere Reihe: ohne, untere Reihe mit Kontrastmittel.

Für die Auswertungen wurden die SI der Leer- und post KM-Messungen, wie in Material und Methoden beschrieben, aufeinander bezogen und das Ergebnis als normierte SI bezeichnet. Die statistischen Berechnungen weisen deutliche Parallelen zu den NIR-Messergebnissen auf. Während sich die SI der Gruppe A nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden ($p = 0,212$; Mann-Whitney-U-Test), heben sich die Messergebnisse der Gruppen B und C signifikant ab. Bei der MRT-Messung ist aber im Unterschied zu der NIR-Bildgebung bereits vor KM-Applikation ein signifikanter Unterschied der Gruppen B ($p = 0,02$) und C ($p < 0,001$) im Vergleich zur Gruppe K zu verzeichnen (Mann-Whitney-U-Test). Die Abbildung 11 stellt diesen Zusammenhang graphisch dar.

Ebenso unterscheiden sich die Messergebnisse der Gruppe B in der KM-gestützten Aufnahme ($p < 0,001$) wie auch als normierte SI ($p < 0,001$) von der Kontrollgruppe signifikant (Mann-Whitney-U-Test). Gleiches gilt für die Gruppe C. Der p-Wert der SI mit KM ist $< 0,001$, der p-Wert der normierten SI beträgt $0,001$ (Mann-Whitney-U-Test). Die Abbildungen 12 und 13 spiegeln diese Ergebnisse wider.

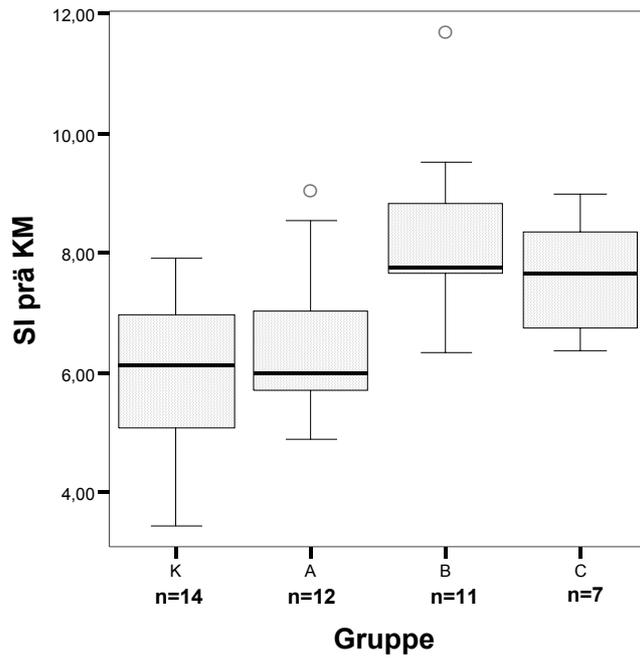


Abb. 11 Signalintensität der MRT-Messung aller Gruppen vor Kontrastmittelgabe (prä KM)

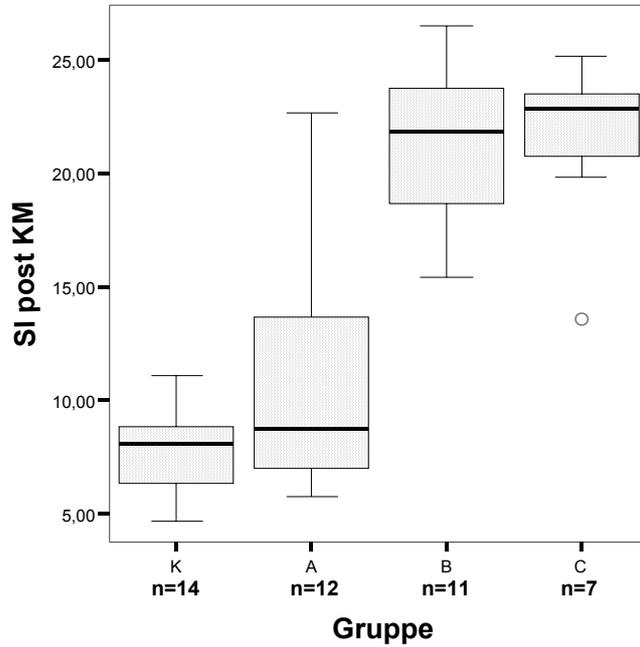


Abb. 12: Signalintensität der MRT-Messung aller Gruppen nach Kontrastmittelgabe (post KM)

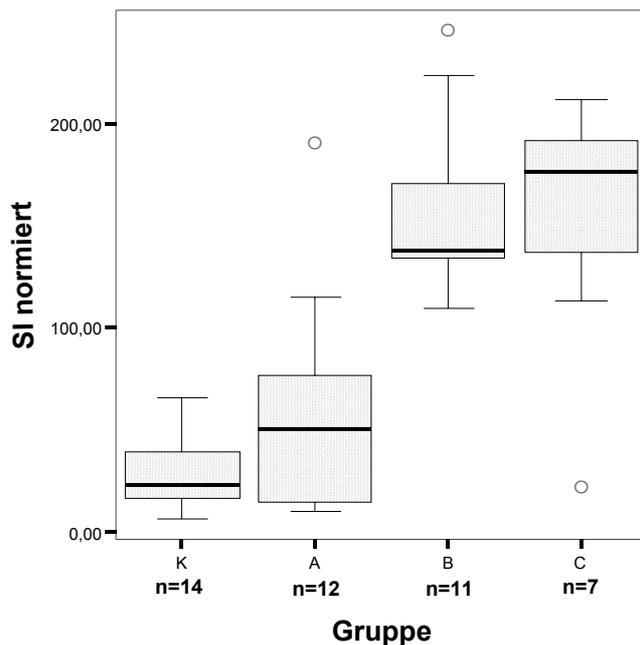


Abb. 13 Normierte Signalintensitäten (siehe Seite 37) aller Gruppen der MRT-Messung

5.3 Histologie

Von allen untersuchten Tieren wurde jeweils von beiden Sprunggelenken ein histologisches Schnittpräparat angefertigt und ausgewertet. Die Auswertung wurde mittels des in Material und Methoden erläuterten Score-Systems vorgenommen, wobei sowohl das Talocrural- wie auch die Metatarsalgelenke beurteilt wurden.

Die Synovialis war bei den Kontrolltieren unauffällig, während sie bei den arthritis-induzierten Tieren variierte. Bei der Vielzahl der Gelenke ergibt sich eine Übereinstimmung zwischen dem Grad der Synovialitis und der klinischen Einstufung. Die synoviale Deckzellschicht war in den entzündlich veränderten Gelenken, je nach Grad der Arthritis, deutlich verbreitert und von mononukleären Entzündungszellen, hauptsächlich Lymphozyten, sowie von neutrophilen Granulozyten infiltriert. Bereits bei den Gelenken mit mittelgradigen Entzündungszeichen dringt die proliferierte Synovialis deutlich in den Gelenkinnenraum vor und bildet sich zum Pannus aus. Der Anteil an Fibrozyten und damit bindegewebiger Zubildung der Gelenkinnenhaut variiert bei den Gelenken, je nach Entzündungsgrad. Bei der Mehrzahl der arthritischen Gelenke überzieht der Pannus, zumindest zum Teil, die Knorpeloberfläche. Folglich sind in den meisten Schnittpräparaten Knorpeldestruktionen erkennbar. Bei vielen

Gelenken mit ausgeprägter Synovialitis ist zusätzlich ein Abbau der knöchernen Struktur zu beobachten. Dieser zeigt sich vor allem in den Metatarsalgelenken. Ebenso verhält es sich mit der Periostitis. Gelenke, in denen viele Entzündungszellen auffallen, zeigen auch Entzündungen des Periosts. Das periartikuläre Gewebe ist bei Gelenken mit geringgradiger Synovialitis meist unauffällig, wohingegen es bei mittel- und hochgradiger Veränderung der Gelenkinnenhaut ebenso von mononukleären, wie auch polymorphkernigen Lymphozyten durchsetzt ist. Eine Tenosynovitis ist nur bei gleichzeitig ausgeprägter Periarthritis auszumachen.

5.3.1 Beispiele histologischer Schnitte von Kontrollgelenken

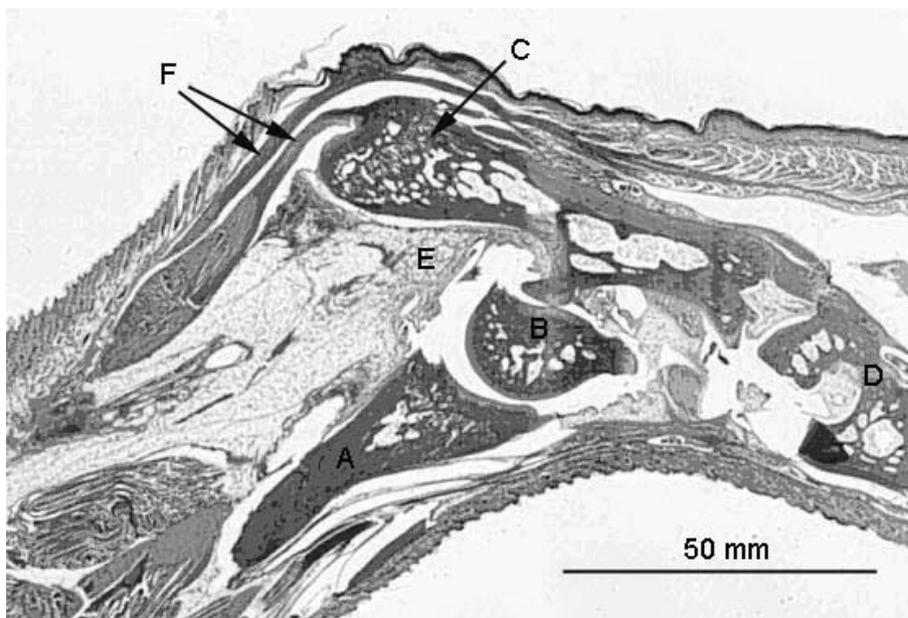


Abb. 14 Übersicht eines Tibiotarsalgelenkes der Ratte mit Tibia (A), Talus (B), Calcaneus (C), Os tarsale IV (D), Synovialis (E) und Tendo calcaneus communis (F); HE-Färbung

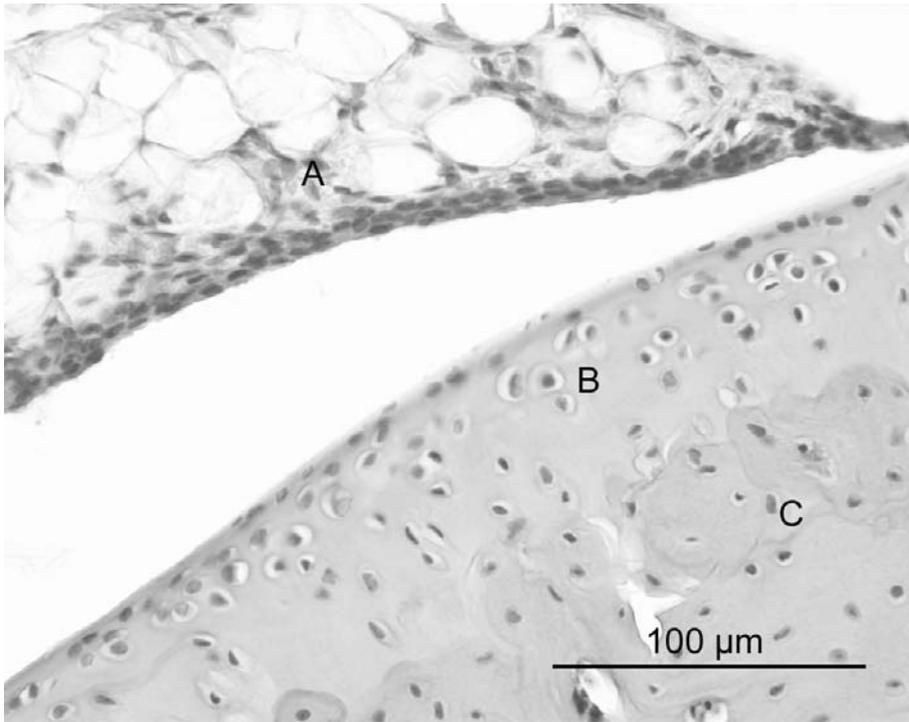


Abb. 15 Ausschnitt vom Tibiotarsalgelenk eines Kontrolltieres; Gelenkinnenraum mit Synovialis (A), Gelenkknorpel (B) und Knochenendplatte der distalen Tibia (C); HE-Färbung

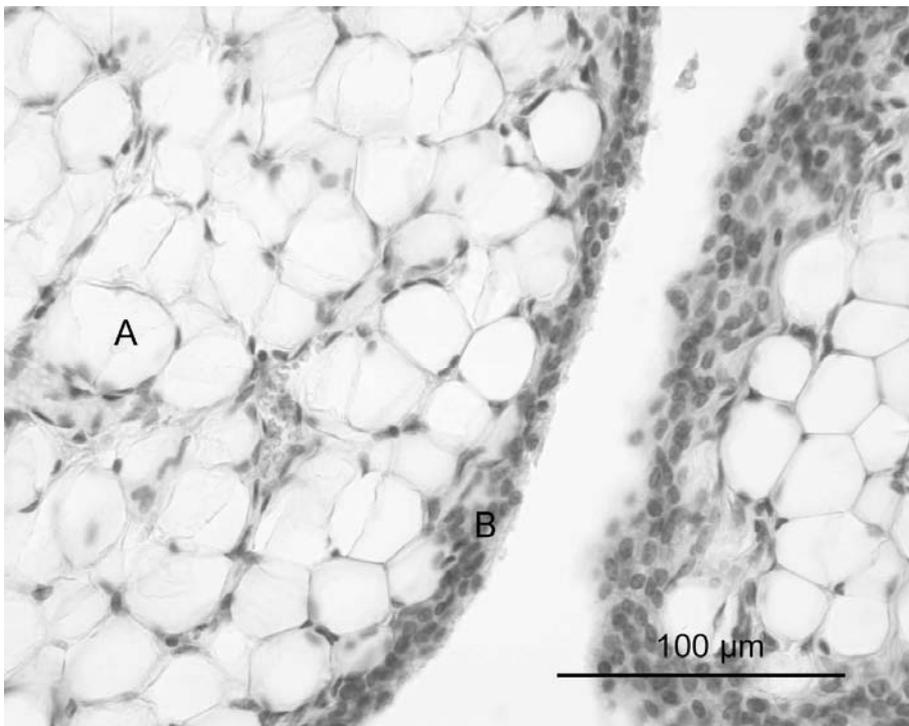


Abb. 16; Synovialis eines Kontrolltieres mit Fettzellen (A) und Schicht aus synovialen Deckzellen (B); HE-Färbung

5.3.2 Beispiele histologischer Schnitte von arthritischen Gelenken

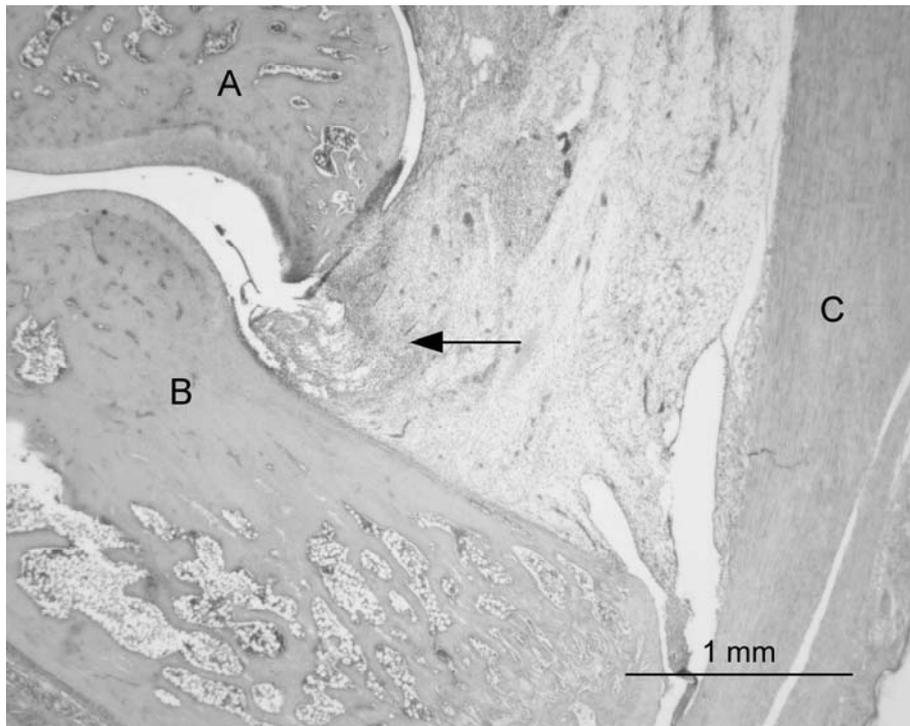


Abb. 17 Proliferierende Synovialmembran (Pfeil) eines arthritischen Tibiotarsal-Gelenkes (A Talus, B Calcaneus, C Achillessehne) mit mittelgradiger Entzündung ;HE-Färbung

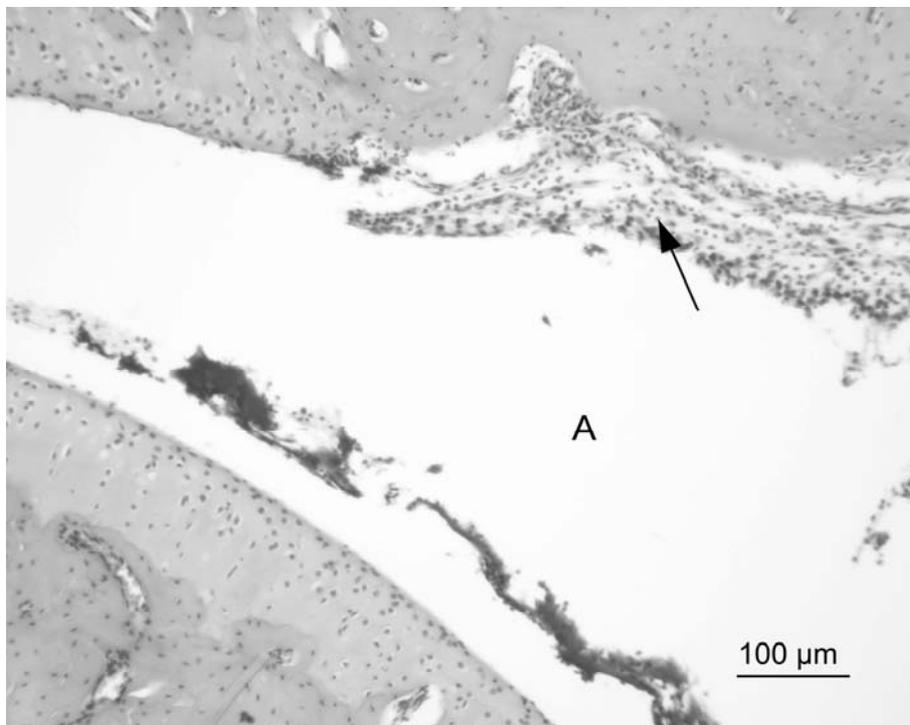


Abb. 18 Proliferierende Synovialmembran, die sich als Pannus (Pfeil) dem Knorpel auflegt (A Gelenkspalt). Schnitt desselben Gelenkes wie in Abb. 17; HE-Färbung

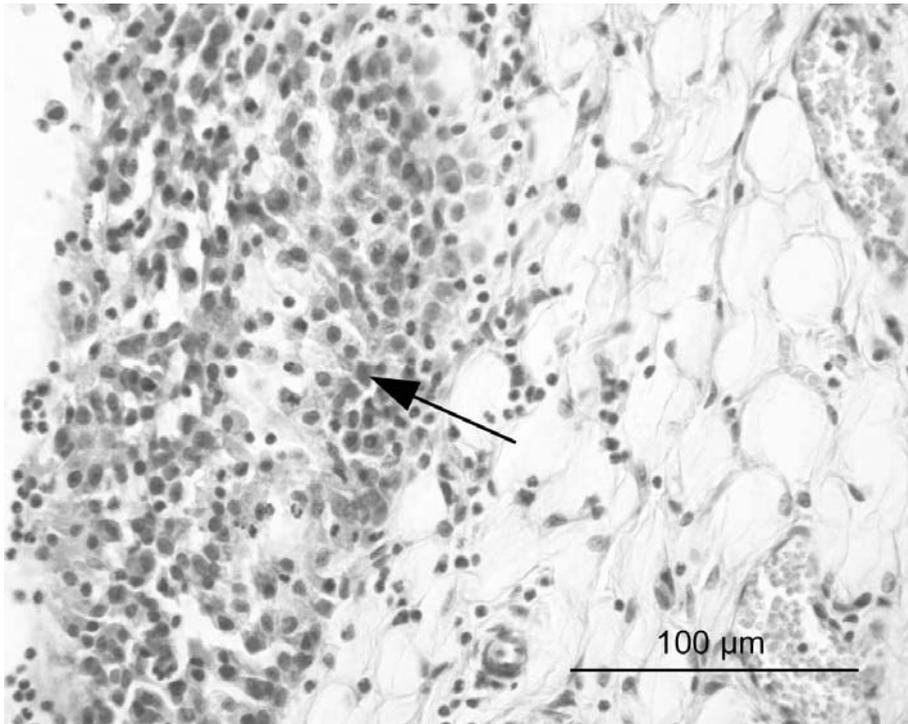


Abb. 19. Tibiotarsal-Gelenk mit mittelgradiger Arthritis. Zelluläre Infiltration der Synovialis, v.a. mit mononukleären Entzündungszellen (Pfeil); HE-Färbung

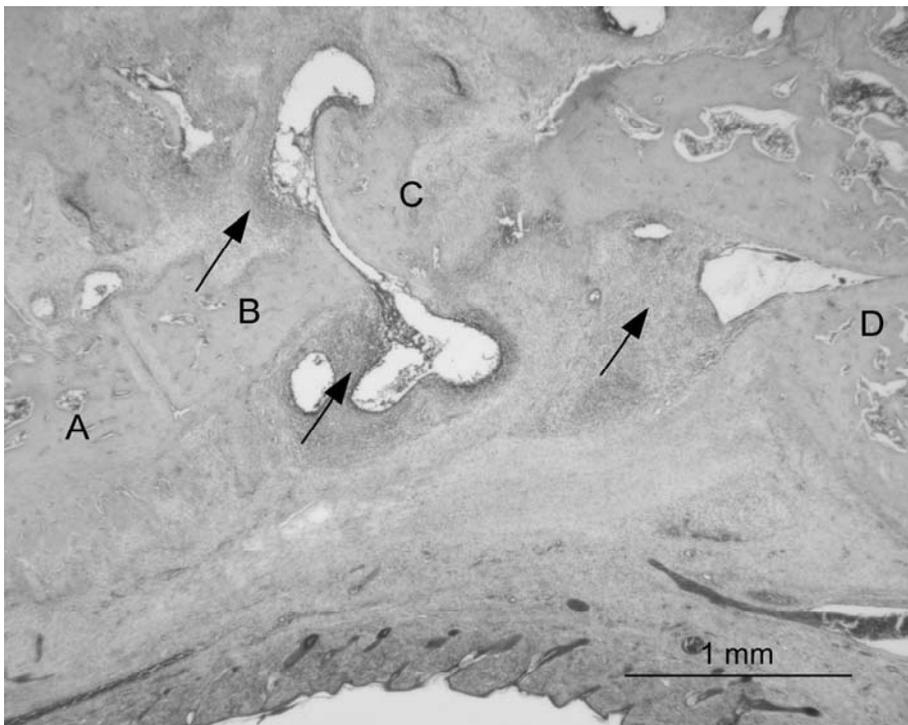


Abb. 20 Ausschnitt aus einem Sprunggelenk (A Os tarsale III, B Os tarsi centr., C Talus, D Tibia) mit hochgradiger Arthritis. Die zum entzündlichen Pannus (Pfeile) veränderte Synovialmembran infiltriert Knorpel und Knochen des Gelenkes; HE-Färbung

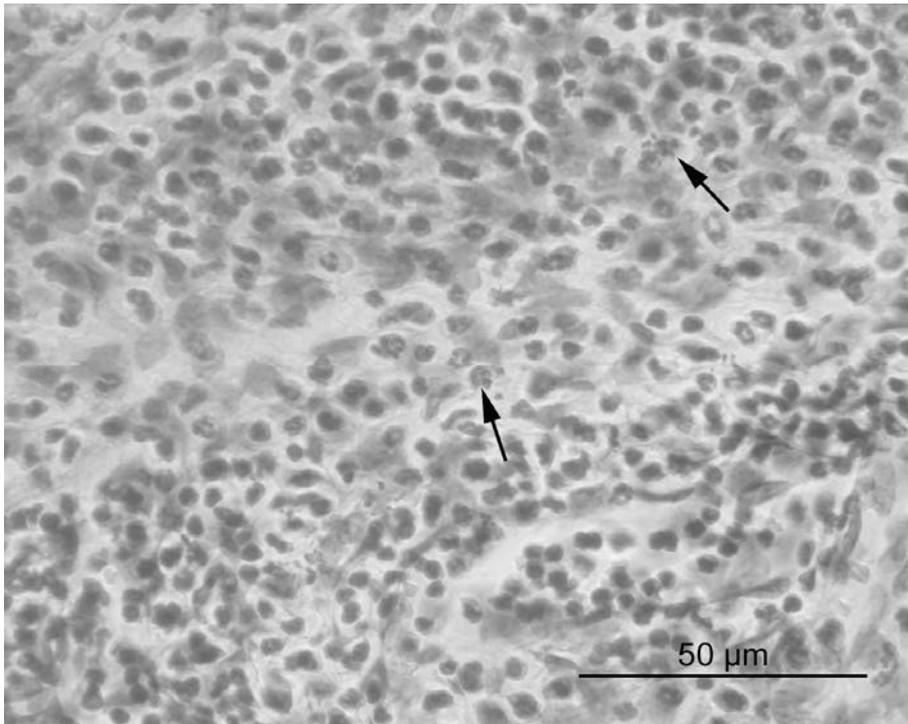


Abb. 21 Entzündlich infiltrierte Synovialis desselben Gelenkes wie in Abb. 21. Neben den mononukleären Entzündungszellen sind zahlreiche neutrophile Granulozyten (Pfeile) zu erkennen; HE-Färbung

Die Gruppeneinteilung wurde, wie bereits erläutert, anhand des histologischen Scores vorgenommen. Die Auswertung der histologischen Schnittpräparate der Sprunggelenke mittels des Score-Systems ergibt für die Kontrolltiere ein einheitliches Bild. Von den 14 Gelenken haben 13 keinerlei histologisch erkennbare Veränderungen, lediglich ein Gelenk ist mit einem Punkt bewertet worden. Der Median dieser Gruppe ist somit Null. Gelenke mit geringgradigen Entzündungszeichen zeigen Werte zwischen 0 und 5 Punkten, deren Median beträgt 2. Arthritische Gelenke mit mittelgradigen Entzündungszeichen variieren in ihren Werten von 6 bis 10 Punkten. Der Median dieser Gruppe beträgt 8. Der Median der stark entzündeten Gelenke ergibt 12 Punkte, die Werte dieser Gruppe reichen bis zu 14 Punkten. Alle Gruppen unterscheiden sich signifikant voneinander (Mann-Whitney-U-Test).

Um einen Zusammenhang zwischen den Signalintensitäten in NIR und MRT und Vaskularisation der Gelenke zu erkennen, wurde die Gefäßdichte innerhalb des synovialen Gewebes beurteilt. Die Anzahl der Blutgefäße wurde nur als Schätzwert erhoben. Auf eine spezifische Gefäßanfärbung wurde verzichtet. Das Ergebnis dieser Auswertung ist nicht in den histologischen Score eingeflossen, da die Abschätzung zu ungenau ist.

Eine Bewertung wird daher nur qualitativ vorgenommen. Mit zunehmend ausgeprägter akuter Synovialitis konnte eine erhöhte Anzahl von Gefäßen in der Synovialis gegenüber den

Kontrollgelenken beobachtet werden. Bei einzelnen Gelenken, die eine deutlich proliferierte, von vielen Fibroblasten bzw. Fibrozyten durchsetzte Gelenkinnenhaut aufwiesen, war die Gefäßdichte im Vergleich zu den Kontrollgelenken weniger deutlich erhöht. Allerdings waren bei diesen Gelenkschnitten massive Knorpel- und Knochenerosionen auffällig.

5.4 Korrelationen zwischen der histologischen Untersuchung und den einzelnen Messmethoden

Mit den folgenden Tabellen und Diagrammen sollen Zusammenhänge zwischen der histologischen Auswertung des Arthritis-Grades und den verwendeten bildgebenden Methoden geprüft und dargestellt werden. Die jeweiligen Korrelationskoeffizienten wurden mithilfe des SPSS-Programms für nicht-normalverteilte Variablen nach Spearman (r_s) berechnet.

Tab. 3: Korrelationskoeffizienten (r_s) nach Spearman, zum Vergleich der Messmethoden NIR und MRT mit den histologischen Ergebnissen

	Histologie	NIR (5 min)	MRT (normiert)
Histologie	1,00	0,74	0,76
NIR (5 min)	0,74	1,00	0,71
MRT (normiert)	0,76	0,71	1,00

5.4.1 NIR-Bildgebung – Histologische Untersuchung

Für die Berechnung der Korrelation wurden die SI der NIR-Messung nach fünf Minuten verwendet, da diese Werte am Besten mit den Ergebnissen aus der MRT-Messung zu vergleichen sind. Es ergibt sich eine hohe Korrelation zwischen den SI der NIR-Messung und der histologischen Auswertung des jeweiligen Sprunggelenkes. Der Korrelationskoeffizient (r_s) beträgt 0,74.

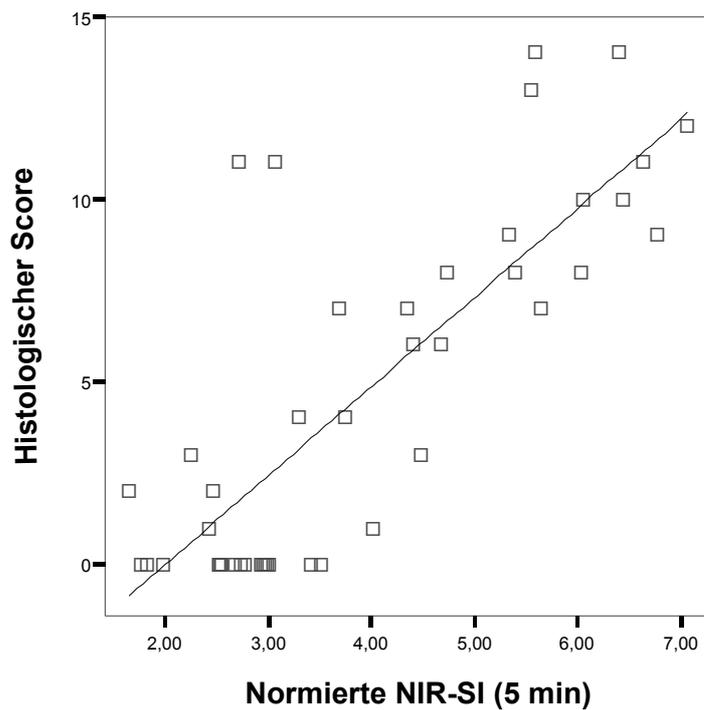


Abb. 22 Korrelation zwischen den NIR-SI nach 5 min und der histologischen Auswertung.
 $r_s = 0,74$

5.4.2 MRT – Histologische Untersuchung

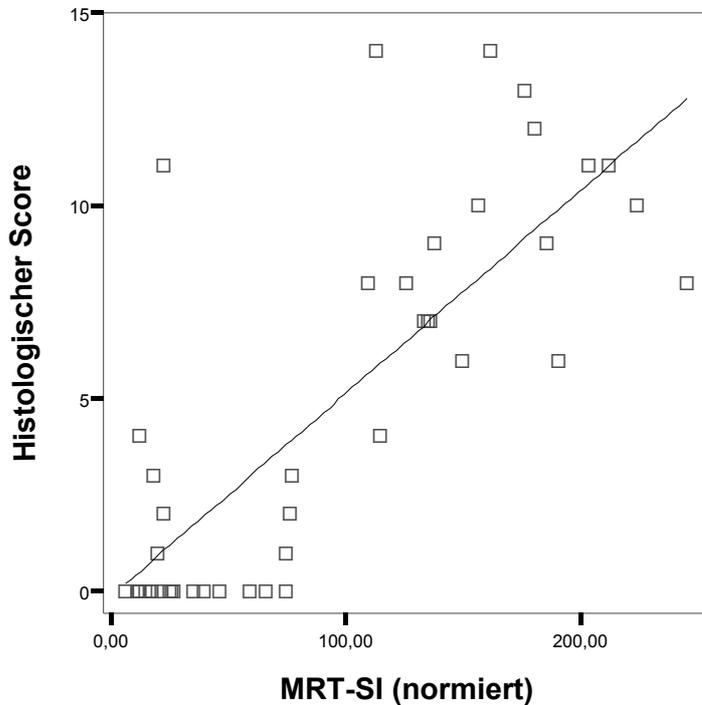


Abb. 23 Korrelation der histologischen Auswertung mit den MRT-Messungen. Es wurde die normierte MRT-SI verwendet. $r_s=0,76$.

Für die Beurteilung der Korrelation aus den Ergebnissen der MRT-Untersuchung wurde der normierte Wert verwendet (Abbildung 23). Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten zeigt, dass die Korrelation zur Histologie fast genau gleich ist wie die der NIR-Messung. Der Korrelationskoeffizient (r_s) ist 0,76, dies ist wiederum eine hohe Korrelation. Auch das Streudiagramm zeigt ein ähnliches Bild.

5.4.3 NIR-Bildgebung – MRT

Die Signalintensitäten der beiden bildgebenden Untersuchungsmethoden korrelieren ebenfalls hoch. Der Korrelationskoeffizient (r_s) beträgt 0,71. Die Streuung der Werte ist im folgenden Diagramm dargestellt.

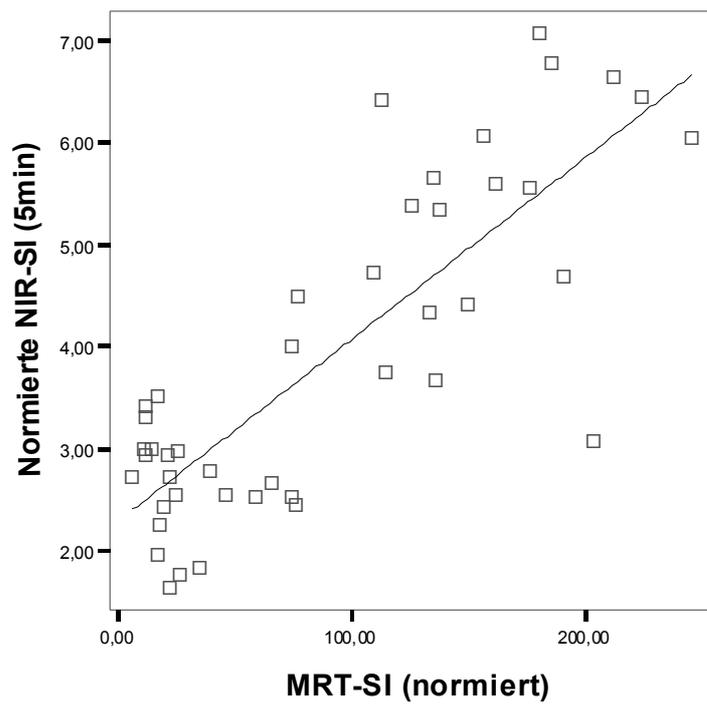


Abb. 24 Korrelation zwischen der NIR- und MRT-Messung. $r_s = 0,71$