

## 3 Grundlagen und Literaturübersicht

### 3.1 Rheumatoide Arthritis

Es gibt zahlreiche entzündliche Erkrankungen der Weichteil- bzw. Knochenstrukturen, die dem rheumatischen Formenkreis zugeordnet werden. Mit ca. 50% machen die rheumatoiden Arthritiden einen erheblichen Anteil aus. Die Begriffe rheumatoide Arthritis (RA) und chronische Polyarthritis werden in der Literatur synonym verwendet. Es ist eine systemisch entzündliche Bindegewebserkrankung unklarer Genese mit bevorzugter Manifestation an den Gelenken. Sie ist mit einer chronischen Entzündung der Synovialis verbunden. Diese greift kurz- oder längerfristig auf das Knorpel- und Knochengewebe über und führt zu einer radiologisch nachweisbaren Destruktion der Gelenke. Extraartikuläre Areale wie Sehnenscheiden, Gefäße und innere Organe können ebenfalls entzündlich verändert sein.

Diese entzündlichen Vorgänge verursachen Schmerzen in den betroffenen Gelenken bzw. gelenknahen Regionen und führen zu Schwellungen, Funktionseinschränkungen und im späteren Stadium zu Gelenkdeformationen. In der Humanmedizin wird die Diagnose RA anhand von Klassifikationskriterien erstellt. Die Kriterien umfassen Morgensteifigkeit, Arthritis in drei oder mehreren Gelenken, Beteiligung der Hand, symmetrischer Befall, Rheumaknoten, Rheumafaktor sowie den radiologischen Nachweis von Erosionen an den Hand-, Finger- oder Zehengelenken.

Die Prävalenz beträgt in Westeuropa und den USA ca. 1% der Bevölkerung. Sie nimmt mit steigendem Alter zu und erreicht etwa 2% bei Männern und Frauen über 55 Jahren. Frauen erkranken etwa zwei- bis dreimal häufiger als Männer.

Die Ätiologie der RA ist bis heute nicht geklärt. Es existieren verschiedene Hypothesen:

Eine erregerbedingte Induktion wird diskutiert. Hier werden Bakterien wie diphteroide Bazillen, Clostridien, verschiedene Mykoplasmentypen und Enterobakterien bzw. deren Zellwandbestandteile in Betracht gezogen. Auch Viren wie Picornaviren, Parvoviren, Zytomegalievirus und im Besonderen das Epstein-Barr-Virus wurden als mögliche Erreger untersucht. Die infektiöse Induktion der RA ist nicht geklärt.

Die genetische Induktion gilt inzwischen als gesichert. Eine familiäre Häufung wird seit langem beobachtet. Zwillingsstudien in den 60er und 80er Jahren haben belegt, dass genetische Faktoren das Erkrankungsrisiko erhöhen. Es wurde nachgewiesen, dass bei Patienten mit chronischer Polyarthritis das Histokompatibilitätsantigen HLA-DR4–negativ in vermehrter Häufigkeit auftritt. Dieses Antigen fördert die durch T-Zellen vermittelte Immunität gegen Kollagen.

Die Autoimmunhypothese beschreibt Reaktionen auf zellulärer bzw. humoraler Ebene gegenüber körpereigenem IgG und Kollagen, die die Synovialis und den hyalinen Knorpel krankhaft verändern. Der Rheumafaktor, ein Autoantikörper gegen den Fc-Teil des IgG wird bei der RA häufig nachgewiesen, kann aber nicht als eindeutiges Diagnosekriterium herangezogen werden, da er sich auch bei 4-8% der gesunden Menschen nachweisen lässt (Miehle und Zacher, 1999; Zink *et al.*, 2001).

Bei der Auslösung und Unterhaltung entzündlicher Prozesse spielen proinflammatorische Zytokine als Botenstoffe eine Schlüsselrolle, da die Zellen mit deren Hilfe miteinander kommunizieren. Zytokine sind Polypeptide, die im Rahmen eines Netzwerkes von agonistisch und antagonistisch wirksamen Zytokinen und physiologischen Inhibitoren agieren. Zytokine, die zur Pathogenese einer RA beitragen, werden hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen, jedoch auch von Fibroblasten sezerniert. Als Schlüsselzytokine bei der Entstehung der RA gelten Interleukin-1 (IL-1) und der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha). IL-1 stimuliert die Produktion von matrixabbauenden Enzymen (z.B. Kollagenase, Elastase, Stromelysin), ist für die Reduktion der Proteoglykansynthese in Chondrozyten verantwortlich und fördert dadurch den Knorpelabbau. Eine vermehrte Synovialitis wird durch die Proliferation von B- und T-Zellen hervorgerufen (Alsalameh *et al.*, 1992; Hein *et al.*, 1995).

### **3.2 Tiermodell**

Für die der humanen RA ähnliche Gelenkentzündung am Tier sind in der Literatur zahlreiche Tiermodelle mit Mäusen, Ratten und auch Kaninchen beschrieben. Sowohl in Bezug auf die Ätiologie als auch auf die Tierart gibt es diverse Unterschiede.

Miehle und Mitarbeiter (1999) grenzen die Tiermodelle hinsichtlich ihrer Ätiologie voneinander ab. Sie unterscheiden erregerinduzierte von autoimmunbedingten Arthritiden. Zu den infektiös bedingten Gelenkentzündungen zählen die Borrelien- und die Adjuvansarthritis, die jeweils bei Mäusen und Ratten angewendet werden. Eine systemische Injektion von Streptokokken-A-Zellwandprodukten kann bei Ratten zu einer RA-ähnlichen Polyarthritiden führen. Eine intraartikuläre Injektion von Proteinantigenen in das Kniegelenk wird bei Mäusen, Kaninchen und Vögeln praktiziert, die nach vorheriger Immunisierung mit demselben Antigen eine Monarthritiden entwickeln.

Zu den autoimmunbedingten Gelenkentzündungen der Versuchstiere zählt die spontane Rheumafaktor-positive Arthritis der Maus, die diese aufgrund eines rezessiven lymphoproliferativen Gens entwickelt. Ein für die Rheumaforschung häufig verwendetes Arthritis-Modell ist die Kollagen-induzierte Arthritis der Ratte bzw. Maus (Fehr, 2000).

### 3.2.1 Kollagen-induzierte Arthritis

Erstmals 1977 wurde die CIA (collagen-induced arthritis) als ein die RA simulierendes Modell von Trentham beschrieben. Natives bzw. lösliches Kollagen Typ II, das vom Menschen, von der Ratte, vom Huhn oder vom Rind stammen kann, wird in einer Emulsion mit komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans (Mineralöl mit hitze-inaktivierten Mikroorganismen bzw. reines Mineralöl) intradermal injiziert. Es provoziert bei empfänglichen Ratten- bzw. Mäusestämmen eine entzündliche Arthritis. Die Suszeptibilität beträgt für Ratten ca. 40%. Kollagen Typ I und III haben dagegen keinen arthritogenen Effekt (Trentham *et al.*, 1977).

- **Mechanismus**

Die Immunisierung mit Kollagen Typ II ruft eine humorale und zelluläre Immunantwort hervor, die gegen Gelenkknorpel gerichtet ist, auf dem die Antigene hauptsächlich lokalisiert sind. Die Übertragung der Arthritis ist durch Lymphozyten-Transfer von einem erkrankten Tier auf ein gesundes Tier möglich und beweist, dass der Kollagen-induzierten Arthritis ein antikörpervermittelter Prozess zu Grunde liegt (Trentham *et al.*, 1978). Es kommt zur Ausbildung von Antikörpern gegen das körpereigene Kollagen vom Typ II, das ein wesentlicher Bestandteil des hyalinen Gelenkknorpels ist. Allerdings haben nur Antikörper, die gegen spezifische Epitope (Ort auf der Moleküloberfläche, an dem der Antikörper an das Antigen bindet) des Kollagens gerichtet sind, eine arthritogene Wirkung (Durie *et al.*, 1994). Auf zellulärer Ebene sind die T-Zellen für die Immunantwort auf das fremde Kollagen verantwortlich (Trentham *et al.*, 1978; Stuart *et al.*, 1979). Somit ist es möglich die Induktion einer CIA durch den experimentellen Verbrauch von T-Zellen mittels spezifischer monoklonaler Antikörper zu verhindern.

Es besteht eine genetische Abhängigkeit. Nur bestimmte Ratten- und Mäusestämmen entwickeln nach Kollagengabe eine Arthritis, es werden vornehmlich Ratten vom Wistar-Lewis- und Sprague-Dawley-Stamm verwendet. Die genetische Disposition steht mit spezifischen MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex) Haplotypen in Verbindung. Somit sind für die CIA dieselben genetischen Faktoren verantwortlich wie für die humane rheumatoide Arthritis (Durie *et al.*, 1994).

- **Klinik**

Die Kollagenarthritis ist ein bezüglich der Klinik sehr ähnliches Modell wie die Adjuvansarthritis. Ca. 10-16 Tage nach Immunisierung, mit einem durchschnittlichen Höhepunkt am 21.Tag, entwickelt sich explosiv eine Entzündung der distalen Gelenke,

vornehmlich der Hinterextremitäten. Es kommt zu einer starken ödematösen Schwellung und Rötung der betroffenen Gelenke, vor allem des Tibio-Tarsalgelenkes und der Interphalangealgelenke. Die Symptome können uni- bzw. bilateral auftreten. Trentham beschreibt bei einer Gruppe von 28 Tieren eine bilaterale Ausprägung von zehn, gegenüber 18 unilateral erkrankten Tieren. Das Ausmaß der Schwellung ist so enorm, dass sie durch eine kalimetrische Messung erfasst werden kann. Bei Wistar-Lewis-Ratten wird ein durchschnittlicher Umfang von arthritischen Sprunggelenken von  $10,2 \pm 0,3$  mm gegenüber  $6,4 \pm 0,1$  mm von Ratten gleichen Alters, die nicht behandelt waren, angegeben. Die Arthritis persistiert dann über vier bis sechs Wochen (Trentham *et al.*, 1977).

- **Histologie**

Histopathologische Untersuchungen der entzündeten Gelenke zeigten, dass es sich um eine chronisch proliferative Synovialitis handelt, die sich in zwei Stadien einteilen lässt (Trentham *et al.*, 1977; Caulfield *et al.*, 1982). Caulfield beschreibt eine Fibrinablagerung in und um die Synovialmembran wie auch auf der Gelenkknorpeloberfläche als erste erkennbare Läsion, die 5-12 Tage nach Immunisierung beginnt (Caulfield *et al.*, 1982). Neben der Fibrinablagerung zeigt sich eine vermehrte Mitose der Synoviozyten.

Einige Tage später beginnt das zweite Stadium mit der Einwanderung einer gemischten Population von polymorphkernigen Leukozyten und mononukleären Entzündungszellen (Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen) in das proliferierte Synovialgewebe (Pannus). Trentham (1977) beobachtete hingegen 24h nach den ersten Symptomen einer Arthritis, somit durchschnittlich erst am 22.Tag nach Immunisierung, neben einem ausgeprägten Ödem eine Infiltration von zahlreichen mononukleären Entzündungszellen und vereinzelt neutrophilen Granulozyten. Im späteren Stadium kommt es dann zu einer Hypertrophie und Fibrosierung der Synovialmembran, bedingt durch Proliferation von Synoviozyten und Fibrozyten. Dieser synoviale Pannus ist für die Knorpel- und subchondrale Knochenerosion verantwortlich. Trentham beobachtete des Weiteren regelmäßig eine periostale Zubildung, die eine Ankylose (Gelenkversteifung) bedingt. Mit dem Erscheinen der Entzündungszellen beginnt auch der Abbau des Gelenkknorpels und der Epiphysen (Trentham, 1982).

Wichtig ist die Frage, ob sich das Modell der Kollagenarthritis auf das Erkrankungsbild der rheumatoiden Arthritis übertragen lässt. Bezüglich der Histologie sind beide chronisch proliferativen Synovitiden sehr ähnlich (Trentham *et al.*, 1977; Morgan *et al.*, 1980). Bei beiden Erkrankungen zeigt sich eine Sensitivität gegenüber Kollagen sowohl auf humoraler wie auch auf zellulärer Ebene (Andriopoulos *et al.*, 1976; Trentham *et al.*, 1978). Die Vergleichbarkeit hinsichtlich der Immunantwort ist noch nicht endgültig geklärt. Es konnten jedoch einige Parallelen zwischen den beiden Krankheitsbildern aufgedeckt werden.

Während Trentham die bei der rheumatoiden Arthritis regelmäßig auftretenden Rheumafaktoren und Antinukleären-Antikörper bei der Kollagenarthritis nicht nachweisen konnte, wurden bei CIA-empfindlichen transgenen Mäusen Rheumafaktoren und Kollagenantikörper gefunden (Taneja *et al.*, 2002). Weiterhin konnten bei den transgenen Mäusen auch Kollagen-II-spezifische T-Zellen zu Beginn und im weiteren Krankheitsverlauf nachgewiesen werden (Wooley *et al.*, 1981). Diese lassen sich auch in der Synovia von RA - Patienten nachweisen. Eine genetische Disposition muss sowohl für das Tier, als auch für den Menschen gegeben sein, um an der jeweiligen Arthritis zu erkranken (Griffiths *et al.*, 1981). Eine geschlechtsabhängige Erkrankungsrate ist sowohl bei der RA als auch der CIA nachweisbar. Frauen erkranken etwa 2,5-mal häufiger als Männer. Während es sich bei Ratten ebenso verhält, dass die Weibchen empfänglicher sind, ist es bei Mäusen genau umgekehrt.

Im Hinblick auf den Mechanismus, die Genetik und die Histologie, scheinen die Arthritiden gut vergleichbar zu sein. Bezüglich der Pathogenese gibt es hingegen zahlreiche Unterschiede. Im Gegensatz zur RA tritt die Kollagenarthritis nicht spontan auf, sondern muss, wie der Name sagt, induziert werden. Die ersten Symptome treten sehr schnell auf, manchmal über Nacht. Das unterscheidet sie erheblich von der humanen Arthritis, bei der manchmal Jahre zwischen dem eigentlichen Krankheitsbeginn und ersten Beschwerden vergehen (Durie *et al.*, 1994). Sie ist selbst-limitierend, verläuft nicht in Schüben und zeigt außer am Ohrknorpel keine extraartikulären Manifestationen. Bei der RA treten extraartikuläre Manifestationen, wie Rheumaknoten, Tendosynovitiden, Vaskulitiden und andere häufig auf. Beide Arthritiden sprechen auf die Therapie mit Corticosteroiden, Cyclooxygenase-Hemmern, Cyclophosphamiden und Penicillaminen an (Sloboda *et al.*, 1981).

Trotz der beschriebenen Differenzen gilt die Kollagenarthritis als ein Tiermodell, das die humane Autoimmunerkrankung RA gut widerspiegelt (Durie *et al.*, 1994).

### **3.3 Gelenkaufbau**

Der Gelenkaufbau ist bei allen Säugetieren im Wesentlichen ähnlich. Gelenke sind funktionelle Einheiten aus knorpelüberzogenen Gelenkflächen und subchondralen Knochen, die von einer Gelenkkapsel sowie Hilfsstrukturen (Menisken oder Disken, Sehnen mit Sehnencheiden und Bänder sowie Bursen) umhüllt sind.

Die Kapsel besteht aus zwei Schichten, dem inneren Stratum synoviale (Synovialis) und dem äußeren stabilisierenden Stratum fibrosum. Die von der Synovialis produzierte Synovia erfüllt Ernährungs- und Gleitfunktionen für den Knorpel.

### *Stratum fibrosum*

Der fibröse Anteil der Gelenkkapsel besteht hauptsächlich aus straff-faserigem kollagenem Bindegewebe (Typ I-Kollagen) und wird nach außen hin durch Bänder verstärkt.

### *Stratum synoviale*

Es besteht aus einer inneren synovialen und einer äußeren subsynovialen Schicht. In einigen Gelenken ragen von Fettgewebe unterlagerte Falten (*Plicae synoviales*) und Zotten (*Villi synoviales*) in den Gelenkinnenraum vor. Die physiologischerweise glatte Intima synovialis wird von einer 1-3 reihigen Lage von synovialen Deckzellen (Synoviozyten) gebildet, bei denen es sich um modifizierte Bindegewebszellen handelt. Morphologisch werden zwei Zelltypen unterschieden: Die Synoviozyten Typ A (bzw. Typ M) stammen histogenetisch von den hämatogenen Monozyten ab und übernehmen im Gelenk eine Makrophagenfunktion. Sie beseitigen den abnutzungsbedingten Zelldetritus. Synoviozyten vom Typ B (bzw. Typ F), die den Fibroblasten des Bindegewebes gleichen, haben im Gelenkstoffwechsel die Aufgabe Hyaluronsäure der Gelenkflüssigkeit zu synthetisieren. An die Synoviozyten schließt sich ohne begrenzende Basalmembran (im Unterschied zu serösen Körperhöhlen) das subsynoviale Gewebe an, das sich aus vaskularisierten, fibrösen und adipösen Anteilen zusammensetzt.

### *Synovia*

Die Gelenkschmiere ist ein Dialysat des Blutplasmas und Sekretionsprodukt der Synoviozyten. Sie hat eine strohgelbe Farbe, ist klar und zeichnet sich durch eine hohe Viskosität aus. Physiologische Synovialflüssigkeit gerinnt nicht, da sie weder Fibrinogen noch andere Gerinnungsfaktoren enthält. Sie setzt sich aus Proteinen, Hyaluronsäure und Glukose zusammen. Die Hyaluronsäure wird von den Synoviozyten Typ-B gebildet, die zusammen mit Proteoglykanen Aggregate formt, deren Länge und Struktur die Viskosität der Synovia bestimmen. Neben abgeschilferten Synoviozyten finden sich auch vereinzelt Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten in der Synovia. Rote Blutzellen fehlen hingegen völlig (Platt, 1983; Fehr, 2000). Bei entzündlichen Gelenkprozessen kann der Gehalt wie auch die Zusammensetzung der Gelenkflüssigkeit nützliche Hinweise für die Differentialdiagnose geben.

### *Gelenknorpel*

Die artikulierenden Gelenkflächen werden von einem je nach Belastungsgrad unterschiedlich dicken, makroskopisch glatten hyalinen Knorpel überzogen. Hyaliner Knorpel besteht aus

Chondrozyten, die einzeln oder in Gruppen (Chondronen) in eine homogene Knorpelgrundsubstanz (Matrix) eingelagert und nur noch bedingt teilungs- bzw. regenerationsfähig sind. Die extrazelluläre Knorpelmatrix ist der eigentliche Funktionsträger, die Chondrozyten sind allerdings für den Aufbau und Erhalt derselben verantwortlich. Ein Netzwerk von Kollagenfibrillen bildet den Hauptbestandteil der Matrix. Insgesamt enthält der Knorpel mindestens sechs Kollagentypen, wovon der Kollagentyp II mit 80-90% den Hauptanteil bildet und mit Kollagen Typ III, IX, X und XI knorpelspezifisch ist. Die Typen VI, XII und XIV stabilisieren das Gitternetz und binden an die dazwischen liegenden Proteoglykane (Harris, 1997; Eyre, 2002). Die zweithäufigste Matrixkomponente ist das Aggrecan, ein Proteoglykan, das in das Kollagenetzwerk eingebunden ist (Roughley und Lee, 1994). An diese sind wiederum als Seitenketten stark negativ geladene Chondroitin-Sulfate, die eine hohe osmotische Wasserbindungskapazität besitzen, wie auch Keratansulfate, gebunden. Dadurch erhält das Protein die Form ähnlich einer Flaschenbürste. Über das so genannte Linkprotein binden die Aggrecanmoleküle an die Hyaluronsäure. Dadurch entstehen riesige Aggregate. Durch die Bindung des Wassers wird ein hoher kolloidosmotischer Druck erzeugt. Das Zusammenspiel zwischen beiden Matrixkomponenten garantiert dem Knorpel Elastizität und begründet damit seine Fähigkeit Stoßbelastungen aufzufangen. Dem hyalinen Knorpel schließt sich der verkalkte Knorpel an, weiter zur Tiefe folgt der Knochen der subchondralen Deckplatte (Mohr, 2000; Denk *et al.*, 2001).

### **3.4 Pathologische Anatomie der rheumatoiden Arthritis**

Nach den Regeln der allgemeinen Entzündungslehre ist eine gesteigerte Durchblutung für die erhöhte Temperatur und das Ödem mit Gelenkerguss verantwortlich. Eine begleitende entzündliche Zellinfiltration und vermehrte Zellproliferation sowie die Synthese von Extrazellulärschubstanz in der Synovialmembran führen ebenfalls zur Schwellung des Gelenkes. Der Gelenkschmerz wird durch die Reizung nozizeptiver Nervenfasern, die in der Gelenkkapsel lokalisiert sind, durch verschiedene Mediatoren hervorgerufen (Mapp, 1995). Morphologische Manifestationen der Krankheit beginnen am synovialen Gewebe, im Verlauf der Krankheit können Knorpel und subchondraler Knochen mit einbezogen werden.

#### **3.4.1 Gelenkerguss**

Wie bei jedem entzündlichen Prozess im Gelenk wird vermehrt Synovia produziert, die verflüssigt, trüb, gelb-grünlich und evtl. flockig ist. Bezogen auf den physiologischen Zustand enthält sie ca. die hundertfache Anzahl an Leukozyten, wovon 70-90% Granulozyten sind.

Mohr ist der Meinung, dass neutrophile Granulozyten eine nicht zu unterschätzende Bedeutung bei der Schädigung des Gelenkknorpels haben (Mohr, 2003). Des Weiteren ist der Gehalt an Gesamtprotein und Glukose in der Synovia deutlich erhöht.

### **3.4.2 Synovialitis**

Die Bildung von neuen Blutgefäßen (Angiogenese) ist eines der ersten histologischen Befunde der RA in der Synovialis und scheint für die Pannusbildung verantwortlich zu sein. Die Zubildung von Kapillaren erhält einerseits, durch die Versorgung mit Blutbestandteilen, die chronisch-morphologischen Veränderungen des Pannusgewebes aufrecht. Andererseits dient sie als Quelle für Zytokine und Proteasen und spielt somit eine aktive Rolle bei der Entzündung (Colville-Nash und Scott, 1992).

Die durch die Angiogenese erhöhte funktionelle Gefäßdichte scheint die Infiltration der Synovialis mit Entzündungszellen zu fördern (Paleolog, 1997). Neben der erhöhten Anzahl von Gefäßen sorgen Vasodilatation und erhöhte Kapillarpermeabilität, die eine Extravasation von Fibrinogen und Diapedese von Leukozyten ermöglichen, für die Entwicklung der Synovialitis. Es entwickelt sich eine ausgeprägte Infiltration der Synovia und Synovialis mit neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten. Die Präsenz von Leukozyten variiert und scheint vor allem vom Entzündungsstadium abzuhängen. Es finden sich in großer Anzahl Zellen mit immunhistologischen Charakteristika von Makrophagen, die sich teilweise auch als fibroblastenähnliche spindelförmige Zellen darstellen. Diese werden von vielen Autoren auch als dendritische Zellen bezeichnet (Zschabitz *et al.*, 1988; Becker und Stiehl, 1996). Die Zahl der Makrophagen steigt mit zunehmender Gelenkzerstörung. Mulherin und Mitarbeiter beschreiben eine positive Korrelation zwischen radiologischem Ausmaß der Gelenkzerstörung und Makrophagenanzahl (Mulherin *et al.*, 1996).

Neutrophile Granulozyten finden sich zahlreich in einem akuten Gelenkerguss (Mohr, 1996). Ob deren Vorkommen Grund einer bakteriellen lokalen Superinfektion ist, oder ob sie regelmäßig in der akuten Phase einer chronischen Arthritis auftreten, ist umstritten (Stiehl und Geiler, 1974). Mohr und Mitarbeiter konnten in licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen aufzeigen, dass neutrophile Granulozyten während der akuten Entzündungsphase in großer Anzahl in der Grenzregion von Knorpel und Pannus lokalisiert sind, insbesondere in Fibrin-überzogenen Synovialregionen (Mohr und Menninger, 1980). Während in frühen Phasen der RA nur wenige Lymphozyten vorkommen und Plasmazellen häufig fehlen, dominieren später aus den Blutgefäßen emigrierte T-Lymphozyten, die kleine Follikel bilden (Konttinen *et al.*, 1981). Diese Lymphfollikel finden sich beim Menschen allerdings erst nach einer mehr als viermonatigen Krankheitsdauer. Burmester *et al.* (1983) beschreiben eine frühzeitige Proliferation und Hypertrophie der Synovialdeckzellen, so dass

es zur Ausbildung einer mehrreihigen Lage von Synoviozyten kommt. Sowohl Typ-A als auch Typ-B-Synoviozyten sind vermehrt. Infolge der Zellproliferation entwickelt sich eine villöse Hyperplasie der Synovialis mit Ausbildung von Pannusgewebe (Wollenhaupt und Zeidler, 1993). Kinne und Mitarbeiter sind hingegen der Meinung die Verbreiterung der Deckzellschicht sei weniger auf eine Zellproliferation als auf eine Invasion von Makrophagen zurückzuführen (Kinne *et al.*, 1995).

### **3.4.3 Zerstörung durch Pannusgewebe**

Pannusgewebe wird von Mohr (1996) als „entzündungsinduziertes Granulationsgewebe“ bezeichnet, auch wenn nicht geklärt ist, ob das Pannuswachstum ursächlich mit der immunologisch induzierten Entzündung in Zusammenhang steht. Es werden ein Oberflächen- und ein Markpannus differenziert. Der oberflächliche Pannus breitet sich als Zellfilm von der Synovialis ausgehend auf den angrenzenden Knorpel aus. Die Adhärenz dieses Gewebes am Knorpel wird eventuell durch proteolytische Enzyme neutrophiler Granulozyten gefördert, indem Proteoglykane, die normalerweise eine Zelladhäsion verhindern, abgebaut werden. Mit Ausdehnung des Zellfilms entwickelt sich ein vaskularisiertes Granulationsgewebe, das zerstörend in die Knorpelmatrix eindringt. Für die Knorpeldestruktion verantwortliche Zellen sind neben den neutrophilen Granulozyten, welche proteolytische Enzyme freisetzen, vor allem Makrophagen.

Entzündliches Gewebe kann auch direkt von den synovialen Rezessus ausgehend über die Kortikalis in den Knochen eindringen und sich zu einem Markpannus ausbilden und somit von der Tiefe her Knochen und Knorpel zerstören. Häufig breitet er sich zwischen hyalinem Knorpel und subchondralen Knochen aus, so dass der Knorpel vom Knochen abgehoben wird. Der entzündliche Pannus muss nicht unbedingt zu einer kompletten Knorpelzerstörung führen. Man findet dann fibröses Pannusgewebe, das die Defekte des hyalinen Knorpels umschließt und in späteren Stadien zu chondroidem Pannus metaplastiert.

Mit fortschreitendem Entzündungsprozess können unter mechanischer Belastung Knorpelfragmente absprengen und in die Synovialflüssigkeit gelangen. Die frei beweglichen Gewebsfragmente induzieren dann wiederum eine Entzündung der Gelenkinnenhaut, die als Detritussynovialitis bezeichnet wird. Da diese sekundäre Synovialitis zum weiteren Pannuswachstum beiträgt, entwickelt sich hieraus ein „Circulus vitiosus“ (Mohr, 1996; Mohr, 2000).

### **3.4.4 Destruktion des Gelenkknorpels**

Entscheidend für die mechanischen Eigenschaften des Knorpels sind die Proteoglykane, die durch ihre Wasserbindungskapazität die Elastizität und Belastbarkeit des Knorpels

bestimmen. Die Zerstörung des Knorpels erfolgt durch Proteinasen, die sowohl die Kollagenfasern, als auch die Proteinbestandteile der Proteoglykane aufspalten. Die Beschädigung des Knorpelstützgerüsts führt zur praktisch irreversiblen Knorpelschädigung. Drei Gruppen von Proteinasen sind maßgeblich an der Knorpeldestruktion der RA beteiligt:

- Matrixmetalloproteinasen (bes. Kollagenase und Stromelysin)
- Cysteinproteasen (bes. Kathepsin B und L)
- Serinproteinasen ( bes. Elastase)

Diese Proteasen wirken kaskadenartig aufeinander ein und sind somit in der Lage die Knorpelstrukturen aufzulösen. Die Aktivität der Proteasen wird durch aktivierende bzw. inhibitorische Zytokine beeinflusst (Fehr, 2000).

### **3.5 Pathologische Anatomie der Kollagen-induzierten Arthritis**

Die krankhaften Veränderungen der Gelenkstrukturen bei der CIA sind mit denen der RA des Menschen vergleichbar (Stuart *et al.*, 1982; Trentham, 1982).

Histopathologische Gewebeschnitte von arthritischen Sprung- und Kniegelenken der Ratte zeigen, dass eine Injektion von aufbereitetem Kollagen Typ II zu einer chronisch-proliferativen Synovialitis mit anschließender Zerstörung von Gelenkknorpel und Knochen führt. 24h nach Auftreten der ersten klinischen Symptome zeigt die Synovialis ein hochgradiges Ödem, eine Infiltration von dichten Aggregaten aus mononukleären Entzündungszellen und vereinzelt neutrophilen Granulozyten. In späteren Entzündungsstadien kommt es zur Proliferation von Synoviozyten und Fibroblasten und damit zur Ausbildung eines Pannusgewebes. Dieses wiederum greift sowohl den hyalinen Knorpel, als auch den Knochen an. Zahlreiche mononukleäre Entzündungszellen persistieren über mehr als sechs Monate in der Gelenkinnenhaut. Auffällig sind bei der CIA periostale Knochenbildungen, die letztendlich zu einer Ankylose des Gelenkes führen. Die Gelenke der Wirbelsäule sind hingegen nicht betroffen (Trentham *et al.*, 1977).

### **3.6 Diagnostik mit bildgebenden Verfahren**

Die frühe und sichere bildgebende Diagnose einer Arthritis ist sowohl für die Einleitung therapeutischer Maßnahmen als auch für die Vermeidung von Fehldiagnosen mit konsekutiven falschen Therapieansätzen notwendig.

Die Bildgebung in der Rheumatologie gibt Auskunft über Ausmaß und Befallmuster der jeweiligen rheumatischen Erkrankung. Sie verhilft somit zur Diagnose und

Differentialdiagnose.

Die Röntgenuntersuchung ist nach wie vor das wichtigste Verfahren für die Diagnose und Verlaufsbeurteilung von rheumatoiden Arthritiden. Ihre diagnostische Aussage konzentriert sich vorwiegend auf knöcherne Veränderungen im Gelenk und kann somit kein Instrument zur Frühdiagnostik sein. Inzwischen erfährt die konventionelle Röntgenologie wertvolle Ergänzung und zum Teil auch Ablösung durch Darstellungsmöglichkeiten, die das Weichteilgewebe des Gelenkes mit einschließen. Eine höhere Sensitivität beim Nachweis von frühen entzündlichen Weichteilgewebsveränderungen ist sowohl mit der Szintigraphie, der Sonographie als auch der Magnetresonanztomographie (MRT) möglich (Backhaus *et al.*, 1999).

Die sehr sensitive, jedoch unspezifische Szintigraphie dient vorwiegend dem Screening, der Darstellung der unterschiedlichen Befallmuster der rheumatischen Erkrankungen. Mit der Szintigraphie lassen sich, im Unterschied zu den sonstigen Nachweisverfahren, die den Zustand einer Veränderung beschreiben, Aktivitätsveränderungen beurteilen (Schicha, 1993).

Die Sonographie dient vor allem der Beurteilung von Gelenk-, Sehnenscheiden- oder Bursaergüssen und der periartikulären Weichteilgewebe, während sie für die Beurteilung von Knorpel- und Knochenveränderungen weniger sensitiv ist (Hein *et al.*, 1995).

Eine noch bessere Gewebsdifferenzierung ist mit der MRT möglich. Sie erlaubt eine sehr genaue Beurteilung der Synovialmembran. Eine Hyperplasie der Synovialis, mit der entzündliche Gelenkveränderungen beginnen, ist somit sehr frühzeitig detektierbar.

Die Computertomographie hat sich für die Diagnostik rheumatischer Erkrankungen als weniger hilfreich erwiesen. Sie ist auf wenige Indikationen, vornehmlich knöcherne Veränderungen, beschränkt (Ernst *et al.*, 2000).

Jedes dieser bildgebenden Verfahren hat hinsichtlich seiner Effektivität einen oder mehrere begrenzende Faktoren. Das konventionelle Röntgen lässt eine Arthritis erst in fortgeschrittenen Stadien erkennen. Ebenso wie beim CT und der Szintigraphie ist die Strahlenbelastung zu berücksichtigen. Die Arthrosonographie bedarf eines sehr erfahrenen Untersuchers sowie eines hohen Zeitaufwandes. Dem intensiven Einsatz der MRT stehen die geringere Verbreitung und vor allem der sehr hohe Kostenaufwand entgegen.

### **3.7 Grundlagen der MR-Tomographie in der Gelenkdiagnostik**

Das Prinzip der magnetresonanztomographischen Bildgebung beruht auf der magnetischen Eigenschaft von Wasserstoffatomen (H-Protonen), aus denen biologisches Gewebe hauptsächlich besteht. Wasserstoffprotonen entsprechen kleinen rotierenden Magneten, die

typische Kreisbewegungen aufweisen. Die Rotation um ihre eigene Achse bezeichnet man als Spin. Normalerweise sind diese Bewegungen ungeordnet. In einem starken Magnetfeld richten sich die Protonen in Richtung der äußeren Magnetisierung aus. Diese Ausrichtung der Protonen kann durch die Einstrahlung von Hochfrequenzimpulsen in einen höherenergetischen Zustand überführt werden, wobei nach Beendigung dieser Anregung die Atomkerne nach einer bestimmten Zeit (Relaxation) in den Ausgangszustand zurückkehren. Die zeitliche Änderung des Nettosummenmagnetvektors der Protonen induziert in einer Empfangsantenne eine Spannung, was die Grundlage der MRT-Bildgebung ist. Dabei hängen die Eigenschaften der Wasserstoffatome von der physikochemischen Umgebung ab was zu unterschiedlichen T1- und T2-Relaxationszeiten führt. Dadurch wird eine differenzierte Gewebediagnostik möglich.

Für die Gelenkdarstellung werden üblicherweise sowohl T1- als auch T2-gewichtete Spinechosequenzen verwendet. Im T1-betonten Bild wird Pannusgewebe mit tiefer Signalintensität sehr gut erfasst. Ebenso ist Fettgewebe signalreich, Gefäße sowie Gelenkerguss sind hypointens. Die entzündlich veränderte Synovia hat einen hohen Albuminanteil, der als „biologisches Kontrastmittel“, ähnlich wie das paramagnetische Kontrastmittel Gadolinium-DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure), die T1- und T2-Relaxationszeit verkürzt. Dadurch werden entzündliche Ergüsse signalreich dargestellt. Während das T1-gewichtete Bild eine gute anatomische Zuordnung ermöglicht, weist eine hohe Signalintensität in T2-betonten Sequenzen auf eine aktive Entzündung hin, da Flüssigkeit in T2-gewichteten Techniken ein hohes Signal gibt.

Bei der Anwendung von MRT-Kontrastmitteln nutzt man in der Gelenkdiagnostik die T1-Relaxationszeit-verkürzende Wirkung von Gadolinium-Chelaten aus (Reiser und Naegele, 1993). Diese niedermolekularen Kontrastmittel verteilen sich nach intravenöser Injektion rasch im gesamten Extrazellulärraum. Pathologische Gewebe, in denen sich eine höhere Konzentration dieser Kontrastmittel aufbaut als in gesunden Geweben, werden dadurch signalreich dargestellt. Allerdings ist die Anreicherung in Entzündungen, bei den derzeit klinisch zugelassenen Gadolinium-Chelaten, nicht gewebe- bzw. entzündungsspezifisch. Die verstärkte Kontrastmittelanflutung beruht primär auf erhöhter Kapillardichte, gesteigerter Perfusion und einer verstärkten Extravasation zwischen gesundem und entzündetem Gewebe (Ostergaard *et al.*, 1998).

In der MRT stellen sich Knorpel, Bänder, Sehnen (-scheiden), Kapsel und die Synovialis gut dar. T1-gewichtete Spinecho-Sequenzen ermöglichen eine detailgenaue Differenzierung der Morphologie. So lassen sich beispielsweise folgende Veränderungen erfassen:

Ödem, Knorpelerosionen, subchondrale Zysten, Knochennekrosen und Osteomyelitis.

Sowohl hyaliner als auch Faserknorpel lassen sich mit hohem Kontrast und hoher Auflösung

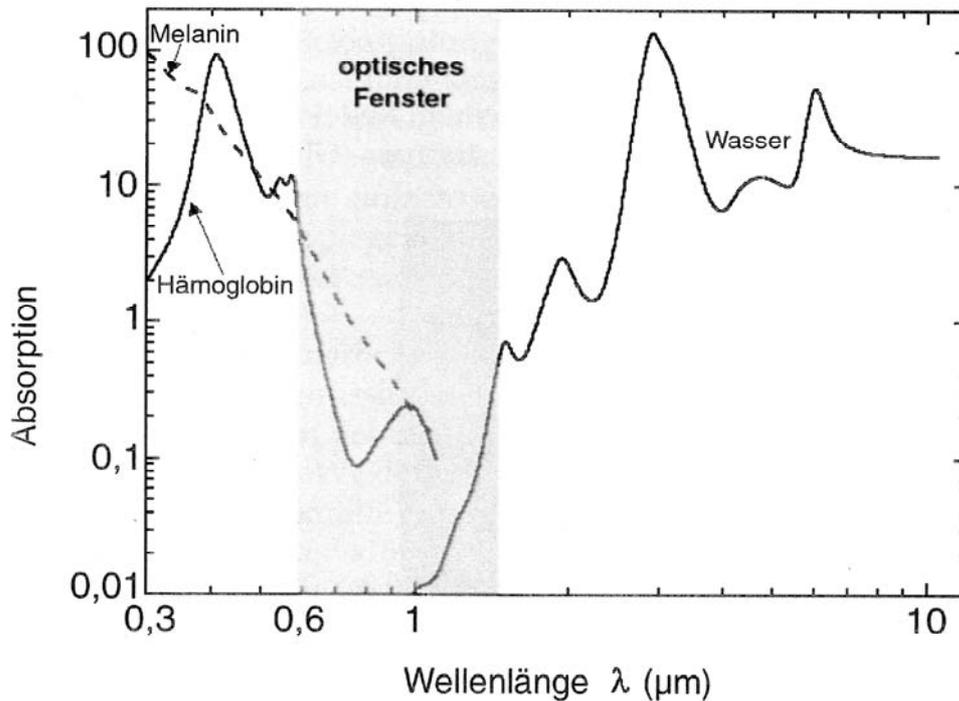
gut darstellen. Es ist somit möglich sowohl die Schichtdicke des Knorpels zu beurteilen als auch lokale Defekte abzugrenzen. Ödeme, Gelenkergüsse oder flüssigkeitsgefüllte Bursae stellen sich in einer T2-gewichteten Spinechosequenz am Besten dar. Diese haben in der T2-Bildgebung hohe Signalintensität. Synoviale Proliferationen (Pannus) zeichnen sich in einer T1-gewichteten Spinechosequenz mit Fettsuppression, nach i. v. Gabe eines paramagnetischen Gd-haltigem KM, mit hoher Signalintensität gut von einem Gelenkerguss ab. Seine Ausdehnung kann exakt beurteilt werden.

In etwa 60% aller Fälle beginnt eine RA überwiegend symmetrisch an Fingergrund- und -mittelgelenken bzw. Zehengrundgelenken (Miehle und Zacher, 1999). Somit nimmt die Untersuchung der Hände und Füße in der RA - Diagnostik einen wichtigen Stellenwert ein. Mittels MR-Untersuchung ist der Nachweis von Knochenläsionen an Hand- und Fingergelenken frühzeitig möglich (Backhaus *et al.*, 1999). Der entzündliche Weichteilprozess kann ebenfalls gut dargestellt werden. Durch den Einsatz eines paramagnetischen KM ist es möglich, aktiven Pannus von inaktivem fibrösem Bindegewebe abzugrenzen. Ebenfalls gut darstellbar sind Sehnen und Sehnencheiden (Ernst *et al.*, 2000).

### **3.8 NIR-Bildgebung**

Bildgebende Verfahren auf der Basis nicht-ionisierender Strahlung finden zunehmendes Interesse in der klinischen Diagnostik. Die Nahinfrarot-Bildgebung ist ein viel versprechendes Verfahren, dass zunächst für die in-vivo-Diagnostik von oberflächennahen Tumoren entwickelt wurde und in diversen Studien erprobt wird. Durch die Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge können endogene oder exogene Farbstoffmoleküle angeregt und die gespeicherte Energie in Form von Fluoreszenzlicht oder Wärme wieder abgeben werden. Mit Hilfe empfindlicher Kameras und geeigneter optischer Filter kann ein Fluoreszenzbild erzeugt und das entzündete oder maligne Gewebe anhand erhöhter Fluoreszenzintensität detektiert werden.

Für die NIR-Bildgebung wird Licht des nahinfraroten Spektralbereichs (700-1000 nm) zur Gewebedifferenzierung verwendet. Während der Spektralbereich des sichtbaren Lichtes (400-700 nm) zur Untersuchung von Gewebeoberflächen (z.B. in der Endoskopie) eingesetzt wird, hat Licht im NIR-Bereich eine größere Eindringtiefe. In diesem Spektralbereich sind die Absorption und die Streuung durch biologisches Gewebe deutlich geringer als im Bereich des sichtbaren Lichtes. Dieses Gebiet der größten optischen Gewebetransparenz wird daher auch als *diagnostisches* oder *optisches Fenster* bezeichnet (siehe Abb.1).



**Abb. 1** Absorptionsspektren von Hämoglobin, Melanin und Wasser mit Markierung des sog. optischen Fensters (Riefke *et al.*, 1997)

Der besondere Vorteil der Fluoreszenzmessung besteht darin, dass durch Selektion der Beobachtungswellenlänge, die im Vergleich zur Anregung zu längeren Wellenlängen verschoben ist, mit Hilfe von Langpassfiltern das Anregungslicht unterdrückt werden kann. Da im NIR-Bereich die Absorption durch biologisches Gewebe sehr klein ist, kann auch nur ein sehr kleiner Anteil als Gewebeeigenfluoreszenz abgestrahlt werden. Die Abgrenzung entzündlich veränderter Areale von gesundem Gewebe ist aber insbesondere in tieferen Schichten schwierig, da die optischen Eigenschaften (Absorption und Streuung) der Gewebe nur geringe Unterschiede aufweisen.

Eine deutliche Gewebedifferenzierung und damit eine verbesserte diagnostische Aussagekraft kann, ebenso wie bei anderen bildgebenden Verfahren, mit Kontrastmitteln (KM) erreicht werden. Dabei kann bei Messungen in Transmissionsanordnung das Absorptionsverhalten der Kontrastmittel zur Bildgebung benutzt werden. Besitzen sie darüber hinaus noch die Eigenschaft absorbierte Energie in Form von Fluoreszenz zu emittieren, kann diese ebenfalls für die Bildgebung genutzt werden. Die Signalverteilung eines Fluoreszenzbildes ist letztendlich durch die Verteilung des KM bestimmt (Riefke *et al.*, 1997). Um einen möglichst hohen Kontrast zu erzielen, ist eine selektive Anreicherung des Farbstoffes im zu untersuchenden Gewebe erforderlich.

### 3.8.1 Geschichtlicher Überblick

Die Fluoreszenzdiagnostik ist ein neues Verfahren, das ursprünglich für die Detektion von Tumoren, insbesondere der Haut sowie der Mukosa von Hohlorganen, entwickelt wurde. Erste Anwendungen fand es z.B. in der Urologie (Kriegmair *et al.*, 1994). Inzwischen ist eine klinische Studie zum Nachweis von Harnblasenkarzinomen abgeschlossen. Es wurde gezeigt, dass mit Hilfe der Fluoreszenzdiagnostik eine höhere Sensitivität erreicht werden kann als mit konventioneller Weißlicht- Endoskopie (Zaak *et al.*, 2002). Auch beim Nachweis von Karzinomen im Mund- und Rachenraum (Harries *et al.*, 1995; Leunig *et al.*, 1996), im Magen-Darm-Trakt (Panjehpour *et al.*, 1995; Cothren *et al.*, 1996) sowie von Lungendysplasien und –tumoren (Lam *et al.*, 1993) kann eine höhere Sensitivität als mit bisherigen Diagnostikverfahren erreicht werden.

In der Dermatologie ist die Fluoreszenzdiagnostik eine Bereicherung als intraoperative Methode zur Abgrenzung des Tumors vom umliegenden gesunden Gewebe (Fritsch *et al.*, 1996; Fritsch *et al.*, 1997).

Ein weiteres, viel versprechendes Anwendungsgebiet der NIR-Bildgebung ist die Diagnostik der weiblichen Brust. Hierzu wurden 1993 von Buttner erste Studien zur Abgrenzung maligner von benignen Tumoren durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Methode momentan noch nicht als zuverlässiges diagnostisches Verfahren in der Routine verwendet werden kann (Buttner *et al.*, 1993). Verbesserte Kontrastunterschiede zwischen gesundem und pathologisch verändertem Gewebe können durch die Anwendung von fluoreszierenden KM erreicht werden. 1997 konnten Riefke und Licha mit dem Einsatz des Cyaninfarbstoffes Indocyaningrün (ICG) ein Signalverhältnis zwischen Tumor und Normalgewebe von 2,5 erzielen. Dieses Verhältnis konnte durch Modifizierung eines dem ICG ähnlichen Farbstoffs auf 6:1 gesteigert werden. Somit wird die Kontrastmittel-verstärkte Fluoreszenzdiagnostik als ein Verfahren eingeschätzt, das kleine ( $1\text{cm}^3$ ) Mammatumoren darstellen kann (Riefke *et al.*, 1997; Ebert *et al.*, 2001).

### 3.8.2 Physikalische Grundlagen

Farbstoffmoleküle, ob körpereigen oder exogen zugeführt (siehe Kap. Fluoreszenzfarbstoffe), absorbieren Photonen geeigneter Wellenlänge. Dabei wird der Grundzustand des Moleküls in einen energetisch höheren Singulettzustand angeregt. Aus diesem angeregten Zustand erfolgt innerhalb von Nanosekunden die Relaxation in den Grundzustand. Die frei werdende Energie kann entweder in Form von Wärme, von Fluoreszenz oder nach Übergang in einen langlebigen Triplettzustand in Form von Phosphoreszenz oder strahlungsloser Energie abgegeben werden.

Dabei wird meist nur ein geringer Anteil der eingestrahnten Energie in Form von Fluoreszenzphotonen wieder abgestrahlt. Sowohl das Anregungslicht, wie auch das emittierte Licht, werden im Gewebe durch Absorption abgeschwächt.

- ***Streuung***

Unter Streuung versteht man die Änderung der Ausbreitungsrichtung von Photonen bzw. Strahlung, verursacht durch Zellen und Gewebestrukturen. Die Wellenlänge oder die Frequenz der Strahlung wird dabei nicht geändert. Man unterscheidet die Mie- und die Rayleigh-Streuung.

Unter Mie-Streuung versteht man die Streuung von Strahlung an kleinen Partikeln, wobei die Wellenlänge der gestreuten Strahlung in etwa dem Durchmesser der streuenden Partikel entspricht. Sie hängt sowohl von der Wellenlänge als auch von der Größe der streuenden Partikel (Zellen) ab. Unter Rayleigh-Streuung versteht man die Streuung von Strahlung an Partikeln, deren Durchmesser viel kleiner als die Wellenlänge der gestreuten Strahlung ist. Strahlung mit kleiner Wellenlänge wird stärker gestreut als Licht mit großer Wellenlänge. Die kurzwelligeren blauen Anteile werden somit stärker gestreut als die langwelligeren, z.B. im NIR-Bereich.

- ***Absorption***

Als Absorption bezeichnet man die Umwandlung von Strahlungsenergie in eine andere Energieform bei Wechselwirkung mit Materie. Man unterscheidet:

- Absorptionsgrad ( $a$ ): Verhältnis der absorbierten Strahlungsleistung (des Lichtstromes) zur auffallenden Strahlungsleistung (zum Lichtstrom).
- Spektraler Absorptionsgrad ( $a(\lambda)$ ): Abhängigkeit des Absorptionsgrades von der Wellenlänge der Strahlung.

Bei der Absorption eines Photons wird ein Elektron von einem tieferen auf ein höheres Energieniveau angehoben, die Energie des Photons wird für diesen Vorgang gerade aufgebraucht. Der entgegengesetzte und quantenmechanisch gleich wahrscheinliche Vorgang ist die stimulierte Emission.

Die Absorption von Licht (Photonen) wird durch den elektronischen Übergang von Atomen/ Molekülen in den Singulettzustand gekennzeichnet. Das Absorptionsspektrum eines Photosensibilisators (auf Lichteinstrahlung reagierender Farbstoff) ist von seiner direkten Umgebung, also dem gewählten Lösungsmittel abhängig. Um eine effektive Absorption zu erreichen, sollte die Anregung möglichst schmalbandig bei der intensivsten

Absorptionsbande des Kontrastmittels erfolgen. In der Fluoreszenzdiagnostik wird aus diesem Grunde häufig Laserlicht für die Anregung der Farbstoffmoleküle eingesetzt.

- **Fluoreszenz**

Absorbierte Energie kann als Fluoreszenzlicht wieder abgegeben werden. Das emittierte Fluoreszenzlicht ist dabei aufgrund molekülinterner Energieverluste zu längeren Wellenlängen verschoben (Stokes-Verschiebung). Die Wahrscheinlichkeit mit der der Übergang in den Grundzustand unter Emission von Fluoreszenzlicht geschieht, wird als Fluoreszenzquantenausbeute ( $\varnothing_F$ ) bezeichnet. Sie beschreibt das Verhältnis der Anzahl emittierter, zur Anzahl absorbierter Photonen.

- **Eindringtiefe von Licht in Gewebe**

Die Diagnostik eines erkrankten Gewebeareals erfordert das Eindringen von Licht in das Gewebe, in dem sich das Kontrastmittel befindet. Aufgrund von Streuung und Absorption ist die Eindringtiefe von Licht in Gewebe begrenzt. Sie ist signifikant von der Wellenlänge des verwendeten Lichtes abhängig. Dies liegt zum einen am unterschiedlichen Absorptionsverhalten der einzelnen Gewebestandteile (Proteine, Hämoglobin, Melanin), zum anderen am Streuverhalten der Gewebe, die jeweils von der Wellenlänge abhängig sind.

Beide Prozesse nehmen zu größeren Wellenlängen hin ab, was eine Zunahme der Eindringtiefe von Licht in Gewebe zur Folge hat (Vargas *et al.*, 2001). Somit kann Licht vom UV-(200 nm) zum NIR-(700-1000 nm) Bereich immer tiefer in Gewebe eindringen und erreicht bei etwa 1000 nm ein Optimum. Bei Wellenlängen über 1000 nm nimmt die Absorption des Lichtes durch Wasser deutlich zu, das im Gewebe allgegenwärtig ist. Die Eindringtiefe wird dadurch deutlich reduziert.

Die Fluoreszenzfarbstoffe sind so gewählt, dass sie ihr Absorptionsmaximum im optischen Fenster bei 760 nm besitzen.

- **Lichtquelle**

Um eine möglichst große Eindringtiefe zu erreichen, wird zur Anregung Licht des roten Spektralbereichs (650-800 nm) verwendet. Die Erzeugung von monochromatischem Licht erfolgt mit Lasern. Der Begriff Laser steht für: „light amplification by stimulated emission of radiation“. Es handelt sich um eine kohärente Lichtquelle. Der austretende Laserstrahl wird in eine Quarzfasern eingekoppelt und mit dieser weitergeleitet. Zur Lichtleitung werden Fasern mit einer ausreichenden Apertur verwendet, wobei durch das "Scrambeln" der Faser eine

nahezu homogene Ausleuchtung eines größeren Areals ermöglicht wird.

Laserlicht ist gut fokussierbar und lässt sich in Fasern ohne große Intensitätsverluste einkoppeln und weiterleiten. Durch die Verwendung eines optisch-parametrischen Oszillators ist das Lasersystem präzise auf das Absorptionsspektrum des Farbstoffes abstimmbare, wodurch eine hohe Selektivität erreicht wird. Die störende restliche Autofluoreszenz von Gewebe kann durch den Einsatz von gepulsten Lasern und zeitverzögerter Messung der Fluoreszenz ebenso wie Raumlichtanteile unterdrückt werden (Ankerst *et al.*, 1984).

### **3.9 Fluoreszenzfarbstoffe**

Neben den exogen applizierten Farbstoffen gibt es auch körpereigene Substanzen, die unter Anregung (z.B. von Laserlicht) Fluoreszenzlicht emittieren. Dieses Phänomen wird als Autofluoreszenz bezeichnet. Die Emissionsbanden dieser endogenen Farbstoffe (Chromophore) sind sehr breit, so dass es zur Überlagerung der Fluoreszenz von exogenen und endogenen Farbstoffen kommen kann. Die Chromophore können aber auch durch Absorption die Anzahl der zur Anregung der exogenen Farbstoffe zur Verfügung stehenden Photonen reduzieren.

#### **3.9.1 Endogene Farbstoffe**

Verschiedene Moleküle in Zellen und Geweben sind für die Autofluoreszenz eines Organismus verantwortlich. So fluoreszieren beispielsweise die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, die Nukleinsäuren der DNA sowie Porphyrinmoleküle, die als Zwischenprodukte bei der Biosynthese von Hämoglobin, Myoglobin und Zytocromen entstehen. Fluoreszenz kann aber auch durch elastische Fasern und Kollagen hervorgerufen werden, ein Effekt der diagnostisch zur Gewebedifferenzierung (Epithel- und Bindegewebe) ausgenutzt werden kann.

Eine Sonderstellung nimmt das in der Haut lokalisierte Pigment Melanin ein. Es zeichnet sich durch ein sehr breites Absorptionsspektrum (400-700 nm) aus, wobei die Absorption zu größeren Wellenlängen hin abnimmt. Diese Komponenten können Licht, welches zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken eingesetzt wird, an seinem Eindringen in Gewebe hindern (Schneckenburger, 2003).

#### **3.9.2 Exogene Farbstoffe**

Exogen zugeführte Farbstoffe, die sich im Gewebe anreichern, verbessern in der Bildgebung den Kontrast zwischen gesundem und pathologisch verändertem Gewebe.

Kontrastmittel, die für die NIR-Bildgebung eingesetzt werden sind sog. Fluoreszenz-

farbstoffe, die folgende Kriterien erfüllen sollten:

- **Eigenschaften**

Der Farbstoff sollte sich möglichst selektiv im erkrankten Gewebe anreichern, um einen hohen Kontrast zwischen dem gesunden und pathologisch veränderten Gewebe zu erzielen. Die maximale Absorption bzw. Emission sollte möglichst im roten und nahen Infrarot - Bereich liegen, da mit steigenden Wellenlängen die größte Eindringtiefe von Licht in Gewebe erreicht wird. Die absorbierte Energie sollte der Farbstoff möglichst effizient als Fluoreszenzlicht wieder abgeben (hohe Fluoreszenzquantenausbeute).

Nach der Diagnostik sollte der Farbstoff möglichst schnell eliminiert werden können. Systemisch verabreichte KM müssen somit eine kurze Plasmahalbwertszeit haben. Für lokal applizierte Stoffe ist eine rasche Metabolisierung in nicht-photosensibilisierende Substanzen günstig. Der Farbstoff und seine Metaboliten sollten eine hohe Verträglichkeit für den Organismus aufweisen. Es sollte sich möglichst um eine chemisch stabile Reinsubstanz handeln (Ackermann, 2001).

- **Geschichtliche Entwicklung**

Ein Ansatz für die Entwicklung von Farbstoffen zur Fluoreszenzdiagnostik war die **5-Aminolävulinsäure (5-ALA)**, ein Vorläufer in der Hämbiosynthese. Durch deren exogene Gabe wird der Feedback-Mechanismus der Hämbiosynthese umgangen und eine Anreicherung von Porphyrinen, insbesondere Protoporphyrin IX (PpIX) in (prä)malignen Läsionen erreicht, ein Effekt der sowohl therapeutisch als auch diagnostisch genutzt wurde (Kennedy *et al.*, 1990). Die Mechanismen, die zu einer bevorzugten Anreicherung von 5-ALA in prä-malignen Veränderungen und Tumoren führen, sind bisher nicht eindeutig geklärt. Diskutiert werden:

- gesteigerte Penetration in die Läsion infolge einer veränderten physiologischen Barriere
- gesteigerte Aufnahme in die Zelle infolge veränderter Eigenschaften transmembraner Transportproteine
- veränderte Enzymaktivitäten (z. B. reduzierte Ferrochelataseaktivität)
- eingeschränkte Eisenverfügbarkeit

Es ist möglich, dass je nach Tumortyp ein anderer Mechanismus für die Anreicherung von Protoporphyrin IX verantwortlich ist. Mit 5-ALA können aber nur sehr oberflächen-nahe Tumoren dargestellt werden. Der Farbstoff kann sowohl lokal (als Therapeutikum) als

auch systemisch (bevorzugt oral als Diagnostikum) angewendet werden. Die entstandenen Porphyrine werden rasch metabolisiert (Rick *et al.*, 1997). Nach systemischer Applikation werden das PpIX, sowie seine Metaboliten teils renal, teils biliär ausgeschieden. Es kommt zu einer kurzfristigen generalisierten Photosensibilisierung, ansonsten sind nur wenige Nebeneffekte bekannt (Webber *et al.*, 1997; Schneckenburger, 2003).

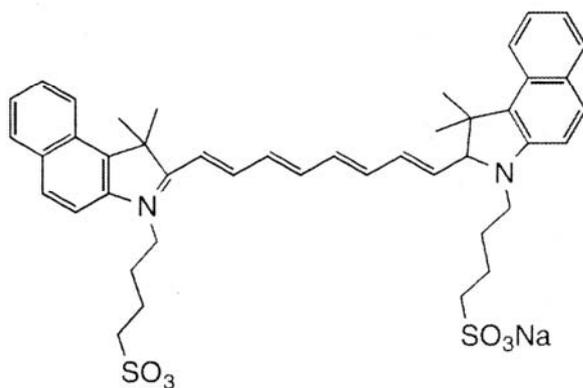
Klinische Anwendung findet 5-ALA für die Detektion von Haut- (Roberts und Cairnduff, 1995), Blasen- (Kriegmair *et al.*, 1996) und Lungentumoren (Baumgartner *et al.*, 1996), wie auch bei der Diagnostik eines Barrett-Oesophagus (Ortner *et al.*, 2003).

### 3.9.3 Cyaninfarbstoffe

Sehr günstige photophysikalische Eigenschaften als Kontrastmittel für diagnostische optische Verfahren weisen die Cyaninfarbstoffe auf. Im Gegensatz zu anderen Farbstoffen absorbieren und emittieren sie im optischen Fenster und haben einen hohen molaren Absorptionskoeffizienten sowie moderate Fluoreszenzquantenausbeuten zwischen 750 und 830 nm.

Als Diagnostikum ist auch positiv zu bewerten, dass sie über nahezu keine photosensibilisierende Wirkung auf den Organismus verfügen (Riefke *et al.*, 1997).

- **Indocyaningrün (ICG)**



**Abb. 2** Strukturformel von Indocyaningrün

Indocyaningrün (siehe Abb. 2) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der von den Kodak Research Laboratories (Rochester, USA) entwickelt und 1956 erstmals vorgestellt wurde (Brooker, 1955; Fox und Wood, 1960).

Bis heute findet ICG Anwendung in der medizinischen Diagnostik des Herz-Kreislauf-Systems (Fox und Wood, 1960), zur Bestimmung des Plasmavolumens (Bradley und Barr, 1968), zur Überprüfung der Leberfunktion (Caesar *et al.*, 1961) und für die Angiographie in

der Ophthalmologie (Craandijk und van Beek, 1976).

Für die Detektion von Tumoren wurde ICG bereits erfolgreich in Tiermodellen getestet (Haglund *et al.*, 1996). In der Humanmedizin sind Mammatumoren mit diesem Farbstoff diagnostizierbar, die Ergebnisse korrelieren mit MR-Untersuchungen bei denen Gadolinium-DTPA als Kontrastmittel eingesetzt wird (Ntziachristos *et al.*, 2000). In der Veterinärmedizin fand ICG bereits Einsatz für den Nachweis von Mammatumoren bei Hunden (Reynolds *et al.*, 1999). Neben der Diagnostik wird der Farbstoff in wesentlich höheren Dosen auch als Therapeutikum verwendet, beispielsweise zur photo-oxidativen Schädigung von Tumorzellen (Abels *et al.*, 1998).

ICG ist ein anionischer, hydrophiler Tricarbocyaninfarbstoff, der nach i.v.-Gabe zu 98% an Serumproteine, hauptsächlich Lipoproteine, bindet. Dadurch wird eine Extravasation in das Gewebe verhindert (Cherrick *et al.*, 1960). Somit wird ICG in der Leber sehr schnell aus dem Blut eliminiert und anschließend nahezu vollständig (>99%) über die Galle ausgeschieden. Schon nach 10 Minuten ist nur noch ein geringer Anteil der ursprünglich injizierten Menge im Blut nachweisbar. Die Plasmahalbwertszeit beträgt ca. drei Minuten und die Gewebahalbwertszeit weniger als zehn Minuten.

Diese kurzen Halbwertszeiten haben zur Folge, dass Veränderungen in tieferen Gewebeschichten (> 1 cm) schlecht mit ICG nachzuweisen sind, da ICG auch in darüber liegenden Schichten im Blut vorhanden ist (Licha *et al.*, 2000).

Die verstärkte Signalintensität im tumorösen Gewebe ist durch die erhöhte Kapillardichte in der Peripherie von Tumoren zu erklären. Die erhöhte Perfusion hat eine Anreicherung von ICG-Molekülen im Bereich des Tumors zur Folge und bewirkt dadurch eine erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zum gesunden Gewebe (de Li *et al.*, 1995). Absorptions- und Emissionsmaximum liegen beide in einem Wellenlängenbereich von 800 nm bis 830 nm. In diesem Spektralbereich ist die Absorption und Autofluoreszenz des Gewebes nur sehr gering, so dass die Fluoreszenz des Farbstoffes nicht überlagert wird. Die Fluoreszenz-Quantenausbeute ist gegenüber PpIX verbessert, sie beträgt in Plasma 0,032% (Sutterer *et al.*, 1966).

ICG wird in einer wässrigen Lösung intravenös verabreicht. Nebenwirkungen treten bei diesem Farbstoff in der für die Diagnostik üblichen Konzentration äußerst selten auf. Vereinzelt kann es zu allergischen Reaktionen kommen. In hohen Dosen ist er hingegen toxisch, die LD<sub>50</sub> beträgt bei der Maus 60-80 µmol/ kg KGW.

### **3.9.4 Modifizierte Cyaninfarbstoffe**

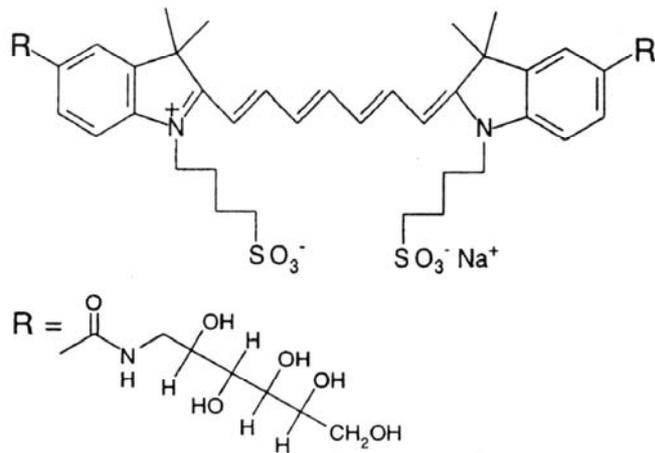
Eine geringere Proteinbindung ermöglicht eine gesteigerte Extravasation und Anreicherung im Gewebe. Es war das Ziel, Substanzen mit einer geringeren Affinität zu Plasmaproteinen

zu entwickeln als derjenigen von ICG. Aus diesem Grunde wurden Cyaninfarbstoffe mit einer höheren Hydrophilie hergestellt. Die Grundstruktur von ICG wurde unter Erhalt der Zielverbindungen durch Substitution mit verschiedenen hydrophilen Resten modifiziert. Neben der gesteigerten Anreicherung im Gewebe bringt die gesteigerte Hydrophilie außerdem noch den Vorteil einer erhöhten Fluoreszenzquantenausbeute mit sich (Licha *et al.*, 2000).

Entwickelt wurden diese Kontrastmittel für den diagnostischen Einsatz in der Onkologie. Der Mechanismus, der zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal in Tumoren nach Gabe dieser Substanzen führt, ist bisher nicht endgültig geklärt. Diskutiert werden eine vermehrte Aufnahme und anschließender Verbleib des Farbstoffes in der Tumorzelle, wie auch eine erhöhte passive Bindung in der Tumorumgebung (Riefke *et al.*, 1996). Andererseits mag auch eine intensivere Farbstoffanflutung infolge einer verstärkten Vaskularisation im Tumorgewebe für den Kontrast verantwortlich sein (de Li *et al.*, 1995).

- **NIR-1**

Dieser fluoreszierende Farbstoff wurde am Institut für Diagnostikforschung GmbH in Berlin entwickelt und von der Firma Schering (Schering AG, Berlin, Germany) bereit gestellt sowie im Jahr 2000 als potentiell Kontrastmittel für die NIR-Mammographie präsentiert. Er basiert auf der chemischen Grundstruktur des ICG. Durch die Substitution von Zuckerresten (Glukamine, Glukosamine) wurde eine gesteigerte Hydrophilie erreicht (siehe Abb. 3). Die Plasmaproteinbindung beträgt somit nur noch 10%, wodurch eine schnelle Extravasation in den Extrazellularraum nach intravenöser Gabe erreicht wird. Nur noch zu einem geringen Anteil im Blut gebunden, wird die Substanz vor einer schnellen Elimination durch die Leber geschützt. Die Ausscheidung findet hauptsächlich auf renalem Wege statt. Die Plasmahalbwertszeit beträgt 33 min. Es konnten nach vier Stunden  $68 \pm 10\%$  des injizierten Farbstoffes im Harn nachgewiesen werden (Riefke *et al.*, 1996). Ebenfalls deutlich erhöht gegenüber ICG ist die Gewebeclearance (Halbwertszeit im Gewebe). Sie beträgt für gesundes Gewebe 115 Minuten, in Tumoren hingegen 75 Minuten. Es ist ein bekanntes Phänomen, dass der Abbau von hydrophilen, niedermolekularen Kontrastmitteln im tumorösen Gewebe schneller vonstatten geht, als im unverändertem Gewebe. In einer Untersuchung mit Mäusen konnte eine deutliche Kontrasterhöhung (zwei Minuten nach Applikation des Farbstoffes) in den Mammatumoren dieser Tiere gegenüber dem umliegenden Gewebe gezeigt werden (Boehm *et al.*, 2001). Der Kontrast bei NIR-1 ist bis zu 24 Stunden nachweisbar (Riefke *et al.*, 1996).



**Abb. 3** Strukturformel von NIR-1

Das Absorptionsmaximum von NIR-1 liegt bei 755 nm, das Emissionsmaximum bei 790 nm (jeweils in Plasma bestimmt). Die Fluoreszenzquantenausbeute ist gegenüber ICG verbessert, sie beträgt im Plasma 11%.

Die biologische Verträglichkeit ist gegenüber ICG, gemessen an Mäusen, um das 60-fache verbessert worden. LD<sub>50</sub>-Versuche an der Maus wurden bis zu einer Konzentration von 5000 µmol/ kg KGW durchgeführt, die noch keine Letalität bei 50% der Tiere verursachte.

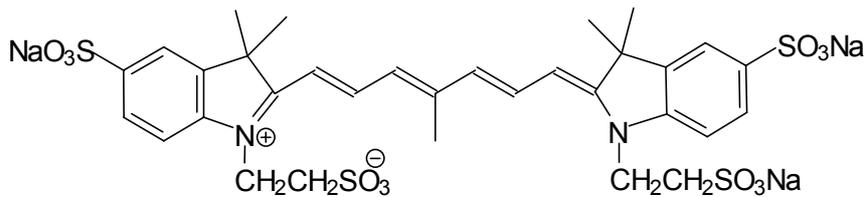
Höhere Konzentrationen wurden nicht ausgetestet.

Der Farbstoff hat derzeit für die Anwendung am Menschen noch keine klinische Zulassung.

- **KC 45**

Der von der Fuji Photo Film Cooperation (Tokio, Japan) und der Schering AG (Berlin, Deutschland) gemeinsam entwickelte Farbstoff wurde zunächst für die kontrastmittelgestützte NIR-Mammographie getestet.

Er basiert ebenfalls auf der Struktur von ICG. Es ist ein Cyaninfarbstoff mit Indotricarbocyanin-Grundstruktur, der wie auch die anderen Substanzen dieser Gruppe, anionisch und hydrophil ist (siehe Abbildung 4). Seine Affinität zu den Proteinen des Blutplasmas liegt zwischen den Werten von ICG und NIR-1, sie beträgt 40%. Der Ausscheidungsmechanismus dieses Farbstoffes ist noch nicht endgültig geklärt, er wird teils renal, teils biliär aus dem Körper eliminiert. Der jeweilige Anteil variiert aber stark zwischen den bisher untersuchten Tierarten. Die Bluthalbwertszeit unterscheidet sich mit rund 26 Minuten nicht wesentlich von der des NIR-1. Die Gewebahalbwertszeit ist bisher nicht bestimmt worden.



**Abb. 4** Strukturformel von KC 45

Der deutlichste Tumor/Gewebe-Kontrast hat sich in einer Studie mit tumortragenden Nacktmäusen nach vier Stunden gezeigt. Nach einer Stunde post injectionem beträgt der Kontrast erst  $1,3 \pm 0,1$ , nach vier Stunden  $2,7 \pm 0,6$ , während er nach 24 Stunden immer noch  $2,2 \pm 0,4$  beträgt. Der Farbstoff KC 45 hat günstige optische Eigenschaften. In wässriger Lösung ist die Fluoreszenz nicht sehr ausgeprägt, sie steigt aber mit der Bindung an Proteine deutlich an. Die Fluoreszenzquantenausbeute im Plasma beträgt 17% und weist damit wesentlich bessere Eigenschaften für die Bildgebung als ICG und NIR-1 auf. Das Absorptionsmaximum liegt bei 756 nm, das Emissionsmaximum bei 771 nm, jeweils im Plasma bestimmt. Die Verträglichkeit ist sehr gut. Die an der Maus untersuchte  $LD_{50}$  liegt bei ungefähr 3500  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  KGW (Licha, 2003).

### 3.9.5 Spezifisch bindende Cyaninfarbstoffe

Ein weiterer Ansatz in der verbesserten Signalgebung von Tumoren ist die Entwicklung spezifisch bindender Farbstoffe. Der Vorteil liegt in der hohen Selektivität und Affinität des Farbstoffes zu bestimmten Rezeptoren des Tumors. Dies ermöglicht eine Anwendung von niedrigeren KM-Dosen und daraus folgend ein verbessertes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis. Es wurden bereits diverse Studien zu spezifisch gebundenen Farbstoffen durchgeführt. So gibt es Untersuchungen zu Antikörper-gebundenen Cyaninen, Protease-aktivierten Farbstoffen und solchen, die über Kopplung an spezifische Analoga an Somatostatin-Rezeptoren binden (Achilefu *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2000; Licha *et al.*, 2000).

Neben der Anwendung in der Tumordetektion werden sich durch die Entwicklung von weiteren spezifischen Farbstoffen sicherlich noch erheblich mehr Einsatzmöglichkeiten ergeben. So ist zum Beispiel in der Gelenkdiagnostik an Farbstoffe zu denken, die an spezifische Entzündungszellen koppeln.