

5. Ergebnisse

Nach der intravenösen Injektion eines Nahinfrarot-Farbstoffes wurden die Sprunggelenke der Maus mittels NIR-Messung dargestellt und hinsichtlich einer Unterscheidung zwischen entzündlichen und gesunden Gelenken charakterisiert. Dazu wurde das dynamische Verhalten der Fluoreszenzintensitäten der Farbstoffe an 45 Tieren ermittelt.

5. 1 Vorversuche

In den Vorversuchen wurden zunächst die zwei Farbstoffe Indocyaningrün (ICG) und NIR-1 auf ihre Eignung überprüft. Da der kontrastmittelgestützte Nachweis entzündlicher Veränderungen mittels optischer Methoden im Bereich der Gliedmaßen noch nicht beschrieben wurde, erfolgten die ersten Messungen zur Geräteoptimierung und Einstellung der Messtechnik, wie z. B. Entfernung und Ausrichtung der optischen Faser und der intensivierten CCD-Kamera, Anpassung der Filter, Belichtungszeiten, Anzahl der Aufnahmen und der Messdauer.

Die Auswertung der Daten ergab für die beiden Farbstoffe ICG und NIR-1 ein deutlich unterschiedliches dynamisches Verhalten.

5.1.1 Vorversuche Indocyaningrün (ICG)

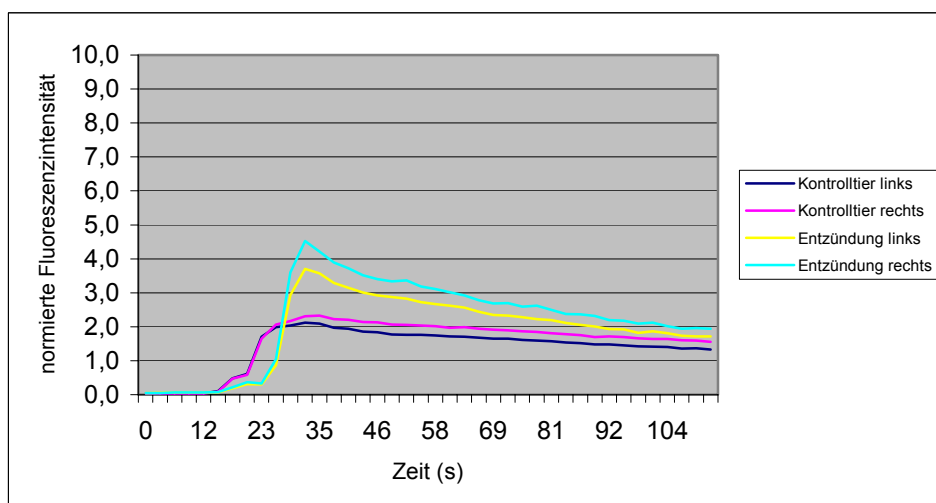


Abb. 6: Verlauf der normierten Fluoreszenzintensitäten von ICG (Dosis 1 $\mu\text{mol/kg}$) an je einem Tier mit Gelenkentzündung und einem Kontrolltier

In Abbildung 6 sind die Fluoreszenzintensitäten von ICG im Bereich der Sprunggelenke bei je einem Kontrolltier und einem Tier mit einer Gelenkentzündung in Abhängigkeit von der Zeit nach der i.v. Applikation von ICG mit einer Dosis von 1 $\mu\text{mol/kg}$ dargestellt. Nach dem Anfluten und einem Anstieg der Fluoreszenzintensitäten bei ca. 35 Sekunden erfolgt ein Abfall der Fluoreszenzintensitäten im Bereich der Hintergliedmaßen.

Mit ICG erreichen die normierten Fluoreszenzintensitäten in den Kontrollgelenken einen Wert auf dem Niveau von zwei, während die normierten Fluoreszenzintensitäten in den entzündeten Gelenken auf das Doppelte ansteigen, d. h. die Fluoreszenzintensitäten in den untersuchten Sprunggelenken sind viermal höher als in der Referenz (ICG 0,05 mg/ml in wässriger Lösung).

Fünf Minuten nach der Farbstoffgabe sinken die normierten Fluoreszenzintensitäten bei beiden Tieren auf Werte zwischen eins und zwei, wobei die Werte des Tieres mit einer Gelenkentzündung über den Werten des Kontrolltieres liegen.

5.1.2 Vorversuche NIR-1

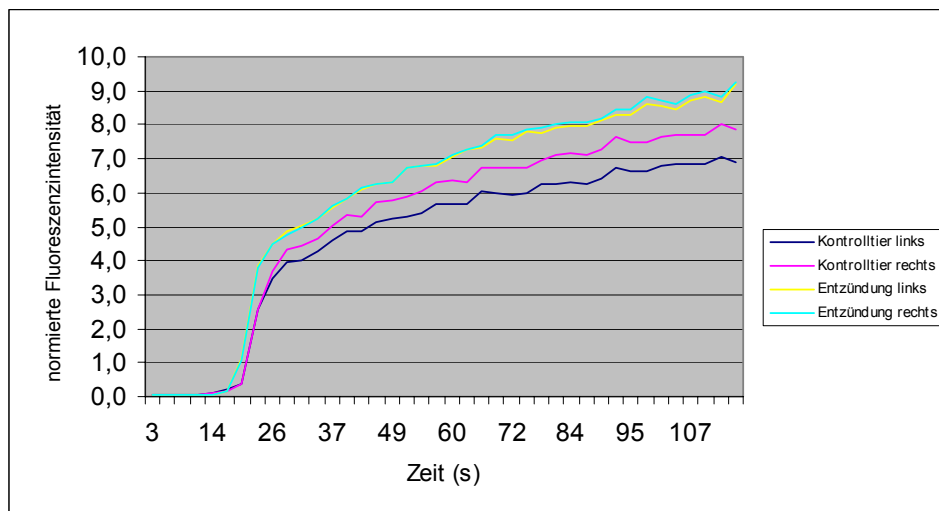


Abb. 7: Verlauf der normierten Fluoreszenzintensitäten von NIR-1 (Dosis 1 $\mu\text{mol/kg}$) an je einem Tier mit Gelenkentzündung und einem Kontrolltier

In Abbildung 7 sind die Fluoreszenzintensitäten von NIR-1 im Bereich der Sprunggelenke bei je einem Kontrolltier und einem Tier mit einer Gelenkentzündung in Abhängigkeit von der Zeit nach der i.v. Applikation von NIR-1 mit einer Dosis von 1 $\mu\text{mol/kg}$ dargestellt.

Im Gegensatz zum ICG erfolgt nach der Injektion von NIR-1 über die gesamte Messzeit ein stetiger Anstieg der normierten Fluoreszenzintensitäten. Mit diesem Farbstoff werden in den Kontrollgelenken normierte Fluoreszenzintensitäten von sieben bzw. acht erreicht, während die normierten Fluoreszenzintensitäten in den entzündeten Gelenken auf rund neun ansteigt, d. h. die Fluoreszenzintensitäten in den untersuchten Sprunggelenken sind rund neun mal höher als in der Referenz (ICG 0,05 mg/ml in wässriger Lösung).

5.2 Ergebnisse der NIR-Messungen mit NIR-1

Bei der Auswertung konnte nicht auf ein bereits etabliertes Auswertsystem zurückgegriffen werden. Zunächst wurden die zeitlichen Verläufe der Anreicherung des Farbstoffes bzw. der daraus resultierenden Fluoreszenzintensitäten im Bereich der Sprunggelenke für die zwei Dosierungen 1 und 2 $\mu\text{mol/kg}$ als Median sowie als 1. und 4. Quartile in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die Berechnung der normierten Fluoreszenz erfolgte bei den weiterführenden Messungen mit NIR-1 mit einer Referenz, bei der mit dem Farbstoff beladene Glaskügelchen in Kunststoff eingebettet sind. Für eine bessere Übersicht wurde in den beiden folgenden Abbildungen lediglich jeder zweite Wert dargestellt.

5.2.1 Zeitverlauf

Beide getesteten Dosierungen (1 und 2 $\mu\text{mol/kg}$ KGW) führen zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensitäten im Bereich der Hintergliedmaßen der Tiere.

NIR-1 Dosis 1 $\mu\text{mol/kg}$

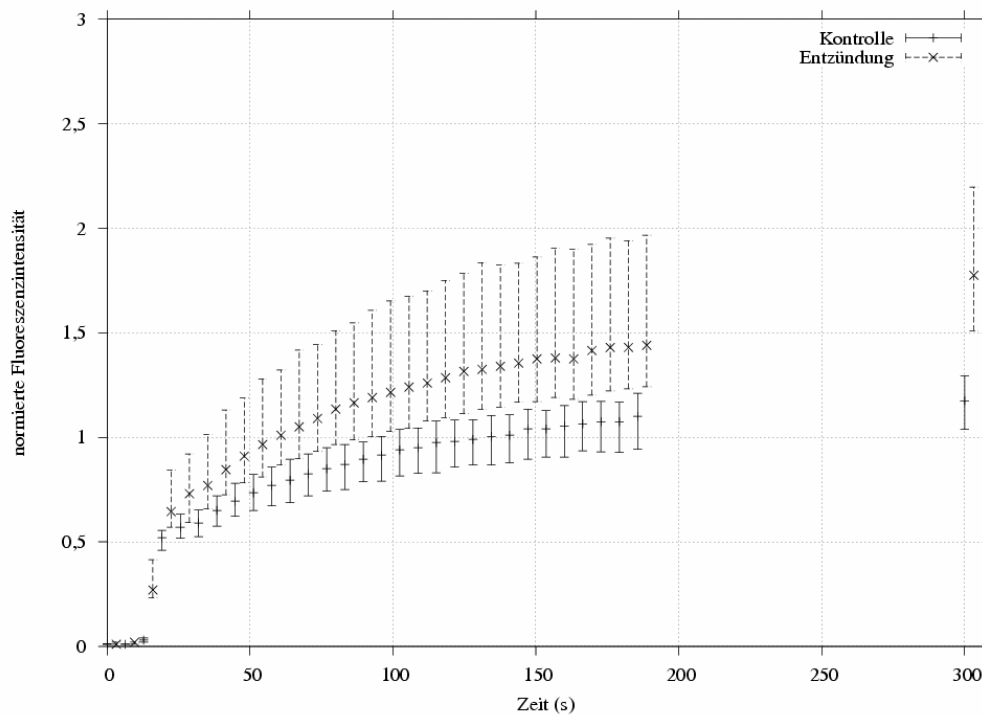


Abb. 8: Verlauf der normierten Fluoreszenzintensitäten der Gruppen 1 (Kontrolle) und 2 (Arthritis)

In Abbildung 8 sind die normierten Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Zeit für die Gruppen 1 und 2 (NIR-1, Dosis 1 $\mu\text{mol/kg}$) aufgetragen. Die Kurve für die Gruppe 1 (Kontrolltiere) beinhaltet 14 Einzelwerte und die der Gruppe 2 (Tiere mit einer Gelenkentzündung) 20 Einzelwerte. Die Gruppe 1 enthält Tiere mit keinen oder sehr geringen histologischen Veränderungen im Bereich der Sprunggelenke (Histo-Score zwischen null und zwei, Median null). Die Gruppe 2 beinhaltet Tiere mit unterschiedlichem Ausprägungsgrad der Gelenkentzündung (Histo-Score zwischen zwei und 15, Median sieben). Die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten im Gebiet des Gelenks (region of interest) erfolgte als Median sowie als 1. und 4. Quartile. Wie bereits bei den Vorversuchen beobachtet, gab es über den gesamten Messzeitraum einen stetigen Anstieg des Medians der normierten Fluoreszenzintensitäten im Bereich der Sprunggelenke bei den Kontrolltieren und auch bei den Tieren mit einer Gelenkentzündung. Es ist ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen beiden Gruppen über den gesamten Messzeitraum zu erkennen, der nach fünf Minuten am deutlichsten ausgeprägt ist.

NIR-1 Dosis 2 $\mu\text{mol/kg}$

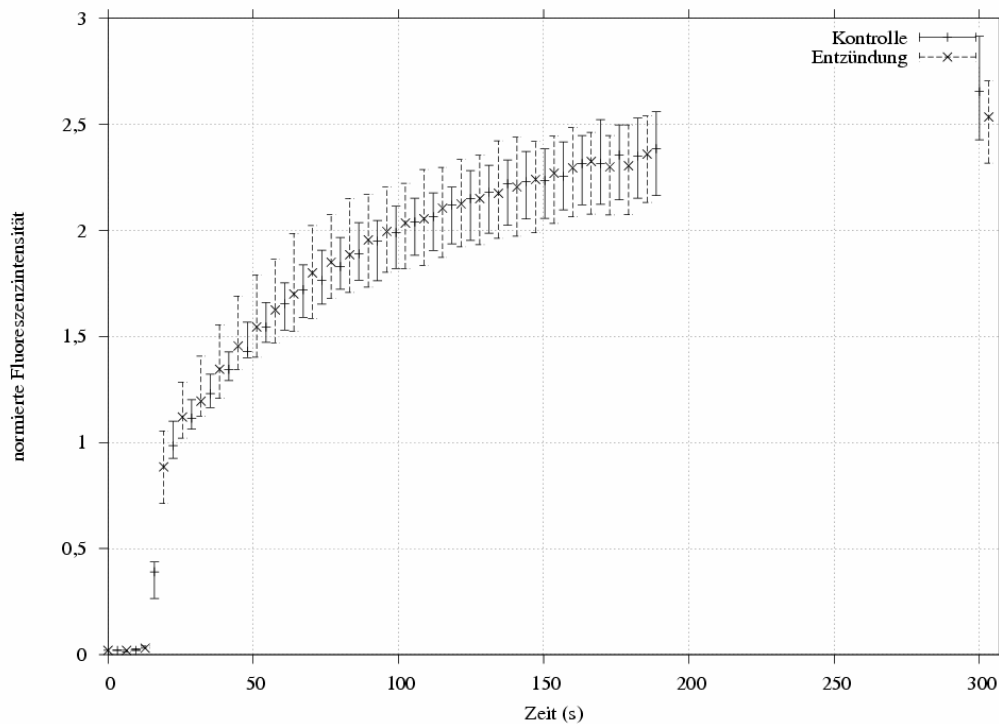


Abb. 9: Verlauf der normierten Fluoreszenzintensitäten der Gruppen 3 (Kontrolle) und 4 (Entzündung)

In Abbildung 9 sind die normierten Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Zeit für die Gruppen 3 und 4 (NIR-1, Dosis 2 $\mu\text{mol/kg}$) aufgetragen. Die Kurve für die Gruppe 3 (Kontrolltiere) beinhaltet 16 Einzelwerte und die der Gruppe 4 (Tiere mit einer Gelenkentzündung) 20 Einzelwerte. Die Gruppe 3 enthält Tiere mit keinen oder sehr geringen histologischen Veränderungen im Bereich der Sprunggelenke (Histo-Score zwischen null und zwei, Median null). Die Gruppe 4 beinhaltet Tiere mit unterschiedlichem Ausprägungsgrad der Gelenkentzündung (Histo-Score zwischen zwei und zehn, Median sieben). Die Darstellung der Fluoreszenzintensität im Gebiet des Gelenks (region of interest) erfolgte als Median sowie als 1. und 4. Quartile. Wie auch bei der Dosis 1 $\mu\text{mol/kg}$ erfolgt über den gesamten Messzeitraum ein stetiger Anstieg der normierten Fluoreszenzintensitäten im Bereich der Sprunggelenke bei den Kontrolltieren und auch bei den Tieren mit einer Gelenkentzündung. Es ist kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,8$) zwischen den Werten beider Gruppen zu erkennen.

5.2.2 Fluoreszenzintensitäten 3 Minuten nach Farbstoffinjektion

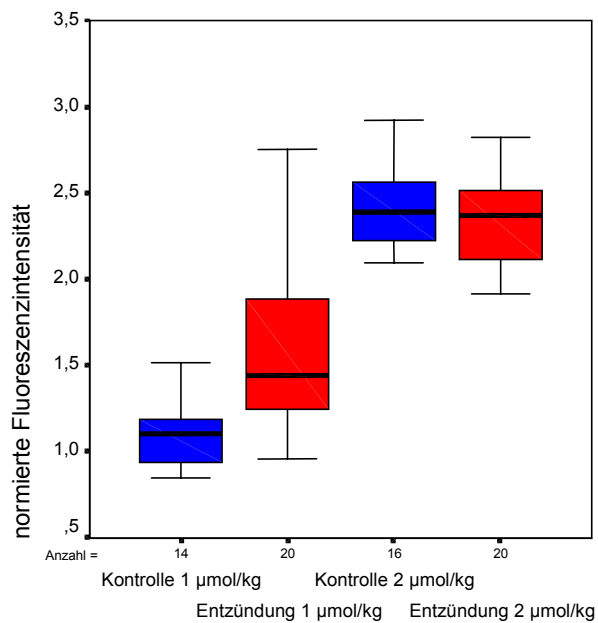


Abb. 10: Normierte Fluoreszenzintensitäten 3 Minuten nach Farbstoffgabe

Die ermittelten Werte der normierten Fluoreszenzintensitäten drei Minuten nach Farbstoffinjektion wurden als Boxplots dargestellt. Bei der Dosis von 1 µmol/kg unterscheiden sich Kontrolltiere (Median 1,11; 1. Quartil 0,93; 4. Quartil 1,20) und die Tiere mit einer Gelenkentzündung (Median 1,44; 1. Quartil 1,24; 4. Quartil 1,97) statistisch signifikant ($p < 0,001$). Der Unterschied bei der Dosis 2 µmol/kg zwischen Kontrolltieren (Median 2,39; 1. Quartil 2,17; 4. Quartil 2,56) und Tieren mit einer Entzündung (Median 2,37; 1. Quartil 2,10; 4. Quartil 2,52) ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,560$).

5.2.3 Fluoreszenzintensitäten 5 Minuten nach Farbstoffinjektion

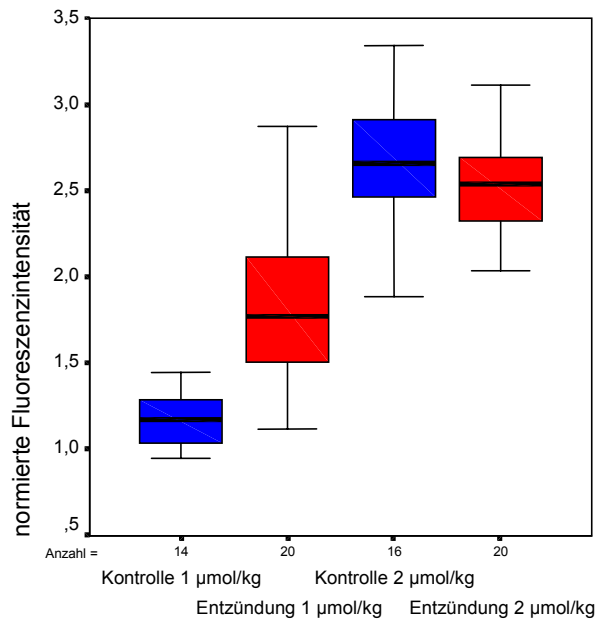


Abb. 11: Normierte Fluoreszenzintensitäten 5 Minuten nach Farbstoffgabe

Die ermittelten Werte der normierten Fluoreszenzintensitäten fünf Minuten nach Farbstoffinjektion wurden als Boxplots dargestellt. Bei der Dosis von 1 µmol/kg unterscheiden sich Kontrolltiere (Median 1,18; 1. Quartil 1,04; 4. Quartil 1,30) und die Tiere mit einer Gelenkentzündung (Median 1,78; 1. Quartil 1,51; 4. Quartil 2,20) statistisch signifikant ($p < 0,001$). Der Unterschied bei der Dosis 2 µmol/kg zwischen Kontrolltieren (Median 2,66; 1. Quartil 2,43; 4. Quartil 2,92) und Tieren mit einer Entzündung (Median 2,53; 1. Quartil 2,32; 4. Quartil 2,71) ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,140$).

5.2.4 Steigung der normierten Fluoreszenzintensitäten

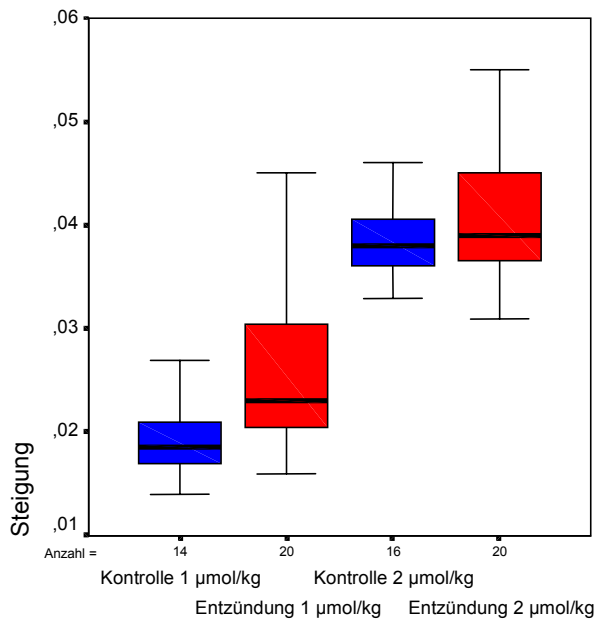


Abb. 12: Steigung der normierten Fluoreszenzintensitäten nach Farbstoffgabe

Die Unterschiede hinsichtlich der Steigung der normierten Fluoreszenzintensitäten sind bei einer Dosis von 1 µmol/kg zwischen Kontrolltieren (Median 0,019; 1. Quartil 0,017; 4. Quartil 0,021) und den Tieren mit einer Gelenkentzündung (Median 0,023; 1. Quartil 0,020; 4. Quartil 0,032) in den ersten 45 Sekunden nach der Injektion des Farbstoffes am größten und statistisch signifikant ($p=0,004$). Für die Dosis 2 µmol/kg sind die Unterschiede zwischen Kontrolltieren (Median 0,038; 1. Quartil 0,036; 4. Quartil 0,041) und Tieren mit einer Entzündung (Median 0,039; 1. Quartil 0,036; 4. Quartil 0,046) hinsichtlich der Steigung der Farbstoffanreicherungskurve statistisch nicht signifikant ($p=0,320$).

5.2.5 Visuelle Einstufung durch eine qualitative Auswertung der NIR-Bilder

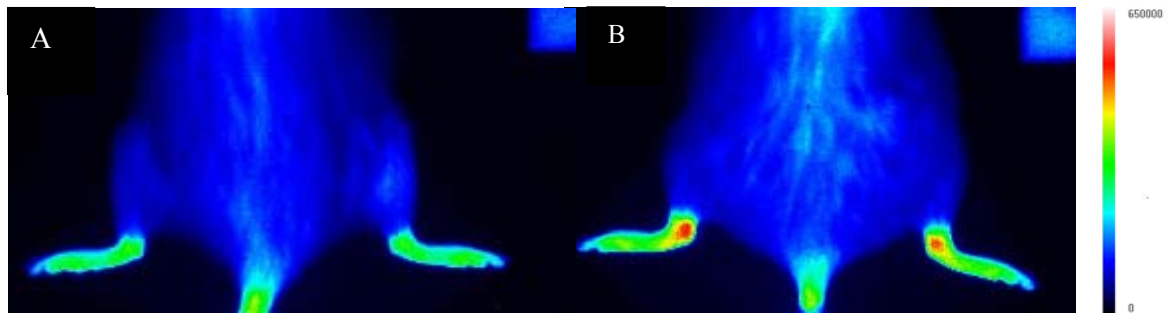


Abb. 13: Darstellung der NIR-Fluoreszenzintensitäten bei einem Kontrolltier (A) und einem Tier (B) mit Gelenkentzündung (Histo-Score: links 7, rechts 8) 5 Minuten nach der Gabe von NIR-1 (Dosis 2 $\mu\text{mol/kg}$)

Die Beurteilung der Darstellung der Fluoreszenzintensität im Bereich der Sprunggelenke fünf Minuten nach Farbstoffapplikation erfolgte durch zwei Untersucher. Die Einteilung wurde anhand der Bewertungskriterien "Kontrolle", "Entzündung" und "fraglich" vorgenommen. Anschließend wurden die Sensitivität und die Spezifität errechnet. Die Sensitivität ist definiert als das Verhältnis der vom Untersucher als positiv befundenen Tiere zu den tatsächlich erkrankten Tieren. Die Spezifität hingegen ist definiert als das Verhältnis der als negativ befundenen Tieren zu den tatsächlich nicht erkrankten Tieren.

Für die Dosis von 1 $\mu\text{mol/kg}$ ergibt sich eine Sensitivität von 14 % (Untersucher 1) bzw. 57 % (Untersucher 2) und eine Spezifität von 86 % bzw. 71 %. Bei der Dosis von 2 $\mu\text{mol/kg}$ wird eine Sensitivität von 100 % bzw. 86 % und eine Spezifität von 60 % bei beiden Untersuchern erreicht.

5.2.6 Ergebnisse der histologischen Untersuchung

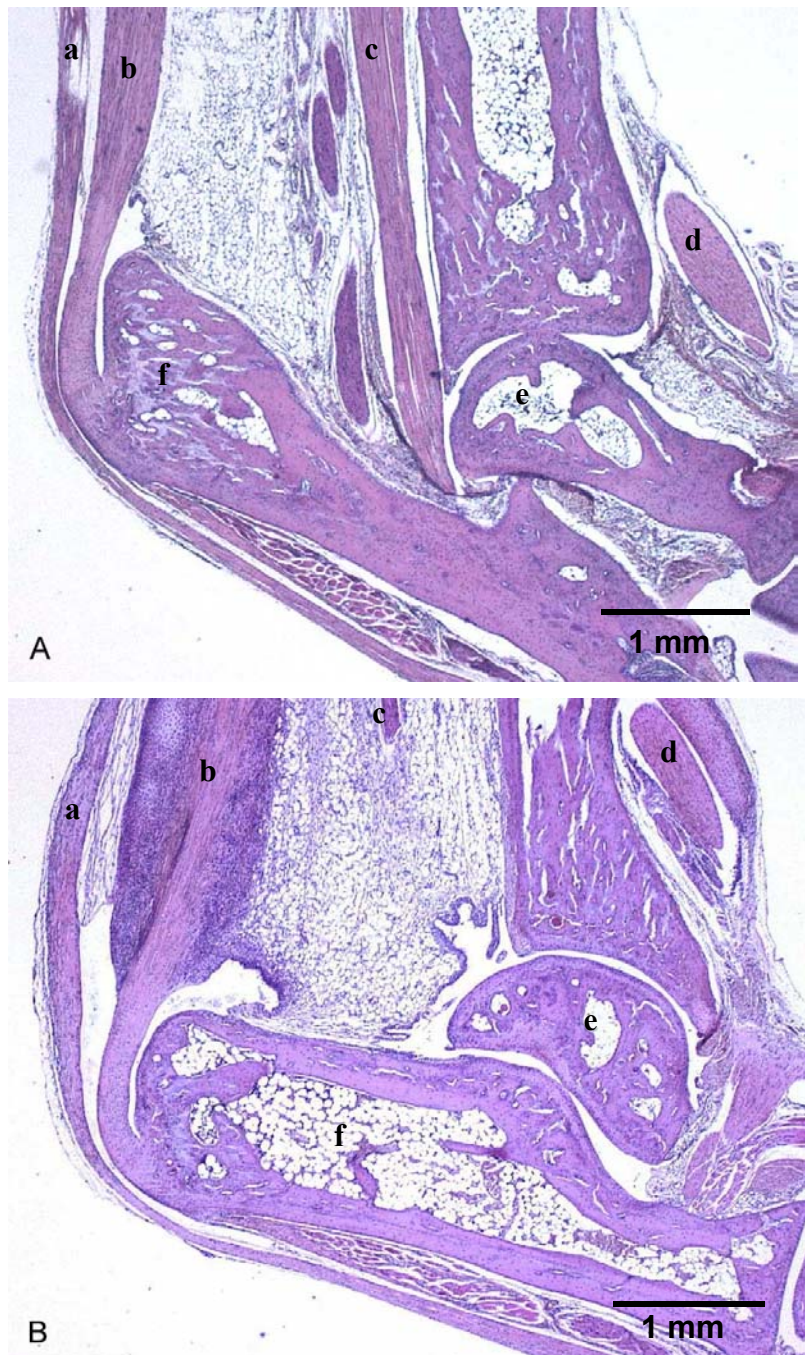


Abb. 14: Histologischer Schnitt durch das Sprunggelenk eines Kontrolltieres (A) und durch das Gelenk eines Tieres mit Gelenkentzündung (B), a) oberflächliche Beugesehne, b) Achillessehne, c) tiefe Beugesehne, d) Sehne des langen Zehenstreckers, e) Talus, f) Calcaneus, 25fache Vergrößerung, HE-Färbung

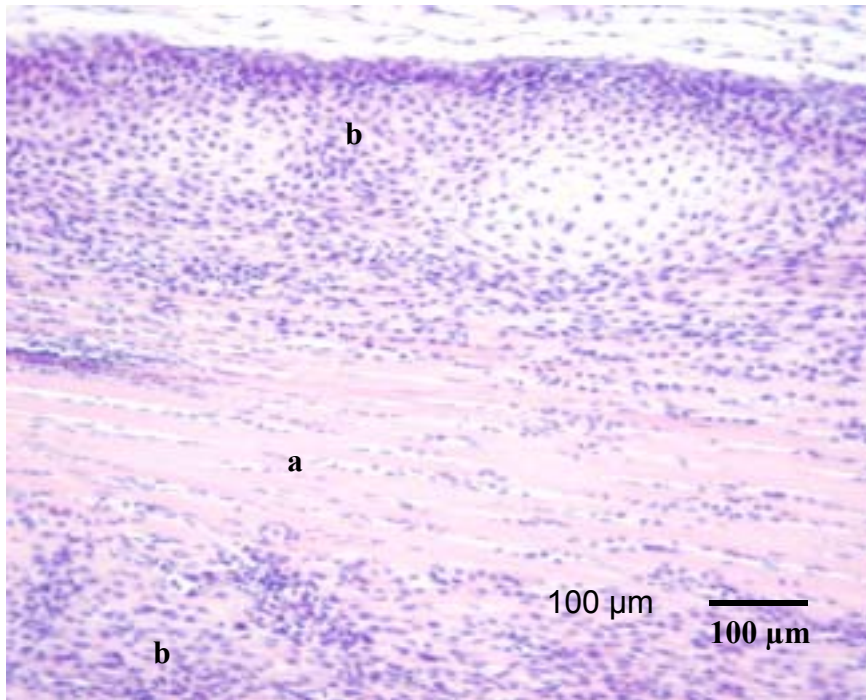


Abb. 15: Histologischer Schnitt durch die Achillessehne (a) mit hochgradiger vom Peritendineum ausgehender zellulärer Infiltration (b) bei einem Tier mit Borrelien-Infektion, 100fache Vergrößerung, HE-Färbung

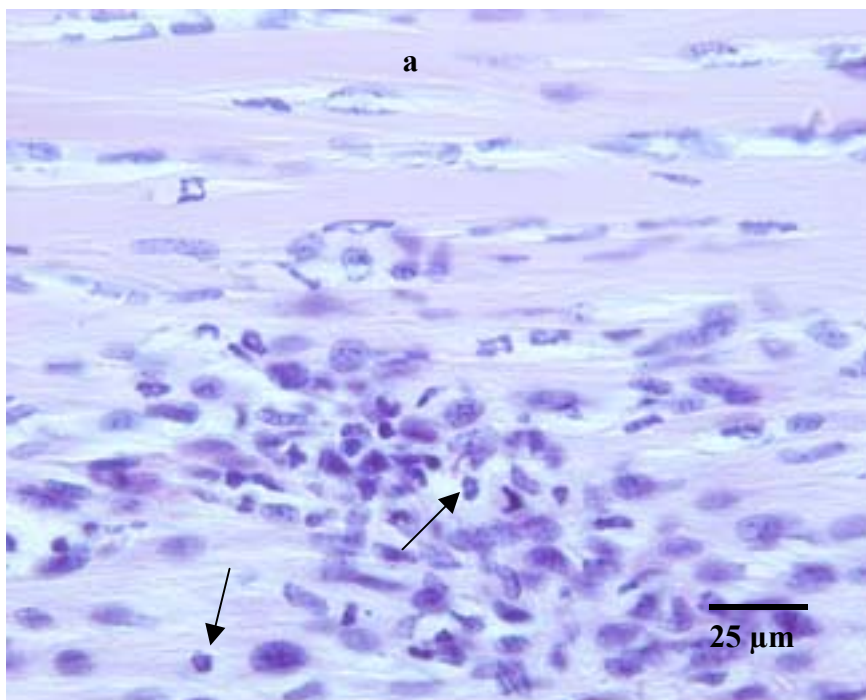


Abb. 16: Neutrophile Granulozyten (Pfeile) in der Achillessehne (a) aus Abb. 15, 400fache Vergrößerung, HE-Färbung

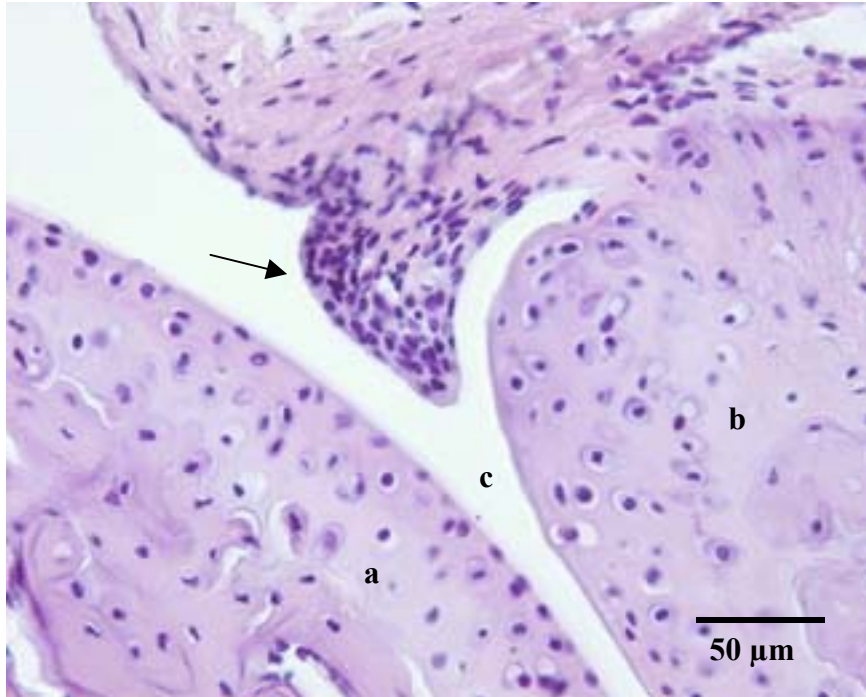


Abb. 17: Histologischer Schnitt durch Talus (a), Tibia (b) und Gelenkspalt des Sprunggelenkes (c) eines Borrelien-infizierten Tieres mit einer vom Gelenkkapselrezessus ausgehenden, den Gelenkknorpel überziehenden Proliferation der Synovialis (Pannus) (Pfeil), 250fache Vergrößerung, HE-Färbung

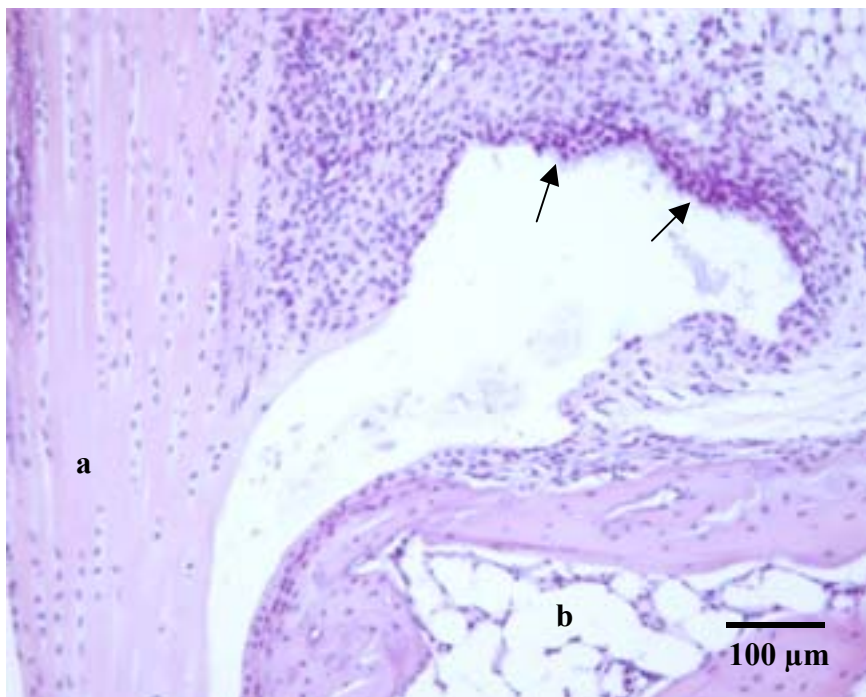


Abb. 18: Histologischer Schnitt durch den Ansatz der Achillessehne (a) am Calcaneus (b) mit mittelgradiger Verdickung der Synovialmembran (Pfeile) bei einem Tier mit Borrelien-Infektion, 100fache Vergrößerung, HE-Färbung

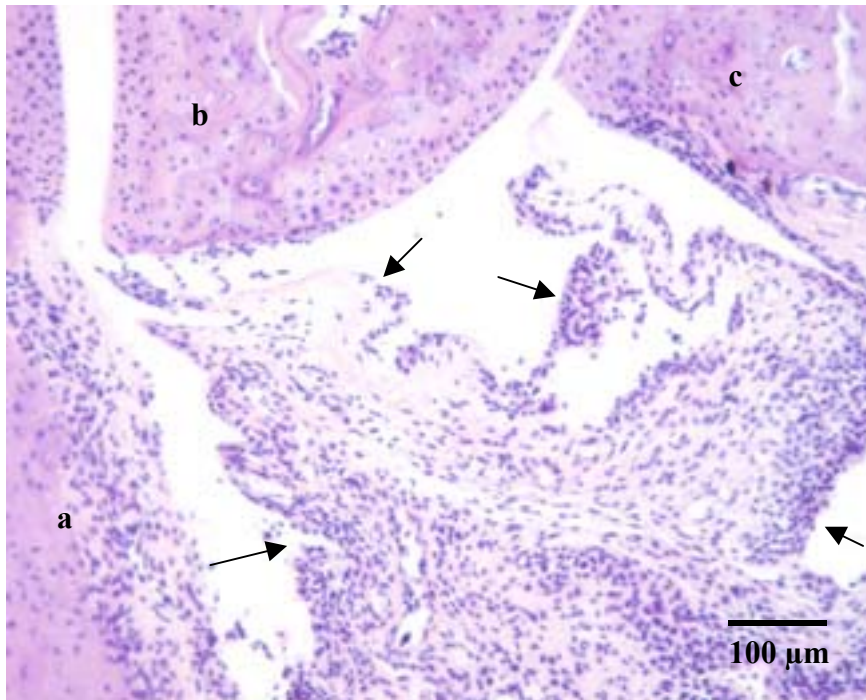


Abb. 19: Histologischer Schnitt durch Calcaneus (a), Talus (b) und Tibia (c) eines Tieres mit Borrelien-Infektion mit hochgradiger Proliferation der Synovialmembran (Pfeile), 100fache Vergrößerung, HE-Färbung

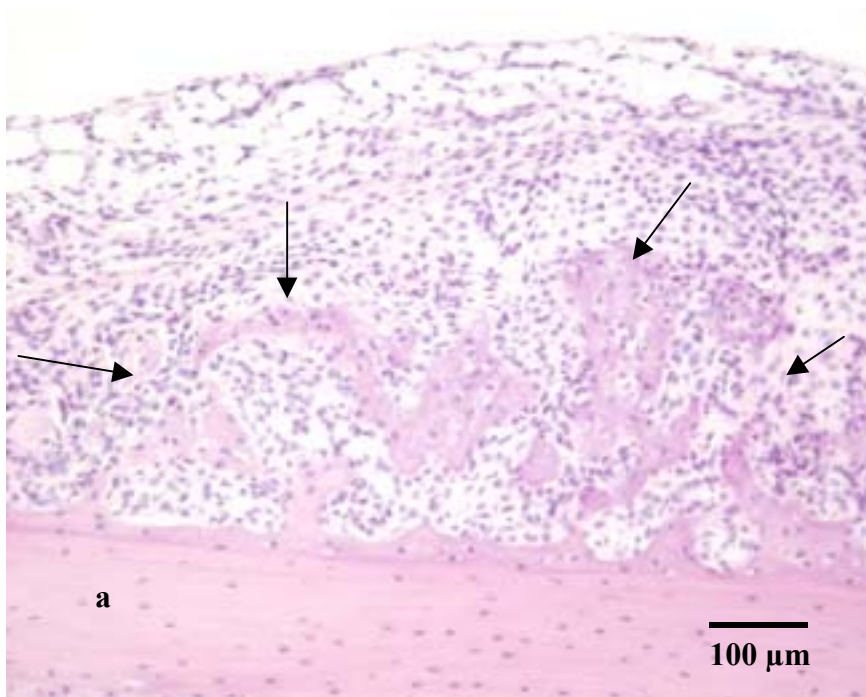


Abb. 20: Histologischer Schnitt durch die äußeren Generallamellen der Tibia (a) und einer knöchernen Zubildung im Bereich des Periost (Pfeile) bei einem Tier mit Borrelien-Infektion, 100fache Vergrößerung, HE-Färbung

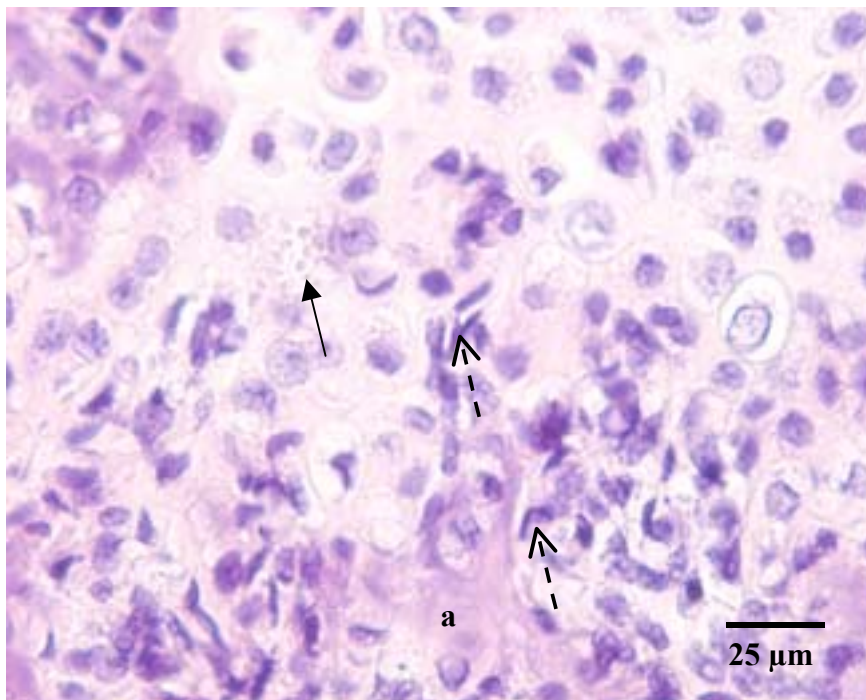


Abb. 21: Knocheninterzellulärsubstanz (a), apoptotische Zellen (gestrichelte Pfeile), Makrophagen und Extravasat (Pfeil) in der knöchernen Zubildung aus Abb. 20 an der Tibia eines Tieres mit einer Borrelien-Infektion, 400fache Vergrößerung, HE-Färbung

Tab. 2 Histologische Auswertung, Anzahl der Fälle

Histo-Score	Gruppe 1 (Kontrolle)	Gruppe 2 (Entz.)	Gruppe 3 (Kontrolle)	Gruppe 4 (Entz.)
0	9	0	11	0
1	2	0	4	0
2	3	1	1	2
3	0	0	0	2
4	0	2	0	1
5	0	1	0	1
6	0	2	0	2
7	0	5	0	5
8	0	1	0	4
9	0	0	0	1
10	0	3	0	2
11	0	0	0	0
12	0	3	0	0
13	0	1	0	0
14	0	0	0	0
15	0	1	0	0

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte semiquantitativ mit einer Graduierung in vier Stufen von 0 (Abwesenheit des Kriteriums) über 1 (gering), 2 (mäßig) bis 3 (stark) für die Kriterien Synovitis, Periarthritis, Tenosynovitis, Periostitis und Knorpel-/Knochen-destruktionen.

Wie in Tabelle 2 dargestellt, zeigen die Kontrolltiere erwartungsgemäß nur in wenigen Fällen leichte Veränderungen. Die Mediane des histologischen Score für die Gruppen 1 und 3 betragen jeweils null.

Die Gruppen 2 und 4 unterscheiden sich leicht in der Ausprägung der Entzündungsanzeichen im Bereich der Sprunggelenke. Bei der Gruppe 2 reichen die Werte von zwei bis 15 je untersuchtem Sprunggelenk, bei der Gruppe 4 von zwei bis zehn. Die Mediane des histologischen Score für die Gruppen 2 und 4 betragen jeweils sieben.

Der histologische Vergleich aller Kontrolltiere und aller Tiere mit einer Borrelien-Infektion ergibt einen statistisch signifikanten Unterschied im Bereich der Sprunggelenke ($p < 0,001$).

5.2.7 Vergleich der histologischen Befunde mit den normierten Fluoreszenzintensitäten

Zur Darstellung der Zusammenhänge zwischen den normierten Fluoreszenzintensitäten fünf Minuten nach der Farbstoffinjektion und dem Ausmaß der histologischen Veränderungen wurden die Tiere je nach Ausprägung der entzündlichen Veränderungen in vier Gruppen geteilt (Histologie-Score null bis drei – keine Arthritis; vier bis sieben – geringgradige Arthritis; acht bis elf – mittelgradige Arthritis; 12 bis 15 – hochgradige Arthritis). Für die beiden Dosierungen werden die Gruppen mittels Boxplots dargestellt.

NIR-1 Dosis 1 µmol/kg

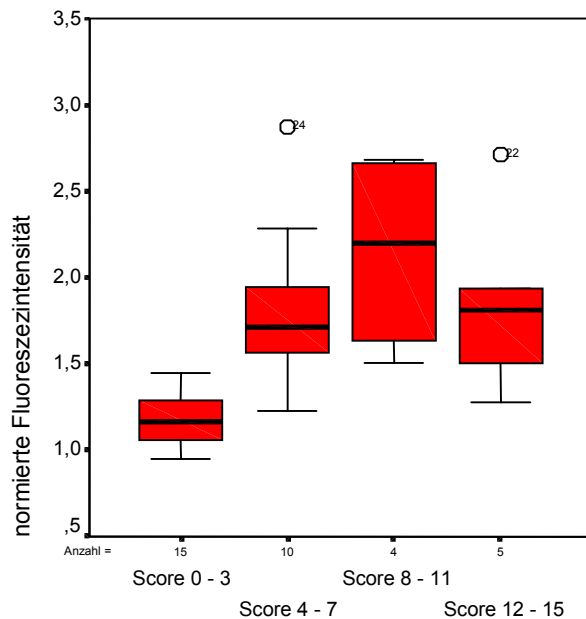


Abb. 22: Normierte Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu den histologischen Veränderungen bei den Tieren der Gruppen 1 und 2 (Dosis 1 µmol/kg)

Bei der Dosis 1 µmol/kg befinden sich 15 Messwerte in der Gruppe mit einem Histologie-Score null bis drei (Median 1,16; 1. Quartil 1,04; 4. Quartil 1,29), zehn Messwerte in der Gruppe mit einem Histologie-Score vier bis sieben (Median 1,71; 1. Quartil 1,57; 4. Quartil 1,95), vier Messwerte in der Gruppe mit einem Histologie-Score acht bis elf (Median 2,20; 1. Quartil 1,64; 4. Quartil 2,66) und fünf Messwerte in der Gruppe mit einem Histologie-Score 12 bis 15 (Median 1,81; 1. Quartil 1,51; 4. Quartil 1,94). Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich der normierten Fluoreszenzintensitäten fünf Minuten nach der Farbstoffinjektion statistisch signifikant ($p < 0,001$).

NIR-1 Dosis 2 µmol/kg

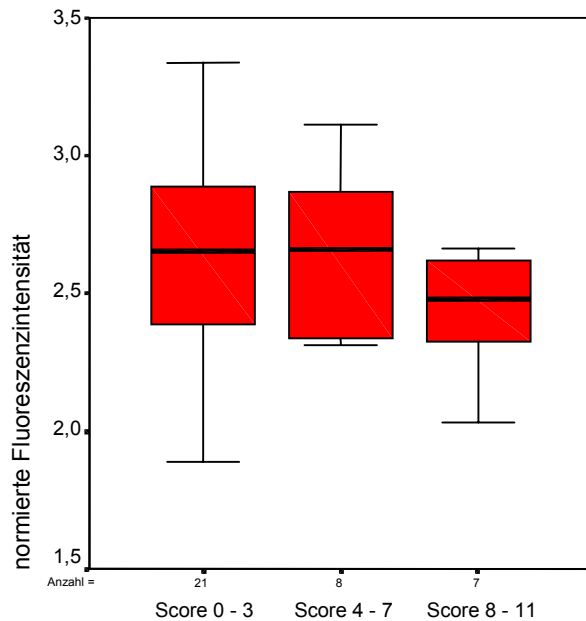


Abb. 23: Normierte Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu den histologischen Veränderungen bei den Tieren der Gruppen 3 und 4 (Dosis 2 µmol/kg)

Bei der Dosis 2 µmol/kg befanden sich 21 Messwerte in der Gruppe mit einem Histologie-Score null bis drei (Median 2,65; 1. Quartil 2,38; 4. Quartil 2,90), acht Messwerte in der Gruppe mit einem Histologie-Score vier bis sieben (Median 2,66; 1. Quartil 2,32; 4. Quartil 2,87), sieben Messwerte in der Gruppe mit einem Histologie-Score acht bis elf (Median 2,48; 1. Quartil 2,31; 4. Quartil 2,65). In dieser Dosisgruppe gab es keine Tiere mit einem Histologie-Score über zehn, so dass keine Messwerte für die Gruppe mit einem Histologie-Score 12 bis 15 vorliegen. Die Messwerte der Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant hinsichtlich der normierten Fluoreszenzintensität fünf Minuten nach der Farbstoffinjektion ($p=0,305$).