

4. Material und Methoden

Die Versuche wurden im Rahmen eines vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin, genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt (Genehmigungsnummer: 0113/01).

4.1 Untersuchte Tiere

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 17 weibliche und 29 männliche Mäuse mit einem Alter zwischen 79 und 139 Tagen und einem Gewicht von 24 - 40 g des Stammes AKR aus dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin verwendet. Die Mäuse wurden im Deutschen Rheumaforschungszentrum und im Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum in Gruppen zu zwei bis sechs Tieren in Makrolonkäfigen Größe 2 in IVC-Regalen gehalten, welche mit einem staubarmen Holzgranulat (altromin GmbH, Lage, Deutschland) versehen waren. Aufgrund des Überdruckbetriebes wurden spezielle Hauben und Deckel mit Silikondichtungen und innenliegenden Tränkflaschen verwendet. Die Fütterung erfolgte durch die ständige Bereitstellung von Standard-Mäusehaltungsfutter (altromin GmbH, Lage, Deutschland). Ebenso stand den Tieren jederzeit frisches Wasser in Tränkflaschen zur Verfügung. Die Temperatur in den klimatisierten Räumen betrug 20 - 22°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 - 60 % und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden.

Für orientierende Vorversuche wurden zunächst zehn Tiere verwendet. In weiterführenden Versuchen erhielten je eine Kontrollgruppe und eine Gruppe von Tieren mit einer Gelenkentzündung den Farbstoff NIR-1 in einer Dosis von 1 µmol/kg und 2 µmol/kg.

Tab. 1 Versuchstiergruppen

Gruppe	1	2	3	4
Anzahl der Tiere	8	10	8	10
Borrelien-Infektion	nein	ja	nein	ja
Farbstoff	NIR-1	NIR-1	NIR-1	NIR-1
Dosis	1 µmol/kg	1 µmol/kg	2 µmol/kg	2 µmol/kg

Ein Tier aus der Gruppe 1 verstarb während der Narkose vor der Messung, so dass für diese Gruppe lediglich sieben auswertbare Messpaare vorliegen.

4.2 Borrelien-Infektion

Die Tiere für die Untersuchungen wurden von dem Humanmediziner Herrn Bert Maier aus dem Deutschen Rheumaforschungszentrum mit Borrelien infiziert und bis zur Durchführung der Untersuchungen dort untergebracht. Für die Infektion mit *Borrelia burgdorferi* (Stamm A218) wurden Mäuse des Inzuchtstammes AKR verwendet. Infiziert wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere in verschiedenen Altersgruppen. Den Tieren wurden ca. 10 Millionen Bakterien subkutan im Bereich der Schwanzbasis injiziert. Die Inokulation mit *Borrelia burgdorferi* erfolgte 34 Tage (erster Messtag) bzw. 45 Tage (zweiter Messtag) vor der Durchführung der NIR-Bildgebung.

4.3 Nahinfrarot(NIR)-Untersuchung

4.3.1 Experimentelle Grundlagen und Aufbauten

Bei der NIR-Bildgebung handelt es sich um die Anregung und den Nachweis farbstoffgestützter Fluoreszenz im Nahinfrarotbereich (650 - 900 nm Wellenlänge).

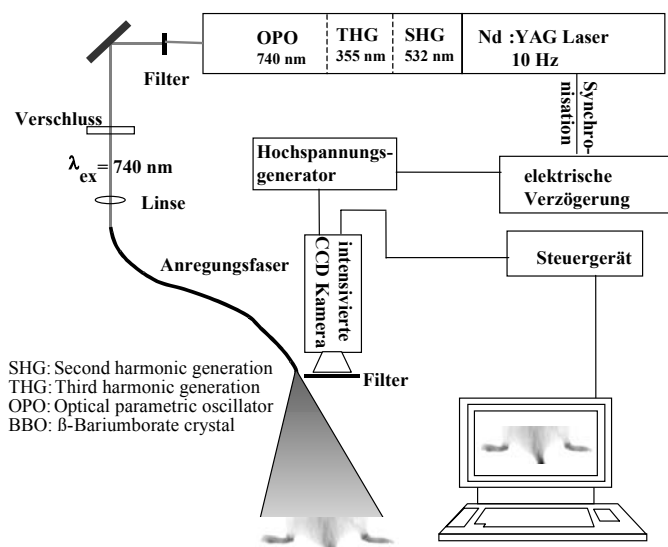


Abb. 3: Schematischer Aufbau des Untersuchungsplatzes in der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt

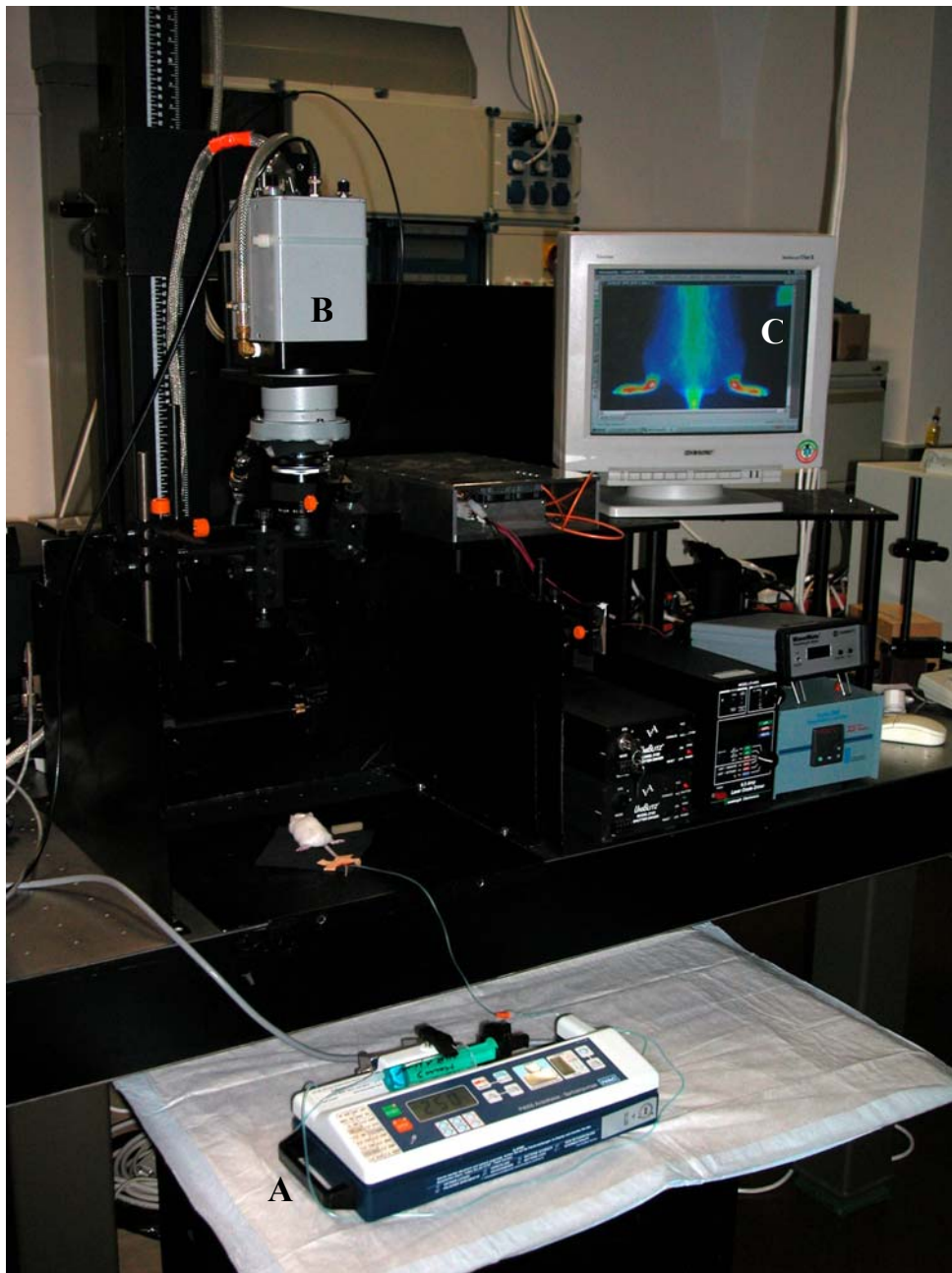


Abb. 4: Untersuchungsplatz in der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt mit Spritzenpumpe zur Farbstoffapplikation (A), Laser (nicht zu sehen), optische Faser, intensivierter CCD-Kamera (B) und integriertem Computersystem (C)

Zur Anregung der laserinduzierten Fluoreszenz der Farbstoffe wurde ein abstimmbares Festkörperlaser-System (Quanta-Ray GCR-11, Spectra-Physics Inc., Mountain View, USA) und ein optisch-parametrischer Oszillator (Modell 355-A, GWU-Lasertechnik, Erftstadt, Deutschland) eingesetzt. Die Pulsrate betrug zehn Hz (entspricht einem Laserblitz alle 0,1 s) und die Dauer eines Pulses drei ns. Die Anregungswellenlänge wurde mit 740 nm den Farbstoffen angepasst, wobei wegen der geringen Stokes-Verschiebung die Anregungswellenlänge kleiner als das Optimum gewählt wurde. Zur Unterdrückung des Anregungslichtes wurde ein Langpass 780 nm (2 mm) und ein Corionfilter ($\lambda_{50\%} = 800 \text{ nm}$) eingesetzt.

Zum Nachweis der Fluoreszenz wurde eine intensivierete CCD (charge coupled device = Ladungsgekoppelte Baugruppe) Kamera (Princeton Instruments, Trenton, USA) eingesetzt. Die Öffnung der Kamera erfolgte synchronisiert zum Laserpuls. Bei einer eingestellten Belichtungszeit von 0,2 s und der Wiederholrate der Laserpulse von 10 Hz wird die Kamera nur für 20 ns geöffnet, was zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung des abgedunkelten Raumlichtes führt (mehr als sechs Größenordnungen), so dass unter ausreichenden Lichtverhältnissen (punktuelle Beleuchtung des Präparationsplatzes) gemessen werden konnte. Zudem werden aufgrund der kurzen eingestellten Belichtungszeit Bewegungsartefakte so gut wie ausgeschlossen. Vor der Aufnahme der Verteilungskinetik des Kontrastmittels wurde das Tier positioniert und ein Autofluoreszenzbild erfasst. Zur Korrektur der möglichen Schwankung der Laserleistung wurden alle Werte auf eine externe Referenz normiert. Bei den Vorversuchen handelt es sich bei dieser Referenz um eine wässrige ICG-Lösung (0,05 mg/ml) in einer Glasküvette. Für die weiterführenden Messungen wurde dann eine Referenz verwendet, bei der mit dem Farbstoff NIR-1 beladene Glaskügelchen in Kunststoff eingebettet sind. Die ermittelten Messwerte entsprechen den gezählten Counts pro Sekunde pro Pixel, welche wiederum der Anzahl der Fluoreszenzphotonen proportional sind.

4.3.2 NIR-Farbstoffe

Für die Versuche wurden zwei unspezifische Nahinfrarotfarbstoffe verwendet:

- **Indocyaningrün** (ICG-Pulsion, Pulsion Medical Systems GmbH, München, Deutschland)
98 % Serumproteinbindung; hepatobiliäre Ausscheidung; Halbwertszeiten: 3 - 4 Minuten im Plasma, 10 Minuten im Gewebe; Absorptionsmaximum 800 nm; Emissionsmaximum 830 nm; Quantenausbeute 3 – 5

- **NIR-1** (Schering AG, Berlin, Deutschland)
10 % Serumproteinbindung; renale Ausscheidung; Halbwertszeiten: 33 Minuten im Plasma, 115 Minuten im Gewebe; Absorptionsmaximum 755 nm; Emissionsmaximum 790 nm; Quantenausbeute 7,6

4.3.3 Durchführung der Vorversuche

In orientierenden Versuchen wurden die Farbstoffe Indocyaningrün und NIR-1 hinsichtlich ihrer bildgebenden Eigenschaften bei der Detektion von entzündlichen Gelenkerkrankungen untersucht und die dafür geeignete Dosierung ermittelt. Dazu wurden Farbstofflösungen unterschiedlicher Konzentrationen konventionell i.v. appliziert. Dabei stellte sich heraus, dass für die Vergleichbarkeit kinetischer Daten und für eine reproduzierbare Auswertung der Anreicherung eine konstante Injektionsgeschwindigkeit und relativ geringe Flüssigkeitsmengen (ca. 50 bis 60 µl im Bolus) notwendig sind.

Weiterhin wurden in Vorversuchen die geeigneten Messbedingungen, wie z. B. Belichtungszeiten, Akkumulationsanzahl, Messzeitraum, Filter, Blende usw. ermittelt. Die Beurteilung der Ergebnisse der Vorversuche erfolgte anhand der Fluoreszenz im Verlauf von 40 Frames (ca. zwei Minuten), wobei sich ein Frame aus vier akkumulierten Einzelbildern mit einer Belichtungszeit von je 0,2 Sekunden (s) zusammensetzt.

4.3.4 Durchführung der Untersuchung

Für die Dauer der Kontrastmittelinjektion (einige Sekunden) und der Messung der Fluoreszenz über eine Dauer von ca. fünf Minuten wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion (Vasocan, Kanüle 27 G, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) eines Gemisches aus 70 mg/kg Ketamin (Ketavet, Pharmacia&Upjohn, Erlangen, Deutschland) und 7 mg/kg Xylazin (Rompun 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) in Narkose versetzt. Für die Farbstoffinjektion wurde mittels Butterflykanüle (Infusionsset, 25 G, ABBOTT, Sligo, Irland) ein Zugang im Bereich einer seitlichen Schwanzvene (Vena coccygealis lateralis) gelegt. Der in einer 20 ml Spritze (Injekt 20 ml Einmalspritze, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) befindliche gelöste Farbstoff wurde über eine Perfusorleitung (Original Perfusor-Leitung PE 150 cm, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in die Butterfly-Kanüle geleitet. Um eine konstante Injektionsgeschwindigkeit zu gewährleisten, die für die Vergleichbarkeit des

Anreicherungsverhaltens unbedingt notwendig ist, wurde der Farbstoff mittels Spritzenpumpe (P 4000, Anästhesie Spritzenpumpe, IVAC/Alaris Medical Systems Inc., San Diego, USA) verabreicht. Für die Aufnahme der Fluoreszenzabbildungen wurden die narkotisierten Tiere in Bauchlage positioniert und die hinteren Extremitäten nach kaudal extendiert.

Die Injektion der Farbstofflösung erfolgte zeitgleich mit der Aufnahme des dritten Frames mit einer Geschwindigkeit von 250 ml/h. Zunächst wurde die Fluoreszenz im Verlauf von 60 Frames (ca. drei Minuten) aus je vier akkumulierten Einzelbildern mit einer Belichtungszeit von je 0,2 Sekunden (s) erfasst. Zusätzlich wurde eine Aufnahme fünf Minuten nach der Farbstoffinjektion aus 16 akkumulierten Einzelbildern mit einer Belichtungszeit von je 0,2 s durchgeführt. Im Anschluss an die Untersuchung wurde den noch narkotisierten Tieren mittels Zellstoff und Klebeband (Leucoplast 1,25 cm x 9,2 m, Beiersdorf S. A., Argentona, Spanien) ein Schutz angelegt, der eine exogene Kontamination durch den nach kurzer Zeit im Harn ausgeschiedenen Farbstoff (NIR-1) verhindern sollte. Trotz dieser Vorsichtsmaßnahmen konnte eine Kontamination und somit eine Beeinträchtigung bzw. Beeinflussung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten nicht verhindert werden. Nach Ablauf von ca. 24 Stunden nach der Farbstoffinjektion wurden die Tiere erneut in Narkose versetzt, um die noch vorhandene Fluoreszenzaktivität zu ermitteln (16 Akkumulationen mit je 0,2 s Belichtungszeit).

4.4 Sektion und histologische Präparation

Nach Beendigung der NIR-Untersuchung wurden die Tiere in tiefer Narkose durch eine Überdosis des Ketamin-Xylazin-Gemisches getötet. Die Hintergliedmaßen wurden abgetrennt, enthäutet und zur weiteren histologischen Aufarbeitung zunächst in Formaldehydlösung (4 %) über eine Dauer von zwei Tagen fixiert. Anschließend erfolgte die Entkalkung der knöchernen Strukturen mittels EDTA-Entkalkungslösung (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland). Dies ist für die spätere Anfertigung von Schnittpräparaten notwendig. Zu diesem Zweck wurden die abgetrennten Gliedmaßen in beschrifteten Einbettkästen (Histosette I with lid, Simport Plastics Ltd., Quebec, Canada) eingebracht und mit Entkalkungslösung im Brutschrank bei 60°C aufbewahrt. Die vollständige Entkalkung der knöchernen Strukturen dauert ca. zwei Wochen und kann durch Einstechen einer Nadel und durch eventuelle Knirschgeräusche oder durch Anschneiden überprüft werden. Es erfolgte ein einmaliger, gesamter Austausch der EDTA-Entkalkungslösung nach einer Woche. Die darauffolgende Entwässerung der Präparate erfolgte in einer Histokinette (Processor 2 LE, SHANDON Southern Products Ltd., Astmoore, England) durch eine Alkoholreihe in

aufsteigender Konzentration. Abschließend wurden die entnommenen Hintergliedmaßen in flüssiges Paraffin eingebettet und auf einer Kühlplatte zur Abkühlung und Aushärtung gebracht. Die Schnitte wurden mittels Rotationsmikrotom (RM 2125 RT, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) in einer Dicke von ca. fünf Mikrometer angefertigt und über ein Wasserbad (HI 1210, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) auf einen Objektträger (SuperFrostPlus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht und im Brutschrank bei 60°C über Nacht getrocknet. Im Anschluß daran erfolgte der Vorgang des Entparaffinierens und der Färbevorgang. Als Färbung wurde Hämatoxylin-Eosin (HE) gewählt.

In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Veit Krenn aus dem Institut für Pathologie an der Charité, Campus Mitte, wurde ein Schema zur Auswertung der histologischen Schnitte ausgearbeitet. Die Auswertung erfolgte unter seiner Anleitung und Gegenkontrolle. Zur standardisierten Graduierung wurden folgende Kriterien herangezogen: a) Synovitis, b) Periarthritis, c) Tenosynovitis, d) Periostitis und e) Knorpel-/Knochendestruktionen. Jedes Kriterium wurde semiquantitativ in vier Stufen von 0 (Abwesenheit des Kriteriums) über 1 (gering), 2 (mäßig) bis 3 (stark) graduiert. Anschließend wurde jede Gliedmaße anhand der histologischen Veränderungen einer von vier Gruppen zugeordnet (Histologie-Score null bis drei – keine Arthritis, vier bis sieben – geringgradige Arthritis, acht bis elf – mittelgradige Arthritis und 12 bis 15 – hochgradige Arthritis).

4.5 Auswertung der NIR-Messung

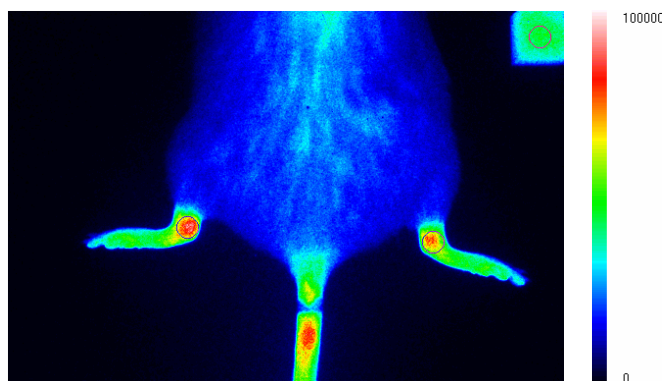


Abb. 5: Darstellung der ermittelten Fluoreszenz ca. 45 s nach Farbstoffapplikation (Tier 6, Gruppe 4) bei Blende 2 mit „regions of interest“ im Bereich der Sprunggelenke und im Bereich der Referenz

Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mit Hilfe einer Windows-basierten Visual-Basic-Auswertesoftware (D. Petzelt, PTB, Berlin, Deutschland). Diese Software gestattet das Einlesen von Grafiken mit speziellen Headerstrukturen und die Definition von 20 "regions of interest" (ROIs) sowie eine Excel-basierte Auswertung. Es wurden drei dieser ROIs im Bereich des linken und rechten Sprunggelenkes sowie in der Abbildung der Referenz platziert (Abb. 5). Jeder für die Auswertung relevante Bereich beinhaltete die gleiche Pixelanzahl. Für die weiteren Berechnungen wurde zuerst der arithmetische Mittelwert (average) der Fluoreszenzintensität aller Pixel im auszuwertenden Bereich gewählt.

Aufgrund der möglichen Schwankungen der Laserleistung wurden zunächst für jeden Messzeitpunkt normierte Fluoreszenzintensitäten (I_n) errechnet, bei dem die ermittelten Mittelwerte der Fluoreszenzintensität im Bereich der Sprunggelenke (I_{aj}) durch den Wert der Referenz (I_r) dividiert wurden ($I_n = I_{aj}/I_r$). Mit dieser errechneten normierten Fluoreszenzintensität erfolgte die weitere Auswertung der Daten.

4.6. Statistische Auswertung

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit Hilfe der Kalkulationsprogramme "Excel" 98 und "Microcal Origin" 6,0 sowie der Statistikprogramme "SPSS" Version 10.0 und "SAS" 8,0. Zur graphischen Darstellung des Anreicherungsverlaufes der Farbstoffe wurden die Mediane sowie die beiden Quartile der Fluoreszenzintensität im Gelenk mittels "Microcal Origin" dargestellt. Mittels "SPSS" wurden zur verbesserten Anschaulichkeit die Werte für die Fluoreszenzintensität drei und fünf Minuten nach der Kontrastmittelapplikation, die Steigung der Kurve (Regressionsgerade) sowie die Auswertung der histologischen Befunde als Boxplots dargestellt. Hierbei können Informationen über die Verteilung der Messwerte, Lage, Streuung, Steigung und gleichzeitig Ausreißer (°) und Extremwerte (*) dargestellt und entnommen werden. Die Boxplots setzen sich aus dem Median, den 1. und 4. Quartilen sowie dem kleinsten und dem größten Wert zusammen. Ausreißer sind mehr als eineinhalb Boxenlängen und Extremwerte sind mehr als drei Boxenlängen vom oberen bzw. unteren Rand der Box entfernt. Ebenfalls mit "SPSS" wurden die Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werte) ermittelt. Wenn zwei unabhängige Stichproben untersucht werden sollten, wurde dafür der Mann-Whitney-Test (U-Test) eingesetzt. Für mehr als zwei unabhängige Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angesehen. Weiterhin wurden die Sensitivitäten und Spezifitäten für die visuelle Einstufung durch eine quantitative Auswertung der NIR-Bilder durch zwei

Untersucher ermittelt. Um die relative Signalintensität der einzelnen Gruppen über die Zeit zu vergleichen, wurde eine nichtparametrische Varianzanalyse mittels "SAS" durchgeführt.