

**Aus dem Institut für Klinische Radiologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Jens Ricke

**Evaluation der möglichen klinischen Anwendbarkeit eines  
mittels ICG kontrastverstärkten, kombinierten  
optischen Bildgebungs-/Röntgensystems**

---

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christian Krug

aus Bad Neustadt an der Saale

2018

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andrea Baur-Melnyk

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Axel Stäbler

Prof. Dr. Dierk Vorwerk

Mitbetreuung durch: Heike Daldrup-Link, MD, PhD  
(Department of Radiology, Stanford University)

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2018

## Eidesstattliche Versicherung

Krug, Christian

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Evaluation der möglichen klinischen Anwendbarkeit eines mittels ICG kontrastverstärkten, kombinierten optischen Bildgebungs-/Röntgensystems**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 06.02.2018

---

Ort, Datum

C. Krug

---

Unterschrift Doktorand

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>3</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>4</b>
<b>PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>5</b>
<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>6</b>
Optische Bildgebung (OI).....	6
Indocyaningrün (ICG) .....	8
Integriertes Optisches Bildgebungs- und Röntgensystem .....	8
Analyse potentieller klinischer Anwendbarkeit im Tiermodell .....	10
<b>DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>14</b>
<b>ENGLISCHE ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>16</b>
<b>PUBLIKATION I.....</b>	<b>18</b>
<b>PUBLIKATION II .....</b>	<b>19</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>20</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>23</b>

## Abkürzungsverzeichnis

CCD	Charge-Coupled Device
CT	Computertomographie
FDA	Food and Drug Administration (Amerikanische Gesundheitsbehörde)
ICG	Indocyaningrün
MRT	Magnetresonanztomographie
NIR	Near Infrared
OI	Optical imaging = optische Bildgebung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
P.I.	Post injectionem
RA	Rheumatoide Arthritis
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomographie

## Publikationsliste

### I) Erstautorenschaft: Originalarbeit

Meier, R. \*, **Krug, C. \***, Golovko, D., Boddington, S., Piontek, G., Rudelius, M., Sutton, E. J., Baur-Melnyk, A., Jones, E. F., Daldrup-Link, H. E. ICG-enhanced imaging of arthritis with an integrated Optical Imaging/X-ray System. *Arthritis and Rheumatism*. 2010;62(8):2322-2327.

doi:10.1002/art.27542. (\* geteilte Erstautorenschaft)

Impact Factor (Arthritis & Rheumatism 2010): **8,435**

### II) Co- Autorenschaft: Originalarbeit

Meier, R., Boddington, S., **Krug, C.**, Acosta, F. L., Thullier, D., Henning, T. D., Sutton, E. J., Tavri S, Lotz, J. C., Daldrup-Link, H. E. Detection of postoperative granulation tissue with an ICG-enhanced integrated OI-/X-ray System. *Journal of Translational Medicine*. 2008;6:73.

doi:10.1186/1479-5876-6-73.

Impact Factor (Journal of Translational Medicine 2008): **2,917**

## Einleitung

### OPTISCHE BILDGEBUNG (OI)

Seit der Entdeckung der Röntgenstrahlen durch Wilhelm Röntgen Ende des 19. Jahrhunderts wurde das medizinische Handeln maßgeblich durch die Entwicklung bildgebender Verfahren beeinflusst. Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) ermöglichen die dreidimensionale, hochauflösende anatomische Darstellung von Geweben. Jedoch sind die ionisierende Strahlung bei CT- und die langen Aufnahmezeiten sowie die hohen Kosten von MRT-Untersuchungen relevante Nachteile [1]. Die Ultraschalldiagnostik ermöglicht die strahlenexpositionsfreie Echtzeit-Darstellung von Geweben bei niedrigen Betriebskosten. Limitiert ist diese durch die hohe Untersucherabhängigkeit und ihre Eindringtiefe [2]. Anders als bei der klassischen diagnostischen Bildgebung liegt der Fokus der molekularen Bildgebung auf der *in vivo* Darstellung von Prozessen auf Zellebene, die zu Pathologien führen und nicht lediglich auf der Abbildung ihrer Auswirkungen [3]. Die im klinischen Alltag etablierten, auf dem Zerfall radioaktiver Isotope beruhenden Verfahren (Positronen-Emissions-Tomographie (PET), Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT), Szintigraphie) zeichnen sich durch eine sehr hohe Sensitivität aus. Nachteile sind sowohl die fehlende anatomische Auflösung, als auch die hohen Kosten und die Strahlenexposition der Patienten. Neben der Anwendung von MRT und Ultraschall ist daher die auf Fluoreszenz beruhende optische Bildgebung (OI) Gegenstand aktueller Forschung.

Die Funktionsweise von OI ähnelt der Technik einer Fotoaufnahme: durch Licht (Wellenlänge  $x$  nm) einer Lichtquelle (häufig ein monochromatischer Laser) wird ein Fluorophor angeregt (Exzitation). Das daraufhin von diesem emittierte Licht (Wellenlänge  $y$  nm) wird nach Passage eines entsprechenden Filters (Wellenlänge  $y$  nm) mit Hilfe eines Detektors (CCD = charged-coupled device) aufgefangen [4]. Die Aufnahmedauer kann beliebig gewählt werden, erbringt jedoch

bereits nach weniger als fünf Minuten verwertbare Bilder. Der Vorgang ruft keine ionisierende Strahlung hervor. Die Kosten von Anschaffung und Betrieb einer OI-Vorrichtung sind gering [5], [6]. Einen bedeutenden Nachteil stellt die fehlende anatomische Auflösung der OI-Aufnahmen dar. In Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichts, Autofluoreszenz, Lichtstreuung und der Präsenz von endogenen Absorbern (Hämoglobin, Wasser, Lipide) im Gewebe können verschiedene Eindringtiefen erreicht werden. Im Bereich von 300nm bis 650nm wird das Licht in einer Tiefe von wenigen Mikro- bis Millimetern von den dort vorhandenen Chromophoren (Oxi- und Deoxihämoglobin) absorbiert [7], [1]. Mit Lichtimpulsen der Wellenlänge 700 bis 900nm (near-infrared = NIR) kann die höchste Eindringtiefe (7 bis 14cm) erzielt werden [8]. Analog zur Kontrastmittelverstärkten CT- und MRT-Bildgebung lässt sich die Sensitivität von OI durch den Einsatz von Kontrastmitteln erhöhen, was auch seine Applikationsmöglichkeiten erweitert. Neben endogenen, ausschließlich in experimentellen Studien angewandten Bioluminescence-Reporter-Systemen (Green fluorescent Protein, Luciferase/Luciferin) kommen exogen zugeführte spezifische und unspezifische Kontrastmittel zur Anwendung [1]. Die spezifischen Kontrastmittel lassen sich in zwei Gruppen unterteilen:

- 1) Die Kopplung an zielgerichtete Substrate (Antikörper, Antikörperfragmente, Proteine und kleine Moleküle). Mittels Bindung eines Fluorochroms an einen tumorspezifischen monoklonalen Antikörper ließen sich beispielsweise im Mausmodell *in vivo* Tumor-Detektion und -Überwachung durchführen [9], [10].

- 2) Die Aktivierung durch enzymatischen Prozess. Diese Substanzen zeigen im intakten Zustand wenig Fluoreszenz. Die Höhe der Fluoreszenz-Emission hängt von der Präsenz des Ziel-Enzyms ab. Sie kann daher als Indikator für die Aktivität dieses Enzyms dienen. Beispielsweise konnte im Mausmodell die Aktivität bestimmter Cathepsine und Matrix-Metalloproteinase mit der Aktivität eines Mammakarzinoms korreliert werden [11], ebenso mit der Aktivität der Rheumatoiden Arthritis und deren Ansprechen auf eine Methotrexat-Behandlung [12].



Unspezifische Kontrastmittel führen nach intravenöser Applikation zur Kontrasterhöhung in Bereichen vermehrter Vaskularität [1]. Ein Vertreter dieser Gruppe ist der Fluoreszenzfarbstoff ICG.

### **INDOCYANINGRÜN (ICG)**

ICG hat eine komplexe molekulare Struktur (molare Masse 779,44 g/mol) und besitzt sowohl hydrophile als auch lipophile Eigenschaften (gute Löslichkeit in Wasser, Methanol und Ethanol) [13]. Absorptions- (600nm bis 900nm, Maximum: 780nm) und Emissionsspektrum (750 bis 900nm, Maximum: 830nm) liegen im NIR-Bereich [14]. Nach intravenöser Applikation binden ca 98% des ICG an Plasmaproteine. Bei normaler Gefäßpermeabilität verbleibt der Farbstoff daher intravasal. Die Halbwertszeit beträgt 3 bis 4 Minuten [15]. Die Elimination erfolgt hepato-biliär. Es besteht eine lediglich geringe Toxizität für den Menschen [14]. ICG erhielt die FDA-Zulassung bereits am Ende der 1950er Jahre, als es zunächst in der Leberfunktionsdiagnostik eingesetzt wurde. Seitdem wird es in verschiedenen Fachbereichen eingesetzt, unter anderem in der Ophthalmologie [16] zur Darstellung von Lymphgefäßen [17], zur intraoperativen Durchblutungskontrolle [18], als auch zur Diagnostik von Tumoren [19], [20] und entzündlichen Prozessen [21], [22] beim Menschen und im Tiermodell.

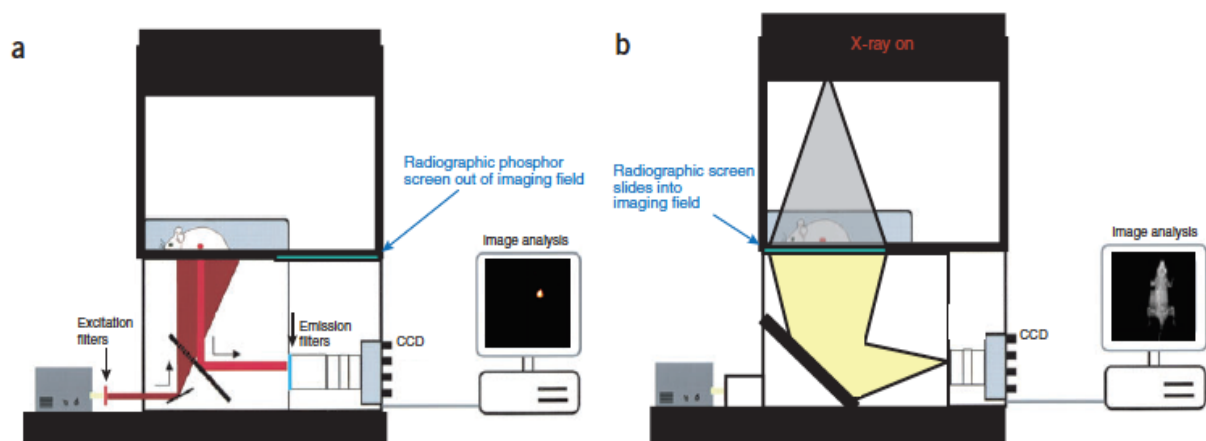
Vor allem aufgrund der bestehenden klinischen Zulassung und Erfahrung, aber auch aufgrund der einfachen Handhabung, der niedrigen Beschaffungskosten und der Möglichkeit der breiten Anwendbarkeit bei verschiedenartigen Pathologien, nutzten wir ICG für die vorliegenden Studien.

### **INTEGRIERTES OPTISCHES BILDGEBUNGS- UND RÖNTGENSYSTEM**

Trotz der oben genannten Vorzüge der ICG-verstärkten optischen Bildgebung bleibt der Nachteil der fehlenden anatomischen Auflösung der Aufnahmen bestehen. Wir beabsichtigten diese zentrale Limitierung von OI daher durch die Addition einer weiteren Bildgebungsmodalität auszugleichen. In der Klinik erfolgt aktuell beispielsweise beim PET/CT die Fusion der jeweils gewonnenen Bildinformationen.

Somit können die in der PET dargestellten molekularen Prozesse präzise den hochaufgelösten anatomischen Strukturen im CT zugeordnet werden [23]. Im Experimentalstadium befinden sich integrierte MRT-optische Bildgebungssysteme [19], [24]. Dieser vielversprechende Ansatz bringt jedoch hohe technische Hürden mit sich. Um eine potentielle, zeitnahe Anwendung unserer Erkenntnisse im klinischen Alltag zu ermöglichen, wählten wir zur Durchführung unserer Studien die Evaluation der Fusion von ICG-verstärkter optischer Bildgebung mit Röntgenaufnahmen. Das Röntgen zeichnet sich vor allem durch sehr kurze Aufnahmedauer, geringe Untersuchungskosten und Strahlenbelastung, als auch durch sehr gute anatomische, jedoch zweidimensionale Auflösung aus [25], [26]. Die Programmierung entsprechender Software vorausgesetzt, wäre die Fusion von Extremitäten-Röntgenbildern und mittels „Hand-held“ OI-Scanner in gleicher Position angefertigter OI-Aufnahmen bereits denkbar [27], [28].

Die Analyse des oben genannten Fusions-Prinzips im Tiermodell führten wir unter Verwendung eines integrierten optischen Bildgebungs-/Röntgen-Scanners (Imaging Station In Vivo FX) der Firma Eastman Kodak (New Haven, USA) durch



**Abb. 1: a) OI-Modus b) Röntgen-Modus.** Mit freundlicher Genehmigung durch Eastman Kodak (New Haven, USA)

(Abb. 1). Dieses System ist mit einer Hochleistungs-Halogen-Lampe, austauschbaren Exzitations/Emissions-Licht-Filtern und einer thermoelektrisch-gekühlten CCD-Kamera sowie einem Röntgenmodul (maximal 35 kVp) ausgestattet. Röntgenstrahlen werden nach Durchleuchtung des Versuchstieres mittels eines Phosphorschirms in Licht umgewandelt. Dieses kann von der CCD-Kamera

aufgenommen werden. Während des Akquisitionsvorgangs liegen die Versuchstiere in einer Kammer, die mit Isofluran-Narkosegas geflutet werden kann. Eine kontinuierliche Narkose ist somit gewährleistet. Beim Wechsel der Bildgebungsmodalität bleibt die Kammer geschlossen und das Tier kann daher jeweils in derselben Position abgebildet werden. Für die optische Bildgebung mittels ICG nutzten wir eine Exzitationswellenlänge von 755nm und eine Emissionswellenlänge von 830nm. Die Röntgenaufnahmen wurden mit einer Expositionszeit von 60 Sekunden und 35kV durchgeführt. Die Ko-Registrierung der Bilder erfolgte durch die Molecular Imaging Software Version 4.5 (Eastman-Kodak, New Haven, USA). Das Falschfarbenbild des OI und das grauskalierte Röntgenbild wird dabei Pixel für Pixel übereinandergelegt. Auf den derart fusionierten OI/Röntgen-Bildern können pathologische Prozesse auf Zellebene exakt anatomischen Strukturen zugeordnet werden.

Um die Anwendbarkeit und den möglichen Mehrwert eines solchen Untersuchungsprinzips für den klinischen Alltag zu demonstrieren, testeten wir dieses anhand im Folgenden beschriebener Tiermodelle.

### **ANALYSE POTENTIELLER KLINISCHER ANWENDBARKEIT IM TIERMODELL**

Die Auswahl der Pathologien für deren Abbildung ein integriertes OI/Röntgensystem sinnvoll einsetzbar ist, muss zwingend unter Berücksichtigung dessen Limitierungen erfolgen. Hier fällt einerseits die eingeschränkte Gewebseindringtiefe der OI ins Gewicht, andererseits für das Röntgen der Summationseffekt und die fehlende anatomische Auflösung im dreidimensionalen Raum. Dies und die eingangs aufgeführten Charakteristika der OI in Betracht ziehend, erwarteten wir vor allem für die Darstellung hypervaskulärer Areale an den Extremitäten sowie an der Wirbelsäule verwertbare Aufnahmen.

Gewährleistet sehen wir dies unter anderem bei den in den vorliegenden Studien im murinen Tiermodell untersuchten Szenarien:

1) Postoperatives Monitoring der Entwicklung von Granulationsgewebe im murinen Modell eines lumbalen Bandscheibenprolapses

2) Detektion und Verlaufskontrolle einer im murinen Tiermodell Antigen-induzierten Arthritis.

Ad 1) Pro Jahr erleiden circa acht Prozent der amerikanischen Bevölkerung Läsionen der unteren Wirbelsäule [29]. Ein Großteil davon entfällt auf Bandscheibenvorfälle, welche zum Teil mittels (Mini-)Diskektomie behandelt werden [30]. Postoperative Komplikationen dieses Eingriffs können durch die Entstehung von Granulationsgewebe hervorgerufen werden. Dazu zählen beispielsweise rezidivierende radikuläre Schmerzen, Muskelschwäche und Parästhesien sowie ein erhöhtes Risiko für Komplikationen bei einer möglichen Operation im Verlauf [31]–[36]. Das Monitoring der Granulationsgewebsentwicklung und deren Ansprechen auf medikamentöse Therapien ist daher essentiell für eine optimale postoperative Nachsorge. Aktuell erfolgt dazu die Bildgebung mittels MRT, aber auch mittels CT und SPECT/PET. Diese Bildgebungsmodalitäten sind jedoch mit den oben genannten Nachteilen assoziiert [37]–[43]. Nach unserem Wissen wurde die ICG-kontrastverstärkte, optische Bildgebung in Kombination mit Röntgenaufnahmen zu diesem Zweck bisher weder in der Klinik eingesetzt, noch im Tiermodell untersucht.

Wir unterzogen achtzehn männliche 280 bis 300g schwere Sprague-Dawley Ratten einem Eingriff an der Wirbelsäule. Dabei wurde in intravenöser Anästhesie mit einer Hohlnadel auf Höhe von L 2/3 eine Läsion des posterioren Annulus gesetzt. Daraufhin füllten wir diesen Defekt mittels weiter kaudal aus den Bandscheiben von drei Schwanzwirbeln gewonnenen Anteilen des Nucleus pulposus auf. Dies führte zu einem Prolaps auf Höhe L2/3. Nach adäquater postoperativer Analgesie führten wir die Bildgebung an Tag 7 und 14 post OP in der oben beschriebenen Imaging Station In Vivo FX (Eastman Kodak, New Haven, USA) durch. Wir verwendeten ICG in der in der Literatur für die Applikation beim Menschen empfohlenen Dosis von

1 mg/kg Körpergewicht (Gruppe A) [44], [45] und in der für Tierversuche verwendeten Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht [46], [47]. Nach ICG-Injektion erfolgte die optische Bildgebung minütlich über einen Zeitraum von 25 Minuten, gefolgt von einer Röntgenaufnahme 30 min p.i.. In der histopathologischen Untersuchung

(H&E, Mason-Trichrom-Färbung) erbrachten wir den Nachweis von Granulationsgewebe an L 2/3. In den fusionierten OI/Röntgenbildern ließ sich dort an Tag 7 und 14 für beide ICG-Dosen jeweils eine statistisch signifikant erhöhte Fluoreszenz erkennen. Es zeigte sich darüber hinaus, dass die höhere ICG-Dosis von 10 mg/kg zu einer stärkeren und länger anhaltenden Fluoreszenz führte.

Das ICG-OI/Röntgensystems ist also als nicht invasives Instrument zur postoperativen Verlaufskontrolle der Granulationsgewebsentwicklung denkbar. Der Erfolg neuer anti-inflammatorischer Medikamente zur Unterdrückung von Granulationsgewebe könnte so regelmäßig, strahlungsarm und kosteneffizient überprüft werden.

Beschreibung des Eigenanteils: Assistenz bei den Wirbelsäulenoperationen aller Versuchstiere, Durchführung der Bildgebung aller Versuchstiere an den oben genannten Zeitpunkten inklusive der intravenösen ICG-Injektionen, Akquirierung der quantitativen Daten aus den mittels optischer Bildgebung gewonnenen Aufnahmen unter Verwendung der oben genannten Software.

Ad 2) Die Rheumatoide Arthritis stellt die am häufigsten auftretende chronisch-entzündliche Gelenkserkrankung weltweit dar, die etwa vierzig Millionen Patienten betrifft [48]. Für die Diagnosestellung der RA spielt die Bildgebung eine untergeordnete Rolle, da im Frühstadium wenige strukturell-anatomische Veränderungen nachzuweisen sind [2]. MRT und Ultraschall werden ergänzend eingesetzt. Die hohen Kosten und die langen Untersuchungszeiten schränken dabei den Einsatz des MRTs ein. Mit der Ultraschalluntersuchung kann die Entzündungsaktivität gut dargestellt werden. Der Informationsgewinn ist jedoch

stark Untersucher-abhängig [2], [49]. Unserer Hypothese zufolge ließe sich mit dem oben beschriebenen OI/Röntgen-Untersuchungssystem die hohe Sensitivität für inflammatorische Prozesse der OI mit der hohen anatomischen Auflösung der Röntgenaufnahmen an den Extremitäten optimal in der Diagnostik und Verlaufskontrolle der RA einsetzen. Um dies nachweisen zu können untersuchten wir neun athymische Harlan Ratten in der Imaging Station In Vivo FX. Gruppe B (n=3) diente als unbehandelte Kontrollgruppe. Gruppe A (n=6) erhielt eine PG-PS-Injektion (Lee Laboratories, USA), ein Streptokokkenzellwandextrakt, intra - peritoneal sowie in beide Knie- und Sprunggelenke (insgesamt 25 mg/kg Körpergewicht). Die Entwicklung der auf diese Weise Antigen-induzierten Arthritis wurde mittels Beobachtung klinischer Zeichen (Hinken) und der Messung der Gelenksdurchmesser kontrolliert. Sobald der Erkrankungsbeginn apparent wurde, erfolgte die Untersuchung. Nach Isoflurangasnarkose, Kontroll-OI-Scan und ICG-Injektion (1mg/kg Körpergewicht) führten wir die optische Bildgebung minütlich über einen Zeitraum von 25 Minuten, gefolgt von einer Röntgenaufnahme 30 min p.i. durch. OI- und Röntgenaufnahmen wurden 60 Minuten, 90 Minuten, 12 Stunden und 24 Stunden p.i. wiederholt. In der histopathologischen Untersuchung waren in allen untersuchten Gelenken entzündliche Veränderungen sichtbar (H&E-Färbung). Eine im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant erhöhte Fluoreszenz der genannten Gelenke zeigte sich 1 Minute bis 12 Stunden p.i. Auf den fusionierten OI/Röntgenaufnahmen ließen sich diese exakt anatomisch lokalisieren. Zusätzlich stellte sich die Fluoreszenz an Knie- und Sprunggelenken der Gruppe A p.i. statistisch signifikant erhöht im Vergleich zu den Aufnahmen prä injectionem dar.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass entzündliche Veränderungen in Gelenken mittels ICG-kontrastverstärkter OI nachgewiesen werden können. Dies bestätigte und ergänzte die Erkenntnisse früherer OI-Studien [50]–[52], [28]. Darüber hinaus ermöglichte die Ko-Registrierung mit den korrespondierenden Röntgenbildern die genaue anatomisch-strukturelle Lokalisation der funktionellen in-vivo-OI-

Information. ICG-kontrastverstärkte OI zur Darstellung von entzündlichen Gelenkveränderungen fand bereits Anwendung in einer klinischen Studie zur Diagnostik von Arthritis an der Hand [28]. Nach der Entwicklung entsprechender Software, könnte unser Untersuchungsprinzip bei standardisiert angefertigten ICG-OI und Röntgenaufnahmen problemlos in der Klinik eingesetzt werden. Vorstellbar wäre dies beispielsweise zur Verbesserung der Sensitivität bei der Diagnosestellung und der Überwachung der Erkrankungsaktivität der Rheumatoiden Arthritis.

Beschreibung des Eigenanteils: Detaillierte Literaturrecherche, Erarbeitung des Studienkonzepts mit Frau Professor Heike Daldrup-Link und Dr. Reinhard Meier, Durchführung der oben genannten Arthritis-Induktion aller Versuchstiere, tägliche klinische Untersuchung der Versuchstiere und Schmerzmittelapplikation soweit erforderlich, Anwesenheit und Durchführung der Bildgebung an den oben genannten Zeitpunkten inklusive der intravenösen ICG-Injektion bei allen Versuchstieren in Zusammenarbeit mit Dr. Reinhard Meier und Dr. Elizabeth Sutton, Euthanasie aller Versuchstiere und Aufbereitung der Präparate für die histologische Untersuchung, Akquirierung der quantitativen Daten aus den mittels optischer Bildgebung gewonnenen Aufnahmen unter Verwendung der oben genannten Software, Unterstützung von Dr. Reinhard Meier bei der statistischen Auswertung der quantitativen Daten, Anfertigung der H&E-Schnitte in Zusammenarbeit mit Guido Piontek, gemeinsame Analyse und Interpretation der Versuchsergebnisse mit den Ko-Autoren der Studie.

## Deutsche Zusammenfassung

Die optische Bildgebung (OI) ist eine Form der molekularen Bildgebung, die auf durch Lichtexzitation im Gewebe hervorgerufene Fluoreszenz beruht. Sie zeichnet sich durch Strahlungsfreiheit, einfache Handhabung, niedrige Kosten und kurze Aufnahmezeiten aus. Ihre Sensitivität kann durch die Anwendung von Kontrastmitteln gesteigert werden. Aufgrund seines jahrzehntelangen Einsatzes in

verschiedenen Fachgebieten im klinischen Alltag und seiner vorteilhaften Fluoreszenzeigenschaften besitzt Indocyaningrün (ICG) dabei eine besondere Bedeutung. Um den Nachteil der fehlenden anatomischen Auflösung bei der optischen Bildgebung zu kompensieren, kombinierten wir diese mit den jeweils korrelierenden Röntgenaufnahmen. Ermöglicht wurde dies in unseren Studien durch die Verwendung eines integrierten optische Bildgebungs-/Röntgen-Scanner (Imaging Station In Vivo FX). Mögliche Anwendungen einer derartig kombinierten Bildgebung in der Klinik zeigten wir anhand zweier tierexperimenteller Studien. Zunächst untersuchten wir die Applikation bei der Detektion und dem Verlaufsmonitoring von postoperativ entstehendem Granulationsgewebe nach Operation an der Wirbelsäule. Wir unterzogen achtzehn Sprague-Dawley Ratten einem Eingriff an der Wirbelsäule, welcher einen Bandscheibenprolaps herbeiführte. Diese Läsion führte zur Bildung von Granulationsgewebe. Nach sieben, beziehungsweise vierzehn Tagen erfolgten die ICG kontrastverstärkten OI und Röntgenaufnahmen. Dabei ließ sich eine im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant erhöhte Fluoreszenz im Bereich des histopathologisch korrelierten Granulationsgewebes nachweisen. Des Weiteren evaluierten wir die Anwendbarkeit bei der Untersuchung und Verlaufskontrolle von entzündlichen Gelenkerkrankungen am Tiermodell der Antigen-induzierten Arthritis. Von neun athymischen Harlan Ratten erhielten sechs eine Injektion in Wasser gelöster Streptococcus pyogenes-Peptidoglycan-Polysaccharid-Zellwandfragemente zur Arthritis-Induktion. Nach Eintreten klinisch apparenter Symptome erfolgte die OI/Röntgenbildgebung aller Versuchstiere nach Protokoll. Eine im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant erhöhte Fluoreszenz der entzündlich veränderten Gelenke konnte nachgewiesen werden. Auf den fusionierten OI/Röntgenaufnahmen ließ sich diese exakt anatomisch lokalisieren. Die anschließende histopathologische Untersuchung erbrachte den Nachweis inflammatorischer Veränderungen.



Nach der Entwicklung einer Software zur Ko-Registrierung von OI- und Röntgenaufnahmen wäre der Einsatz unseres Untersuchungsprinzips bei standardisiert angefertigten ICG-OI und Röntgenaufnahmen vorstellbar. In einem nächsten Schritt könnten unsere Erkenntnisse dann im Rahmen klinischer Studien validiert werden.

## Englische Zusammenfassung

Optical imaging (OI), a molecular imaging modality, relies on fluorescence triggered by light excitation. It is fast (< 5 minutes), inexpensive, non-invasive and does not require exposure to radiation. The addition of contrast agents leads to increased sensitivity. One of the most promising contrast agents is Indocyanine green (ICG). It shows favorable fluorescent properties and has been extensively used in the fields of ophthalmology and cardiology for decades. In order to compensate for the lack of anatomic resolution in optical imaging we added correlating XRay image information by image fusion. This was accomplished using an integrated optical imaging/XRay Scanner (Imaging Station In Vivo FX). To investigate possible clinical applications of this diagnostic approach two animal studies were conducted. Firstly, we evaluated its application for the detection and monitoring of granulation tissue formation after spine surgery. Eighteen Sprague Dawley rats underwent spine surgery which caused disc protrusion and thereafter formation of granulation tissue. ICG-enhanced optical and correlated XRay imaging was performed seven and fourteen days post surgery. Significantly increased fluorescence was visible in areas where granulation tissue had formed as confirmed by histopathology. Secondly, our diagnostic approach was applied for the detection and monitoring of inflammatory joint disease in an animal model of antigen-induced arthritis. Nine athymic Harlan rats were injected with PGPS to trigger arthritic joint inflammation. When clinical symptoms became apparent OI/XRay imaging was performed according to our protocol. Significantly increased fluorescence was detected in arthritic joints and could precisely be anatomically located by OI/XRay image fusion. Joint inflammation was confirmed by histopathology.

In conclusion, once software for OI and XRay image co-registration becomes available our diagnostic approach could easily be applied in a clinical setting of standardized OI and XRay imaging. In a next step our findings could be validated by clinical trials.

## Publikation I

Titel:

ICG-enhanced imaging of arthritis with an integrated Optical Imaging/X-ray System

Autoren:

Meier, R., **Krug, C.**, Golovko, D., Boddington, S., Piontek, G., Rudelius, M., Sutton, E. J., Baur-Melnyk, A., Jones, E. F., Daldrup-Link, H. E.

Journal:

Arthritis & Rheumatism 2010

**doi:10.1002/art.27542**

## Publikation II

Titel:

Detection of postoperative granulation tissue with an ICG-enhanced integrated OI-/X-ray System

Autoren:

Meier, R., Boddington, S., **Krug, C.**, Acosta, F. L., Thullier, D., Henning, T. D., Sutton, E. J., Tavri S, Lotz, J. C., Daldrup-Link, H. E.

Journal:

Journal of Translational Medicine 2008

**doi:10.1186/1479-5876-6-73**

## Literaturverzeichnis

- [1] K. Licha and C. Olbrich, "Optical imaging in drug discovery and diagnostic applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 8, pp. 1087–1108, 2005.
- [2] M. Szkudlarek, M. Klarlund, E. Narvestad, M. Court-Payen, C. Strandberg, K. E. Jensen, H. S. Thomsen, and M. Østergaard, "Ultrasonography of the metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints in rheumatoid arthritis: a comparison with magnetic resonance imaging, conventional radiography and clinical examination.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 8, no. 2, p. R52, 2006.
- [3] R. Weissleder and U. Mahmood, "Molecular Imaging," *Radiology*, vol. 219, no. 2, pp. 316–333, 2001.
- [4] J. V Frangioni, "In vivo near-infrared fluorescence imaging.," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 7, no. 5, pp. 626–34, Oct. 2003.
- [5] V. Ntziachristos, C. Bremer, and R. Weissleder, "Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging.," *Eur. Radiol.*, vol. 13, no. 1, pp. 195–208, Jan. 2003.
- [6] E. J. Sutton, T. D. Henning, B. J. Pichler, C. Bremer, and H. E. Daldrup-Link, "Cell tracking with optical imaging," *Eur. Radiol.*, vol. 18, no. 10, pp. 2021–2032, Oct. 2008.
- [7] R. Weissleder and V. Ntziachristos, "Shedding light onto live molecular targets.," *Nat. Med.*, vol. 9, no. 1, pp. 123–8, Jan. 2003.
- [8] C. H. Tung, "Fluorescent peptide probes for in vivo diagnostic imaging," *Biopolym. - Pept. Sci. Sect.*, vol. 76, no. 5, pp. 391–403, 2004.
- [9] B. Ballou, G. W. Fisher, A. S. Waggoner, D. L. Farkas, J. M. Reiland, R. Jaffe, R. B. Mujumdar, S. R. Mujumdar, and T. R. Hakala, "Tumor labeling in vivo using cyanine-conjugated monoclonal antibodies.," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 41, no. 4, pp. 257–63, Oct. 1995.
- [10] S. Folli, P. Westermann, D. Braichotte, A. Pèlegrin, G. Wagnières, H. van den Bergh, and J. P. Mach, "Antibody-indocyanin conjugates for immunophotodetection of human squamous cell carcinoma in nude mice.," *Cancer Res.*, vol. 54, no. 10, pp. 2643–9, May 1994.
- [11] C. Bremer, C.-H. Tung, A. Bogdanov, and R. Weissleder, "Imaging of Differential Protease Expression in Breast Cancers for Detection of Aggressive Tumor Phenotypes," *Radiology*, vol. 222, no. 3, pp. 814–818, Mar. 2002.
- [12] A. Wunder, C.-H. Tung, U. Müller-Ladner, R. Weissleder, and U. Mahmood, "In vivo imaging of protease activity in arthritis: a novel approach for monitoring treatment response.," *Arthritis Rheum.*, vol. 50, no. 8, pp. 2459–65, Aug. 2004.
- [13] J. T. Alander, I. Kaartinen, A. Laakso, T. Pätälä, T. Spillmann, V. V. Tuchin, M. Venermo, and P. Välisuo, "A Review of Indocyanine Green Fluorescent Imaging in Surgery," *Int. J. Biomed. Imaging*, vol. 2012, pp. 1–26, 2012.
- [14] B. Yuan, N. Chen, and Q. Zhu, "Emission and absorption properties of indocyanine green in Intralipid solution.," *J. Biomed. Opt.*, vol. 9, no. 3, pp. 497–503, 2004.
- [15] S. Luo, E. Zhang, Y. Su, T. Cheng, and C. Shi, "A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging.," *Biomaterials*, vol. 32, no. 29, pp. 7127–38, Oct. 2011.
- [16] R. Brancato and G. Trabucchi, "Fluorescein and indocyanine green angiography in vascular chorioretinal diseases.," *Semin. Ophthalmol.*, vol. 13, no. 4, pp. 189–98, Dec. 1998.
- [17] A. A. Gashev, T. Nagai, and E. A. Bridenbaugh, "Indocyanine green and lymphatic imaging: current problems.," *Lymphat. Res. Biol.*, vol. 8, no. 2, pp. 127–30, Jun. 2010.
- [18] M. Griffiths, M. P. Chae, and W. M. Rozen, "Indocyanine green-based fluorescent angiography in breast reconstruction.," *Gland Surg.*, vol. 5, no. 2, pp. 133–49, Apr. 2016.
- [19] V. Ntziachristos, A. G. Yodh, M. Schnall, and B. Chance, "Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 6, pp. 2767–72, Mar. 2000.
- [20] C. Zeng, W. Shang, K. Wang, C. Chi, X. Jia, C. Fang, D. Yang, J. Ye, C. Fang, and J. Tian, "Intraoperative Identification of Liver Cancer Microfoci Using a Targeted Near-Infrared Fluorescent Probe for Imaging-Guided Surgery.," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 21959, Feb. 2016.

- [21] J. M. Christensen, G. A. Brat, K. E. Johnson, Y. Chen, K. J. Buretta, D. S. Cooney, G. Brandacher, W. P. A. Lee, X. Li, and J. M. Sacks, "Monocytes loaded with indocyanine green as active homing contrast agents permit optical differentiation of infectious and non-infectious inflammation.," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e81430, 2013.
- [22] C. Vinegoni, I. Botnaru, E. Aikawa, M. A. Calfon, Y. Iwamoto, E. J. Folco, V. Ntziachristos, R. Weissleder, P. Libby, and F. A. Jaffer, "Indocyanine green enables near-infrared fluorescence imaging of lipid-rich, inflamed atherosclerotic plaques.," *Sci. Transl. Med.*, vol. 3, no. 84, p. 84ra45, May 2011.
- [23] H. Schöder, Y. E. Erdi, S. M. Larson, and H. W. D. Yeung, "PET/CT: a new imaging technology in nuclear medicine," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 30, no. 10, pp. 1419–1437, Oct. 2003.
- [24] V. Ntziachristos, A. G. Yodh, M. D. Schnall, and B. Chance, "MRI-Guided Diffuse Optical Spectroscopy of Malignant and Benign Breast Lesions," *Neoplasia*, vol. 4, no. 4, pp. 347–354, 2002.
- [25] J. E. Gray and C. G. Orton, "Medical Physics: Some Recollections in Diagnostic X-ray Imaging and Therapeutic Radiology," *Radiology*, vol. 217, no. 3, pp. 619–625, Dec. 2000.
- [26] B. Lentle and J. Aldrich, "Radiological sciences, past and present," *Lancet*, vol. 350, no. 9073, pp. 280–285, Jul. 1997.
- [27] S. J. Erickson, A. Godavarty, U. L. Osterberg, K. D. Paulsen, M. L. Melany, H. E. Reynolds, and et al., "Hand-held based near-infrared optical imaging devices: a review.," *Med. Eng. Phys.*, vol. 31, no. 5, pp. 495–509, Jun. 2009.
- [28] T. Fischer, B. Ebert, J. Voigt, R. Macdonald, U. Schneider, A. Thomas, B. Hamm, and K.-G. A. Hermann, "Detection of rheumatoid arthritis using non-specific contrast enhanced fluorescence imaging.," *Acad. Radiol.*, vol. 17, no. 3, pp. 375–81, Mar. 2010.
- [29] L. Manchikanti, "Epidemiology of low back pain.," *Pain Physician*, vol. 3, no. 2, pp. 167–92, Apr. 2000.
- [30] D. T. Gray, R. A. Deyo, W. Kreuter, S. K. Mirza, P. J. Heagerty, B. A. Comstock, and L. Chan, "Population-based trends in volumes and rates of ambulatory lumbar spine surgery.," *Spine (Phila. Pa. 1976)*, vol. 31, no. 17, p. 1957–63; discussion 1964, Aug. 2006.
- [31] K. Olmarker and B. Rydevik, "Pathophysiology of sciatica.," *Orthop. Clin. North Am.*, vol. 22, no. 2, pp. 223–34, Apr. 1991.
- [32] B. I. Martin, S. K. Mirza, B. A. Comstock, D. T. Gray, W. Kreuter, and R. A. Deyo, "Reoperation rates following lumbar spine surgery and the influence of spinal fusion procedures.," *Spine (Phila. Pa. 1976)*, vol. 32, no. 3, pp. 382–7, Feb. 2007.
- [33] J. S. Ross, N. Obuchowski, and R. Zepp, "The postoperative lumbar spine: evaluation of epidural scar over a 1-year period.," *AJNR. Am. J. Neuroradiol.*, vol. 19, no. 1, pp. 183–6, Jan. 1998.
- [34] J. Cauchoix, C. Ficat, and B. Girard, "Repeat surgery after disc excision.," *Spine (Phila. Pa. 1976)*, vol. 3, no. 3, pp. 256–9, Sep. 1978.
- [35] M. Hurme, K. Katevuo, F. Nykvist, T. Aalto, H. Alaranta, and S. Einola, "CT five years after myelographic diagnosis of lumbar disk herniation.," *Acta Radiol.*, vol. 32, no. 4, pp. 286–9, Jul. 1991.
- [36] R. B. North, J. N. Campbell, C. S. James, M. K. Conover-Walker, H. Wang, S. Piantadosi, J. D. Rybock, and D. M. Long, "Failed back surgery syndrome: 5-year follow-up in 102 patients undergoing repeated operation.," *Neurosurgery*, vol. 28, no. 5, pp. 685–90–1, May 1991.
- [37] R. Kubota, S. Yamada, K. Kubota, K. Ishiwata, N. Tamahashi, and T. Ido, "Intratumoral distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in vivo: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography.," *J. Nucl. Med.*, vol. 33, no. 11, pp. 1972–80, Nov. 1992.
- [38] R. Kubota, K. Kubota, S. Yamada, M. Tada, T. Ido, and N. Tamahashi, "Microautoradiographic study for the differentiation of intratumoral macrophages, granulation tissues and cancer cells by the dynamics of fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake.," *J. Nucl. Med.*, vol. 35, no. 1, pp. 104–12, Jan. 1994.
- [39] H. E. Rice, D. P. Frush, D. Farmer, J. H. Waldhausen, and APSA Education Committee, "Review of radiation risks from computed tomography: essentials for the pediatric surgeon.," *J. Pediatr. Surg.*, vol. 42, no. 4, pp. 603–7, Apr. 2007.
- [40] H. E. Daldrup-Link, M. Rudelius, G. Piontek, S. Metz, R. Bräuer, G. Debus, C. Corot, J. Schlegel, T. M. Link, C. Peschel, E. J. Rummeny, and R. A. J. Oostendorp, "Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: in vivo monitoring with 1.5-T MR imaging equipment.," *Radiology*, vol. 234, no. 1, pp. 197–205, Jan. 2005.

- [41] H. E. Daldrup-Link, R. Meier, M. Rudelius, G. Piontek, M. Piert, S. Metz, M. Settles, C. Uherek, W. Wels, J. Schlegel, and E. J. Rummeny, "In vivo tracking of genetically engineered, anti-HER2/neu directed natural killer cells to HER2/neu positive mammary tumors with magnetic resonance imaging.," *Eur. Radiol.*, vol. 15, no. 1, pp. 4–13, Jan. 2005.
- [42] M. Lewin, N. Carlesso, C. H. Tung, X. W. Tang, D. Cory, D. T. Scadden, and R. Weissleder, "Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 18, no. 4, pp. 410–4, Apr. 2000.
- [43] S. Metz, G. Bonaterra, M. Rudelius, M. Settles, E. J. Rummeny, and H. E. Daldrup-Link, "Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro.," *Eur. Radiol.*, vol. 14, no. 10, pp. 1851–8, Oct. 2004.
- [44] S. G. Sakka, H. Koeck, and A. Meier-Hellmann, "Measurement of indocyanine green plasma disappearance rate by two different dosages.," *Intensive Care Med.*, vol. 30, no. 3, pp. 506–9, Mar. 2004.
- [45] M. Gurfinkel, A. B. Thompson, W. Ralston, T. L. Troy, A. L. Moore, T. A. Moore, J. D. Gust, D. Tatman, J. S. Reynolds, B. Muggenburg, K. Nikula, R. Pandey, R. H. Mayer, D. J. Hawrysz, and E. M. Sevick-Muraca, "Pharmacokinetics of ICG and HPPH-car for the detection of normal and tumor tissue using fluorescence, near-infrared reflectance imaging: a case study.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 72, no. 1, pp. 94–102, Jul. 2000.
- [46] W. Slikker, M. Vore, J. R. Bailey, M. Meyers, and C. Montgomery, "Hepatotoxic effects of estradiol-17 beta-D-glucuronide in the rat and monkey.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 225, no. 1, pp. 138–43, Apr. 1983.
- [47] S. G. Kulkarni, A. A. Pegram, and P. C. Smith, "Disposition of acetaminophen and indocyanine green in cystic fibrosis-knockout mice.," *AAPS PharmSci*, vol. 2, no. 2, p. E18, 2000.
- [48] A. J. Silman and J. E. Pearson, "Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis.," *Arthritis Res.*, vol. 4 Suppl 3, pp. S265-72, 2002.
- [49] R. J. Wakefield, P. J. O'Connor, P. G. Conaghan, D. McGonagle, E. M. A. Hensor, W. W. Gibbon, C. Brown, and P. Emery, "Finger tendon disease in untreated early rheumatoid arthritis: a comparison of ultrasound and magnetic resonance imaging.," *Arthritis Rheum.*, vol. 57, no. 7, pp. 1158–64, Oct. 2007.
- [50] W.-T. Chen, U. Mahmood, R. Weissleder, and C.-H. Tung, "Arthritis imaging using a near-infrared fluorescence folate-targeted probe.," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 7, no. 2, pp. R310–R317, 2005.
- [51] A. K. Scheel, A. Krause, I. M.-V. Rheinbaben, G. Metzger, H. Rost, V. Tresp, P. Mayer, M. Reuss-Borst, G. A. Müller, I. Mesecke-Von Rheinbaben, G. Metzger, H. Rost, V. Tresp, P. Mayer, M. Reuss-Borst, and G. A. Müller, "Assessment of proximal finger joint inflammation in patients with rheumatoid arthritis, using a novel laser-based imaging technique.," *Arthritis Rheum.*, vol. 46, no. 5, pp. 1177–1184, May 2002.
- [52] T. Fischer, I. Gemeinhardt, S. Wagner, D. V. Stieglitz, J. J. Schnorr, K.-G. A. G. A. Hermann, B. Ebert, D. Petzelt, R. Macdonald, K. Licha, M. Schirner, V. Krenn, T. Kamradt, and M. Taupitz, "Assessment of unspecific near-infrared dyes in laser-induced fluorescence imaging of experimental arthritis.," *Acad. Radiol.*, vol. 13, no. 1, pp. 4–13, Jan. 2006.

## Danksagung

Ich möchte mich bei allen, die mich bei der Entstehung dieser Doktorarbeit unterstützt haben, sehr herzlich bedanken. Der Weg bis zum Ende war lange und durchaus mühevoller als erwartet.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Professor Heike Daldrup-Link, die mich ermutigte diese Arbeit und den damit verbundenen Forschungsaufenthalt an der University of California, San Francisco durchzuführen. Zu jeder Zeit stand sie mir mit ihrer beeindruckenden Expertise zur Seite.

Des Weiteren bin ich vor allem auch meiner Doktormutter Frau Professor Andrea Baur-Melnyk zu ganz besonderem Dank verpflichtet.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich geduldig unterstützte und bis zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit motivierte.



*Am Ende wird alles gut. Wenn es nicht gut wird, ist es noch nicht das Ende.*

*- Oscar Wilde*