

6 Diskussion

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA) des Menschen handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Autoimmunerkrankung, wenngleich ein auslösendes Antigen bisher nicht präzise formuliert werden konnte. Es ist eine systemische Erkrankung welche in der Regel mit einem Befall der peripheren Gelenke beginnt, im Verlauf aber verschiedene andere Organe einbeziehen kann.

Aufgrund seiner hohen Prävalenz von 1% hat die Erkrankung infolge ihrer enormen Kosten, die für Diagnose, Therapie, Rehabilitationsmaßnahmen sowie Arbeitsausfälle aufgewendet werden müssen, eine volkswirtschaftliche Bedeutung erlangt.

Die Diagnose einer RA stützt sich auf klinische Kriterien, Laborparameter und radiologische Befunde. Wichtigstes bildgebendes Verfahren, sowohl zur Beurteilung von Krankheitsstatus als auch seinem Verlauf, ist nach wie vor die konventionelle Röntgenuntersuchung (Hein *et al.*, 1995). Diese vermag eine Arthritis aber erst im chronischen Stadium aufzudecken, also wenn bereits knöcherne Gelenkstrukturen angegriffen sind. Durch den Einsatz ergänzender bildgebender Methoden, wie der Skelettszintigraphie, der Computertomographie, der Arthrosonographie und auch der MRT (Mundinger *et al.*, 1993) konnte die Frühdiagnostik wesentlich verbessert werden. Mittels der Sonographie und MRT ist die Erfassung einer frühen synovialen Entzündung möglich, jedoch ist deren Einsatz aufgrund ihres Zeitaufwandes bzw. der enormen Kosten als Routine-Verfahren begrenzt. Vor diesem Hintergrund ist ein kostengünstiges und weitläufig einsetzbares Verfahren für Frühdiagnostik der entzündlichen Gelenkveränderungen wünschenswert.

Viel versprechend hinsichtlich diagnostischer und ökonomischer Gesichtspunkte erscheint die Bildgebung mittels Licht bestimmter Wellenlängen, die sog. laserinduzierte Fluoreszenzdiagnostik. Es ist ein optisches Verfahren, das zunächst für die Visualisierung oberflächlicher Tumoren entwickelt wurde und bis heute vor allem für die Mammadiagnostik klinisch verwendet wurde (Grosenick *et al.*, 2003). Die mögliche Anwendung der NIR-Bildgebung als diagnostisches Verfahren arthritischer Veränderungen wurde bereits von Weissleder und Mitarbeitern vorgestellt (Bremer *et al.*, 2003).

Das Prinzip der Fluoreszenzdiagnostik beruht auf der Anregung von Molekülen durch die Bestrahlung mit Licht des nahinfraroten Spektrums. Mittels spezieller Laser lässt sich Licht dieser Wellenlängen (700-1000 nm) erzeugen. Die durch das Laserlicht angeregten Moleküle geben ihre Energie in Form von Fluoreszenz wieder ab, welche mithilfe einer speziellen Kamera in Bildpunkte umgesetzt werden kann. Photonen im genannten Wellenlängenbereich haben eine Eindringtiefe von einigen Zentimetern, somit lassen sich an

der Oberfläche gelegene Gewebe gut darstellen. Die Gelenke der Extremitäten sind zu einem Großteil oberflächennah lokalisiert, so dass deren Visualisierung möglich ist.

Erste Ansätze für die Frühdiagnostik einer RA wurden in Studien vorgestellt, deren Bildgebung auf der Streuung von NIR-Licht bei der Durchleuchtung von Fingergelenken beruht (Prapavat *et al.*, 1997; Klose und Hielscher, 1999). Die dafür geeigneten Wellenlängen (675 nm und 905 nm) wurden mithilfe von *ex vivo* Experimenten zur Bestimmung der optischen Eigenschaften von charakteristischem Gewebe (Knochen, Knorpel, Synovia, Synovialis) ausgewählt. Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen, dass allein auf Änderungen in der Lichtstreuung beruhende Verfahren nur bedingt tauglich sind, was auch von anderen Bildgebungsverfahren prinzipiell bekannt ist (Grosenick *et al.*, 2003).

In einer Studie an der Georg-August-Universität Göttingen, wurden die Hände von RA-Patienten unter Zuhilfenahme eines speziell entwickelten Fingerphantoms mit NIR-Licht durchleuchtet und das Streuverhalten untersucht. Es wurde dabei festgestellt, dass interindividuelle anatomische Unterschiede der Gelenke der untersuchten Patienten die Ergebnisse der Methode erheblich beeinflussen. Eine verlässliche Unterscheidung von gesunden und erkrankten Gelenken scheint mittels veränderter Lichtstreuung nicht möglich (Scheel *et al.*, 2002).

Durch den Einsatz von fluoreszierenden Farbstoffen wird eine Verbesserung der Gewebedifferenzierung möglich. Durch sie wird die Fluoreszenz verstärkt, wodurch die Möglichkeit gegeben ist, bei einem vergleichsweise geringen Signaluntergrund (Autofluoreszenz) messen zu können. Die zurzeit eingesetzten NIR-Farbstoffe werden dabei im oben genannten optischen Fenster angeregt und emittieren auch in diesem Spektralbereich. Damit sind die Voraussetzungen für eine NIR-Fluoreszenzbildgebung kleinerer Gelenke, sowohl hinsichtlich der Eindringtiefe des anregenden Lichtes als auch der Austrittstiefe des Fluoreszenzlichtes, gegeben.

In diversen Studien zur Arthritis-Diagnostik mittels MR-Tomographie wurde die verbesserte Bildgebung unter dem Einsatz geeigneter KM bereits bewiesen (König *et al.*, 1990; Bashir *et al.*, 1997). Bisherige Ergebnisse aus einer Studie laserinduzierter Fluoreszenzdiagnostik an der Maus konnten die grundsätzliche Differenzierbarkeit von gesunden und entzündeten Gelenkstrukturen, unter Einsatz der NIR-Farbstoffe ICG und NIR-1, aufzeigen (Fischer *et al.*, 2002; Wojner, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden das Anreicherungsverhalten des von der Schering AG zur Verfügung gestellten Farbstoffes KC 45 im entzündeten Gelenk am Modell der Kollagen-induzierten Arthritis der Ratte untersucht. Wie die Farbstoffe ICG und NIR 9010, gehört er zur Gruppe der fluoreszierenden Cyaninfarbstoffe. Als Versuchstier hat sich die Ratte für das angewandte Arthritismodell besonders bewährt. Sie war aufgrund ihrer Größenverhältnisse

der Maus vorzuziehen, da in Ergänzung zu den Fluoreszenzmessungen noch Untersuchungen im Magnetresonanztomographen durchgeführt wurden, um eine sichere Vergleichsmethode für die Beurteilung der Ergebnisse aus den NIR-Untersuchungen zu haben.

6.1 Arthritisinduktion

Mit der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) der Ratte wurde ein Tiermodell gewählt, das erstmals 1977 beschrieben wurde (Trentham *et al.*, 1977) und bis heute als etablierte Methode für die Forschung der RA Bestand hat. In der Literatur gibt es diverse Angaben über den Krankheitsverlauf, die Abhängigkeit vom Geschlecht und die Empfindlichkeit der verschiedenen Stämme. Für die beschriebenen Versuche wurden ca. fünf Wochen alte weibliche Tiere des Stammes Wistar-Lewis eingesetzt, die zu Beginn des Versuches 160 ± 20 Gramm wogen.

6.1.1 Abhängigkeit vom Geschlecht

Während Trentham beschrieb, dass es für die Kollagen-Arthritis im Gegensatz zur RA keine geschlechtliche Disposition gäbe, bestätigt eine Studie mit Ratten des DA-Stammes, dass weibliche Tiere signifikant häufiger erkranken. Verantwortlich für die erhöhte Prädisposition werden bestimmte Haupthistokompatibilitätsantigene (MHC) gemacht. Es wird vermutet, dass bei Frauen die etwa 2,5 höhere Erkrankungsrate gegenüber Männern auf demselben genetischen Hintergrund beruht (Remmers *et al.*, 2002). Andere Studien beschreiben einen Androgenmangel, der sowohl bei Männern als auch bei Frauen in Zusammenhang mit dem Auftreten einer RA vorliegen kann (James, 1993). In tierexperimentellen Studien konnte ein chondroprotektiver Effekt von Androgenen nachgewiesen werden, der offenbar mit der Suppression der IL-1-Synthese assoziiert ist (Hermann *et al.*, 1993). IL-1 ist als Schlüsselzytokin in der Ätiologie der RA bekannt.

Aus Vorversuchen zu dieser Arbeit hat sich ergeben, dass deutlich mehr weibliche Ratten des Wistar-Lewis-Stammes eine Arthritis nach Kollagen-Injektion entwickelten als männliche Tiere, so dass für die endgültigen Untersuchungen nur weibliche Tiere eingesetzt wurden.

6.1.2 Abhängigkeit vom genetischen Muster eines Organismus

Experimentelle Studien weisen sowohl für die RA als auch die CIA auf eine genetische Abhängigkeit hin (Durie *et al.*, 1994).

Von den 15 Ratten, denen mittels löslichem Kollagen Typ II eine Arthritis induziert werden sollte, erkrankten 13 Tiere, zum Teil unilateral. Die Suszeptibilität wird von Trentham für

Ratten mit ca. 40-100% angegeben (Trentham *et al.*, 1977), wobei er weder eine genaue Aussage für die in dieser Studie verwendeten Wistar-Lewis-Ratten trifft, noch über das Verhältnis von männlichen zu weiblichen erkrankten Tieren.

Im Vergleich zu den Angaben in der Literatur war die Suszeptibilität mit ca. 87% in diesem Versuch sehr hoch, was auf die verwendete Tierzahl zurückzuführen sein könnte. Die genetische Disposition dieser Gruppe war möglicherweise durch Zufall besser und kann nicht den Durchschnitt einer Population widerspiegeln. Andererseits ist die für diese Studie verwendete Kombination von weiblichen Lewisratten sowie die Rezeptur der Kollagenaufbereitung bisher in der Literatur so nicht beschrieben und erzielt möglicherweise bessere Ergebnisse als andere Methoden.

6.2 NIR-Messungen

6.2.1 Abhängigkeit der NIR-Signalintensität von der Dosis

Studien am Arthritismodell der Maus hatten gezeigt, dass eine günstige Dosierung für die Differenzierung von Kontroll- und Arthritis-Tieren für die NIR-Farbstoffe ICG und NIR-1 1 µmol pro kg KGW ist. Bei 2 µmol trat bereits ein Überdosierungseffekt auf (Fischer *et al.*, 2002; Wojner, 2004). Vorversuche mit dem Farbstoff KC 45 an der Maus, wie auch an der Ratte, ergaben dieselbe Aussage, so dass für die Versuche dieser Arbeit eine Farbstoffdosierung von 1 µmol pro kg KGW gewählt wurde.

6.2.2 NIR-Signalintensitäten der Sprunggelenke im Verlauf der Zeit

Das Anreicherungsverhalten des Farbstoffes zeigte deutliche Parallelen zwischen den vier Gruppen auf. Die Messzeitpunkte wurden aufgrund der Ergebnisse aus Vorversuchen bestimmt. Die SI waren, sowohl bei Arthritis- als auch bei Kontroll-Tieren, im Durchschnitt fünf Minuten nach Farbstoff-Applikation am höchsten (siehe Tab. 2). Die Gruppe B mit mittelgradiger Arthritis erzielte hingegen nach zehn Minuten einen höheren Median als nach fünf Minuten. Aber auch bei einzelnen Tieren anderer Gruppen war die Anreicherung im Gelenk nach zehn etwas höher als nach fünf Minuten. Da dieser Effekt unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit beobachtet wurde, kann er nicht mit den pathologischen Veränderungen im Gelenk zusammenhängen. Die verzögerte Anreicherung mancher Gelenke scheint vielmehr auf einer langsameren Verteilung des Farbstoffes als bei den anderen Tieren zu beruhen. Ein Grund könnte die verwendete Xylazin/Ketamin-Injektionsnarkose sein, die bekanntermaßen zu einer Blutdruckdepression führt (Löscher, 2002), welche eine verlängerte Kreislaufzeit bedingt. Somit kann die Anreicherung im

Gewebe, abhängig von der Narkosetiefe, zwischen den einzelnen Tieren variieren. Die SI sind bei allen Gruppen nach 30 min deutlich geringer als nach 5 min. In dieser Zeitspanne ist schon über die Hälfte der applizierten Farbstoffmenge aus dem Kreislauf eliminiert, da die Bluthalbwertszeit von KC 45 ca. 26 min beträgt. Die 60 und 120 min nach Farbstoff-Injektion weiterhin kontinuierlich gesunkenen SI beruhen auf der schnellen Elimination über die Leber. Aufgrund seiner Proteinbindung von 40% extravasiert der Farbstoff nur mäßig und wird deshalb zu einem Teil aus dem Blut von der Leber eliminiert und hepato-biliär ausgeschieden. Da der Ausscheidungsmechanismus jedoch nicht endgültig geklärt ist, gibt es für die Ratte keine genauen Angaben (Licha, 2003). In diversen Studien am Tumormodell der Nacktmaus wurde das Verhalten der verschiedenen NIR-Farbstoffe geprüft. Ein wichtiger Parameter ist der Tumor/ Gewebe-Kontrast, der für den NIR-Farbstoff KC 45 zu einem Zeitpunkt von vier Stunden am höchsten ist (Licha, 2003). Dieses Ergebnis scheint nicht im Einklang mit den SI-Messungen dieser Arbeit zu stehen, da sich bereits nach zwei Stunden die Signalintensitäten von gesunden und entzündeten Gelenken nicht mehr signifikant unterscheiden. Die Kinetik eines Kontrastmittels im Tumor ist aber nicht mit der Kinetik im entzündlichen Gewebe eines Gelenkes zu vergleichen. Im Tumor herrschen andere Druckverhältnisse als im Gelenk. Durch die ungeordneten Gefäßstrukturen im Tumor sind sowohl der venöse Blutabfluss als auch der Abtransport der Lymphe häufig gestört, während die arterielle Blutzufuhr durch Neovaskularisation gesteigert ist (Jain, 1988). Als Folge nimmt der Druck im Tumorrinneren zu. Kontrastmittel, das nach intravenöser Applikation in den Tumor gelangt ist, wird aufgrund der gestörten Abflussbedingungen über einen längeren Zeitraum dort verweilen als im entzündlich veränderten Gewebe. Somit ist erklärlich, warum das Maximum der Kontrastgebung des verwendeten Farbstoffes im Tumor wesentlich später als im Gelenk auftritt.

6.2.3 NIR-Signalintensitäten der Sprunggelenke abhängig vom Entzündungsgrad

Wie in Kapitel 4. erläutert, wurden die Gelenke der Ratten in vier Gruppen unterteilt, in Kontrollgelenke (Gr. K) und Gelenke mit geringgradigen (Gr. A), mittelgradigen (Gr. B) sowie hochgradigen (Gr. C) Entzündungszeichen. Die Einteilung erfolgte nach dem histologisch festgestellten Entzündungsgrad. Daher sind die Gruppengrößen nicht einheitlich. Bei einer geringeren Zahl an untersuchten Gelenken kommen Schwankungen der Messbedingungen stärker zum Tragen, als bei einem größeren Stichprobenumfang. Die Messungen fanden für je sechs Tiere jeweils am selben Tag statt, so dass die Bedingungen innerhalb einer Gruppe desselben Tages als relativ konstant zu werten sind. Die Gruppen

eines Tages umfassten jeweils Kontroll- und Arthritisratten.

Zwischen den einzelnen Messtagen konnten aber leichte Veränderungen im technischen Aufbau nicht vermieden werden. So variierten die Wellenlängen des verwendeten Laserlichtes, der Abstand zwischen Kamera und untersuchtem Tier wie auch die Ausleuchtung des Untersuchungsfeldes. Diese Änderungen waren jeweils nur minimal, konnten aber aufgrund der momentanen Untersuchungsbedingungen nicht verhindert werden. Die Auswertungen der SI ergaben, dass diese Schwankungen eine gewisse Fehlerquelle darstellen, die aber mithilfe des Auswertverfahrens zu minimieren versucht wurde. Mit Einrichtung eines festen Messplatzes und einer konstanten Messapparatur wären die Untersuchungsbedingungen für eine klinische Anwendung leichter zu standardisieren.

Auch wechselnde klimatische Verhältnisse sind in diesem Zusammenhang zu erwähnen. Bei höheren Umgebungstemperaturen ist der Blutdruck eines Organismus gesteigert und kann die vermehrte Durchblutung peripherer Regionen bedingen. Infolge einer stärkeren Durchblutung kann die Permeabilität erhöht sein und somit der injizierte Farbstoff schneller extravasieren. Dieser Effekt führt dann zu einer verstärkten Signalgebung.

Abbildung 10 zeigt, dass sich die Boxplots der Kontrollgruppe, über alle gemessenen Zeitpunkte hinweg, von denjenigen der Gruppe mit geringgradiger Arthritis (Gr. A) nur wenig unterscheiden. Diese geringe Differenz hängt von der Gruppeneinteilung ab. Um eine klare Abgrenzung zwischen Kontroll- und Arthritistieren zu erhalten, wurden sämtliche Tiere die eine Kollageninjektion erhielten der Gruppe der Arthritis-Ratten zugeordnet. Wie bereits erläutert, entwickelten jedoch nicht alle dieser Tiere eine entzündliche Gelenkveränderung, bzw. prägte sich diese nur unilateral aus. Somit sind in der Gruppe der geringgradigen Arthritis, Gelenke die keinerlei Entzündungsmerkmale aufwiesen, vertreten. Laut histologischem Score wiesen vier der zwölf Gelenke dieser Gruppe, ebenso wie die Gelenke der Kontrolltiere, keinerlei Veränderungen auf. Eine nochmalige Unterteilung dieser Gruppe war jedoch nicht möglich, da die Probandenzahl vier für statistische Berechnungen zu klein ist.

Die Gruppen B und C heben sich deutlich von der Gruppe A mit geringgradigen Entzündungserscheinungen ab, unterscheiden sich untereinander aber nur wenig. Da die Gruppengrößen mit elf und sieben Gelenken eine große Differenz aufweisen, ist der Vergleich der Gruppen schwierig. Die deutlich stärkere Signalgebung der Gelenke mit histologisch mittelgradigen Veränderungen gegenüber den geringgradig entzündeten Gelenken beweist, dass eine stärkere Entzündung ein deutlicheres Fluoreszenzsignal verursacht. Es ist zu vermuten, dass eine sehr massive Entzündung, die zum Teil schon Merkmale von Chronizität aufweist, keine höhere SI aufweist als eine mittelgradige Entzündung.

Die Arthritiden mittleren (Gr. B) und starken (Gr. C) Grades lassen sich mit diesem Verfahren gut darstellen und signifikant von nicht-entzündeten Gelenken abgrenzen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sicherlich auch leichte Gelenkentzündungen mit der NIR-Bildgebung detektiert werden können. Weitere Untersuchungen mit derselben Fragestellung und einer höheren Tierzahl zugunsten der genaueren Statistik, wären hinsichtlich des Tierschutzes nicht vertretbar gewesen.

6.2.4 Abhängigkeit der NIR-Signalintensitäten vom applizierten Farbstoff

Eine Differenzierung von gesunden und arthritischen Gelenken allein auf der Basis von NIR-Licht ist nicht verlässlich (Scheel *et al.*, 2002), es bedarf des Einsatzes von fluoreszierenden Farbstoffen. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist vom verwendeten Farbstoff abhängig, der sich möglichst konzentriert im entzündeten Gewebe anreichern sollte, um einen hohen Kontrast zum gesunden Gewebe zu erzielen.

In dieser Arbeit wurde der Cyaninfarbstoff KC 45 verwendet, dessen Verhalten im entzündeten Gewebe bisher nicht bekannt ist. Der Farbstoff mit Indotricarbocyanin-Grundstruktur ist, wie auch die anderen Stoffe dieser Gruppe, anionisch und hydrophil. Er bindet etwa zu 40 % an Serumproteine, daher kann nur ca. 60% der applizierten Menge extravasieren und sich im entzündeten Gelenk anreichern. Der aus den Gefäßen diffundierte Farbstoff ist der Anteil, der über einen längeren Zeitraum fluoreszieren kann. Der gebundene Anteil wird schnell über die Leber aus dem Blut eliminiert, kann somit also keine Fluoreszenz verursachen. Der Rest wird vermutlich renal ausgeschieden (Licha, 2003).

Welche Mechanismen, außer der Proteinbindung, für die SI maßgeblich sind, ist nicht geklärt. Wichtig dürfte neben der Bluthalbwertszeit auch die Halbwertszeit im Gewebe sein, die vom pH-Wert sowie vom Zellmilieu abhängig ist. Untersuchungen hinsichtlich dieser Fragestellung liegen zu dem verwendeten Farbstoff noch nicht vor.

Da es sich bei dem NIR-Farbstoff KC 45 um eine niedermolekulare Substanz handelt, kann angenommen werden, dass seine pharmakokinetischen Eigenschaften denen eines niedermolekularen MR-Kontrastmittels ähneln (Wagner, 2004). Untersuchungen mit den üblicherweise für die Arthritisdiagnostik verwendeten niedermolekularen Gd-Kontrastmitteln haben gezeigt, dass diese im Extrazellulärraum der entzündeten Synovialmembran akkumulieren und somit den Ort der Entzündung anzeigen. Die Anreicherungs- und -zeit sind von der Gewebepfusion und der mikrovaskulären Permeabilität abhängig (Ostergaard *et al.*, 1998).

Die Synovialis zeichnet sich durch einen besonderen anatomischen Aufbau aus. Im Gegensatz zu Schleimhäuten verfügt sie nicht über eine Basalmembran oder tight junctions, so dass Gd in den Gelenkspalt diffundieren kann und dort zusätzlich für eine gesteigerte

Signalgebung der Gelenkflüssigkeit sorgt (Ostergaard und Klarlund, 2001).

Die Proteinbindung von Gd-Chelat-Kontrastmitteln ist vernachlässigbar gering. Somit liegen sie im Blut überwiegend in freier Form vor und können deswegen schnell in den Extrazellulärraum diffundieren. Bereits zehn Minuten nach Applikation enthält das Plasma nur noch 20% der verabreichten Kontrastmittelmenge (Felix, 1997). In einem Gewebe mit vermehrter Vaskularisation und Perfusion, wie der entzündeten Synovialmembran, reichern sie sich infolgedessen vermehrt an und sorgen für eine stärkere Signalgebung.

Ein weiteres Kontrastmittel für die MRT, das seit kürzerem in Studien der Arthritis-Diagnostik eingesetzt wird, ist das niedermolekulare Gd-haltige und proteinbindende MS-325. In Bezug auf die Visualisierung von Arthritiden, wird für diese Substanz eine stärkere und längere Kontrastgebung beschrieben als für herkömmliche Gd-Chelat-Kontrastmittel. Die guten signalgebenden Eigenschaften von MS-325 werden seiner hohen Bindungskapazität (85-95%) an Proteine zugeschrieben (Parmelee *et al.*, 1997). Die Substanz bindet dabei vornehmlich an Albumin, das in entzündeten Geweben, infolge der gesteigerten Permeabilität der Gefäße, aus dem Plasma extravasiert. Somit kann das KM lokal gebunden werden, was für eine verlängerte Signalgebung der entzündeten Synovialmembran sorgt (Jiang *et al.*, 2002).

Der NIR-Farbstoff KC 45 hat mit 40% eine Proteinbindungskapazität, die zwischen derjenigen der beiden beschriebenen MRT-Kontrastmittel liegt. Die Extravasation dürfte demnach geringer sein als bei den gebräuchlichen Gadoliniumchelaten. Damit kann sich zunächst sehr wahrscheinlich weniger Farbstoff in der Synovialmembran anreichern. Aufgrund seiner relativ hohen Bindungskapazität, wobei der Großteil an Albumine bindet, kommt bei dieser Substanz aber sicherlich auch der Effekt der lokalen Proteinbindung, ebenso wie bei MS-325 zum Tragen. Die Anreicherung und folglich auch die Kontrastgebung dürften somit länger sichtbar sein, als bei einem Farbstoff, der zu einem geringeren Anteil an Proteine bindet.

6.3 MRT-Messungen

Die Untersuchung im Magnetresonanztomographen wurde als ergänzendes Verfahren gewählt, um die Sensitivität der NIR-Bildgebung mit einer etablierten Methode vergleichen zu können.

Die MR-Tomographie ist eine immer häufiger eingesetzte bildgebende Methode für die Diagnose einer frühen Arthritis. Sie ist nützlich um Weichteil- wie auch Knochen-Läsionen aufzudecken. Synoviale Membranen, Sehnen, Sehnenscheiden, Bänder, Knorpel, destruirende Prozesse im Gelenk wie auch Synovialzysten können aufgrund des hohen

Weichteilkontrastes sensitiv erfasst werden. Osteonekrosen werden mittels MRT-Untersuchung frühzeitiger als im konventionellen Röntgenbild erkannt.

An Hand- und Fingergelenken gelingt mittels MRT frühzeitig der Nachweis eines entzündlichen Weichteilprozesses. Durch den Einsatz von geeigneten KM kann in der Humanmedizin aktiver Pannus von inaktivem fibrösem Gewebe unterschieden werden (Backhaus *et al.*, 2002).

Sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Tieren mit einer Arthritis wurden im Anschluss an die NIR-Messungen magnetresonanztomographische Untersuchungen durchgeführt. Es wurde jeweils eine T₁-gewichtete Leeraufnahme, wie auch eine T₁-gewichtete kontrastmittelgestützte Aufnahme mit Fettsättigung gemessen. Für die Untersuchung der Ratten wurde das Gd-haltige Kontrastmittel Omniscan™ eingesetzt, wie es in der Humanmedizin für die Untersuchung arthritischer Fingergelenke üblich ist (Taupitz, 2004).

6.3.1 MRT-Signalintensitäten der Sprunggelenke abhängig vom Entzündungsgrad

Die Ergebnisse weisen Parallelen zu den NIR-Messungen auf. Auch das MRT-Bild zeigt keine signifikanten SI-Unterschiede zwischen den Kontrollgelenken und Gelenken mit geringen Entzündungszeichen. Dies ist, wie bei den NIR-Untersuchungen erläutert, höchstwahrscheinlich auf die Gruppenzusammenstellung zurückzuführen. Diese Aussage trifft sowohl für die Leer-, als auch für die KM-gestützte Aufnahme zu. Signifikant unterscheiden sich hingegen die Gelenke mit mittel- (Gr. B) und hochgradig (Gr. C) starken Entzündungen von den Kontrollgelenken. Diese deutlichen Signalunterschiede sind im Gegensatz zur Fluoreszenzmessung bereits vor Gabe des KM zu sehen.

Die SI-Änderungen im Leerbild beruhen auf den pathologischen Vorgängen im Gelenk, die mit der Entzündung einhergehen. Eine akute Arthritis, die bei den untersuchten Ratten vorgelegen hat, beginnt mit einem Gelenkerguss. Durch Änderung der Perfusions- und Permeabilitätsverhältnisse ist im Gelenk mehr Synovia vorhanden, die dünnflüssiger ist und einen erhöhten Albuminanteil als im gesunden Zustand aufweist. Das Albumin wirkt quasi als biologisches Kontrastmittel, indem es durch Verkürzung der Relaxationszeit zu einem Anstieg des T₁- und T₂-Signals führt. Außer dem Erguss im Gelenk kommt es zu einer Ödematisierung der Synovialmembran. Durch die erhöhte Anzahl an Wassermolekülen wird wiederum ein erhöhtes Signal erreicht.

Somit kann die magnetresonanztomographische Messung Arthritiden, die mit histologisch erkennbaren Veränderungen einhergehen, ohne Einsatz von Kontrastmittel aufdecken, was die NIR-Bildgebung nicht vermag.

6.3.2 MRT-Signalintensitäten nach Kontrastmittelgabe

Die beste Methode eine Synovialitis mittels MRT zu erkennen, ist die intravenöse Applikation eines Gadolinium-Chelates, wie Gd-DTPA (Reiser und Naegele, 1993). Die Aufnahme des Gd-DTPA ist ein zeitabhängiges Phänomen, das einerseits von der Gewebepерfusion, andererseits von der Permeabilität der Kapillaren bestimmt wird. Da die entzündete Synovialmembran durch eine erhöhte Gefäßdichte, wie auch durch eine gesteigerte Permeabilität gekennzeichnet ist, akkumuliert das Gadolinium-Chelat im Extrazellulärraum. In der Humanmedizin erlaubt eine Gadolinium-gestützte dynamische MRT die Abschätzung der Verbreiterung der Synovialmembran (Ostergaard *et al.*, 1998). Eine entsprechende Aussage konnte mit den in dieser Arbeit angefertigten MRT-Bildern von den Rattengelenken indes nicht gemacht werden. Das verwendete klinische 1,5 Tesla-Gerät erreicht nicht die räumliche Auflösung, die den Größenverhältnissen der untersuchten Gelenke angepasst wäre.

Die Untersuchungsergebnisse nach i.v.-Injektion des Gadoliniumkontrastmittels in einer Dosierung von 0,2 mmol/ kg KGW weichen nicht wesentlich von den Leermessungen ab. Auch im KM-gestützten Bild konnten die Gelenke mit geringgradigen histologischen Veränderungen nicht signifikant von den Kontrollgelenken abgegrenzt werden. Da die MRT aber für ihre gute Detektion von Synovitiden bekannt ist (Backhaus *et al.*, 2002), hängt dieses Ergebnis sehr wahrscheinlich auch mit der Gruppeneinteilung zusammen. Wie zu erwarten, grenzen sich die Gruppen B und C hingegen signifikant von der Kontrollgruppe ab und das mit einem deutlicheren Kontrast als in der Leermessung (siehe Abbildungen 12 und 13).

Um die Ergebnisse möglichst gut mit den Literaturangaben vergleichen zu können, wurde auch eine auf den Leerwert normierte SI berechnet (Formel siehe Kap. 4.6.2.). Diese berechneten Ergebnisse ähneln den nicht-normierten Werten in der KM-gestützten Messung stark, was auch in der Abbildung 14 durch Boxplots graphisch sichtbar wird. Diese unterscheidet sich kaum von der Abbildung 13.

6.4 Histologische Auswertung

Die Kollagen-induzierte Arthritis der Ratte ist ein bereits gut erforschtes Tiermodell. In histopathologischen Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten wurde herausgefunden, dass die Kollagenarthritis eine chronisch proliferierende Synovialitis ist, die in zwei Phasen verläuft (Trentham *et al.*, 1977; Caulfield *et al.*, 1982). Der akute Prozess beginnt nach Trentham *et al.* (1977) mit Ödematisierung der Synovialmembran und einer Infiltration von zahlreichen mononukleären Entzündungszellen und vereinzelt neutrophilen Granulozyten.

Außerdem ist eine Fibrinablagerung auf der Synovialmembran und der Knorpeloberfläche zu beobachten (Caulfield *et al.*, 1982). Die Synovialis proliferiert durch eine vermehrte Mitose der Synoviozyten und fibrosiert im späteren Stadium. Dieser von Entzündungszellen durchsetzte Pannus legt sich der Knorpeloberfläche auf und ist für den Abbau von Knorpel- und Knochensubstanz im Gelenk verantwortlich. Die Angaben über die zeitlichen Zusammenhänge variieren zwischen den Autoren. Von Trentham werden des Weiteren periostale Zubildungen beschrieben, die eine Ankylose des Gelenkes beschleunigen (Trentham, 1982).

Die histologische Auswertung der in dieser Arbeit untersuchten Ratten ergibt sehr ähnliche Befunde wie sie in der Literatur beschrieben sind.

6.4.1 Ergebnisse der histologischen Score-Auswertung

Die histologischen Präparate sind am selben Tag entnommen worden wie auch die NIR- und MRT-Messungen durchgeführt wurden und spiegeln somit den histopathologischen Zustand zu diesem Zeitpunkt wider. Es wurde von allen 44 untersuchten Gelenken ein HE-gefärbtes Schnittpräparat angefertigt.

Die Auswertung der histologischen Schnitte mittels des Score-Systems für murine Arthritiden, das in Zusammenarbeit mit Prof. Krenn (Institut für Pathologie, Charité Campus Mitte, Berlin) entwickelt wurde, ergab Veränderungen, die zwischen 0 und 14 Punkten liegen. Der Score beinhaltet folgende Kriterien: Synovialitis, Tenosynovitis, Knorpel-/Knochendestruktion, Periostitis und Periarthritis.

Anhand der histologischen Beurteilung wurden die entzündeten Gelenke in drei Gruppen unterteilt, die Kontrolltiere wurden in eine separate Gruppe eingeteilt. Da die Auswertung fünf Kriterien umfasst, die mit jeweils 0-3 Punkten bewertet werden, ergibt sich ein maximal möglicher Score-Wert von 15 Punkten. Somit wurden Gelenke mit einem Ergebnis zwischen 0 und 5 Punkten als geringgradig (Gr. A), zwischen 6 und 10 Punkten als mittelgradig (Gr. B) und zwischen 11 und 15 Punkten als hochgradig (Gr.C) arthritisch eingestuft.

Die Gruppeneinteilung der Ratten mit einer induzierten Arthritis ergab sich also zufällig und ist mit 12 (Gr. A), 11 (Gr. B) und 7 (Gr. C) Gelenken relativ unausgeglichen. Demgegenüber stehen 14 Kontrollgelenke.

Die Gruppe der Kontrolltiere zeigt ein einheitliches histologisches Bild. Lediglich ein Tier hat einseitig eine schwache Periarthritis, während die übrigen Tiere histologisch vollkommen unauffällig sind. Somit ergibt sich ein Median von null Punkten. Diese pathologische Veränderung scheint aber so minimal zu sein, dass sie weder in der MRT noch in der NIR-Bildgebung zu einer Signalerhöhung geführt hat. Das Gelenk fällt nicht aus dem Durchschnitt der anderen Gelenke heraus. Bei der klinischen Untersuchung war ebenfalls keine

Veränderung zu erkennen.

Die Gruppe A umfasst vier Gelenke die keinerlei histologische Veränderungen aufwiesen. Diese Gelenke waren auch klinisch unauffällig. Trotz systemischer Injektion des Kollagens ist eine einseitige Ausprägung des Krankheitsbildes häufig, was auch in der Literatur beschrieben ist (Trentham *et al.*, 1977). Da andere Entzündungserscheinungen wie beispielsweise Vaskulitiden nicht ausgeschlossen werden konnten, sind diese Gelenke, wie bereits erläutert der Gruppe A zugeordnet worden.

Die übrigen Gelenke variierten in ihrem Ergebnis, hauptsächlich waren geringe bis mittelgradige Entzündungen der Synovialmembran zu erkennen, zum Teil in Verbindung mit einer leichten Periarthritis. Die Verbreiterung der synovialen Deckzellschicht und Infiltration von Entzündungszellen als erstes histologisches Kennzeichen einer CIA stimmt mit den Angaben in der Literatur überein (Trentham *et al.*, 1977; Caulfield *et al.*, 1982). Pathologische Veränderungen des Knorpels und Knochens oder der Sehnenscheiden waren nicht festzustellen. Der Median dieser Gruppe fällt mit zwei Punkten, durch die mit erfassten Gelenke ohne pathologische Zeichen, relativ gering aus.

Die Gelenke der Gruppe B mit mittelmäßigen Entzündungszeichen weisen im histologischen Präparat neben einer stärkeren Synovialitis, die sich häufig schon zum Pannus ausgebildet hat, auch Knorpel- und zum Teil bereits Knochenerosionen auf. In manchen Präparaten ist auch eine milde Periostitis erkennbar.

Die hochgradig arthritischen Gelenke unterscheiden sich von der vorherigen Gruppe durch eine massive Entzündung der Synovialmembran, die zum Teil bereits fibröse Anteile aufweist. Diese Form der Synovialitis mit Tendenz zur Chronifizierung beschreiben auch Trentham und Caulfield (Trentham *et al.*, 1977; Caulfield *et al.*, 1982). In Schnittpräparaten mit massiver Infiltration von Entzündungszellen zeichnen sich sehr viele neutrophile Granulozyten ab, die bei einer leichten Synovialitis nur vereinzelt auftreten. Nach Trentham *et al.* (1977) würde dies wiederum für ein fortgeschrittenes Stadium sprechen. Alle Gelenke dieser Gruppe zeigen mehr oder weniger starke Knorpel- und Knochenerosionen, außerdem Periarthritiden, die bei starker Ausprägung auf die Sehnenscheiden übergreifen. Eine Tenosynovitis konnte immer nur in Zusammenhang mit deutlichen Entzündungszeichen im periartikulären Gewebe beobachtet werden.

Die in den jeweiligen Gruppen beobachteten variierenden Entzündungszeichen entsprechen im Wesentlichen den in der Literatur beschriebenen Stadien. Da jedoch die Tiere jeweils am 15. Tag nach Immunisierung untersucht und euthanasiert wurden, klinische Symptome aber frühestens am Tag 12 sichtbar waren, ist davon auszugehen, dass der pathologische Prozess bei den einzelnen Tieren zu variierenden Zeitpunkten begonnen hat.

Aus Vorversuchen ist bekannt, dass Tiere, die am 15. Tag noch keine Symptomatik

aufwiesen, auch weiterhin keine Arthritis entwickelten.

6.5 Korrelationen

6.5.1 Korrelation: NIR-Bildgebung – Histologische Untersuchung

Für die Berechnung der Korrelation wurde aus zwei Gründen jeweils der SI-Wert nach fünf Minuten gewählt. Erstens ist der Median der Ergebnisse zu diesem Zeitpunkt im Durchschnitt am höchsten und zweitens ist dieser Zeitwert am besten mit der kontrastmittelgestützten MRT-Messung vergleichbar.

Die Ergebnisse der NIR-Messung und der histologischen Auswertung korrelieren hoch ($r_s = 0,74$). Somit lässt sich der Schluss ziehen, dass der **Nachweis einer Arthritis im Sprunggelenk der Ratte mit der Methode der Fluoreszenzmessung unter Verwendung des Farbstoffes KC 45 sensitiv möglich ist**. In den entzündlich veränderten Gelenkstrukturen wird ein höherer Kontrast erreicht, als in histologisch unveränderten Gelenken.

In dieser Korrelationsberechnung sind alle Gelenke mit ihren unterschiedlichen Entzündungsstadien erfasst. Wie beschrieben haben einige dieser Gelenke neben den Weichteilveränderungen bereits Läsionen des Knorpel- bzw. Knochengewebes. Nach der Klassifizierung der RA sind diese nicht mehr als frühe Arthritiden einzustufen. Die Zahl der untersuchten Gelenke, die nur Entzündungen des Weichteilgewebes aufweisen ist aber zu gering, um eine Korrelation zu berechnen. Der Nachweis, dass auch ganz frühe arthritische Veränderungen mittels NIR-Bildgebung bei der Ratte erkannt werden können, müsste durch Messungen zu früheren Zeitpunkten nach Immunisierung erbracht werden. Im Kniegelenk der Ratte beginnt das erste Entzündungsstadium teilweise bereits nach fünf Tagen, obwohl klinische Symptome frühestens nach zehn Tagen auftreten (Trentham, 1982).

Die Ergebnisse aus der Studie mit arthritischen Mäusen, die zum Großteil keinerlei Läsionen des Knorpels und Knochens aufweisen, aber dennoch Kontrasterhöhungen lieferten (Fischer *et al.*, 2002; Wojner, 2004), lassen aber die Vermutung zu, dass die Korrelation auch bei Gelenken ohne Knorpel- und Knochenveränderungen hoch wäre.

Welche der beschriebenen histologischen Veränderungen für die gesteigerten SI der NIR-Bildgebung verantwortlich sind, ist nicht bekannt. Studien mit kontrastmittelgestützter MRT geben die erhöhte Gefäßdichte, wie auch eine gesteigerte Extravasation, als Ursache für eine verstärkte Signalgebung der entzündeten Synovialmembran an (Jiang *et al.*, 2002). Es ist anzunehmen, dass für die NIR-Bildgebung dieselben Mechanismen verantwortlich sind. Damit würde die stagnierende Kontrastgebung bei steigender Entzündung mit der Anzahl der Gefäße in Verbindung stehen. Um einen Beweis dieser These zu erbringen, müsste man

eine spezifische Gefäßfärbung durchführen. Wie bereits erläutert, konnte aber beobachtet werden, dass die Gefäßdichte mit massiver Synovialitis wieder sinkt, da die Synovialmembran dann mehr fibröse Anteile mit weniger Kapillaren enthält.

6.5.2 Korrelation: MRT – Histologische Untersuchung

Für die Korrelationsberechnung der MRT-Untersuchung wurde der normierte SI-Wert verwendet (siehe Kap. 4.6.2). Die Korrelation zwischen den histologischen und magnetresonanztomographischen Befunden ist ebenfalls hoch ($r_s = 0,76$). Wie aus zahlreichen Studien bekannt, ist die MR-Bildgebung ein sensitives Verfahren, um pathologische Prozesse einer CIA bildlich nachzuweisen (Beckmann *et al.*, 1998). Es können Synovitiden und Knochenerosionen mit hoher Sensitivität erfasst werden. Besonders gut werden sie in KM-gestützten Aufnahmen detektiert (Reiser und Naegele, 1993).

Die hohe Korrelation, die sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt, bestätigt die Angaben der Literatur.

6.5.3 Korrelation: NIR-Bildgebung – MRT

Wie der Korrelationskoeffizient ($r_s = 0,71$) zeigt, korrelieren die beiden bildgebenden Verfahren hoch. Der Nachweis der pathologischen Prozesse war demzufolge mit beiden Messmethoden erfolgreich.

Anhand der gemessenen Signalintensitäten der MRT-Bilder im Vergleich zu denen der NIR-Bilder lässt sich die Aussage machen, dass sich mit beiden Methoden die histologischen Gelenkveränderungen mit etwa derselben Sensitivität belegen lassen.

Interessanterweise konnten die geringgradig entzündeten Gelenke weder mit der zu prüfenden Methodik, noch mit der MRT, die besonders für ihre hervorragende Weichteildarstellung bekannt ist, von den Kontrollgelenken signifikant abgegrenzt werden. Gelenke dieser Gruppe zeigten aber überwiegend nur Veränderungen in den Weichteilstrukturen.

Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine geringere Vaskularisation dieser Gelenke als bei den anderen Entzündungsgraden, wodurch weniger KM im Gelenk angeflutet würde. In der Literatur gibt es keine speziellen Angaben über die Neoangiogenese im Zusammenhang mit der CIA der Ratte. Für die RA des Menschen ist hingegen bekannt, dass sie mit einer gesteigerten Kapillareinsprossung beginnt (Colville-Nash und Scott, 1992). Die Ergebnisse könnten einerseits dafür sprechen, dass bei den geringgradig entzündeten Gelenken noch keine erhebliche Neoangiogenese stattgefunden hatte, oder aber dass die neu gebildeten Gefäße noch keine gesteigerte Permeabilität aufwiesen. Auch hinsichtlich der veränderten Gefäßdurchlässigkeit bei der CIA findet man in der Literatur keine Angaben. In Anbetracht

des geringen Gelenkumfanges ist aber vorstellbar, dass eine vermehrte Durchblutung allein nicht ausreichen würde, um die Farbstoffanflutung so weit zu erhöhen, dass sich der Kontrast zu gesundem Gewebe signifikant erhöht. Vielmehr ist denkbar, dass die gesteigerte Extravasation, die auf einer erhöhten Permeabilitätsrate beruht, eine deutlichere und vor allem länger anhaltende Signalsteigerung mit sich bringt.

In der Versuchsreihe dieser Arbeit haben beide bildgebenden Verfahren eine vergleichbare Aussagekraft. Bestätigt sich dieses Ergebnis in weiteren Studien, kann die Fluoreszenzdiagnostik die zeitaufwändige und sehr kostenintensive MRT sicherlich zum Teil ersetzen. Die Bildgebung mit NIR-Licht hat den Vorteil, dass sie leicht zu handhaben ist und um ein Vielfaches kostengünstiger gestaltet werden kann. Somit erscheint der Einsatz als Screening-Verfahren sowie für häufige Verlaufsuntersuchungen als Therapiekontrolle besonders geeignet.

6.6 Ausblick

Studien mit NIR-Licht ohne Verwendung eines Farbstoffes ergaben keine eindeutige Differenzierbarkeit zwischen gesunden und erkrankten Fingergelenken (Scheel *et al.*, 2002), somit ist die Entwicklung eines geeigneten fluoreszierenden Kontrastmittels besonders wichtig. Durch die Weiterentwicklung der bisherigen Cyaninfarbstoffe soll eine verbesserte Spezifität erreicht werden. Für die Arthritis-Diagnostik ist hier insbesondere an Farbstoffe zu denken, die spezifisch an Entzündungszellen binden. Eine kürzlich veröffentlichte Studie beschreibt den Einsatz eines antikörpergebundenen Cyaninfarbstoffes, der an Antigene auf der Oberfläche von Makrophagen bindet (Hansch *et al.*, 2004). Es wurde die Signalgebung des an Makrophagen bindenden Farbstoffes mit einem nicht-konjugierten Cyaninfarbstoff verglichen. Als Tiermodell wurde eine Antigen-induzierte Arthritis am Kniegelenk der Maus gewählt. Hansch *et al.* (2004) beschreiben deutliche Signalunterschiede zwischen Kontroll- und arthritischen Gelenken, wobei der an Makrophagen bindende Farbstoff deutlich höhere Fluoreszenzsignale als der freie Farbstoff erbracht haben soll. Fraglich erscheint jedoch die Aussagekraft der Untersuchung des Kontrollgelenkes in diesem Tiermodell. Den Tieren wurde zunächst systemisch zweimalig eine Mischung aus bovinem Serum-Albumin und Freund'schen kompletten Adjuvans sowie inaktivierte Bordetellakeime appliziert, bevor sie nach 14 Tagen in je ein Kniegelenk eine Injektion mit steriler Serum-Albuminlösung erhielten. Sowohl Albumin als auch komplettes Adjuvans können allein, systemisch verabreicht, eine Arthritis erzeugen. Somit ist äußerst fraglich, ob die als Kontrollen fungierenden Gelenke nicht bereits arthritische Veränderungen aufwiesen. Weiterhin könnte die Rasur der Gelenke vor der Messung die Ergebnisse beeinflusst haben. Durch diese wird ein Entzündungsreiz

auf der Haut gesetzt, woraufhin ebenfalls vermehrt Makrophagen einwandern können, an die sich der Farbstoff ebenso gut gekoppelt haben könnte. Da die NIR-Bildgebung bisher nur eine quantitative Messmethode darstellt, ist somit nicht abgrenzbar, in welcher anatomischen Lokalisation sich die Makrophagen befanden.

Des Weiteren sind auch fluoreszenzoptische Kontrastmittel die an spezifische Zellen des Gelenkes (z.B. Synoviozyten) koppeln, vorstellbar. Bedenkt man, dass eine Arthritis mit der Proliferation der Synoviozyten beginnt, könnte ein spezifisch bindender Farbstoff vor allem die Frühdiagnostik weiter verbessern.

Erste Forschungsergebnisse mit NIR-Farbstoffen auf molekularer Ebene scheinen außerdem viel versprechend zu sein. So wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Weissleder in Boston bereits am CIA-Modell der Maus ein so genannter "intelligenter" molekularer Farbstoff getestet, welcher eine Schnittstelle beinhaltet, die von Kathepsin B gespalten werden kann (Weissleder *et al.*, 1999). Diese Cysteinprotease ist maßgeblich am Knorpelabbau, der mit einer RA einhergeht, beteiligt.

Um mit der NIR-Diagnostik neben der sensitiven Erfassung von Arthritiden auch eine Beurteilung der anatomischen Strukturen zu ermöglichen, ist eine optische Tomographie nötig. Diese erlaubt Fluoreszenzverteilungen dreidimensional und quantitativ zu erfassen. Erste Ergebnisse dieser Methodik liegen bereits vor (Ntziachristos *et al.*, 2002).

Die klinische Prüfung dieser Methodik unter Einsatz des zugelassenen Cyaninfarbstoffes ICG an RA-Patienten ist noch für dieses Jahr am Institut für Radiologie, Charité Campus Mitte in Zusammenarbeit mit der PTB, Berlin geplant (Taupitz, 2004).

Zukünftig ist der Einsatz dieses diagnostischen Verfahrens auch im tiermedizinischen Bereich zur Beurteilung von Lahmheiten, beispielsweise von Hund und Pferd, wünschenswert, da hier besonders der Aspekt der leichten Handhabung sowie der niedrigen Kosten enorme Vorteile gegenüber Computertomographie bzw. MRT bieten würde.