

6. Diskussion

Für die Diagnose und Differentialdiagnose von entzündlichen Veränderungen im Bereich eines Gelenkes nimmt bis heute die konventionelle Röntgenuntersuchung eine zentrale Stellung innerhalb der bildgebenden Verfahren ein. Ihre diagnostische Aussage konzentriert sich allerdings vorwiegend auf die knöchernen Anteile des Bewegungsapparates. Eine Auswirkung von entzündlichen Prozessen im Bereich eines Gelenkes ist erst in fortgeschrittenen Stadien vorhanden, so dass das konventionelle Röntgen kein Instrument zur Frühdiagnostik sein kann (Ostendorf et al., 2003). Wertvolle Ergänzungen aufgrund besserer und erweiterter Darstellungsmöglichkeiten erfährt die Röntgenuntersuchung durch die Sonographie und die Magnetresonanztomographie (MRT), die zusätzlich den Vorteil der Vermeidung von Strahlenbelastungen bieten. Beide Darstellungsmöglichkeiten machen eine Beurteilung der Weichteile des Bewegungsapparates möglich (Peterfy, 2001; Ostendorf et al., 2003; Ostergaard und Szkudlarek, 2003). Diese Verfahren sind jedoch wegen des hohen zeitlichen sowie personellen und bei der MRT zusätzlich auch noch hohen finanziellen Aufwandes für den routinemäßigen Einsatz nicht geeignet. Die sehr sensitive, jedoch unspezifische Szintigraphie dient vorwiegend dem Screening zum Zweck der Frühdiagnostik mit Darstellung der unterschiedlichen Befallsmuster. Dieses nuklearmedizinische bildgebende Verfahren ist durch die Strahlenbelastung und auch aus Kostengründen ebenfalls nicht für den Routineeinsatz bzw. für Verlaufsuntersuchungen anwendbar (Weissleder und Mahmood, 2001).

Fluoreszenzoptische Verfahren, wie die Nahinfrarot(NIR)-Bildgebung, bieten die Möglichkeit, pathologische Veränderungen in Geweben (z. B. Tumoren, entzündliche Vorgänge) ohne entstehende Strahlenbelastung und ohne hohe personelle und apparative Kosten im Frühstadium direkt nachzuweisen. Diese Verfahren sind aufgrund der Lichtstreuung im Gewebe durch ein Tiefenlimit im Bereich von wenigen Zentimetern und eine relativ geringe räumliche Auflösung im Bereich von einigen Millimetern beschränkt. Sie sind aber für die Bildgebung von oberflächennahen Veränderungen gut geeignet. Bei Nutzung des „diagnostischen Fensters“ (650 – 900 nm Wellenlänge) im NIR-Bereich tritt nur eine geringe Autofluoreszenz auf und es bietet sich ein gutes Signal-zu-Untergrund-Verhältnis. Durch die Verwendung von Farbstoffen im NIR-Bereich wird zudem die Gewebepenetration von Licht maximiert. Hierbei sind relativ geringe Farbstoffkonzentrationen nötig (Li et al., 1995; Hansch et al., 2004).

In der Diagnostik von Gelenkentzündungen wurde Licht im NIR-Bereich erstmals für die Untersuchung von Synovia-Aspiraten mittels NIR-Spektroskopie verwendet. Auf Grundlage der Veränderungen der optischen Eigenschaften der Synovialflüssigkeit konnten entzündliche Prozesse mit einer über 70%igen Sensitivität richtig klassifiziert werden (Shaw et al., 1995; Carvin et al., 2003). Die für jedes zu untersuchende Gelenk notwendige Gelenkpunktion gestaltet dieses Verfahren allerdings für die Betrachtung mehrerer Gelenke oder für eine Verlaufskontrolle als nicht praktikabel.

Für den nicht-invasiven Nachweis von frühen entzündlichen Veränderungen im Bereich der Fingergelenke mittels NIR-Licht wurden von Prapavat et al. (1997) und von Beuthan et al. (2001) Fingergelenkphantome entwickelt, welche die durch die Proliferation der Synovialmembran und die Trübung der Synovialflüssigkeit bedingten veränderten optischen und geometrischen Eigenschaften in frühen Stadien der rheumatoiden Arthritis (RA) simulierten. Mit Hilfe dieser Phantome konnten die Absorptions- und Streukoeffizienten für gesunde und pathologisch veränderte Synovialflüssigkeit und die Gelenkkapsel ermittelt werden. Diese sollten als Grundlage für ein neues optisches System zur frühen Diagnose von entzündlichen Gelenkerkrankungen dienen. Eine erste klinische Studie am Patienten zur Anwendung dieses auf veränderter Lichtstreuung basierenden Bildgebungsverfahrens wurde von Scheel et al. (2002) durchgeführt, bei dem die proximalen Interphalangealgelenke (PIP-Gelenke) von Patienten mit RA mittels Laser durchstrahlt wurden. Mit diesem Verfahren ist es bislang noch nicht möglich, definitiv zwischen gesunden und entzündeten Gelenken in verschiedenen Individuen zu unterscheiden. Unabänderliche individuelle Unterschiede in der Gelenkanatomie oder in der Hautbeschaffenheit, wie z. B. Feuchtigkeitsgehalt, Hautfarbe oder Verhornung, können die Ergebnisse der Laserbildgebung signifikant beeinflussen und die Effekte der Arthritis überlagern. Diese Methode ermöglicht jedoch eine frühe Diagnose von Gelenkentzündungen, wenn eine Aufnahme von dem gesunden unveränderten Gelenk des Patienten vorliegt. Dieses Durchleuchtungsverfahren ist als Verlaufskontrolle bei bzw. nach einer Therapie denkbar (Scheel et al., 2002).

Ein weiteres Einsatzgebiet findet die NIR-Bildgebung in der Diagnostik von Tumoren. Auch hier wurden zunächst Verfahren angewandt, die unterschiedliche optische Eigenschaften von Geweben bildgebend erfassen. Bei der optischen Mammographie konnte auf diesem Weg keine ausreichende Spezifität bei der Erkennung und Differenzierung von Tumoren erreicht werden (Riefke et al., 1997; Grosenick et al., 2003). Da bei bereits etablierten Verfahren, wie Röntgen, MRT und Ultraschall, der Einsatz von Kontrastmitteln eine bessere

Differenzierung zwischen benigne und maligne verändertem Geweben möglich macht und somit die diagnostische Aussagekraft erhöht, wurde auch bei der NIR-Bildgebung der Einsatz von Farbstoffen erprobt. Die Verwendung des unspezifischen Farbstoffes Indocyaningrün konnte die Darstellung von Tumoren in der optischen Mammographie deutlich verbessern (Li et al., 1995; Zhao et al., 1995).

Nach dem erfolgreichen Einsatz dieses unspezifischen Farbstoffes erfolgten Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der NIR-Farbstoffe, da die Einsatzmöglichkeiten von ICG aufgrund der initialen intravaskulären Verteilung, basierend auf der hohen Bindung an Plasmaproteine und der schnellen nachfolgenden hepato-biliären Exkretion, beschränkt sind. Einerseits wurden in Anlehnung an das ICG-Gerüst neue Cyaninfarbstoffe mit veränderten pharmakologischen Eigenschaften durch Substitution mit verschiedenen hydrophilen Resten (z. B. NIR-1) entwickelt (Licha et al., 1996). Andererseits erfolgte eine Kopplung von Cyaninfarbstoffen an spezifisch bindende Biomoleküle für eine spezifische Anreicherung der Farbstoffe. Eine Strategie für solch ein Verfahren ist die Bindung von Farbstoffen an monoklonale Antikörper oder deren Fragmente (Folli et al., 1994). Weiterhin ist eine Kopplung von Cyaninfarbstoffen an Peptide z. B. Somatostatinanaloga und somit eine Visualisierung von Tumoren bzw. deren Somatostatinrezeptoren möglich (Becker et al., 2001). Noch spezifischer erfolgt die Darstellung von Tumoren mit den von Weissleder et al. (1999; 2001) entwickelten „smarten“ bzw. „intelligenten“ Farbstoffen. Hierbei sind die Farbstoffe hochkonzentriert an ein Polymer gekoppelt („gequencht“) und somit ohne Fluoreszenzaktivität. In dieser inaktivierten Form werden die Farbstoffe intravenös verabreicht. Erst durch die Spaltung dieser Makromoleküle durch lysosomale Proteasen (z. B. Cathepsin B, Matrix-Metalloproteinasen) im Zielgewebe (z. B. Tumoren, vulnerable Plaques oder RA) kommt es zu einer Freisetzung der Farbstoffe und somit zu einem NIR-Signal.

Die Darstellung der NIR-Fluoreszenz in der üblichen Reflexionsanordnung hat den Nachteil, dass oberflächennahe Fluoreszenz heller erscheint als Fluoreszenz aus tiefer gelegenen Arealen. Aus diesem Grund wurde mit der optischen Tomographie ein Darstellungsverfahren entwickelt, welches eine dreidimensionale Darstellung und zudem auch eine quantitative Erfassung der Fluoreszenzintensität und somit der Enzymaktivität ermöglicht (Ntziachristos et al., 2002; Weissleder, 2002).

Die bisherigen erfolgversprechenden Anwendungen der farbstoffunterstützten NIR-Bildgebung in der Tumordiagnostik lassen auf eine mögliche Anwendung des Verfahrens in der Darstellung von entzündlichen Gelenkveränderungen schließen. Diese Idee wurde kürzlich auch von einer Arbeitsgruppe an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena aufgegriffen (Hansch et al., 2004). Bei dem verwendeten Modell der Antigeninduzierten-Arthritis (AIA) der Maus kommt es auf der Oberfläche der Makrophagen in den betroffenen Kniegelenken zu einer Expression des F4/80 Antigens. Die Darstellung der entzündlichen Veränderungen erfolgte durch einen an monoklonale F4/80 Antikörper gekoppelten Cyaninfarbstoff. Neben der signifikant höheren Fluoreszenz im Bereich des erkrankten Kniegelenkes kam es auch zu einer Anreicherung des hochmolekularen Farbstoffes in der Leber, was einen limitierenden Faktor bei der Anwendung in der Humanmedizin darstellt. Bemerkenswert bei dieser Untersuchung war, dass auch der als Kontrollsubstanz verwendete unspezifische Cyaninfarbstoff in den betroffenen Gelenken eine signifikant höhere Signalintensität im Vergleich zu den Kontrollgelenken bewirkte. Dies ist ein Hinweis darauf, dass für die routinemäßige Verwendung im Rahmen eines Screeningverfahrens der Einsatz relativ einfacher, preiswert zu synthetisierender und gut verträglicher modifizierter unspezifischer Cyaninfarbstoffe, die im Rahmen dieser Arbeit überprüft wurden, erfolgversprechend ist (Hansch et al., 2004).

Der Nachweis pathologischer Veränderungen mit Hilfe von unspezifischen NIR-Farbstoffen nach intravenöser Injektion basiert auf dem selben Prinzip wie das Extravasations- und Anreicherungsverhalten bekannter niedermolekularer unspezifischer MRT-Kontrastmittel (Gadolinium-Chelate z. B. Gd-DTPA) (Ercolani et al., 1998). Die Perfusionsunterschiede in entzündlich verändertem Gewebe beruhen zum einen auf einer verstärkten Durchblutung (Gefäßdilatation, Angiogenese) und andererseits auf einer verstärkten Permeabilität der Gefäße. Aus diesem Grund können bei der kontrastmittelunterstützten NIR-Untersuchung ebenso wie bei der MRT zwei Phasen beobachtet werden: 1. Die Anflutungsphase, die durch die erhöhte Durchblutung in entzündlich verändertem Gewebe charakterisiert wird und 2. die verstärkte Extravasation in der Equilibriumphase (Gleichgewichtsphase), in der sich das Kontrastmittel gleichmäßig im Organismus verteilt hat. In den Untersuchungen sollte unter anderem geklärt werden, in welcher Phase eine geeignete Differenzierung entzündlich veränderter von unveränderten Gelenken durchgeführt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst in Vorversuchen die zwei Fluoreszenzfarbstoffe Indocyaningrün (ICG) und NIR-1 auf ihre Eignung zum Nachweis von entzündlichen

Veränderungen bei Mäusen im Bereich der Sprunggelenke überprüft und geeignete Messbedingungen ermittelt. Anschließend wurde das Anreicherungsverhalten des Farbstoffes NIR-1 in den zwei Dosierungen 1 und 2 $\mu\text{mol/kg}$ untersucht, da dieser neue Farbstoff die für diese Studie geeigneteren Eigenschaften besitzt. Die Sprunggelenke der Mäuse wurden unmittelbar nach der NIR-Messung histologisch aufgearbeitet und evaluiert, um einen direkten Vergleich der Ergebnisse der histologischen Auswertung mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmessungen zu ermöglichen.

6.1 Arthritis-Tiermodell

Die Lyme-Borreliose der Labormaus ist ein etabliertes und gut erforschtes Tiermodell (Barthold et al., 1991, 1993). Dieses Modell dient hauptsächlich der Erforschung der Vorgänge bei einer Infektion mit Borrelien und liefert somit Rückschlüsse auf die humane Infektion mit *Borrelia burgdorferi* und deren Therapie. Im Gegensatz zur humanen Erkrankung kommen bei der Maus keine neurologischen oder dermatologischen Veränderungen vor. Somit stehen die entzündlichen Veränderungen im Bereich der Gelenke im Vordergrund. Betroffen sind vor allem die Tibiotarsalgelenke, die aufgrund ihrer Lage und ihrer relativ haarlosen Beschaffenheit gut für bildgebende Untersuchungen zugänglich sind. Die Borrelien-Arthritis der Maus zeigt nicht bei jedem Tier einen gleichen zeitlichen Verlauf und Ausprägungsgrad der entzündlichen Veränderungen. Bei einigen Tieren sind die histologischen Entzündungszeichen so gering, dass sie nicht als Tiere mit einer Arthritis eingestuft werden können.

6.2 Vorversuche

6.2.1 Vorversuche Indocyaningrün (ICG)

ICG ist ein seit langem bekannter unspezifischer NIR-Farbstoff, der bis heute in der Humanmedizin in der Herz-Kreislauf-Funktionsdiagnostik (Fox und Wood, 1960), in der Leber-Funktionsdiagnostik (Caesar et al., 1961) sowie zur Fluoreszenz-Angiographie in der Ophthalmologie (Brancato und Trabucchi, 1998) verwendet wird. Weiterhin wurde ICG erfolgreich als potentieller Farbstoff für den Nachweis von Tumoren am Tiermodell (Li et al.,

1995), in der Humanmedizin (Zhao et al., 1995; Haglund et al., 1996; Ntziachristos et al., 2000) und in der Veterinärmedizin (Reynolds et al., 1999) erprobt.

Die in der Humanmedizin verwendeten Dosierungen für die Herz-Kreislauf-Diagnostik und die Leber-Funktionsdiagnostik liegen zwischen 0,1 und 0,3 mg/kg (entspricht 0,13 bis 0,39 $\mu\text{mol/kg}$). Von Li et al. (1995) wurde ICG in einer Dosierung von 1,7 $\mu\text{mol/kg}$ für die Detektion von Mamma-Adenokarzinomen der Ratte verwendet. Für den Nachweis von Tumoren an der Milchleiste von Hunden wurde von Reynolds et al. (1999) ICG in einer Dosierung von 1 mg/kg (entspricht 1,3 $\mu\text{mol/kg}$) eingesetzt. Basierend auf diesen Untersuchungen wurden die Vorversuche mit einer Dosierung von 1 $\mu\text{mol/kg}$ durchgeführt.

Die Kurve der normierten Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Zeit im Bereich der Sprunggelenke nach der intravenösen Injektion von ICG steigt über einen Zeitraum von ca. 30 Sekunden an, um dann nach dem Erreichen eines Maximalwertes wieder abzufallen. Verglichen mit den Kontrolltieren ist dabei der maximale Wert bei den Tieren mit einer Gelenkentzündung etwa um das Doppelte höher. Somit ist eine deutliche Unterscheidung anhand des Anreicherungsverhaltes zwischen beiden Tiergruppen möglich. Mit diesen Beobachtungen können die Ergebnisse von Li et al. (1995) bestätigt werden, die bei der Detektion von Mamma-Adenokarzinomen der Ratte ebenfalls ein Maximum des Fluoreszenzsignals 30 Sekunden nach der intravenösen ICG-Injektion (Dosis 1,7 $\mu\text{mol/kg}$) und eine darauf folgende Abnahme des Signals nachweisen konnten. Im Bereich der Tumore konnte dabei ein ca. zweifach höheres Fluoreszenzsignal im Vergleich zum Kontrollbereich verzeichnet werden. Einen ähnlichen Verlauf der Anreicherungskurve konnte Licha et al. (2000) bei Ratten mit einem im Bereich der Flanke implantierten Gliom feststellen. Jedoch wurde ein maximaler Kontrast hier 2,5 Minuten nach der intravenösen Injektion von ICG (Dosis 0,5 $\mu\text{mol/kg}$) gemessen. Das unterschiedliche zeitliche Erreichen der Maxima der Fluoreszenzintensitäten könnte mit der jeweils gewählten Dosierung zusammenhängen, wobei bei einer höheren Dosis der Maximalwert scheinbar schneller erreicht wird als bei einer niedriger gewählten Dosis. Auch die unterschiedliche Morphologie der Tumoren könnte zu einem veränderten Anreicherungsverhalten der Farbstoffe führen.

ICG bindet nach intravenöser Gabe innerhalb von zwei Sekunden zu 98 % an Serumproteine. Somit ist eine Extravasation und ein Übergang in peripheres Gewebe (Equilibriumphase) dieses Farbstoffes nahezu ausgeschlossen. Das stärkere Ansteigen der normierten Fluoreszenzintensitäten im Bereich der Sprunggelenke mit einer Arthritis ist daher auf eine höhere Blutperfusion zurückzuführen, welche zu einer vermehrten Zufuhr

von ICG-Molekülen in diesem Bereich führt und somit ein höheres Fluoreszenzsignal bewirkt. Der Farbstoff wird mit einer Halbwertszeit von drei bis vier Minuten hepato-biliär aus dem Blutkreislauf eliminiert, was das beobachtete schnelle Absinken im Verlauf der NIR-Messung erklärt.

In den Vorversuchen konnte beobachtet werden, dass der Verlauf der Anreicherungskurve von den Untersuchungsbedingungen, wie z. B. Injektionsmenge, Injektionsgeschwindigkeit und Konzentration des gelösten Farbstoffes, abhängig sein kann. Aufgrund der möglichen Blutdruckdepression des verwendeten Ketamin-Xylazin-Injektionsnarkosegemisches kann es durch einen Blutdruckabfall zu einer verzögerten Anreicherung des Farbstoffes kommen.

6.2.2 Vorversuche NIR-1

Dem bereits etablierten unspezifischen Farbstoff ICG wurde in den Vorversuchen der auf dem ICG-Grundgerüst basierende, neu synthetisierte unspezifische Farbstoff NIR-1 gegenübergestellt. Dieser Farbstoff wurde bereits erfolgreich für die Darstellung von Tumoren am Tiermodell (Riefke et al., 1996; Licha et al., 2000; Boehm et al., 2001) verwendet. Die dabei verwendeten Dosierungen lagen zwischen 0,5 und 2 $\mu\text{mol/kg}$ KGW, so dass auch für die Vorversuche mit NIR-1 die mittlere Dosierung von 1 $\mu\text{mol/kg}$ gewählt wurde.

In den Vorversuchen mit diesem Farbstoff steigen die Kurven der normierten Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Zeit über den gesamten Messzeitraum (ca. zwei Minuten) nach der intravenösen Verabreichung des Farbstoffes im Bereich der Sprunggelenke an. In den Gelenken mit einer Arthritis sind dabei signifikant höhere Werte im Vergleich zu den Kontrollgelenken zu verzeichnen. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Boehm et al. (2001) überein, wobei bei Mäusen mit einem Mamma-Adenokarzinom nach der Injektion von NIR-1 (Dosis 2 $\mu\text{mol/kg}$) ebenfalls über einen Zeitraum von zwei Minuten eine starke Steigerung der Fluoreszenz ermittelt werden konnte, die im Bereich des Tumors signifikant höher war im Vergleich zu unverändertem Gewebe. In den darauf folgenden 20 Minuten erfolgte bei diesen Tieren keine weitere Steigerung der Fluoreszenzintensitäten. Dahingegen konnten Licha et al. (2000) bei Ratten mit im Bereich der Flanke implantierten Gliomen nach der intravenösen Injektion von NIR-1 (Dosis 0,5 $\mu\text{mol/kg}$) einen maximalen Kontrast nach sieben Minuten ermitteln. Danach sank der

Kontrast innerhalb von 100 Minuten auf das ursprüngliche Niveau. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass das Erreichen des Maximalwertes mit der Dosierung zusammenhängt. Eine höhere Dosis scheint ein schnelleres Erreichen des maximalen Signals zu bewirken.

Die NIR-Messungen mit NIR-1 sind im Vergleich zu den Versuchen mit ICG stabiler gegen äußere Einflüsse, wie Injektionsmenge, Injektionsgeschwindigkeit und Kreislaufsituation der Tiere.

6.2.3 Einstellung der Messbedingungen und Optimierung der Messtechnik

Neben der Überprüfung der zwei Farbstoffe ICG und NIR-1 erfolgte in den Vorversuchen die Ermittlung der optimalen Einstellungen der Messtechnik, wie z. B. Entfernung und Ausrichtung der optischen Faser und der intensivierten CCD-Kamera, Anpassung des Filters, Bestimmung der Belichtungszeiten, Anzahl der Aufnahmen sowie die Messdauer.

Da für ein reproduzierbares und vergleichbares Ergebnis der Anreicherungskurve einer Fluoreszenzmessung einheitliche und standardisierte Injektionsbedingungen von großer Bedeutung sind, war es notwendig, diese in den Vorversuchen zu definieren. Die anfängliche Injektion des Farbstoffes per Hand, bei welcher die Ergebnisse starken Schwankungen unterlagen, wurde durch den Einsatz einer Spritzenpumpe mit einer konstanten Injektionsgeschwindigkeit von 250 ml/h abgelöst. Bei der Festlegung der zu injizierenden Flüssigkeitsmenge war zu beachten, dass das Volumen aufgrund einer möglichen Kreislaufbelastung des Tieres nicht zu hoch, aber auch aufgrund der dadurch höheren Fehlerquelle nicht zu niedrig gewählt werden darf. Als geeignet erwies sich für diese Versuche ein im Bolus verabreichtes Volumen von 50 bis 60 µl.

Ebenso wichtig wie die Einhaltung der gleichen Mess- und Injektionsbedingungen für eine vergleichbare Auswertung ist auch die Lagerung der Tiere und die Lagerung der Referenz. Dabei war zu beachten, dass die Tiere immer in gleicher Position in der Mitte des ausgeleuchteten Bereiches und die Referenz in der rechten oberen Ecke positioniert waren.

6.2.4 Schlussfolgerungen aus den Vorversuchen

Für die Durchführung weiterer Versuche mit größeren Tiergruppen wurde nach den Vorversuchen der Farbstoff NIR-1 ausgewählt. Dieser Farbstoff scheint aufgrund der verbesserten pharmako-kinetischen Eigenschaften und dem damit veränderten Anreicherungsverhalten besser für den Nachweis von entzündlichen Veränderungen geeignet. Durch die Substitution von hydrophilen Seitenketten konnte eine wesentlich geringere Plasmaproteinbindung (10 %) erreicht werden, die eine Extravasation aus den Blutgefäßen ins umliegende Gewebe ermöglicht und gleichzeitig einen Schutz vor schneller hepato-biliärer Elimination aus dem Blutvolumen bietet. Durch die Anreicherung von NIR-1 im Gebiet einer Entzündung ist ein deutlich besserer Nachweis entzündlicher Veränderungen durch eine Equilibriumphase möglich. Vergleichend dazu wird mit ICG lediglich der sehr kurzzeitige Effekt der höheren Perfusion ausgenutzt. Es findet mit diesem Farbstoff keine Equilibriumphase statt.

Bei gleicher Dosierung können mit NIR-1 etwa doppelt so hohe Fluoreszenzintensitäten im Bereich der entzündlichen Veränderungen erreicht werden.

Ein weiterer Punkt, der für den Einsatz von NIR-1 spricht, ist die wesentlich bessere Verträglichkeit dieses Farbstoffes. Während ICG in höheren Dosen toxisch ist (LD₅₀ der Maus 60 – 80 µmol/kg) (Warner, 1971), konnten bei NIR-1 auch bei der höchsten getesteten Dosis von 5000 µmol/kg keine letalen Effekte vermerkt werden (Riefke et al., 1996).

6.3 NIR-Messungen mit NIR-1

Als Dosierungen für die weiteren Versuche wurden die in den Vorversuchen verwendete Dosis von 1 µmol/kg und zusätzlich die von Riefke et al. (1996) und Boehm et al. (2001) eingesetzte Dosis von 2 µmol/kg gewählt.

Nach der Durchführung der Messungen wurden zunächst die Werte für die normierten Fluoreszenzintensitäten aller Kontrolltiere und Tiere mit einer Gelenkentzündung zusammengefasst, die Mediane und Quartile berechnet und als Verlaufskurve über den gesamten Messzeitraum aufgetragen. Ziel war es, zu erkennen, ob sich das Anreicherungsverhalten des Farbstoffes beider Tiergruppen voneinander unterscheidet und

welche Ansatzpunkte sich für eine Auswertung der NIR-Messungen bieten. Die Betrachtung der beiden Kurven der normierten Fluoreszenzintensitäten für die Dosis von 1 $\mu\text{mol/kg}$ zeigt einen deutlich unterschiedlichen Verlauf der Werte der beiden Tiergruppen im Bereich der Sprunggelenke, was durch eine nicht-parametrische Varianzanalyse statistisch bestätigt wurde. Die Kurve, die den Tieren mit einer Entzündung entspricht, steigt über den gesamten Zeitraum stärker an als die Kurve für die Kontrolltiere. Die statistisch signifikanten Unterschiede in den normierten Fluoreszenzintensitäten sind fünf Minuten nach der Injektion des Farbstoffes größer als nach drei Minuten, so dass sich dieser Messzeitpunkt besser für eine Abgrenzung zwischen Kontrolltieren und Tieren mit einer Arthritis eignet. Lediglich im Bereich der höchsten Werte der Kontrolltiere und der kleinsten Werte für die Tiere mit einer Arthritis gibt es geringe Überschneidungen. So können in der vorliegenden Studie Tiere, die nach fünf Minuten eine normierte Fluoreszenzintensität über 1,5 aufweisen, der Gruppe der Tiere mit einer Arthritis zugeordnet werden. Dieser Wert hat jedoch nur für die vorliegende Studie Gültigkeit. Durch Erweiterung des Stichprobenumfangs unter Einbeziehung weiterer Spezies könnte ein sicherer Referenz- bzw. Schwellenwert für eine normierte Fluoreszenzintensität ermittelt werden, der die Abschätzung einer Arthritis ohne vergleichendes Kontrollgelenk möglich macht. Der Vergleich der Steigungen der Kurve der normierten Fluoreszenzintensitäten von Kontrolltieren und den Tieren mit einer Arthritis in den ersten 45 Sekunden ergibt für die Dosis von 1 $\mu\text{mol/kg}$ ebenfalls einen signifikanten Unterschied. Dieser ist jedoch geringer, als der Vergleich der normierten Fluoreszenzintensitäten drei und fünf Minuten nach der Farbstoffinjektion. Für die Diagnose einer Arthritis im Tiermodell scheint daher diese Form der Auswertung weniger geeignet, da es sich um einen relativ kurzen Zeitraum und somit von äußeren Einflüssen (Injektionsbedingungen, mögliches Blutkoagulum im Venenverweilkatheter, Kreislaufdepression) stark beeinflussbaren Parameter handelt. Für eine Anwendung dieses Verfahrens am Menschen könnte diese Auswertung der Messdaten durchaus geeignet sein, da beim Mensch im Vergleich zur Maus andere Größenverhältnisse vorliegen und einheitlichere Injektionsbedingungen einzuhalten sind.

Bei der Dosis 2 $\mu\text{mol/kg}$ unterscheiden sich die Kurven der Kontrolltieren und den Tieren mit einer Arthritis für die normierten Fluoreszenzintensitäten nicht in ihrem Verlauf. Der Vergleich der normierten Fluoreszenzintensitäten nach drei und fünf Minuten sowie die Steigung der Kurve ergibt keine statistisch signifikanten Unterschiede. Der Grund für den gleichartigen Verlauf der beiden Kurven bei dieser Dosierung könnte ein Überdosierungseffekt sein. In der Literatur finden sich kaum Ausführungen zu einem

Überdosierungseffekt bei der Gabe von Farbstoffen oder Kontrastmitteln, da vermutlich eine Veröffentlichung von Daten nur bei eindeutigen Ergebnissen vorgenommen wird. Untersuchungen im Rahmen von Dissertationen weisen aber darauf hin, dass es auch bei der Gabe von MRT-Kontrastmitteln zu einem Überdosierungseffekt, z. B. bei der Angiographie (Abramjuk, 2001) kommen kann, der zu einem frühen Zeitpunkt den signalsteigernden Effekt überlagert, was zu einer Überkontrastierung führt. Möglicherweise eignet sich daher die Dosis von 2 $\mu\text{mol/kg}$ bei entzündlichen Veränderungen im Bereich eines Gelenkes nicht für die Ermittlung der Fluoreszenz unmittelbar nach der Farbstoffinjektion. Eine von Riefke et al. (1996) durchgeführte Betrachtung der NIR-Bildgebung über einen längeren Messzeitraum bei Ratten mit Mammakarzinomen in der Flanke ergab den besten Kontrast zwischen Tumor und umliegendem Gewebe für NIR-1 bei einer Dosis 2 $\mu\text{mol/kg}$ 24 Stunden nach der Farbstoffinjektion. Zu diesem Zeitpunkt war fast der gesamte Farbstoff aus dem Körper eliminiert, lediglich im Bereich des Tumors konnte eine erhöhte Fluoreszenz ermittelt werden.

24 Stunden nach der Farbstoffinjektion wurden die Tiere erneut in Narkose versetzt und die noch vorhandene Fluoreszenz ermittelt. Aufgrund der renalen Ausscheidung des Farbstoffes und des schwer zu realisierenden Schutzes der Hintergliedmaßen vor einer externen Kontamination durch den Harn der Tiere waren die Daten jedoch nicht auswertbar.

6.4 Visuelle Einstufung durch eine qualitative Auswertung der NIR-Bilder durch zwei Untersucher

Bei dieser Form der Auswertung wurden die NIR-Bilder, die fünf Minuten nach der Farbstoffinjektion aufgenommen wurden, einheitlich skaliert und zwei Untersuchern zur Bewertung vorgelegt. Dabei sollte überprüft werden, ob anhand des Verteilungsmusters der Fluoreszenz im Bereich der Sprunggelenke auf das Vorhandensein einer Arthritis geschlossen werden kann. Die Anzahl von lediglich zwei Untersuchern ist für eine statistische Analyse zu gering und soll lediglich einer Trendaussage dienen.

Bei der Betrachtung der nach fünf Minuten erfassten Fluoreszenzbilder bei einer Dosis von 1 $\mu\text{mol/kg}$ wird von den Untersuchern nur eine geringe Sensitivität (14 % bzw. 57 %) erreicht. Die Sensitivität beschreibt die Fähigkeit, die Tiere mit einer Arthritis vollständig

herauszufiltern. Das bedeutet, dass nur rund ein Sechstel bzw. etwa die Hälfte der Tiere mit einer Arthritis richtig eingeordnet wurden. Dem gegenüber steht eine verhältnismäßig hohe Spezifität (86 % und 71 %). Die Spezifität wiederum ist die Fähigkeit dieses Tests, ausschließlich Tiere ohne eine Arthritis zu erfassen. Die visuelle Einstufung der NIR-Bilder scheint bei der Dosis von 1 $\mu\text{mol/kg}$ nicht geeignet zu sein, da mit diesem Verfahren nur ein kleiner Teil der Tiere mit einer Arthritis als erkrankten Tiere befundet wurde.

Bei der individuellen Auswertung der aufgenommenen Fluoreszenz-Bilder für die Dosis von 2 $\mu\text{mol/kg}$ wurden Sensitivitäten von 100 % bzw. 86 % erreicht, d. h. die mit Borrelien infizierten Tiere wurden vollständig bzw. zu einem hohen Anteil herausgefiltert. Die Sensitivität und die Spezifität von Tests stehen meist in umgekehrtem Verhältnis zueinander, d. h. je spezifischer ein Test ist, desto unvollständiger ist die Erfassung und umgekehrt. Daher überrascht es nicht, dass die Spezifität bei dieser Dosis nur 60 % für beide Untersucher beträgt. Die Ergebnisse der qualitativen Auswertung der NIR-Bildgebung weichen somit von den quantitativ ermittelten Ergebnissen für die normierten Fluoreszenzintensitäten ab, bei denen keine Unterscheidung zwischen Kontroll- und Entzündungstieren bei dieser Dosierung möglich war. Grundsätzlich scheint sich somit die Betrachtung der entstehenden Fluoreszenz-Bilder bei der Dosis von 2 $\mu\text{mol/kg}$ durch einen Untersucher für eine erste Begutachtung zu eignen, sie steht aber in der Zuverlässigkeit weit hinter der statistischen Auswertung der normierten Fluoreszenzintensitäten bei der Dosis von 1 $\mu\text{mol/kg}$.

6.5 Histologische Untersuchung

Zur Bestätigung des Vorliegens einer Arthritis bei den Tieren mit einer Borrelien-Infektion wurde die histologische Untersuchung gewählt, da diese ein etabliertes Verfahren zur Diagnostik von Gelenkveränderungen darstellt. Zudem ist es ein kostengünstiges, wenn auch durch die notwendige Entkalkung ein sehr zeitaufwändiges Verfahren. Für die histologische Auswertung der Borrelien-Arthritis der Maus sind der Literatur umfassende Informationen zu entnehmen (Barthold et al., 1991; Barthold et al., 1993; Barthold, 1996).

Die Proben zur histologischen Aufarbeitung wurden am Tag nach der NIR-Messung entnommen und entsprechen somit weitestgehend den Bedingungen am Messtag. Die histologische Untersuchung erfolgte mit Hilfe einer Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung zur

Beurteilung des Sprunggelenkes bzw. dessen Umgebung hinsichtlich pathologischer Veränderungen. Die Auswertung wurde anhand eines in Zusammenarbeit mit Prof. Krenn (Institut für Pathologie, Charité Campus Mitte, Berlin) entwickelten „Murinem Arthritis-Score“ vorgenommen. Analog zum Synovitis-Score für humane Arthritiden (Krenn et al., 2002) wurden die Kriterien für die histologische Auswertung gewählt.

6.5.1 Kontrolltiere

Für beide Kontrollgruppen ergibt sich im Histologie-Score ein Median von null Punkten.

6.5.2 Tiere mit Borrelien-Infektion

Übereinstimmend mit den in der Literatur beschriebenen Veränderungen bei einer Infektion mit Borrelien (Barthold et al., 1991) sind die patho-histologischen Veränderungen im Bereich der Synovialis, der Achillessehne und im umliegenden Gewebe besonders ausgeprägt. Die Synovitis ist gekennzeichnet durch eine zelluläre Infiltration (neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten), durch die Verbreiterung der synovialen Deckzellschicht und durch eine Proliferation und Aktivierung der residenten Zellen, insbesondere Fibroblasten und Endothelien. Die Beurteilung der umliegenden Strukturen, wie Sehnenscheiden (Tenosynovitis), Periost (Periostitis), subkutanes Bindegewebes und Skelettmuskulatur (Periarthritis) erfolgte anhand der Dichte des entzündlichen Infiltrates. Veränderungen an Knorpel und Knochen waren relativ selten zu beobachten. Diese werden sichtbar durch Unebenheiten in der Oberfläche des Knorpels (Grad 1), in der flächenhaften Abnahme der Knorpeldicke (Grad 2) und schließlich in einer Zerstörung des subchondralen Knochens (Grad 3).

Die Gruppen der Tiere mit einer Borrelien-Infektion für die beiden Dosierungen von 1 und 2 $\mu\text{mol/kg}$ unterscheiden sich gering in der Ausprägung der Entzündungszeichen im Bereich der Sprunggelenke (Tabelle 2). Während bei der Gruppe 2 (Dosis 1 $\mu\text{mol/kg}$) der Histo-Score von zwei bis 15 reicht, schwanken die Werte bei der Gruppe 4 (Dosis 2 $\mu\text{mol/kg}$) lediglich von zwei bis zehn. Die Mediane für beide Gruppen betragen jedoch einheitlich sieben.

6.6 Vergleich der Befunde

Für den Vergleich der histologischen Veränderungen mit den normierten Fluoreszenzintensitäten fünf Minuten nach der Injektion des Farbstoffes wurden die Tiere anhand ihrer histologischen Veränderungen in vier Gruppen, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, eingeteilt.

Die Höhe der normierten Fluoreszenzintensitäten fünf Minuten nach Farbstoffapplikation scheint bei der Dosis von 1 $\mu\text{mol/kg}$ mit dem Ausmaß der histologischen Veränderungen zusammenzuhängen. So kann eine Steigerung der normierten Fluoreszenzintensitäten von der Gruppe ohne histologische Veränderungen im Vergleich zu den Gruppen mit geringgradigen und mittelgradigen Veränderungen beobachtet werden. Bei der Gruppe mit hochgradiger Arthritis sind die normierten Fluoreszenzintensitäten wieder geringer im Vergleich zu der Gruppe mit mittelgradiger Arthritis. Die beiden letztgenannten Gruppen beinhalten nur vier bzw. fünf Werte, was eine statistische Beurteilung erschwert, jedoch eine Tendenz erkennen lässt.

Stadien einer chronisch proliferativen Entzündung, wie sie in der Gruppe der Tiere mit hochgradiger Arthritis vorkommen, sind gekennzeichnet durch die Zubildung kollagener und elastischer Fasern bei gleichzeitiger Verminderung der Anzahl der Gefäße (Sandersleben et al., 1989; Weiss, 1990). Die Reduktion der Blutgefäße kann zur Erklärung der niedrigeren Fluoreszenzintensität der Gruppe der Tiere mit einer hochgradigen Arthritis im Vergleich zu den Tieren mit einer mittelgradigen Arthritis herangezogen werden, da die vermehrte Gefäßdichte hauptsächlich für die erhöhte Signalintensität im Bereich pathologischer Veränderungen (z. B. Tumoren) beim Einsatz von unspezifischen NIR-Farbstoffen verantwortlich gemacht wird (Li et al., 1995).

Unspezifische Cyanin-Farbstoffe, zu denen auch NIR-1 gehört, sind in ihrem Extravasations- und Anreicherungsverhalten vergleichbar mit niedermolekularen unspezifischen MRT-Kontrastmitteln (Ercolani et al., 1998), bei deren Einsatz nachgewiesen werden konnte, dass aktive Arthritiden mit einer hohen Entzündungszellichte und Neovaskularisation einen hohen Grad der Anreicherung der Kontrastmittel bewirken (Bollow et al., 2000).

Bei der Dosis von 2 $\mu\text{mol/kg}$ scheint es keine Beziehung zwischen den normierten Fluoreszenzintensitäten und den histologischen Veränderungen zu geben. Die beiden

Gruppen ohne und mit geringgradiger Ausprägung der Arthritis unterscheiden sich kaum im Median und in den Werten für das erste und vierte Quartil. Bei den Tieren mit einer mittelgradigen Arthritis ist der Wert für den Median und das vierte Quartil etwas niedriger. In dieser Dosisgruppe gibt es keine Tiere mit einer hochgradigen Arthritis. Auffällig ist die starke Streuung in der Kontrollgruppe. Auch hier könnte ein Überdosierungseffekt als Ursache angenommen werden.

6.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die NIR-Bildgebung unter Einsatz unspezifischer Farbstoffe im Tiermodell für den Nachweis von entzündlichen Veränderungen im Bereich eines Gelenkes eignet. Basierend auf den in diesen Versuchen gewonnenen Erkenntnissen ist die Durchführung weiterer Untersuchungen sinnvoll und notwendig. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse ist ein baldiger Einsatz der NIR-Bildgebung in der Human- und Veterinärmedizin neben Röntgen, Ultraschall, CT und MRT zum frühen Nachweis von Arthritiden vorstellbar und realistisch.

Weiterführende Studien am Tiermodell sollten dabei untersuchen, wie sich die Anreicherungskurve der normierten Fluoreszenzintensitäten des Farbstoffes NIR-1 bei der Dosis von 1 $\mu\text{mol/kg}$ über einen längeren als den bisher gewählten Zeitraum verhält und ob zu einem späteren Zeitpunkt eine noch bessere Diagnose einer Arthritis möglich ist. Weiterhin könnte die Analyse der Anreicherungskurve nach der Injektion der Dosis von 2 $\mu\text{mol/kg}$ über einen längeren Zeitraum Aufschluss darüber geben, ob sich diese Dosis für eine spätere quantitative Beurteilung eignet. Ein weiteres Ziel ergänzender Untersuchungen könnte auch die Erfassung des Anreicherungsverhaltens dieses Farbstoffes bei niedrigeren Dosierungen sein, um die kleinstmögliche effektive Dosis zu ermitteln und somit die zu applizierende Farbstoffmenge so gering wie möglich zu halten. Neben dem Einsatz von unspezifischen NIR-Farbstoffen ist die Entwicklung von spezifischen Farbstoffen vorstellbar, die an entzündungsspezifische Zellen (z. B. Makrophagen) binden. Denkbar wäre auch die selektive Darstellung von Zellen bzw. Geweben im Gelenk, die in sehr frühe entzündliche Veränderungen involviert sind (Synovialzellen, Blutgefäße). Hierfür sollte ein Tiermodell einer milden Form der Arthritis, die zu einem definierten Zeitpunkt auftritt, entwickelt werden, um zu zeigen, dass die NIR-Bildgebung geeignet ist, besonders frühe Stadien einer Arthritis nachzuweisen, die noch keine radiologisch erkennbaren Schädigungen aufweisen. Dabei

wäre ein Tiermodell der Ratte dem der Maus aufgrund der günstigeren Größenverhältnisse und des geringeren Narkoserisikos vorzuziehen. Bei diesen Tieren wäre auch eine bessere Erfassung der klinischen Parameter einer Entzündung (Rötung, Schwellung, Funktionseinschränkung) sowie die zusätzliche Durchführung ergänzender bildgebender Verfahren (z. B. Röntgen, MRT) möglich.