

3. Grundlagen und Literaturübersicht

3.1 Arthritis-Tiermodell

Für die Detektion einer Arthritis mittels Nahinfrarot-Fluoreszenz-Diagnostik ist ein solches Modell geeignet, welches eine subakute Arthritis an einem oder mehreren Gelenken in exponierter Lage bei einer kleinen Tierart entwickelt. Von Herrn Dr. Thomas Kamradt aus dem DRFZ (Deutsches Rheumaforschungszentrum Berlin und Medizinische Universitätsklinik mit Schwerpunkt Rheumatologie, Berlin) wurde das etablierte Modell der Lyme-Borreliose der Labormaus zur Verfügung gestellt.

3.1.1 Lyme-Borreliose der Labormaus

Die Lyme-Borreliose wird auch als Zeckenborreliose, Lyme-Arthritis, Lyme disease, Lyme-Krankheit, Erythema-migrans-Krankheit oder auch nur als Borreliose bezeichnet. Der Erreger, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, hat ein großes natürliches Wirtstierspektrum. Eine Vielzahl von Labortieren, z.B. Rhesusaffen, Hunde, Kaninchen, Meerschweinchen, Gerbille, Hamster, Ratten und Mäuse lassen sich leicht mit diesem Bakterium infizieren. Jedes Modell hat seine Vorzüge. Die Labormaus bietet aufgrund ihrer genetischen und mikrobiologischen Definition und ihrer Empfänglichkeit in allen Altersstufen die besten Voraussetzungen und stellt zugleich ein kostengünstiges Modell dar (Barthold, 1995; Moody und Barthold, 1998).

Experimentelle Infektion von Labortieren

Die experimentelle Infektion der Tiere mit Borrelien kann über eine Verfütterung der Borrelien-haltigen Zecken oder über eine intradermale, subkutane oder intraperitoneale Injektion erfolgen. Bei der intradermalen Inokulation einer Borrelien-Suspension wird die geringste Anzahl der Spirochäten für eine Infektion der Labortiere benötigt, da dieses Einbringen der Bakterien dem natürlichen Infektionsweg entspricht (Barthold, 1996; Moody und Barthold, 1998). Diese Methode macht jedoch eine kurzfristige Immobilisation der Tiere sowie eine Schür der betreffenden Hautpartie notwendig, so dass die ebenfalls gut wirksame subkutane Injektion zu bevorzugen ist, da diese eine geringere Belastung für die Tiere darstellt und zudem einfacher durchzuführen ist.

Für das Modell der Lyme-Borreliose in der Labormaus werden Mäuse des Standard-Inzuchtstammes AKR einmalig mit Borrelien z. B. des Stammes *Borrelia burgdorferi* A218 infiziert. Dieser Stamm wurde 1998 von Harri Marttila in Turku (Finnland) aus einer Zecke isoliert, die in Finnland auf der Insel Akvenenman gesammelt worden war. Die Mäuse entwickeln nach circa drei bis vier Wochen eine reaktive Arthritis, besonders im Bereich der Sprunggelenke, welche aufgrund ihrer exponierten Lage und des geringen Fellwuchses für die Nahinfrarot-Untersuchungen besonders geeignet sind.

Manifestation der Borreliose in der Labormaus

Die Lyme-Borreliose einiger spezieller immunologisch intakter Inzucht-Mausstämme (z. B. AKR-Mäuse) stimmt in vielen klinischen und pathologischen Merkmalen mit der Erkrankung des Menschen überein. Wie beim Menschen entwickeln diese Mäuse eine akute Infektion mit Arthritis, Vaskulitis und Myokarditis, gefolgt von einem Abklingen der klinischen Symptome und periodischer Wiederkehr über einen Zeitraum von vielen Monaten, wobei die wiederkehrenden Krankheitsschübe generell milder ausfallen und lediglich einige Gelenke betreffen (Barthold et al., 1993; Moody und Barthold, 1998). Nach einer Infektion der Tiere mit Borrelien können bereits einige Tage nach der Inokulation histologisch entzündliche Veränderungen in der Umgebung von Gelenken (Sehnen, Bänder, Sehnenscheiden) und wenig später eine Arthritis nachgewiesen werden (Barthold et al., 1991). Charakteristisch sind die Infiltration mit neutrophilen Granulozyten, Hyperplasie und Hypertrophie der Synovialis und eine fibropurulente Exsudation in den Gelenkspalt sowie Vaskulopathien der Intima. Äußerlich ist bei den betroffenen Tieren eine Rötung und Schwellung aufgrund eines periartikulären Ödems im Bereich der gut sichtbaren Tibiotarsalgelenke zu erkennen. (Barthold et al., 1991; Moody und Barthold, 1998). Abweichend von der humanen Erkrankung kommen bei dem Modell der Maus weder neurologische noch dermatologische Veränderungen vor (Barthold, 1996; Moody und Barthold, 1998).

Suszeptibilitäts-Unterschiede

Nicht bei allen Labormaus-Stämmen können klinische Symptome hervorgerufen werden, da die verschiedenen Stämme unterschiedliche Suszeptibilitäten (Empfänglichkeiten) zur Entwicklung einer Arthritis nach *Borrelia burgdorferi*-Infektion aufweisen. Die Empfänglichkeit für diese Erkrankung ist eng korreliert mit dem MHC (major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex)-Genotyp, dessen Gene die Proteine kodieren, die die immunologische Individualität des Menschen oder des Tieres ausmachen. Die Mäuse mit dem so genannten H2k MHC-Genotyp (z. B. AKR-Mäuse) weisen eine ausgeprägte Arthritis

auf. Ebenfalls eine Arthritis, jedoch in geringerem Ausmaß, entwickeln Mäuse mit H2b bzw. H2d MHC-Genotyp.

Eine tierexperimentelle Studie mit SCID (severe combined immunodeficiency = schwerer kombinierter Immundefekt) - Mäusen, deren B- und T-Zellfunktion stark beeinträchtigt ist, zeigte einen sehr dramatischen Krankheitsverlauf mit deutlicher Beeinträchtigung der Motilität der Tiere, verbunden mit massiver Schwellung und Rötung im Bereich der Sprunggelenke. Der Verlauf der Borrelien-Infektion bei diesen Tieren ist aufgrund der starken Ausprägung nicht mit dem Verlauf beim Menschen zu vergleichen (Philipp und Johnson, 1994).

3.1.2 Lyme-Borreliose (Lyme-Krankheit) in der Humanmedizin

Bei der Lyme-Borreliose des Menschen handelt es sich ebenfalls um eine multisystemische Erkrankung, welche hauptsächlich durch einen Zeckenbiss übertragen wird. Die häufigste Form der Lyme-Borreliose beim Menschen ist ebenfalls charakterisiert durch eine große Breite von muskuloskelettalen sowie kardialen, aber auch dermatologischen und neurologischen Symptomen, welche dazu tendieren, spontan abzuheilen und intermittierend wiederzukehren, soweit keine antibiotische Therapie erfolgt.

Entdeckung der Lyme-Krankheit

Das so genannte Erythema migrans (ringförmig wandernde Hautrötung, "Wanderröte"), welches im Bereich des Zeckenbisses auftreten kann, wurde bereits 1909 vom schwedischen Arzt Dr. Arvid Afzelius beobachtet (Afzelius, 1921). Vier Jahre später wurde es als Erythema chronicum migrans auch in Deutschland von Lipschütz (1913) beschrieben. Im Sommer 1975 traten unter den Kindern der Gemeinden East Haddam, Lyme und Old Lyme im Bundesstaat Connecticut (USA) zahlreiche Erkrankungen auf, die von den dortigen Ärzten für "juvenile rheumatoide Arthritiden" gehalten wurden. Die Arbeitsgruppe um Steere veröffentlichte die ersten Ergebnisse ihrer klinischen und epidemiologischen Untersuchungen über das neuartige Krankheitsbild, das zunächst als "Lyme Arthritis" in die Fachliteratur einging (Steere et al., 1977).

Ätiologie der Lyme-Krankheit

Bereits Afzelius hat die Zecke *Ixodes ricinus* und andere Insekten als Krankheitsüberträger angesehen. Der ätiologische Zusammenhang mit Zeckenbissen wurde 1922 in Frankreich erkannt und die Vermutung einer ursächlichen Rolle von Spirochäten wurde bereits 1948 aufgestellt (Lennhoff, 1948). 1982 konnten von Burgdorfer et al. Borrelien aus Zecken (*Ixodes dammini*) isoliert und als ätiopathologisches Agens der Erkrankung identifiziert werden. Bis heute wurde das Auftreten der Lyme-Krankheit in über 50 Ländern beschrieben. In Europa gibt es eine geographische Häufung der Erkrankungsfälle in den skandinavischen Ländern sowie Zentraleuropa und hier besonders in Deutschland, Österreich und der Schweiz (Kamradt, 2002).

Krankheitsverlauf der Lyme-Krankheit

Zur Beschreibung des klinischen Verlaufes wird häufig eine Klassifikation der Lyme-Borreliose in drei Stadien verwandt (Stadium I: frühe lokalisierte Infektion, Stadium II: frühe disseminierte Infektion, Stadium III: persistierende Infektion). Nicht alle Patienten durchlaufen alle Stadien, so dass sich in einigen Fällen die Erkrankung erst in fortgeschrittenem Stadium erstmals klinisch manifestiert. Nur etwa ein Drittel aller Patienten mit einer Lyme-Arthritis erinnern sich an einen Zeckenbiss oder an ein vorangegangenes Erythema migrans (Steere, 1989).

Immunantwort bei Infektion mit Borrelien

Die Entwicklung der Antikörperantwort bei einer *Borrelia burgdorferi*-Infektion bei unbehandelten Patienten konnte bereits gut erforscht werden. Spezifische IgM-Antikörper sind drei bis vier Wochen post infectionem nachweisbar. Nach einem Höhepunkt der Antikörperproduktion nach sechs bis acht Wochen kommt es zu einer anschließenden Abnahme der IgM-Antikörper im Blut. IgG-Antikörper treten sechs bis acht Wochen nach einer Infektion auf, weisen einen Peak nach vier bis acht Monaten auf und bleiben viele Jahre nachweisbar. Auch nach einer erfolgreichen Antibiotika-Therapie kann die IgG- und IgM-Antwort über zehn Jahre und länger bestehen bleiben (Steere, 2001).

Antikörper-Nachweis bei Verdachtsdiagnose

Bei dem Verdacht einer Infektion mit *Borrelia burgdorferi* wird ein serologischer Nachweis von Antikörpern durchgeführt. Dabei wird zunächst mittels ELISA das Vorhandensein von

Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* überprüft. Bei einem positiven Ergebnis erfolgt anschließend zur Bestätigung ein weiterer Nachweis mittels Westernblot (Shapiro und Gerber, 2000; Steere, 2001).

Die bislang auf dem Markt befindlichen Testsysteme weisen allerdings Mängel in Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit auf. Die Situation in Europa wird zudem noch dadurch verkompliziert, dass verschiedene Subspezies von *Borrelia burgdorferi* sensu lato die Lyme-Krankheit verursachen können. Somit unterscheidet sich die Immunantwort der Probanden in Europa komplett von der in Amerika und es gibt gegenwärtig keine offiziell anerkannten Kriterien für den serologischen Nachweis der Lyme-Krankheit (Kamradt, 2002). Die Interpretation der serologischen Daten wird weiterhin durch die Tatsache erschwert, dass bei einer Vielzahl von Einwohnern endemischer Gebiete ein seropositiver Nachweis bei gleichzeitigem Fehlen von jeglichen Symptomen möglich ist (Steere, 2001). Zudem ergibt die ELISA-Nachweismethode in manchen Fällen ein falsch positives Resultat, da es zu Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen Spirochäten der normalen oralen Flora und gegen andere Spirochäten-Infektionen (z. B. Syphilis, Leptospirose, Rückfallfieber) sowie gegen virale Infektionen (z. B. Varicella) kommen kann.

Kulturverfahren zur Anzucht von Borrelien

Ein weiteres Nachweisverfahren stellt die Anzucht von Borrelien aus Probenmaterial (Haut, Synovia, Urin, Liquor) dar. Diese kann mit Barbour-Stoenner-Kelly Medium (BSK-Medium) vorgenommen werden und erfordert eine Kulturdauer von sechs bis acht Wochen bei 33°C in mikroaerophiler Umgebung. Dies ist jedoch ein sehr aufwändiges Verfahren und wird daher selten für diagnostische Zwecke eingesetzt.

Nachweis mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction - PCR) erlaubt einen zuverlässigen Nachweis von *Borrelia burgdorferi*-DNA in Synovia oder in Proben der Synovialis von Patienten mit Lyme-Arthritis sowie in Zerebrospinalflüssigkeit bei Patienten mit früher zentralnervöser Manifestation der Lyme-Krankheit (Nocton et al., 1994; Nocton et al., 1996; Priem et al., 1998).

Nachweis durch Silber-Färbung

Das Bakterium *Borrelia burgdorferi* kann mittels Silber-Färbung (Warthin-Starry oder modifizierte Dieterle's) in Haut-, Synovial- oder Myokardbiopsien angefärbt und nachgewiesen werden. Jedoch können die Bakterien leicht mit normalen Gewebestrukturen verwechselt oder aufgrund ihrer oft geringen Anzahl übersehen werden (Shapiro und Gerber, 2000).

Therapie der Borreliose

Die Behandlung der Lyme-Arthritis bei Mensch und Tier ist mit oraler Gabe bei früh erkannter Erkrankung und mit intravenöser Gabe bei später Manifestation von Doxycyclin oder Amoxicillin sehr erfolgreich. Neurologische und kardiologische Erkrankungen werden mit intravenöser Applikation von Cephalosporinen über vier Wochen behandelt (Kamradt, 2002).

Impfung

In Deutschland existiert keine Impfung für Menschen gegen die Borreliose. Der in den USA entwickelte Impfstoff gegen Borreliose (LYMErix, SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Philadelphia, USA) wurde aufgrund der geringen Resonanz in der Bevölkerung wieder vom Markt genommen.

Seit 1998 ist in Frankreich und seit 1999 in Deutschland ein Impfstoff für Hunde (Merilym, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) erhältlich. Dieser Impfstoff verhindert die Lyme-Borreliose, indem sie die Übertragung der Borrelien von der Zecke auf den Wirt bereits in ihren Anfängen verhindert. Die durch die Impfung induzierten Antikörper gegen ein spezielles Oberflächenprotein (OspA) von *Borrelia burgdorferi* zirkulieren im Blutstrom des Hundes. Bei der Blutmahlzeit nehmen die Zecken mit dem Blut diese Antikörper auf, die dann im Mitteldarm der Zecke an die dort vorhandenen Borrelioseerreger binden. Eine für die Übertragung auf den Wirt zwingend notwendige Wanderung der Borrelien in die Speicheldrüse der Zecke wird somit verhindert (Fikrig et al., 1992; Chang et al., 1995).

3.1.3 *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Borrelien sind geschraubte Bakterien mit einer durchschnittlichen Länge von 20 bis 30 µm. Sie bestehen aus einem protoplasmatischen Zylinder, der von einer Zellmembran, sieben bis

elf Flagellen und einer äußeren Membran mit sogenannten "outer-surface" Proteinen umgeben ist. In tierexperimentellen Studien an Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass Borrelien hauptsächlich extrazellulär vorkommen. Nur in sehr wenigen Ausnahmen sind Borrelien im Sarkoplasma von Herzmuskelzellen in frühen Stadien der Erkrankung gefunden worden (Barthold, 1996).

Der Erreger der Lyme-Borreliose, die Spezies *Borrelia burgdorferi* sensu lato, gehört zur Gattung der *Borrelia*. Borrelien, Spirochaeten, Christispiiren und Treponemen bilden die Familie der Spirochaetacea (Blenk, 1993). Aufgrund molekularbiologischer und immunologischer, aber auch klinischer Unterschiede wird die Spezies *Borrelia burgdorferi* sensu lato in der Zwischenzeit in die Sub- bzw. Genospezies *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii* und *Borrelia garinii* unterteilt. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto verursacht überwiegend arthritische Verläufe der Borreliose. *Borrelia afzelii* ist für eine hauptsächlich dermatologische Manifestation und *Borrelia garinii* für eine zumeist neurologische Manifestationen der Lyme-Borreliose verantwortlich, jedoch können beide Arten ebenso arthritische Krankheitserscheinungen hervorrufen (Baranton et al., 1992).

Übertragung der Borrelien

Die Übertragung der Borrelien auf Mensch und Tier erfolgt hauptsächlich über Schildzecken der Gattung *Ixodes*. Zwar wurde *Borrelia burgdorferi* auch in Fliegen, Mücken, Bremsen, Flöhen sowie Milben nachgewiesen, aber ihre Rolle als Vektoren konnte weitestgehend ausgeschlossen werden (Matuschka und Richter, 2002). Bei den dafür in Frage kommenden Zeckenarten gibt es geographische Unterschiede. In Europa tritt zu einem großen Anteil *Ixodes ricinus* (Gemeiner Holzbock) als Vektor in Erscheinung (Burgdorfer, 1989). In den USA wurde hauptsächlich *Ixodes dammini*, aber auch *Ixodes scapularis*, *Ixodes pacificus* und auch *Amblyomma americanum* als Überträger von Borrelien auf den Menschen beschrieben.

Die Lebensdauer von Zecken beträgt zwei Jahre. Während dieser Zeit durchlaufen sie drei Entwicklungsstadien: Larve, Nymphe und Erwachsenenform. Jedes dieser Stadien benötigt eine Nahrungsaufnahme.

Das Risiko der Übertragung von *Borrelia burgdorferi* durch eine infizierte Zecke ist abhängig von der Dauer der Blutmahlzeit. Eine Übertragung von Borrelien findet erst nach dem vollständigen Eindringen der Mundwerkzeuge der Zecke in die Haut des Wirtes statt. Der Zeckenbiss ist schmerzlos, da Bradykinase-ähnliche Enzyme sezerniert werden, die

Entzündungsmediatoren unterdrücken. Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass sowohl Nymphen als auch erwachsene Zecken mindestens für 24 Stunden am Wirt verbleiben müssen, bevor ein Risiko zur Übertragung von *Borrelia burgdorferi* besteht. Bei einer Anheftung einer borrelieninfizierten Zecke an einem Wirt bis zu ihrer Sättigung (rund 72 Stunden) kommt es in mehr als 90 % der Fälle zu einer Übertragung von Borrelien (Piesman et al., 1987).

Die Übertragung der Borrelien auf den Menschen erfolgt in einer Vielzahl der Fälle durch das Nymphenstadium der Zecke. Die Nymphe ist sehr klein und somit schwer rechtzeitig zu erkennen. Die im Verhältnis dazu sehr große adulte Zecke wird öfter von den betroffenen Menschen entdeckt und vor dem vollständigen Eindringen der Mundwerkzeuge entfernt. Des Weiteren erreicht die Nymphe aufgrund ihrer Größe schneller als eine erwachsene Zecke die für die Übertragung der Borrelien notwendige Sättigung mit Wirtsblut (Shapiro und Gerber, 2000).

Reservoir- und Wirtstiere von *Borrelia burgdorferi*

Mäuse stellen den natürlichen Reservoir-Wirt für *Borrelia burgdorferi* dar. Sie entwickeln eine persistierende Infektion, weisen jedoch keine Krankheitssymptome auf (Levine et al., 1985; Barthold, 1995). In Zentraleuropa handelt es sich hauptsächlich um die Brandmaus (*Apodemus agrarius*), aber auch die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*), die Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) sowie die Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*) (Matuschka et al., 1992). In den USA fungiert die Weißfußmaus (*Peromyscus leucopus*) als Reservoir für *Borrelia burgdorferi*.

Bei der Blutmahlzeit einer Zecken-Larve, seltener auch einer Nymphe, an einer borrelieninfizierten Maus gelangen die Borrelien über den Rachen und Oesophagus in den Mitteldarm der Zecke. Bereits nach wenigen Stunden reichern sich die Spirochäten im Interzellularraum der Darmepithelien an. Von dort aus durchdringen sie frühestens 24 Stunden nach der Aufnahme in die Zecke die Basalmembran und treten in die Körperhöhle der Zecke ein, wo sie sich durch Zweiteilung stark vermehren. Anschließend findet eine Einwanderung in verschiedene Gewebe der Zecke statt, z. B. Zentralganglion, Coxal-Organ und das Genitalsystem. Die Borrelien können dann von den Zecken bei der nächsten Nahrungsaufnahme über den Speichel oder die Coxal-Flüssigkeit auf ein Wirtstier übertragen werden (Burgdorfer, 1993).

Natürliche Wirtstiere von Nymphen und erwachsenen Zecken sind eine Vielzahl größerer Säugetiere (u. a. Rotwild, Waschbären, Rinder, Pferde, Schafe, Ziegen, Schweine, Hunde, Katzen, Nager, Eidechsen) und Vögel (z. B. Nachtigall) (Anderson, 1988; Burgess, 1988; Kaiser et al., 2002; Liebsch und Liebsch, 2003). Der Mensch gehört nicht zu den natürlichen Wirtstieren der Zecke und es ist daher anzunehmen, dass die Blutmahlzeit von Zecken an Menschen ein eher zufälliges Ereignis darstellt (Philipp et al., 1994).

3.2 Anatomie

3.2.1 Allgemeiner Aufbau eines Gelenkes

Bei einem Gelenk (*Articulatio synovialis*) handelt es sich um eine bewegliche Verbindung zwischen zwei (*Articulatio simplex*, z. B. Schultergelenk) oder mehreren Knochen (*Articulatio composita*, z. B. Kniegelenk).

Ein Gelenk setzt sich aus den mit hyalinem Gelenkknorpel (*Cartilago articularis*) überzogenen Gelenkenden, der Gelenkkapsel (*Capsula articularis*), der Gelenkhöhle (*Cavum articulare*) mit Gelenkschmiere (*Synovia*) und den Gelenkbändern (*Ligamenta articularia*) zusammen.

Der Gelenkknorpel besteht aus hyalinem Knorpel, der in frischem Zustand bläulich erscheint, eine glatte Oberfläche besitzt und durch eine schmale verkalkte Zone auf dem Knochen fest verankert ist. Lichtmikroskopisch können im Gelenkknorpel anhand der Ausrichtung der Kollagenfibrillen vier Schichten unterschieden werden: Zone I - oberflächliche Knorpelzone (Anteil ca. 5%, tangentielle Fibrillenordnung), Zone II - mittlere Knorpelzone (Anteil ca. 15%, transitionale Fibrillenordnung), Zone III - tiefe Knorpelzone (Anteil ca. 50%, radiale Fibrillenordnung) und Zone IV - kalzifizierte Knorpelzone (Anteil ca. 30%) (Lane und Weiss, 1975). Der Knorpel hat eine gewisse Stoßdämpferfunktion und bewirkt eine Anpassung der Gelenkflächen. Hyaliner Knorpel besteht aus Chondrozyten, die einzeln oder in Gruppen in eine homogene Knorpelgrundsubstanz (Matrix) eingelagert und nur bedingt teilungs- und regenerationsfähig sind. Die Knorpelmatrix setzt sich im wesentlichen aus speziellen Kollagenfibrillen, Hyaluronsäure und Proteoglykanen zusammen. Neben Typ II können im hyalinen Knorpel auch die Kollagentypen III, VI, IX, X, XI und XIV nachgewiesen werden (Keene et al., 1988; Remberger, 1990; Wotton und Duance, 1994). Bei Vögeln ist nicht Kollagen Typ II, wie bei Säugetieren, sondern Kollagen vom Typ I die hauptsächliche Kollagenkomponente im Gelenkknorpel (Eyre et al., 1978). Bei Proteoglykanen handelt es

sich um makromolekulare Glykoproteine, bei denen viele Glykosaminoglykane (im Knorpel hauptsächlich Chondroitinsulfat oder Keratansulfat) an einem Kernprotein hängen. Der Gehalt an Proteoglykanen im Knorpel bewirkt die Viskosität. Für die Elastizität und Festigkeit ist der Gehalt an Kollagenfibrillen verantwortlich.

Die Gelenkkapsel setzt sich aus zwei Schichten, dem Stratum fibrosum und dem Stratum synoviale (Synovialis) zusammen. Das zur Gelenkhöhle hin gelegene Stratum synoviale enthält zwei Typen locker aneinander gefügter Synovialzellen. Es handelt sich einerseits zu ca. 80 % um die Fibroblasten-ähnlichen sezernierenden Synovialzellen (B-Zellen), die durch ein gut entwickeltes rauhes endoplasmatisches Retikulum und nur wenige Vesikel gekennzeichnet sind. Diese Zellen produzieren die in der Synovia enthaltenen Glykosaminoglykane (z. B. Hyaluronsäure und Heparansulfat) und sind somit für die Zusammensetzung der Synovia verantwortlich. Die Synovia stellt ein aus den Blutkapillaren in die Gelenkhöhle einsickerndes Ultrafiltrat dar, das Proteine, Glukose und Hyaluronsäure enthält. Sie erfüllt eine ernährende Funktion für den avaskulären Gelenkknorpel und minimiert zusätzlich als Schmiersubstanz die Reibung zwischen den Gelenkflächen. Synovialflüssigkeit ist klar und von strohgelber Farbe, hat eine hohe Viskosität und zeigt keine Gerinnung. Des Weiteren sind im Stratum synoviale Makrophagen-ähnliche phagozytierende Synovialzellen (A-Zellen) vorzufinden, die mit Pseudopodien und zahlreichen Vesikeln, Vakuolen und Lysosomen ausgestattet sind. Diese können z. B. Blutzellen nach Gelenkblutungen oder kleinste Knorpelpartikel bei degenerativen Gelenkveränderungen phagozytieren (Budras, 1994; Nagaoka et al., 2001; Nickel et al., 2004).

3.2.2 Skelett des Sprunggelenkes

Das Sprunggelenk (Hinterfußwurzelgelenk, *Articulatio tarsi*) wird von Knochen des Unterschenkels, der Hinterfußwurzel und des Mittelfußes gebildet. Es ist ein zusammengesetztes Gelenk und besteht aus vier Gelenkspalten, die jeweils eine eigene Synovialhöhle besitzen. Bei den einzelnen Gelenken handelt es sich um das Unterschenkel-Hinterfußwurzelgelenk (*Articulatio tarsocruralis*), dem aus zwei Anteilen bestehenden oberen Hinterfußwurzel-Mittelgelenk (*Articulatio talocalcaneocentralis* und *Articulatio calcaneouartalis*), dem unteren Hinterfußwurzel-Mittelgelenk (*Articulatio centrodistalis*) und den Hinterfußwurzel-Mittelfußgelenken (*Articulationes tarsometatarsae*). Die Gelenkbänder des Sprunggelenkes werden unterteilt in Seitenbänder, proximale und distale Fußwurzelbänder sowie Fußwurzel-Mittelfußbänder. Bei den seitlich des Tarsus befindlichen

Seitenbändern (Ligg. collateralia) werden die langen Seitenbänder (Ligg. collateralia tarsi longa) und die kurzen Seitenbänder (Ligg. collateralia tarsi brevia) unterschieden. Die proximalen (Lig. talocalcaneum laterale, Lig. talocalcaneum plantare) und distalen Fußwurzelbänder (Ligg. tarsi dorsalia, plantaria et interossea) verlaufen in verschiedene Richtungen und reichen über einen oder mehrere Gelenkspalten. Die Fußwurzel-Mittelfußbänder (Ligg. tarsometatarsa) überspannen die Tarsalknochen dorsal und plantar. Zusätzlich verbinden sie die Ossa metatarsalia als innere Bänder (Nickel et al., 2004).

3.3 Entzündung

Eine Entzündung stellt einen komplexen Abwehrvorgang des Organismus mit Reaktionen des Gefäßbindegewebes und Reaktionen von Zellen im Bereich der Einwirkungsstelle der auslösenden Noxe dar (Weiss, 1990).

Allgemeine Vorgänge bei einer Entzündung

Eine akute Entzündung ist gekennzeichnet durch die Kardinalsymptome Rötung (rubor), Wärme (calor), Schwellung (tumor), Schmerz (dolor) und Funktionsstörung (functio laesa). Sie umfasst vaskuläre und zelluläre Reaktionen. Die vaskulären Veränderungen der Endstrombahn des geschädigten Gewebes werden durch vasoaktive Entzündungsmediatoren, wie z. B. Histamine, plättchenaktivierender Faktor und Kinine hervorgerufen. Die wichtigsten Folgen sind Vasodilatation mit vermehrter Gewebsdurchblutung und Permeabilitätssteigerung der Gefäßwand (Weiss, 1990; Böcker et al., 2001).

Nach einer kurzfristigen Kontraktion der Arteriolen kommt es wenige Minuten später zu einer Dilatation der Arteriolen und postkapillären Venolen sowie zu einer Öffnung der präkapillären Sphinkteren. Daraus resultiert eine bis auf das Zehnfache des Ausgangswertes gesteigerte Durchblutung, d. h. es entsteht eine aktive Hyperämie. Der dadurch erhöhte hydrostatische Druck führt zu einem vermehrten Flüssigkeitsausstrom in das Interstitium (Ödem). Das zunächst eiweißarme Ödem wird aufgrund der zunehmenden Permeabilitätsstörung zu einem proteinreichen Ödem. Im weiteren Verlauf kommt es zum Austritt von Blutplasma in das Interstitium, so dass die Viskosität des Blutes steigt. Dieses führt zu einer erheblichen Strömungsverlangsamung des Blutes (Prästase), die bis zum völligen Stillstand (Stase) gehen kann. Die Permeabilitätsstörungen im Bereich der Venolen und Kapillaren entstehen aufgrund funktioneller bzw. struktureller Endothelalterationen. Je nach Ausmaß der

Schädigung kommt es zu zwei verschiedenen endothelialen Schädigungsmustern. Bei leichten Schädigungen kommt es zu Endothelkontraktionen. Es bilden sich interzelluläre Endothellücken von 0,5 - 1,0 mm Durchmesser. Diese Lücken ermöglichen eine erhöhte Durchlässigkeit mit Ausstrom einer proteinreichen Flüssigkeit aus dem Blut in das Interstitium. Da diese Flüssigkeit ein Gewicht von über 1018 g/l aufweist, wird von Exsudat gesprochen. Starke zytotoxische Noxen, wie z. B. Verbrennungen, chemische oder bakterielle Toxine und Schädigung durch leukozytäre Enzyme oder Sauerstoffradikale führen zu direkten Endothelschäden mit erheblichen Veränderungen. Es können Ablösungen der Endothelzellen von der Basalmembran bis hin zu Endothelnekrosen beobachtet werden. Darüber hinaus kann durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade eine intravitale Blutgerinnung (Thrombose) ausgelöst werden mit nachfolgender Durchblutungsstörung des Gewebes (Ischämie und Gewebsnekrose) (Weiss, 1990; Gaethgens, 1996; Böcker et al., 2001).

Einteilung von Entzündungen

Die Einteilung der Entzündung kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen: nach dem zeitlichen Ablauf (akut, subakut, chronisch, rezidivierend), nach der Art der Ausbreitung und Lokalisation (lokalisiert, generalisiert, metastasierend), nach der Verlaufsform (exsudativ, granulomatös, proliferativ) oder aber nach der Ätiologie (bakteriell, viral, allergisch bedingt) (Weiss, 1990; Pschyrembel, 1994).

3.4 Gelenkentzündung (Arthritis)

Eine Arthritis stellt eine entzündliche Erkrankung eines Gelenkes dar. Davon unterschieden werden degenerative Erkrankungen (Arthrosen) (Pschyrembel, 1994).

Bei dem Befall eines Gelenkes wird von Monarthritis, bei der Erkrankung mehrerer Gelenke von Polyarthritis gesprochen (Pschyrembel, 1994). Arthritiden können entweder folgenlos abheilen oder zu bleibenden Defekten führen (Mohr, 1984).

Bei der Borrelienarthritis der Maus handelt es sich um eine anfangs akute und später chronisch proliferative, bakteriell bedingte Entzündung hauptsächlich des Sprunggelenkes (Barthold et al., 1993).

Allgemeine Vorgänge bei Gelenkentzündungen

Gelenkentzündungen (Arthritiden) beginnen mit Veränderungen der stark vaskularisierten Synovialmembran der Gelenkkapsel. Durch die gesteigerte Gefäßpermeabilität kommt es zu einem Ödem der Synovialmembran und nachfolgend zu einem Gelenkerguss. An der synovialen Oberfläche polymerisiert Fibrinogen zu Fibrin. Es kommt zu einer entzündlichen Infiltration des synovialen Gewebes, wobei der Charakter und das Ausmaß von dem auslösenden Agens und der Abwehrlage des Individuums abhängt. Nach der anfänglichen vorwiegend exsudativen Reaktion folgt schnell eine Proliferation der Zellen des synovialen Gewebes. Als Folge kommt es zu einer Verbreiterung der Synovialzellschicht und einer Vermehrung der Zellen des Stratum synoviale, welche mikroskopisch zu erkennen sind und sich sogar manchmal bereits makroskopisch als villöse Hyperplasie darstellen. Es kann weiterhin zur Ausbildung eines so genannten Pannusgewebes kommen, welches von den Gelenkkapselrezessus ausgeht, sich von dort aus auf die Knorpeloberfläche ausbreitet und bis in den subchondralen Markraum vordringen kann. Der entzündliche Erguss und die Ausbildung des Pannus können zu schweren Schädigungen des Gewebes führen. Endstadium eines fortschreitenden Entzündungsprozesses kann die komplette Zerstörung der Gelenke mit fibrösen oder ossären Ankylosen sein (Mohr, 1984).

Pathologische Prozesse in einem Gelenk führen auch zu einer Veränderung der Menge und der Beschaffenheit der Synovialflüssigkeit. Da sich unter normalen Bedingungen kein Punktat gewinnen lässt, ist vermehrte und abpunktierbare Synovialflüssigkeit immer Ausdruck einer Erkrankung des Gelenkes. Weiterhin können die Kriterien Farbe, Gerinnung, Trübung, Gesamtprotein und der Gehalt an Kristallen, Bakterien oder Leukozyten zur Erkennung und Differenzierung bestimmter Erkrankungen, z. B. bakterielle Arthritis, rheumatoide Arthritis, Arthrose oder Trauma, eines Gelenkes genutzt werden. Bei fast allen pathologischen Vorgängen kommt es zu einer Veränderung der Farbe, einer erhöhten Gerinnung, einer verminderten Viskosität, einer veränderten Mucinausfällung sowie zu einem Anstieg des Proteingehaltes, der Leukozytenanzahl und des Gehaltes an Glukose in der Synovialflüssigkeit. Weiterhin können bei einigen Erkrankungen Kristalle (z. B. Gicht) oder Bakterien (bakterielle Arthritis) in der Synovia gefunden werden (Fehr, 2000).

Neben den Änderungen der Zusammensetzung der Synovialflüssigkeit kommt es auch zu Verschiebungen im Kollagen- und Proteoglykangehalt des Gelenkknorpels bei pathologischen Prozessen, die z. B. für die Osteoarthritis sehr gut untersucht wurden. Es gibt deutliche Unterschiede in den Veränderungen in den oberflächlichen und in den tieferen Schichten des Knorpels. In den Knorpelschichten, die sich dem Gelenkspalt direkt

anschließen, kommt es zu einem Abbau von Kollagen vom Typ II durch Kollagenasen (Billinghurst et al., 1997) und zu einem Verlust der Proteoglykane Decorin, Biglycan (Poole et al., 1996) und Aggrecan (Hollander et al., 1995). In den mittleren und tiefen Schichten des Gelenkknorpels hingegen kommt es zu einem kompensatorischen Anstieg der Expression und Synthese von Proteoglykanen (besonders Biglycan und Decorin) (Poole et al., 1996) und der Synthese von Kollagen Typ II (Nelson et al., 1998). Auch kann es in den tieferen Schichten zu einer Erhöhung solcher Kollagentypen kommen, die normalerweise im Gelenkknorpel nur zu sehr geringen Anteilen vorhanden sind, z. B. Kollagen vom Typ III oder VI (Aigner et al., 1993; Hambach et al., 1998). Zusätzlich kann bei pathologischen Prozessen in den oberflächlichen Schichten des Gelenkknorpels Kollagen vom Typ I nachgewiesen werden (Pfander et al., 1999).

3.5 Diagnostische Verfahren

3.5.1 Etablierte bildgebende Verfahren in der Gelenkdiagnostik

Röntgenuntersuchung

Gegenwärtig gilt die konventionelle Röntgenuntersuchung als etablierte Standardmethode für den Nachweis und die Quantifizierung von Gelenkveränderungen. Sie stellt eine schnelle und preiswerte Bildgebung mit hoher Auflösung dar (Jewell und Watt, 1996; Kainberger et al., 1996).

Substrat der röntgendiagnostischen Betrachtung bei der Beurteilung von Gelenkveränderungen ist das knöcherne Skelett mit seinen Veränderungen und Reaktionen. Daher werden entzündliche Veränderungen im Bereich der Gelenke mit diesem Verfahren vorwiegend erst dann zugänglich, wenn sie sich an den knöchernen Anteilen des Bewegungsapparates auswirken.

Somit ist der Nachteil dieser Methode die niedrige Sensitivität bei der Erfassung früher entzündlicher Vorgänge der Weichteilgewebe, wie z. B. entzündlich veränderte Synovialmembranen oder Sehnenscheiden. Es können lediglich späte Stadien mit Veränderungen an den knöchernen Strukturen (z. B. Knochendemineralisierung, Knochenproliferationen oder Usuren) oder indirekte röntgenologische Zeichen (z. B. Verbreiterung des Gelenkspaltes oder unspezifische Weichteilschwellungen) dargestellt werden. Sowohl direkte, aber auch indirekte röntgenologische Zeichen treten erst bis zu einem halben Jahr nach Beginn der Erstsymptomatik auf (Ostendorf et al., 2003). Dabei ist

gerade eine rechtzeitige Erkennung von Gelenkentzündungen für einen frühen Beginn der Behandlung und somit zur Verhinderung bzw. Verzögerung fortschreitender Prozesse wichtig. Es wurde nachgewiesen, dass ein früher Therapiebeginn eine signifikante Verzögerung der Gelenkzerstörung bewirkt. Eine Studie von Backhaus et al. (1999) an Patienten mit einer Sakroiliitis ergab, dass, vergleichend zur konventionellen Röntgendiagnostik, klinische Untersuchung, Szintigraphie, Magnetresonanztomographie (MRT) und Ultraschall jeweils eine höhere Sensitivität beim Nachweis von frühen entzündlichen Weichteilgewebsveränderungen aufweisen.

Ebenfalls nachteilig bei der Röntgenuntersuchung ist die Strahlenbelastung, so dass die Untersuchungen z. B. bei Kindern und jungen Frauen im gebärfähigen Alter problematisch sind.

Computertomographie

Gegenüber der konventionellen Radiographie bietet die Computertomographie eine verbesserte Bildgebung von Weichteil- und Knochenstrukturen, wobei insbesondere die überlagerungsfreie Darstellung und die Möglichkeit einer dreidimensionalen Rekonstruktion von Vorteil sind. Jedoch können mit diesem Verfahren, wie auch bei der konventionellen Röntgenuntersuchung, keine frühen pathophysiologischen Veränderungen erfasst werden, da auch hier eine Entzündung nur anhand des Vorhandenseins von indirekten Zeichen und nicht anhand einer direkten Darstellung der entzündlichen Vorgänge nachgewiesen werden kann. Auch bei der Computertomographie ist die Strahlenbelastung zu berücksichtigen (Weissleder und Mahmood, 2001).

Szintigraphie

Mit der Skelettszintigraphie können ossäre Veränderungen früher als mit röntgenologischen Verfahren erfasst werden, da Stoffwechselveränderungen sichtbar gemacht werden, die den röntgenologischen Veränderungen zeitlich voraus gehen. Ein Vorteil der Skelettszintigraphie ist die Ganzkörperdarstellung und somit auch die Darstellung von Befallsmustern, die bei den einzelnen Arthritisformen unterschiedlich ausfallen (z. B. rheumatoide Arthritis mit meist symmetrischer Ausprägung an Händen, Fingergrund- und -mittelgelenke im Vergleich zur Arthritis psoriaca mit asymmetrischem strahlenförmigem Befall). Die Szintigraphie hat gegenüber der Röntgenuntersuchung eine höhere Sensitivität (Russel et al., 1975), jedoch eine geringere Spezifität (Ho et al., 1979), da es mit dieser Methode schwierig ist, entzündliche, degenerative und metastatische Knochenprozesse zu unterscheiden.

Nuklearmedizinische Verfahren, wie die Szintigraphie, liefern aufgrund ihres relativ geringen räumlichen Auflösungsvermögens weniger detaillierte Bilder als die Röntgenuntersuchung, CT und MRT. Dies hat zur Folge, dass die dargestellten Veränderungen nur eingeschränkt anatomisch zugeordnet werden können. Nachteilig sind auch die Strahlenbelastung und die relativ hohen Kosten (Weissleder und Mahmood, 2001).

Magnetresonanztomographie

Mit der MRT können aufgrund des hohen Weichteilkontrastes sensitiv pathophysiologisch frühe Gelenkveränderungen erfasst werden. Die MRT erlaubt strahlungsbelastungsfrei die Visualisierung der Synovitis als Ort der primären Läsionen, des Pannus und deren Auswirkungen auf Knorpel, Knochen und benachbarten Weichteilstrukturen wie Sehnen, Bänder und Bursen in hoher Auflösung. Durch Anwendung krankheitsspezifischer, gadoliniumhaltiger oder superparamagnetischer Kontrastmittel besitzt die MRT das Potential, frühe pathophysiologische Prozesse auf zellulärer und molekularer Ebene ohne Tiefenlimit darzustellen. Von Vorteil ist auch, dass die nötigen Kontrastmittelkonzentrationen relativ niedrig sind. Nachteilig bei der MRT sind die hohen Kosten und der hohe Zeitaufwand des Verfahrens (Bollow et al., 1996; Fenton, 1996; Peterfy, 2001; Ostendorf et al., 2003).

Sonographie

Die Sonographie bietet eine gute Darstellung von Weichteilstrukturen und ist hinsichtlich der Identifikation von Knochenerosionen sensitiver als die konventionelle Radiographie, da Veränderungen der Knochenoberfläche gut dargestellt werden können, sofern sie sonographisch zugänglich sind. Die Verwendung von Farbdoppler-Sonographie ermöglicht anhand der Gewebsvaskularität eine Einschätzung der Entzündungsaktivität in der Synovialmembran (Ostergaard und Szkudlarek, 2003; Schmidt et al., 2003). Die Sonographie ist beliebig oft wiederholbar, mobil einsetzbar und für den Patienten wenig belastend. Jedoch erfordern sowohl die Durchführung der Sonographie, als auch die Auswertung und die Bewertung der Befunde sehr viel Erfahrung.

3.5.2 Nahinfrarot(NIR)-Fluoreszenz-Diagnostik

Einen neuen Ansatz stellt die Darstellung von entzündlichen Gelenkveränderungen mittels laserinduzierter Fluoreszenz mit Hilfe von Nahinfrarot-Farbstoffen dar. Vorteile dieser neuen Methode sind, im Vergleich z. B. zum MRT, geringere Kosten, die für den apparativen

Aufbau und die Wartung anfallen sowie die relativ einfache Bedienung. Im Vergleich zur Röntgenuntersuchung kommt diese Messmethode ohne den Einsatz von ionisierender Strahlung aus.

Die farbstoffgestützte NIR-Diagnostik ist ein relativ neues Verfahren in der Humanmedizin aber auch in der Veterinärmedizin, das zur Visualisierung (Erkennung und Abgrenzung) von Tumoren und prämaligen Veränderungen insbesondere der Brust, der Haut und der Mukosa verschiedener Hohlgänge (z. B. Gastrointestinaltrakt, Respirationstrakt) sowie von entzündlichen Veränderungen, z. B. am Gelenk, geeignet ist. Der Schwerpunkt der Forschung liegt bislang besonders in der Onkologie und hier speziell in der Verbesserung der Methoden für eine frühe Tumordetektion. Die Diagnose von kleinen prämaligen Läsionen und Tumorfrühstadien ist entscheidend für den Erfolg der Therapie und für die Erhöhung der Überlebensrate. Dies gilt besonders für Brust- und Darmkrebs sowie für Melanome der Haut (Becker und Wahrendorf, 1998).

3.5.2.1 Grundlagen der Fluoreszenz-Diagnostik

Bei der laserinduzierten Fluoreszenz wird die Anregung von Atomen bzw. Molekülen durch Absorption von Photonen einer Lichtquelle ausgenutzt. Der angeregte Zustand zerfällt wieder unter Abstrahlung eines Photons (Fluoreszenz), welche mit einer speziellen Kamera erfasst und dargestellt werden kann.

Atome oder Moleküle können durch die Absorption elektromagnetischer Strahlung (z. B. Licht) aus ihrem energetischen Grundzustand in einen energetisch höheren Elektronenzustand (Singulett-Zustand) angeregt werden. Innerhalb weniger Nanosekunden kann dieser angeregte Zustand unter Abgabe von Wärme oder unter Abgabe von Energie in Form von Licht (Fluoreszenz) bzw. über einen langlebigen Triplett-Zustand deaktiviert werden.

Deaktivierung unter Abgabe von Wärme

Die Umwandlung der Anregungsenergie in Wärme ist ein Verlustprozess, der dazu führt, dass sich die Anzahl der Fluoreszenzphotonen verringert (Bäumler, 2003).

Deaktivierung in Form von Fluoreszenz

Der Übergang vom angeregten Niveau in den Grundzustand unter Abgabe der absorbierten Energie in Form von Fluoreszenz-Licht wird für die Fluoreszenz-Darstellung genutzt. Das Spektrum verschiebt sich dabei aufgrund des molekulinternen Energieverlustes zu längeren Wellenlängen hin (Stokes-Verschiebung). Als Quantenausbeute wird dabei das Verhältnis der Anzahl der absorbierten Photonen zur Anzahl der emittierten Photonen in Prozent bezeichnet und ist vom chemischen Aufbau des verwendeten Farbstoffes und zusätzlich von Umgebungseinflüssen wie Lösungsmittel, Temperatur und pH-Wert abhängig. Die Intensität des entstehenden Fluoreszenz-Lichtes hängt von der absorbierten Intensität des Anregungslichtes ab (Bäumler, 2003).

Deaktivierung über Triplett-Zustand

Der nichtstrahlende Übergang im Molekül vom Singulett-Zustand zu dem langlebigen Triplett-Zustand wird in der Photodynamischen Therapie ausgenutzt. Dabei kann die Energie entweder auf das Substrat (Typ-I-Reaktion) oder auf molekularen Sauerstoff (Typ-II-Reaktion) übertragen werden. Durch die Typ-I-Reaktion werden Radikale oder Anionen des Sauerstoffs induziert. Die Typ-II-Reaktion führt zu einer energetischen Anregung von Sauerstoff und zur Entstehung von hoch reaktivem Singulett-Sauerstoff.

Anregung der Fluoreszenz

Für die Durchführung der Fluoreszenz-Diagnostik ist die Anregung des Farbstoffes mittels einer inkohärenten (z. B. Glühlampe) oder einer kohärenten Lichtquelle (z. B. Laser) notwendig. Der Begriff Laser stellt eine Abkürzung der Bezeichnung "light amplification by stimulated emission of radiation" dar. Bei der Erzeugung von Laserlicht steht im Gegensatz zu inkohärenten Lichtquellen die stimulierte Emission im Vordergrund. Dazu wird ein aktives Medium (z. B. ein Festkörper oder ein Gas) durch eine Blitzlampe in einen angeregten Zustand gebracht (Inversion). Durch die Positionierung des aktiven Mediums zwischen zwei Spiegel kommt es zu einer Verstärkung des Laserstrahls. Der dabei entstehende Laserstrahl ist monochromatisch (einfarbig), kohärent (phasenkonstant) und nahezu parallel. Kontinuierliches Laserlicht wird durch eine kontinuierliche Anregung des aktiven Mediums (z. B. durch elektrischen Strom) erzeugt. Neben kontinuierlichem Laserlicht kann auch gepulstes Laserlicht erzeugt werden (Bäumler, 2003).

Vorteile von Laserlicht

Laserlicht hat zahlreiche Vorteile, beispielsweise die relativ einfache Fokussierbarkeit bis in den Mikrometer- und Submikrometerbereich und somit die einfache Übertragung mittels Glasfasern sowie die präzise Abstimmbarkeit auf das Absorptionsmaximum eines Fluoreszenz-Farbstoffes, welche eine höchstmögliche Sensitivität ermöglicht. Der Einsatz von Laserimpulsen im Nanosekundenbereich und eine zeitverzögerte Fluoreszenzmessung ermöglichen eine Unterdrückung der oft störenden Autofluoreszenz (Ankerst et al., 1984). Während die Autofluoreszenz des Gewebes eine Fluoreszenzabklingzeit von drei bis vier Nanosekunden (ns) besitzt, beträgt diese z. B. bei den Porphyrinfarbstoffen 15 bis 20 ns (Schneckenburger, 2003). So ist bei der verzögerten Erfassung der Fluoreszenz der Porphyrinfarbstoffe die Gewebeautofluoreszenz bereits zu einem großen Anteil abgeklungen und beeinträchtigt nur in einem geringen Maß die Messergebnisse. Neue NIR-Farbstoffe hingegen haben eine Abklingzeit von nur 300 bis 500 Pikosekunden (ps). Um den Anteil der Gewebeautofluoreszenz gering zu halten, erfolgt die Messung prompt (unmittelbar nach der Laseranregung) mit einer kurzen Gatezeit (Öffnungszeit) von ca. 5 Mikrosekunden (μ s).

Streuung und Absorption im Gewebe

Wegen der Streuung (z. B. durch Zellen, Zellorganellen, Kollagen) und der Absorption des Lichtes (z. B. durch Melanin, Hämoglobin, Proteine) durch verschiedene Komponenten im Gewebe ist die Eindringtiefe von Licht im Nahinfrarot-Bereich auf wenige Zentimeter begrenzt.

3.5.2.2 Anwendungen der klinischen Fluoreszenz-Diagnostik und der Photodynamischen Therapie

Die Entwicklung der Fluoreszenz-Diagnostik ist eng an die Entwicklung der Photodynamischen Therapie gekoppelt.

Erste Beobachtung der Photodynamischen Reaktion

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts war bekannt, dass bestimmte Farbstoffe in der Lage sind, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und längerwelliges Licht (Fluoreszenz) zu emittieren. Erste Versuche, den wirkungsverstärkenden Effekt dieser Farbstoffe therapeutisch zu nutzen, wurden bereits 1895 durchgeführt. Bei der Suche nach einem neuen Antimalariamittel wurde ein tageslichtabhängiger toxischer Effekt von Farbstoffen, wie

Eosin, Chinin oder Acridin, auf Protozoen beobachtet (Tappeiner, 1895; Raab, 1900). Nachdem durch weiterführende Versuche der direkte Einfluss des Lichtes, d. h. ohne Beteiligung weiterer Moleküle, ausgeschlossen werden konnte, wurde der Begriff "Photodynamische Reaktion" für diesen Effekt geprägt (Tappeiner und Jodlbauer, 1904). Zunächst wurde vermutet, dass der toxische Effekt ein fluoreszenzbasierter Effekt sei. Es konnten jedoch zahlreiche Farbstoffe identifiziert werden, welche zwar eine ausgeprägte Fluoreszenz aufweisen, aber keinerlei suffiziente photodynamische Aktivität zeigen. Somit ist die Fluoreszenz an und für sich nicht Teil der photodynamischen Reaktion (Mettler, 1905). Die meisten Experimente mit Farbstoffen wie Chinidin, Acridin und Eosin wurden mit insgesamt klinisch unbefriedigenden Ergebnissen durchgeführt (Tappeiner, 1909).

Hämatoporphyrin

Neben fluoreszierenden Pflanzenfarbstoffen wurde von Hausmann auch Hämatoporphyrin (Hp), ein eisenfreies Hämderivat, für Versuche mit Paramecien (Pantoffeltierchen), Erythrozyten und Mäusen eingesetzt. Eine geringfügige Belichtung der in wässriger Hämatoporphyrinlösung befindlichen Paramecien und Erythrozyten führte zum Absterben der Pantoffeltierchen bzw. zu einer Hämolyse. Bei den Mäusen, die nach einer subkutanen Hämatoporphyrininjektion dem Sonnenlicht ausgesetzt wurden, kam es zu einem ausgeprägten Erythem und Ödem bis hin zur Hautnekrose (Hausmann, 1908; Hausmann, 1911).

Der französische Arzt Policard entdeckte 1924 bei einem frisch exzidierten Sarkom einer Ratte eine rötliche Fluoreszenz in dessen nekrotischem Zentrum, welche auf der Akkumulation und Retention von Hämatoporphyrin in diesem Tumor basierte. Von Auler und Banzer (1942) wurde nach Injektion von Hämatoporphyrin eine rote Fluoreszenz in Tumorealen, Metastasen und in Lymphgefäßen von Krebspatienten detektiert. Bei Hämatoporphyrin handelt es sich um ein Gemisch aus verschiedenen Porphyrinen mit verschiedenen Eigenschaften. Durch Acetylierung und Reduktion gewannen Schwartz et al. (1955) das so genannte Hämatoporphyrinderivat (HpD), welches einen höheren Anteil an hydrophoben oligomeren Porphyrinen enthält, der eigentlichen photodynamischen wirksamen Fraktion. Dadurch konnten eine erhöhte Akkumulation im Tumorgewebe sowie bessere und reproduzierbare Ergebnisse erreicht werden. Von Dougherty et al. (1978) wurde die Substanz Dihämatoporphyrinether entwickelt und zu Forschungszwecken eingesetzt. Ab Mitte der 80er Jahre wurden weltweit experimentelle und klinische Studien mit Photosensibilisatoren durchgeführt. Ein großer Teil der Photosensibilisatoren fluoreszieren

und sind aufgrund ihrer tumorselektiven Anreicherung auch für die Fluoreszenz-Diagnostik geeignet (Schneckenburger, 2003).

5-Aminolävulinsäure (5-ALA)

Neuere Untersuchungen konzentrieren sich auf natürliche Vorläufer der Porphyrine z. B. 5-Aminolävulinsäure (5-ALA). Diese Substanz führt zur Anreicherung von Protoporphyrin IX, das sowohl ein Sensibilisator für die photodynamische Therapie als auch ein Fluoreszenz-Diagnostikum in vielen Bereichen der Medizin ist. So wurde zum Beispiel 5-ALA erfolgreich eingesetzt, um die metabolische Produktion von Protoporphyrin IX besonders im Bereich von neoplastisch verändertem Gewebe zu stimulieren (Kennedy und Pottier, 1992) und die dadurch entstehende Fluoreszenz mittels Fluoreszenz-Spektroskopie oder Fluoreszenz-Bildgebung zu erfassen und somit den Nachweis für derartige Veränderungen zu ermöglichen. Klinische Anwendung findet 5-ALA bei der Detektion von Haut- (Roberts und Cairnduff, 1995), Blasen- (Kriegmair et al., 1996) oder Lungentumoren (Baumgartner et al., 1996) und Barrett-Oesophagus (Ortner et al., 2003).

Protease-aktivierte Farbstoffe

Von Weissleder et al. (1999) wurde ein auf Protease-aktivierte Nahinfrarot-Fluoreszenz basierendes Verfahren zum Tumornachweis entwickelt. Bei dieser Methode wird der Farbstoff Poly-L-Lysin durch eine tumorassoziierte lysosomale Protease in der Tumorzelle aktiviert und somit darstellbar.

Spezifisch bindende Farbstoffe

Viele Tumorzellen bilden im Vergleich zu unveränderten Zellen eines Gewebes oft eine größere Anzahl von bestimmten Rezeptoren aus. Diese Eigenschaft kann durch die chemische Kopplung von Therapeutika oder Farbstoffen an die Liganden dieser Rezeptoren (z. B. Transferrin) oder entsprechende Analoga (z. B. Somatostatin-Analoga) für die Diagnostik und Therapie genutzt werden. Dadurch kommt es zu einer sehr spezifischen Anreicherung in Tumoren und somit zu einer effektiven Tumorthherapie bzw. einer guten Darstellung besonders kleiner und in der Tiefe liegender Läsionen (Licha et al., 1999; Achilefu et al., 2000; Becker et al., 2000; Becker et al., 2001). Der Vorteil von spezifisch bindenden Farbstoffen ist die hohe Selektivität und Affinität und damit verbunden eine geringe Dosis der Farbstoffe, die wiederum einen hohen Kontrast zur Folge hat, da sich das Kontrastmittel fast ausschließlich im Targetbereich befindet.

Unspezifische Cyanin-Farbstoffe

Es ist möglich, unspezifische Cyanin-Farbstoffe für den Nachweis von Tumoren zu verwenden (Licha et al., 2000; Ebert et al., 2001). Mit der Ausgangssubstanz Indocyaningrün ist zwar aufgrund der höheren Perfusion in Tumoren eine kurzzeitige Erhöhung des Kontrastes zwischen unverändertem Gewebe und Tumoren möglich, jedoch erfolgt eine schnelle Elimination des Farbstoffes aus dem Blutkreislauf. Aus diesem Grund wurden neue Substanzen auf der Basis eines Indocyanin-Grundgerüsts mit verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften entwickelt. Für diese Zwecke wurden glucamin- und glucosamin-substituierte Cyanin-Farbstoffe synthetisiert, die dem Indocyaningrün strukturell sehr ähnlich sind. Diese Verbindungen weisen eine erhöhte Hydrophilie, eine geringere Plasmaproteinbindung (unter 50 %) und ein verringertes Molekulargewicht auf. Diese Farbstoffe extravasieren schneller in den Extrazellularraum. Dies führt zu einer verlangsamten Elimination durch die Leber. Zudem wird mit diesen Substanzen ein erhöhter Tumor-zu-Gewebe Kontrast nach der intravenösen Injektion erreicht. Die Quantenausbeute wurde auf bis zu 15 % erhöht. Die Quantenausbeute für Indocyaningrün in Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung ist mit 1,2 % gering (Soper und Mattingly, 1994). Eine höhere Ausbeute ist hingegen in Plasma (3-5 %) zu verzeichnen (Sutterer et al., 1966). Im Vergleich zu Indocyaningrün konnte auch die Gewebe-Halbwertszeit erheblich gesteigert werden. Diese beträgt z. B. für NIR-1 73 Minuten im Vergleich zu 10 Minuten bei ICG im Tumorgewebe nach intravenöser Injektion bei tumortragenden Ratten (Licha et al., 2000).

Die modifizierten Cyanin-Farbstoffe sind in ihrem Extravasations- und Anreicherungsverhalten mit niedermolekularen unspezifischen MRT-Kontrastmitteln, z. B. mit Gd-DTPA, vergleichbar (Ercolani et al., 1998). Über die Ursachen der Anreicherung der modifizierten unspezifischen Cyanin-Farbstoffe konnte bislang nur spekuliert werden. Ein wichtiger Faktor ist sicherlich die erhöhte Permeabilität der Gefäße und somit die vermehrte Extravasation bzw. die verstärkte Vaskularisation im Bereich des Tumors und der Entzündung. Diskutiert werden aber auch eine passive Bindung im Bereich der Umgebung des Tumors sowie ein bestimmter Aufnahmemechanismus in die Tumorzelle und Retention des Farbstoffes in der Tumorzelle (Riefke et al., 1996; Licha et al., 1999).

Eigenfluoreszenz von Zellen und Geweben

Neben der Fluoreszenz von exogenen Farbstoffen kann auch eine Eigenfluoreszenz von Molekülen in Zellen und Geweben erfasst werden. So fluoreszieren beispielsweise

Nukleinsäuren und Aminosäuren (z. B. Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin). Im extrazellulären Bereich ist oft eine ausgeprägte Fluoreszenz durch Kollagen oder elastische Fasern erkennbar. Diese extrazelluläre Fluoreszenz kann zur Gewebedifferenzierung (z. B. Epithelgewebe und Bindegewebe) genutzt werden.

Weiterhin können die Coenzyme der Oxidoreduktasen Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid (NAD) und Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid-phosphat (NADP) bzw. deren reduzierte Molekülspezies NADH und NADPH aufgrund unterschiedlicher Emissionsmaxima zum Nachweis von Hypoxien und zur Differenzierung von Tumorgewebe genutzt werden (Horvath et al., 1992).

3.6 Eingesetzte Farbstoffe

3.6.1 Indocyaningrün

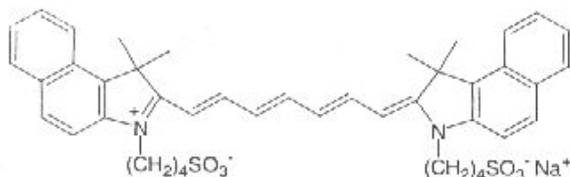


Abb. 1: Chemische Struktur von Indocyaningrün (ICG)

Indocyaningrün (ICG) ist ein hydrophiler, anionischer, dunkelgrüner Tricarbocyaninfarbstoff, der von den Kodak Research Laboratories (New York, USA) entwickelt und erstmals 1956 vorgestellt wurde. Dieser unspezifische Nahinfrarot-Farbstoff wird bis heute zumeist 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 und wurde bereits erfolgreich als Farbstoff für den Nachweis von Tumoren an Tiermodellen (Li et al., 1995), in der Humanmedizin (Zhao et al., 1995; Haglund et al., 1996; Ntziachristos et al., 2000) und in der Veterinärmedizin bei Mammakarzinomen des Hundes (Reynolds et al., 1999) getestet.

Der Farbstoff ist in hohen Dosen toxisch (LD_{50} bei der Maus 60 - 80 $\mu\text{mol/kg}$) (Warner, 1971). ICG bindet nach intravenöser Gabe innerhalb von ein bis zwei Sekunden zu 98 % an Serumproteine (Cherrick et al., 1960). Durch diese sekundenschnelle, vollständige Bindung ist eine Aufnahme in das periphere Gewebe, Niere oder Lunge nahezu ausgeschlossen und

kann vernachlässigt werden. Bei gesunden Menschen lässt sich ICG weder im Urin noch im Liquor nachweisen. Der Farbstoff wird aus dem Blut ohne chemische Veränderung über die Leber und über die Gallenflüssigkeit ausgeschieden. In klinischen Versuchen konnten nach intravenöser Injektion innerhalb von 18 Stunden 80 % des injizierten Farbstoffes über die Gallenflüssigkeit zurückgewonnen werden. Ein entero-hepatischer Kreislauf findet nicht statt. Die Plasmakonzentration fällt biphasisch ab. Nach einer Initialphase mit einer Halbwertszeit von drei bis vier Minuten konnte eine zweite Phase mit einer dosisabhängigen Halbwertszeit von 67 bis 89 Minuten bei Dosierungen von 0,5 bis 2 mg/kg nachgewiesen werden (Meijer et al., 1988). Die Gewebe-Halbwertszeit von ICG beträgt in unverändertem und tumorösem Gewebe weniger als 10 Minuten (Licha et al., 2000). Die Quantenausbeute von ICG in physiologischer Kochsalzlösung und in Plasma wird in der Literatur mit 1,2 % bzw. mit 3 – 5 % angegeben (Soper und Mattingly, 1994; Sutterer et al., 1996). Die für die Injektion benötigte wässrige Lösung weist nur eine geringe Stabilität auf (Landsman et al., 1976). Das Absorptionsmaximum von ICG im Plasma liegt bei 800 nm und das Emissionsmaximum bei 830 nm. Somit befinden sich sowohl das Absorptions- als auch das Emissionsmaximum in einem biologischen bzw. therapeutischen Fenster, in welchem die Gewebsabsorption nur sehr gering ist (Licha et al., 1996; Reynolds et al., 1999).

Aufgrund der starken Plasmaproteinbindung von ICG und der schnellen Entfernung durch die Leber aus dem Blutkreislauf sind die Möglichkeiten zum Nachweis von verändertem Gewebe eingeschränkt. Jedoch ist eine Darstellung von oberflächennahen Tumoren oder entzündlichen Veränderungen in den ersten Minuten nach der Injektion aufgrund der erhöhten Perfusion möglich. Bereiche von frühen tumorösen Entartungen und Entzündungen weisen im Vergleich zu unverändertem Gewebe eine höhere Anzahl von Blutgefäßen auf. Aus diesem Grund sind auch vermehrt ICG-Moleküle in den betroffenen Gebieten vorhanden, die eine erhöhte Fluoreszenz bewirken. Es kann allerdings lediglich ein geringer Kontrast von Tumoren und kein weiterer Anstieg der Tumorfluoreszenz über einen längeren Zeitintervall erreicht werden (Li et al., 1995).

Der maximale Kontrast zwischen Tumorgewebe und unverändertem Gewebe von 1,61 (Quotient aus der Fluoreszenzintensität im Bereich des Tumors in der rechten Flanke des Tieres und der Fluoreszenzintensität der unveränderten linken Flanke) wird nach intravenöser Gabe von ICG nach 2,5 Minuten erreicht und ist nach 10 Minuten nicht mehr nachweisbar. Jedoch wurde von Licha et al. (2000) ein leicht erhöhter Kontrast von 1,35 (Ausgangswert: 1,3) über den gesamten weiteren Messzeitraum von 200 Minuten beobachtet.

Unterschied basiert auf dem bekannten Phänomen, dass der Abtransport von hydrophilen, niedermolekularen Kontrastmitteln in Tumorgewebe aufgrund der erhöhten Perfusion schneller als in unverändertem Gewebe stattfindet (Ercolani et al., 1998). Im Plasma der Ratten beträgt die Halbwertszeit 33 Minuten (Licha et al., 1996). Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffes liegt im Plasma bei 755 nm. Das Fluoreszenzmaximum in Plasma beträgt 790 nm.

Riefke et al. (1996) konnten bei Ratten mit Mammakarzinomen den höchsten Kontrast zwischen Tumor und umliegendem Gewebe (4:1) 24 Stunden nach der Injektion des Farbstoffes (Dosis 2 $\mu\text{mol/kg}$) aufzeigen.

Weiterführende Untersuchungen an Ratten mit im Bereich der Flanke implantierten Gliomen ergaben mit einer Dosis von 0,5 $\mu\text{mol/kg}$ einen maximalen Kontrast von 1,78 nach einer Zeit von sieben Minuten (Licha et al., 2000). Boehm et al. (2001) konnten diese Ergebnisse bei Mäusen mit implantierten Mammakarzinomen in der Flanke bestätigen. Nach der Injektion von NIR-1 in einer Dosis von 2 $\mu\text{mol/kg}$ konnte ebenfalls in den ersten Minuten ein Anstieg der Fluoreszenz festgestellt werden, welche im Bereich des Tumors signifikant höher als im umliegenden Gewebe war.