

Aus der Universitäts-Frauenklinik mit Poliklinik Tübingen

Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Wallwiener

**Experimentelle „sentinel“ Lymphonodektomie nach
interstitieller Chromolymphographie mit blauen Liposomen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Marcus Bernd Dieter

aus Tübingen

2002

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. Hirnle

2. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Briel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Material und Methodik.....	5
2.1 Material.....	5
2.2 Versuchsablauf.....	7
2.3 Messung.....	8
2.3.1 Probenaufbereitung.....	8
2.3.2 Zentrifugation.....	8
2.3.3 Spektralphotometrische Messung.....	10
3. Ergebnisse.....	13
3.1 Optische Auswertung.....	13
3.2 Messergebnisse.....	31
3.3 Histologische Untersuchung.....	54
4. Diskussion.....	56
5. Zusammenfassung.....	61
6. Literatur.....	62

1. Einleitung

Die im Verlauf maligner Erkrankungen häufig auftretende lymphogene Metastasierung ist ein prognostisch wichtiger Faktor (1,8,15,20,24,28,57,69,82,90).

Die Behandlung befallener Lymphknoten stellt ein bis jetzt nur unzureichend gelöstes Problem dar, da die Therapie mittels chirurgischer Entfernung, Bestrahlung oder der Gabe von Zytostatika meist zu unbefriedigenden Ergebnissen führt.

So besitzen die in der Chemotherapie verabreichten Zytostatika meist eine hohe Toxizität (59), welche die intravenös applizierbaren Dosen stark limitieren. Der ohnehin geringe, die Lymphknoten erreichende Anteil der Zytostatika wird zusätzlich begrenzt, sodass eine effektive Konzentration an den Lymphknoten nur schwerlich erreicht werden kann.

Ähnliche Probleme treten bei der Strahlentherapie auf. Bei einer Bestrahlung befallener retroperitonealer Lymphknoten werden die benachbarten Organe unnötigerweise starker Strahlenbelastung ausgesetzt (4). Die Lymphknoten dagegen werden nur von einem kleinem Prozentsatz der applizierten Strahlung erreicht.

Bei einer radikalen Lymphonodektomie werden die Lymphknoten mitsamt ihrer Gefäße und ihrem umgebenden Fettgewebe entfernt. Diese schlechte Selektion ist ausschlaggebend für die erheblichen Nebenwirkungen, die regelmäßig nach einer radikalen Lymphonodektomie beobachtet werden.

Eine neue vielversprechende Methode stellt die Biopsie des „sentinel“ Lymphknotens („SL“) dar. Der „SL“ drainiert direkt das vom Tumor befallene Gebiet. Es wurde postuliert, dass das Ergebnis der histologischen Untersuchung des „SL“ für alle anderen

in der Region gelegenen Lymphknoten in Bezug auf die Metastasierung repräsentativ ist.

Ein weiteres Problem vor dem die Operateure bei einer Lymphonodektomie stehen, ist die Unterscheidung der Lymphknoten vom umgebenden Fettgewebe. Die vorausgegangenen Versuche, dieses Problem durch Färben der Lymphknoten zu umgehen (19,29,56,78,81,93) zeigten aufgrund unzureichenden Kontrasts oder inakzeptabler Toxizität nur wenig Erfolg.

In vorangegangenen Untersuchungen wurden verschiedene Stoffe auf ihre Färbeeigenschaften hin getestet (56). Es wurden Versuche mit Chlorophyll (grün), Carbon (schwarz) und Guajazulen (blau) jeweils in Lösung mit Lipidiol untersucht (22,30,75). Die untersuchten Stoffe führten allerdings zu erheblichen Nebenwirkungen, einschließlich der Schädigung der Lymphgefäße und des Lymphgewebes. Überdies verursachte Lipidiol Mikroembolisationen in den Lungenkapillaren (27,52) und ist daher zur klinischen Anwendung nicht geeignet.

Patentblau Violett (PBV) ist ein wasserlöslicher Farbstoff, welcher erfolgreich bei Lymphographien zur Darstellung der Lymphgefäße verwendet wird. Die Färbeeigenschaften von PBV werden heute im klinischen Alltag auch für die Anfärbung der „SL“ ausgenutzt (17,70,80).

Ein großer Nachteil bei der interstitiellen Applikation eines wasserlöslichen Farbstoffs stellt die nur geringe Speicherung in den Lymphknoten dar. Der größte Anteil des injizierten Farbstoffs gelangt über Kapillaren ins Blut (79).

Die Speicherung in den Lymphgefäßen kann durch die Verwendung eines lipidalen Trägers gesteigert werden (94).

Der Träger sollte weder die Lymphknoten noch die Gefäßwände beschädigen. Er sollte nicht zu groß sein, um eine Aufnahme in die Lymphgefäße zu ermöglichen.

Um die geeignete Präparation zu finden wurden mehrere Versuche unternommen.

Versuche mit Emulsionen (40), Suspensionen (35) und Lösungen (33) auf Lipid- Basis wurden aufgrund ihrer Nebenwirkungen für die klinische Anwendung allerdings als nur wenig geeignet befunden.

Bei weiteren Experimenten zeigten Liposomen nahezu optimale Eigenschaften als endolymphatischer Substanzträger (41).

Die Vorteile der hier verwendeten Liposomen liegen in ihrer Zusammensetzung. Sie bestehen aus Ei- Lecithin und Cholesterol.

Liposomen werden für die klinische Behandlung verschiedener Krankheiten mit Erfolg eingesetzt. Liposomen verbessern die Wirkung, Absorption und Verweildauer pharmakologischer Wirkstoffe.

Die guten Eigenschaften der Liposomen als Substanzträger wurden in vorausgehenden Versuchen auch für die Lymphknotenfärbung ausgenutzt. So zeigte ein Versuch mit in Liposomen eingekapseltem Patentblau V nach endolymphatischer Injektion eine erfolgreiche Färbung der Lymphknoten, ohne das Auftreten messbarer Nebenwirkungen (37).

Da sich die Technik der endolymphatischen Injektion als sehr aufwendig und schwierig darstellt, wurden Versuche unternommen, einen zeitsparenderen und einfacheren Applikationsweg zu finden.

Ein Experiment, bei welchem ein in Liposomen eingeschlossener Fluoreszenzmarker (Carboxyfluorescein) in die Zunge von 15 Ratten injiziert wurde, ergab, dass

Liposomen dazu geeignet sind, Stoffe nach interstitieller Injektion in die das Gebiet drainierende Lymphknoten zu transportieren (79).

Diese Erkenntnisse bildeten die Grundlage für die vorliegende Arbeit. Ihr Ziel lag bei der zuverlässigen Identifikation der „SL“, nach dem die mit PBV beladenen Liposomen im Tierexperiment interstitiell injiziert wurden.

2. Material und Methodik

2.1 Material

Als Farbstoff wurde Patentblau V (Abb. 1) verwendet. Patentblau V ist ein wasserlöslicher Farbstoff, welcher seit Jahren zur Darstellung der Lymphgefäße bei Lymphographien Anwendung findet.

Die Herstellung der Liposomen erfolgte mittels Hochdruckextrusion.

Ei-Phosphatidylcholin (EPC; Lipoid GmbH, Ludwigshafen) / Cholesterin (E. Merck, Darmstadt) (3:1, mol/mol) wurden mit Cholat-Na (Sigma, USA) in einem molaren Lipid- Detergens- Verhältnis von 0,625 gemischt und in Methanol (E. Merck, Darmstadt) gelöst. Durch vollständige Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und anschließendes Trocknen am Hochvakuum wurde ein klarer Lipid- Detergens- Film erhalten. Dieser wurde in einer isotonen Lösung von 3 % (m/V) Patentblau Violett (Bleu Patenté V; Laboratoire Guerbet, F) in Phosphatpuffer pH 7,4 (10 mM Na₂HPO₄*12 H₂O) gelöst. Daraufhin erfolgte die Herstellung der Liposomen durch Detergens- Entfernung mittels Tangentialfiltration (64) über drei Stunden (Minisette, OMEGA, Screen Channel, 10 kD; Filtron Technology Corporation, USA). Abschließend wurde die Präparation durch ein steriles Filter (0,45 µm; Sartorius AG, Göttingen) filtriert. Die liposomale Präparation wies eine Gesamtkonzentration von 25 (± 0.4) mg PBV/ ml auf. 7,4% des enthaltenen Farbstoffes waren mit Abschluss der Herstellung liposomal verkapselt.

Die Liposomen besaßen einen mittleren Durchmesser von 172 nm.

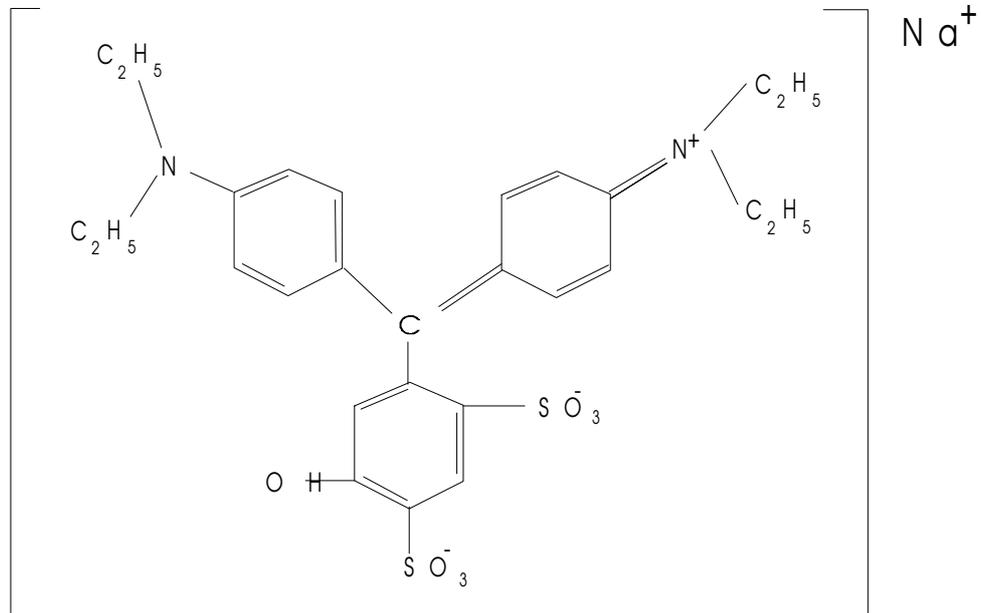


Abb. 1: Strukturformel PBV (2,4Disulfo-5-hydroxy-4-4''-bis-(diethylamino)-triphenylcarbinolmononatriumsalz (63).

2.2 Versuchsablauf

Das behördlich genehmigte Experiment wurde an 7 Schweinen mit einem durchschnittlichem Gewicht von ca. 40 (\pm 2) kg durchgeführt.

Die Tiere waren narkotisiert. Die Prämedikation bestand aus 0,05 ml/kg Atropin 0,1% (Braun, Melsungen) und 0,1ml/kg Stresnil (Janssen, Neuss). Zur Narkose wurde 0,2 ml/kg Diazepam (Ratiopharm, Ulm) und 0,07ml/kg Ketamin 10% (WDT, Garbsen) verwendet.

Bei allen Schweinen wurde Patentblau V (PBV) perimammillär in die vier jeweils am weitesten caudal beziehungsweise am weitesten cranial gelegenen Mammae injiziert.

Bei allen Tieren wurde auf der rechten Seite eine Lösung mit in Liposomen eingekapseltem PBV und auf der linken Seite eine wässrige PBV- Lösung verabreicht.

Pro Depot wurden 0,5 ml der jeweiligen Präparation mit 25mg PBV/ml appliziert.

Tier 1 wurde nach 3 Stunden, Tier 2 und Tier 3 nach 6 Stunden, Tier 4, Tier 5 und Tier 6 nach 12 Stunden und Tier 7 nach 24 Stunden getötet.

Bei allen Tieren wurden danach die Lymphknoten aufgesucht, fotografisch dokumentiert, entnommen und erneut fotografiert.

2.3 Messung

2.3.1 Probenaufbereitung

Die Lymphknoten wurden von Fett- und Bindegewebe befreit und gewogen. Danach wurde der stark blau gefärbte Bereich vom restlichen Lymphknoten getrennt und gewogen. Bei nur schwacher Färbung des gesamten Lymphknotens, wurde eine Referenzprobe von circa 1 g für die weitere Messung verwendet. Das gefärbte Lymphknotengewebe wurde zerkleinert und je nach Gewicht in 1,5 bis 3 ml Ethanol aufgenommen.

2.3.2 Zentrifugation

Die Proben wurden 30 min bei 100 000 g und 4° C mit einem Festwinkel-Rotor (Abb. 2) zentrifugiert.

Der Grundvorgang bei der Zentrifugation ist die Bewegung von Partikeln (Zellen, Organellen oder Einzelmoleküle) durch ein flüssiges Medium unter dem Einfluss eines Zentrifugalfeldes. Für die Geschwindigkeit eines kugelförmigen Partikels gilt dabei nach dem Stokeschen Gesetz (51):

$$V = \frac{K}{6\pi\eta r_p} = \frac{ma}{6\pi\eta r_p}$$

Hierbei ist $K = ma$ die auf das Partikel mit der Masse m und dem Radius r_p ausgeübte Kraft im Schwerfeld. Im Feld herrscht die Beschleunigung a , angegeben in Vielfachen der Erdbeschleunigung $g = 981 \text{ (cm} \cdot \text{s}^{-2}\text{)}$. η ist in dieser Gleichung die Viskosität des Mediums, in dem sich das Partikel bewegt. Die Sedimentationsgeschwindigkeit eines Partikels ist also proportional seiner Masse und der angewandten Zentrifugalbeschleunigung und umgekehrt proportional dem Teilchenradius und der Viskosität des Mediums.

Für das Zentrifugalfeld gilt:

$$a = \omega^2 r_R$$

r_R ist der Radius des Rotors oder genauer die jeweilige Entfernung des Partikels von der Drehachse und ω die Winkelgeschwindigkeit.

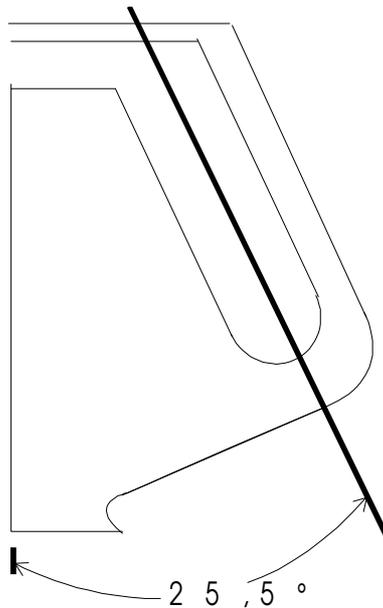


Abb. 2: Schnitt durch einen Festwinkel –Rotor mit Angabe des Neigungswinkels der Zentrifugenröhrchen (51).

2.3.3 Spektralphotometrische Messung

Die Konzentration von PBV wurde mit Hilfe spektralphotometrischer Messung, bei einer Wellenlänge von 635 nm, ermittelt.

Wird Licht durch eine Substanz, z.B. durch ein in einem farblosen Lösemittel gelöster Farbstoff, gestrahlt, wird ein Teil der einfallenden Strahlung I_0 , absorbiert ($= I_a$) ein weiterer Teil wird reflektiert oder gestreut ($= I_r$) und der Rest wird durch die Probe ungehindert transmittiert ($= I_t$) (Abb. 3).

Damit gilt (31):

$$I_0 = I_a + I_r + I_t$$

Der Transmissionsgrad T, der Reflektionsgrad R und der Absorptionsgrad A errechnen sich nach folgenden Formeln:

$$\mathbf{T} = \frac{I_t}{I_0}; \quad \mathbf{R} = \frac{I_r}{I_0}; \quad \mathbf{A} = \frac{I_a}{I_0}$$

Die Absorption A (Extinktion) wird als optische Dichte angegeben. Die Absorption A ist von der Schichtdicke der Probe d und der Wellenlänge λ des eingestrahltten Lichtes abhängig:

$$\mathbf{A}_\lambda = m_\lambda d$$

Dabei wird m_λ als Absorptionsmodulus bezeichnet und aus der Konzentration c und dem molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten ϵ_λ (Extinktionskoeffizienten) berechnet.

$$m_\lambda = \epsilon_\lambda c$$

Die Kombination beider Gleichungen ergibt das Lambert-Beersche Gesetz:

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda c$$

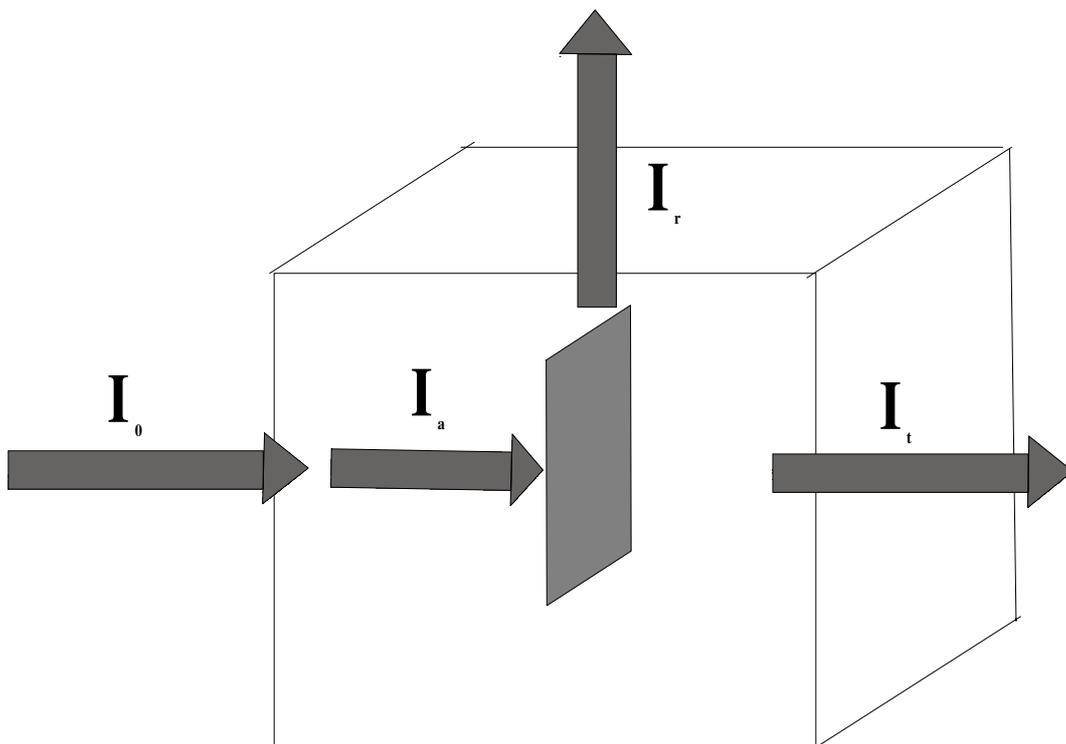


Abb. 3: Ein Lichtstrahl der durch eine Kuvette mit einer gefärbten Lösung fällt, wird teilweise absorbiert (I_a), teilweise reflektiert oder gestreut (I_r) und geht teilweise ungehindert durch (I_t) (31).

Der Absorptionskoeffizient für PBV in Ethanol wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe ermittelt (Abb. 4):

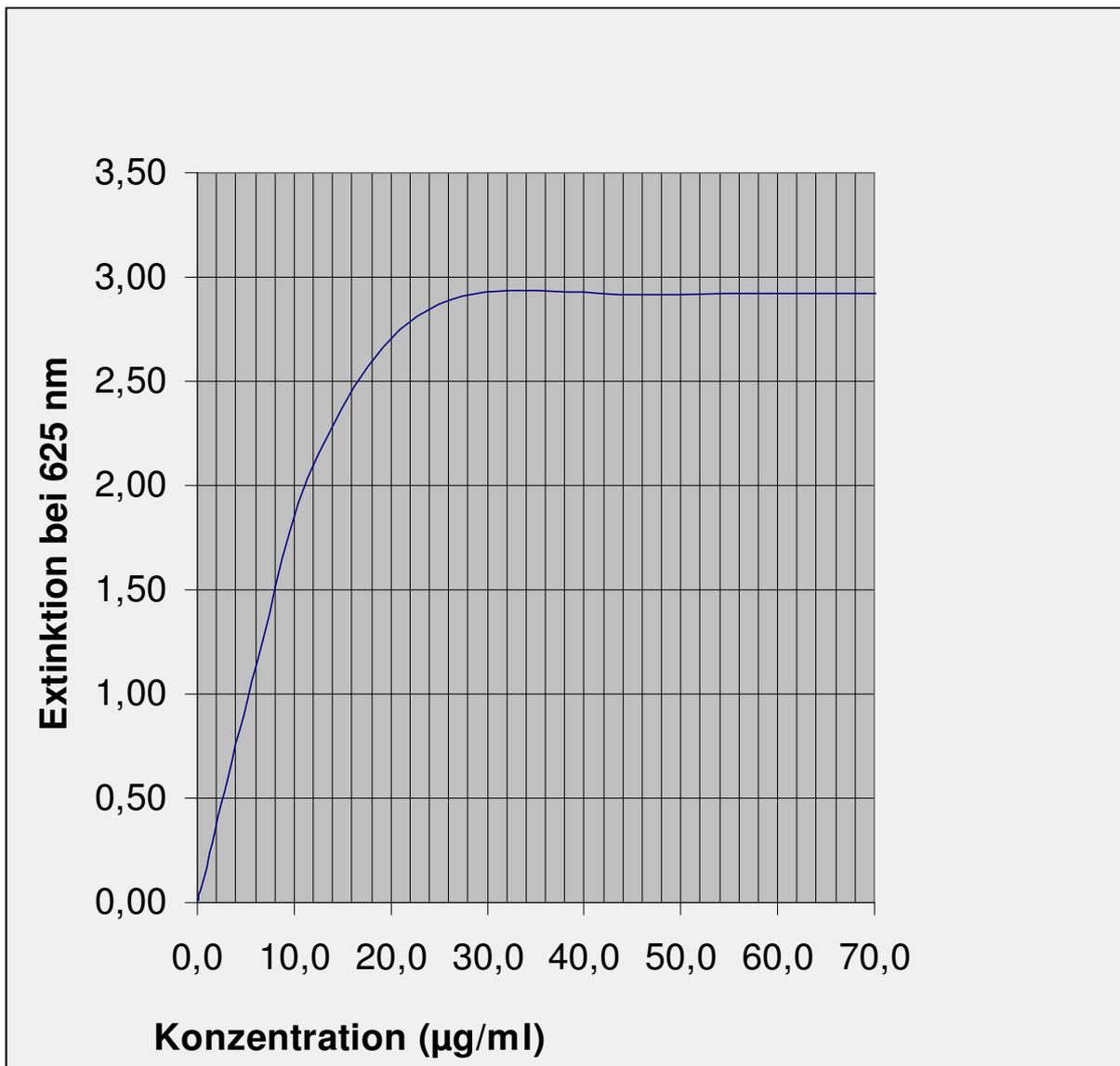


Abb. 4: Extinktionen der Verdünnungsreihe von Patentblau V gelöst in Ethanol, bei einer Wellenlänge von 625 nm.

3. Ergebnisse

3.1 Optische Auswertung

Bei Tier 1 waren drei Stunden nach der Injektion die Halslymphknoten der rechten Seite gut gefärbt (Abb. 5, 6). Aufgrund des guten Kontrastes konnte sie schnell aufgefunden und entnommen werden, was sich auf der linken Seite (Abb. 7) wesentlich schwieriger gestaltete. Die iliakalen und inguinalen Lymphknoten waren samt der benachbarten Lymphgefäße bei Tier 1 beidseitig gut gefärbt (Abb. 8, 9). Allerdings wurde das Operationsfeld nach Durchtrennen der Lymphgefäße mit PBV kontaminiert, sodass die Unterscheidung zwischen den einzelnen anatomischen Strukturen erschwert war.

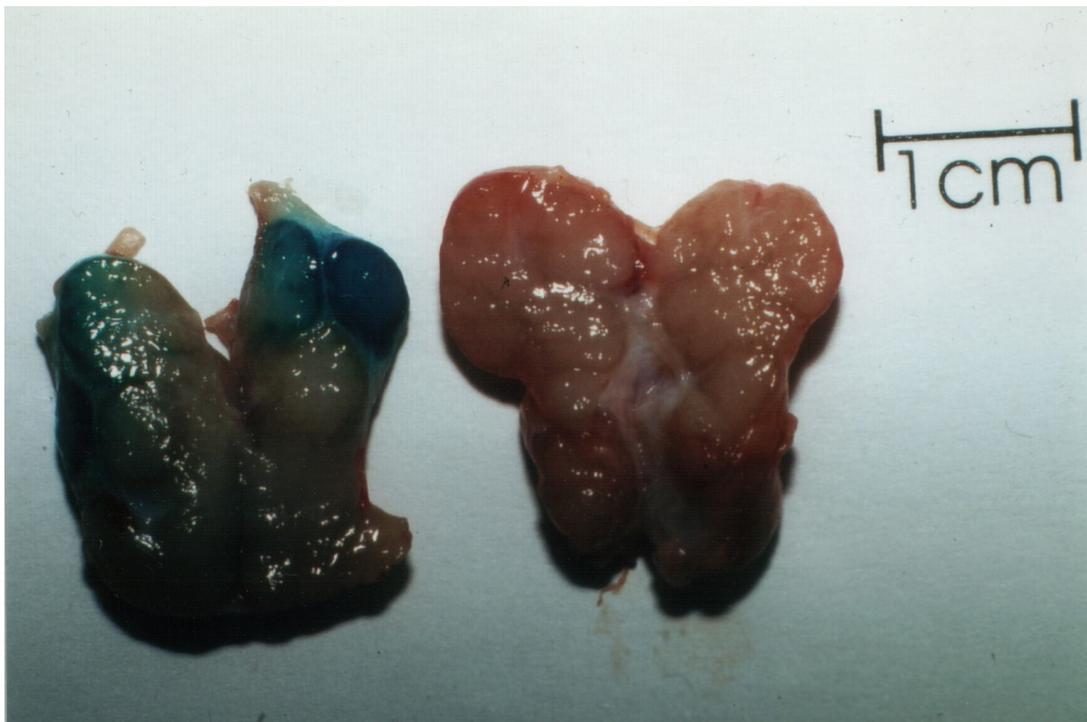


Abb. 5: Tier 1; Zervikale Lymphknoten der linken und rechten Seite 3 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

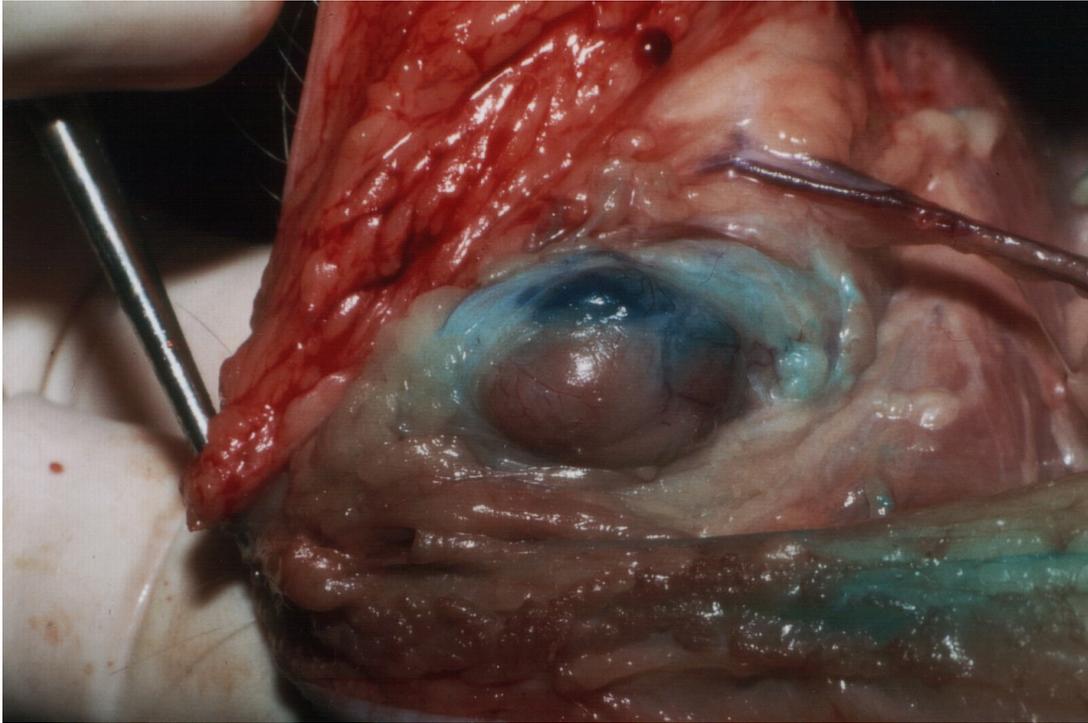


Abb. 6: Tier 1; Zervikale Lymphknoten der rechten Seite in situ, 3 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen.

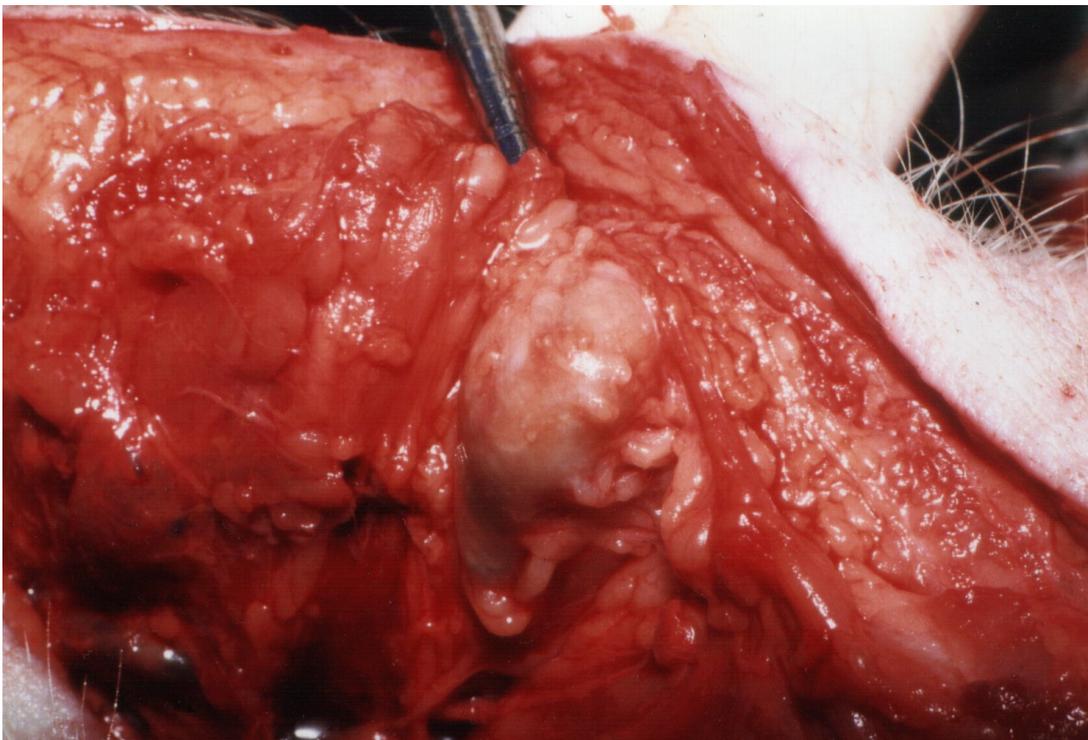


Abb. 7: Tier 1; Zervikale Lymphknoten der linken Seite in situ, 3 Stunden nach perimamillärer Injektion wässriger PBV Lösung.

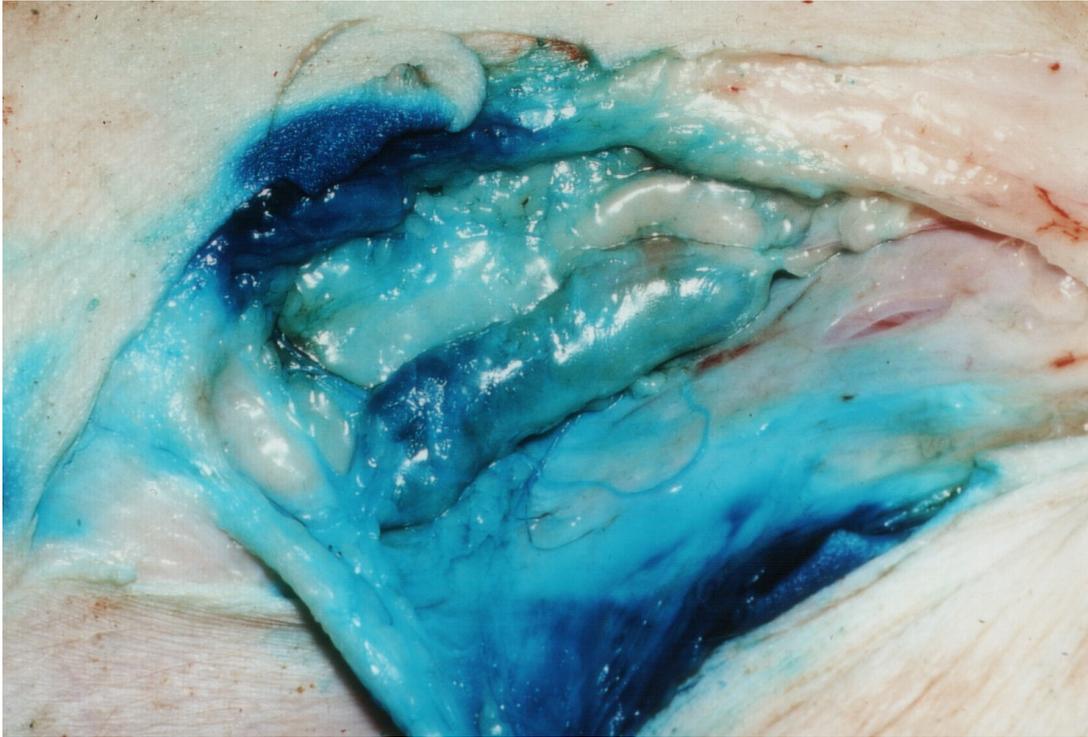


Abb. 8: Tier 1; Inguinale Lymphknoten der rechten Seite in situ 3 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen.

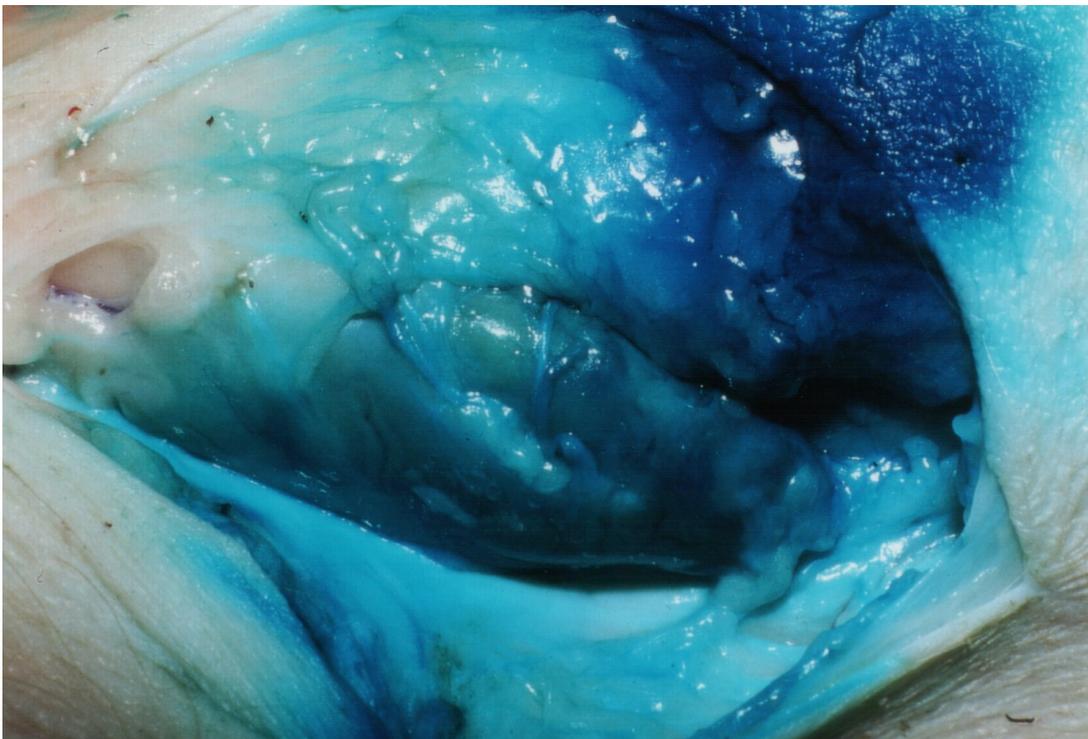


Abb. 9: Tier 1; Inguinale Lymphknoten der linken Seite in situ, 3 Stunden nach perimamillärer Injektion.

Sechs Stunden nach der Injektion waren bei Tier 2 am Hals nur die Lymphknoten der rechten Seite suffizient gefärbt (Abb. 10, 11). Die iliakalen und inguinalen Lymphknoten waren ebenfalls auf der rechten Seite stärker gefärbt (Abb. 12, 13).

Bei Tier 3 waren nach 6 Stunden die zervikalen Lymphknoten beiderseits nicht auffindbar. Von den inguinalen Lymphknoten zeigte die rechte Seite eine stärkere Färbung (Abb. 14, 15).

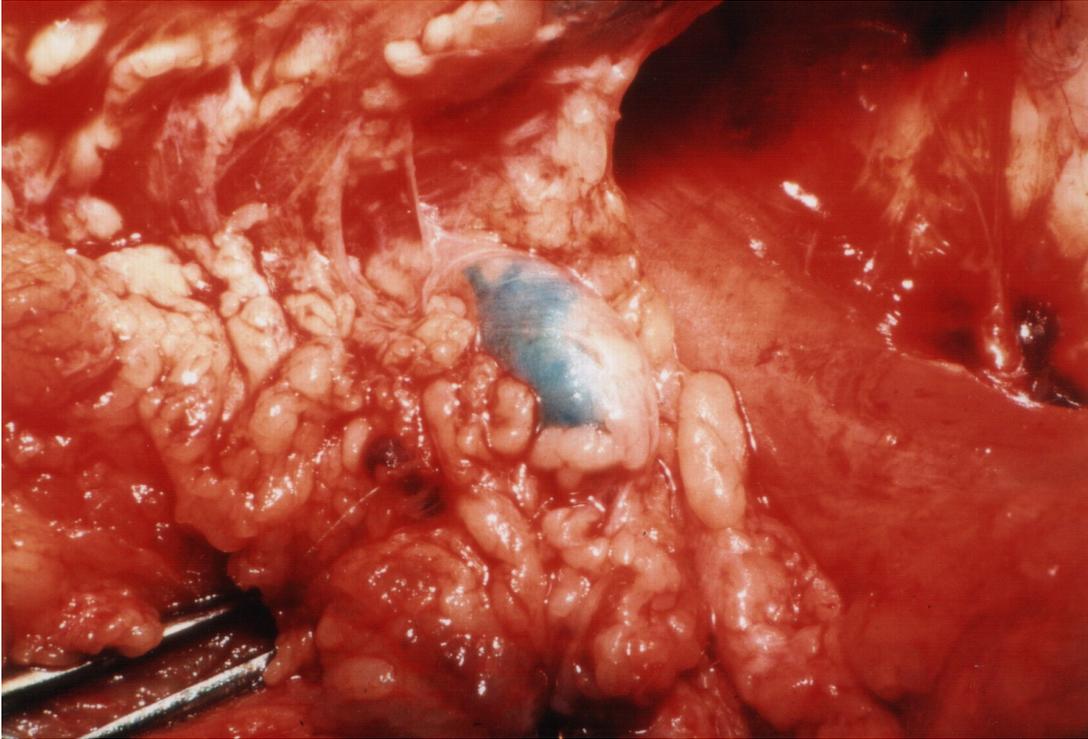


Abb. 10: Tier 2; Zervikale Lymphknoten der rechten Seite in situ, 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen.

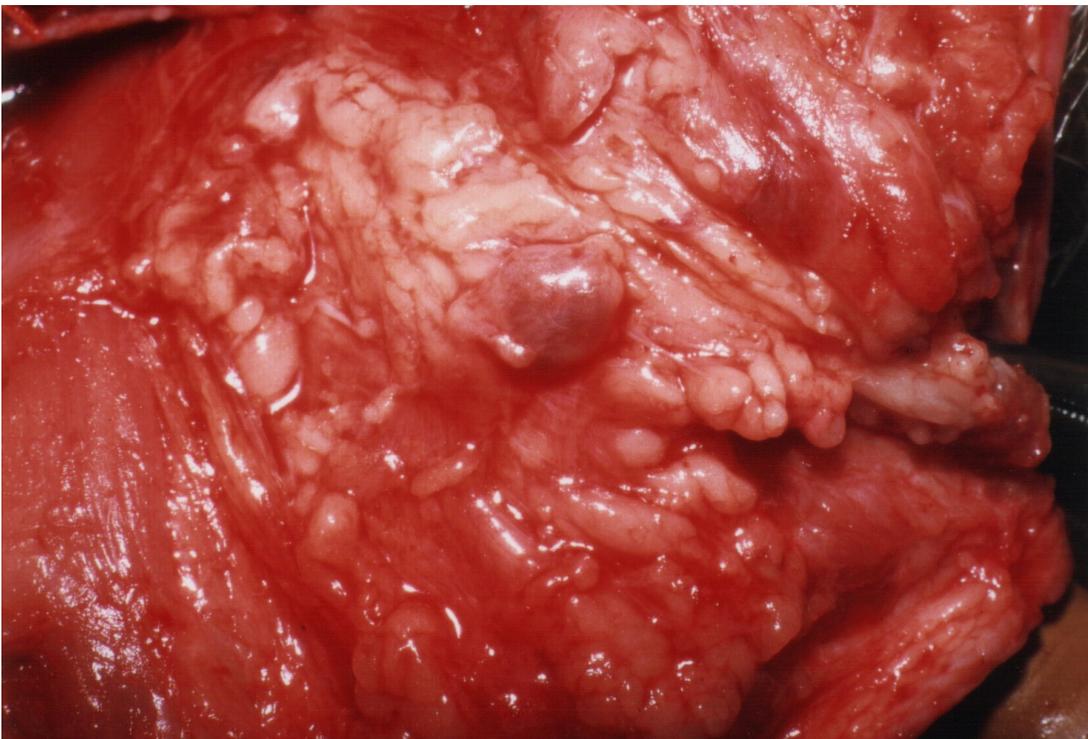


Abb. 11: Tier 2; Zervikale Lymphknoten der linken Seite in situ, 6 Stunden nach perimamillärer Injektion wässriger PBV Lösung.

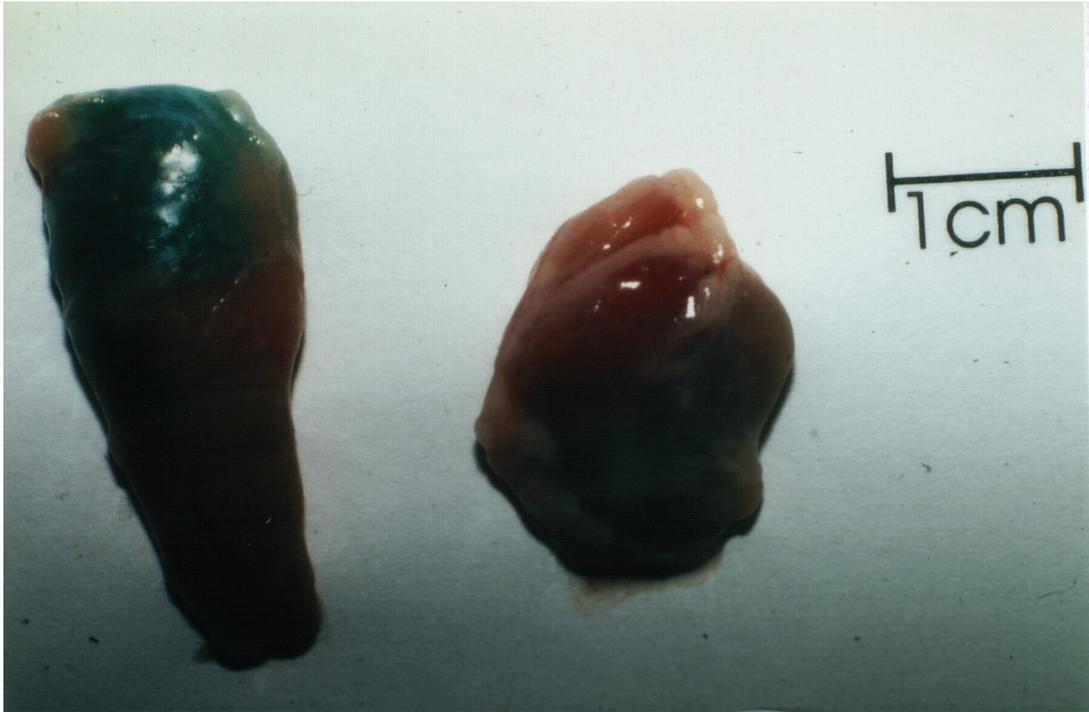


Abb. 12: Tier 2; Iliakale Lymphknoten der linken und rechten Seite 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

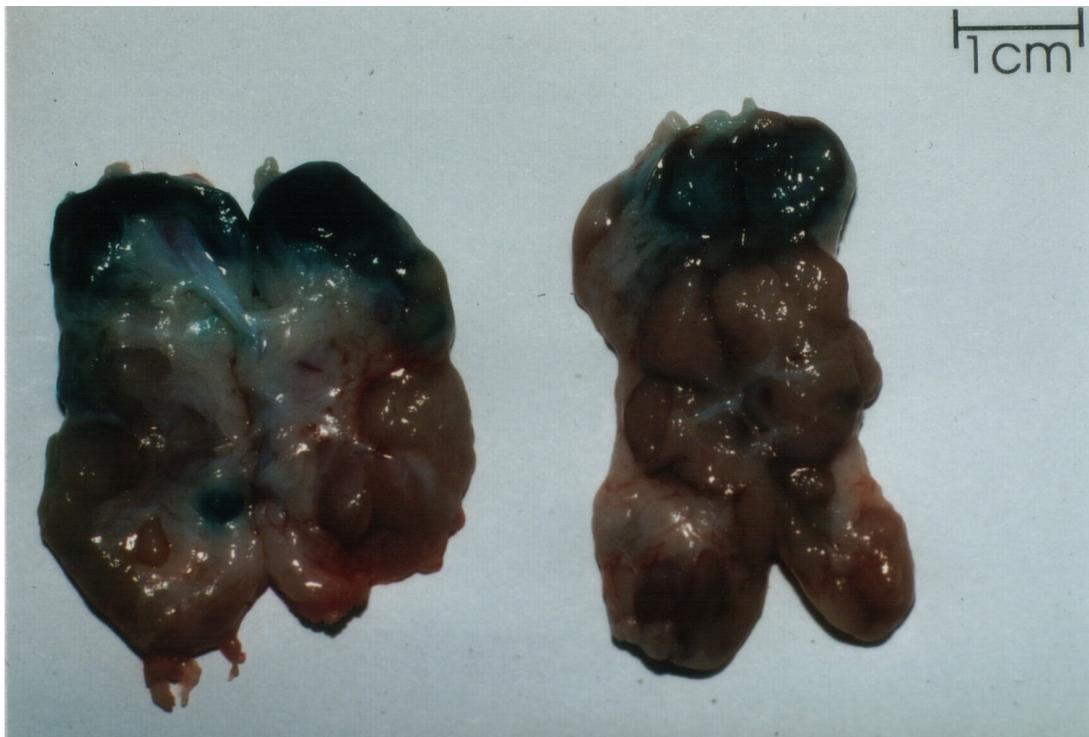
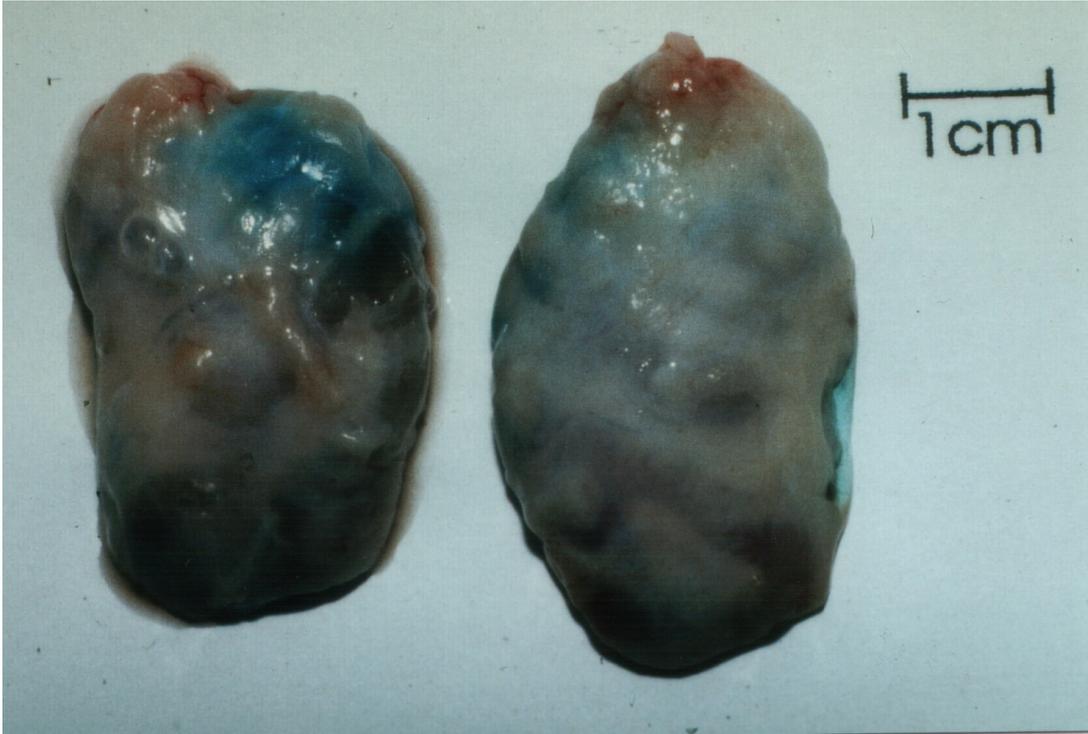


Abb. 13: Tier 2; Inguinale Lymphknoten der linken und rechten Seite 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.



14: Tier 3; Inguinale Lymphknoten der linken und rechten Seite 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

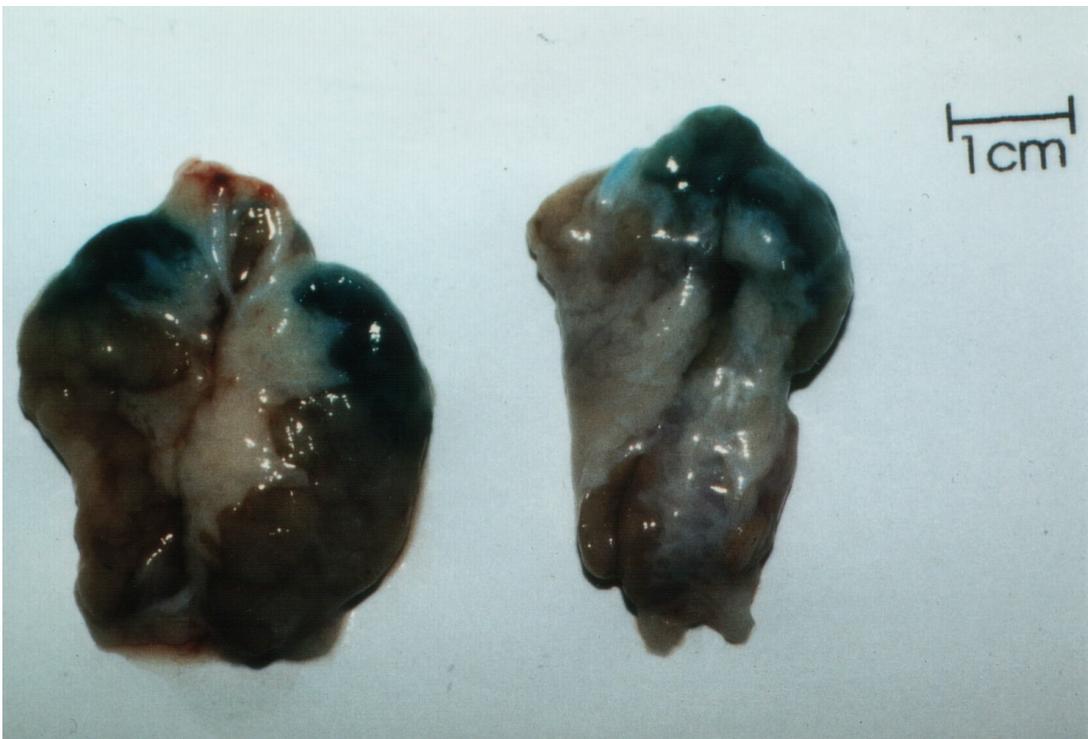


Abb. 15: Tier 3; Inguinale Lymphknoten der linken und rechten Seite 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

Bei Tier 4 waren 12 Stunden nach der Injektion die Halslymphknoten der rechten Seite gut gefärbt (Abb. 16, 18). Die zervikalen Lymphknoten der linken Seite hingegen zeigten keine sichtbare Färbung (Abb. 17, 18).

Die inguinalen Lymphknoten waren ebenfalls auf der rechten Seite stärker gefärbt (Abb. 19, 20, 21).

Bei Tier 5 waren nach 12 Stunden die zervikalen und inguinalen Lymphknoten der rechten Seite besser gefärbt.

Die iliakalen Lymphknoten waren nur auf der rechten Seite gefärbt (Abb. 22, 23, 24, 25, 26).

Bei Tier 6 waren nur die rechten Zervikallymphknoten gefärbt.

Die inguinalen Lymphknoten zeigten auf der rechten Seite eine stärkere Färbung (Abb. 27, 28, 29, 30).

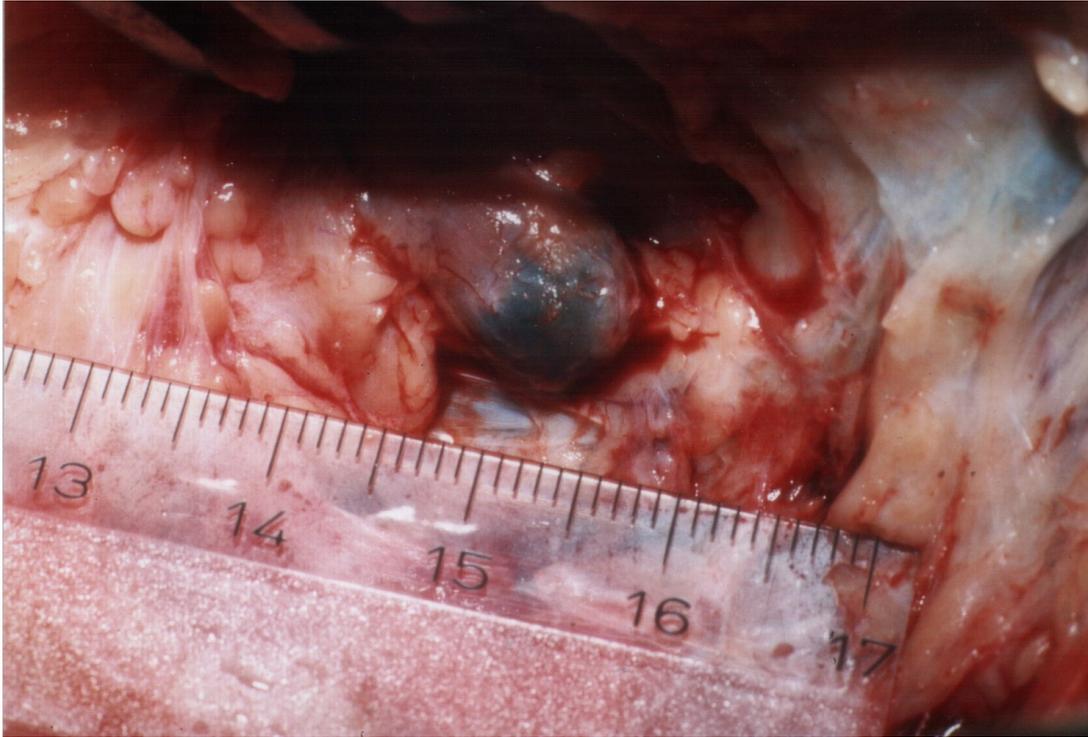


Abb. 16: Tier 4; Zervikale Lymphknoten der rechten Seite in situ, 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen.

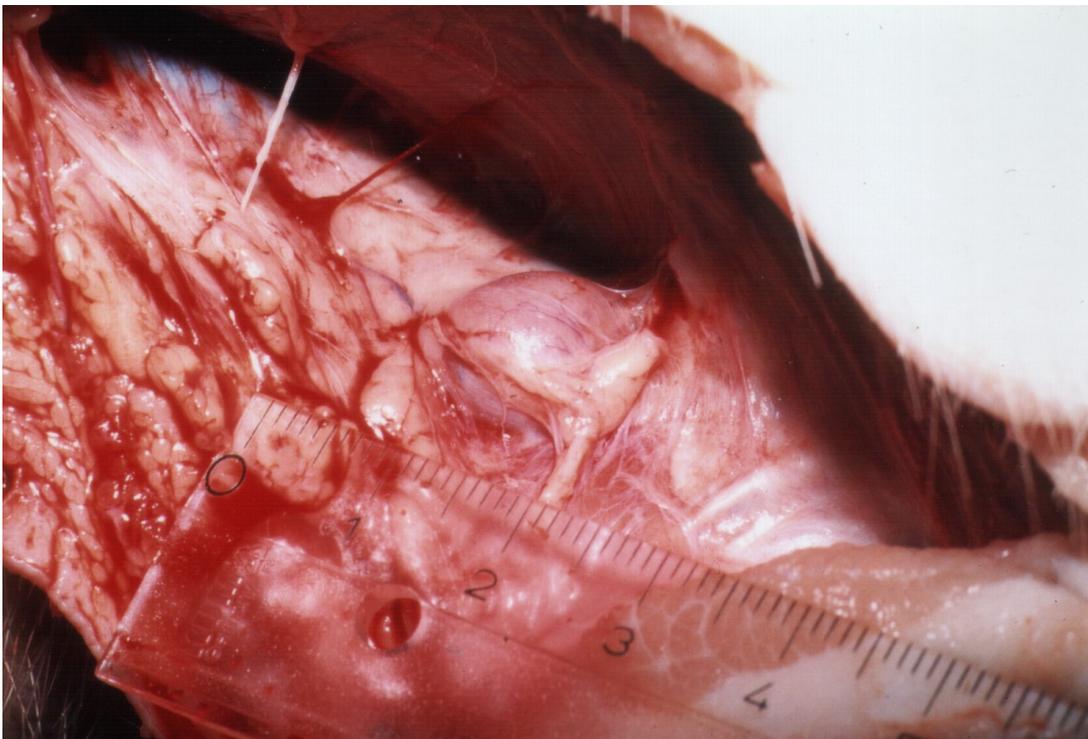


Abb. 17: Tier 4; Zervikale Lymphknoten der linken Seite in situ, 12 Stunden nach perimamillärer Injektion wässriger PBV Lösung.

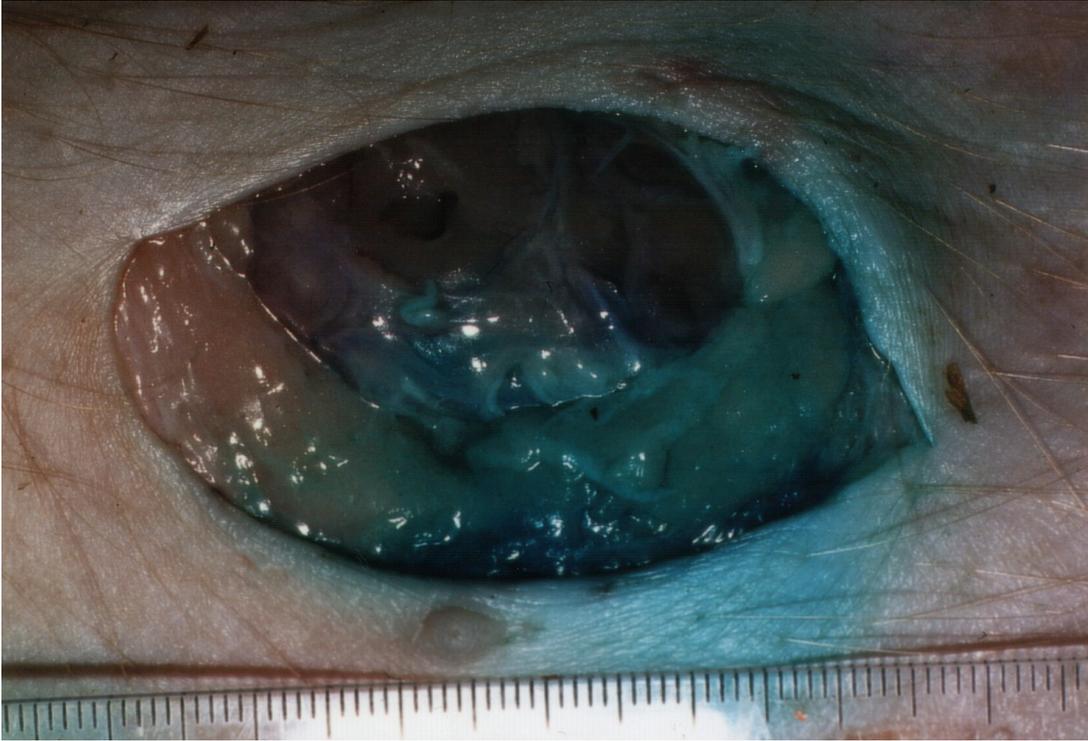


Abb. 18: Tier 4; Inguinale Lymphknoten der rechten Seite in situ, 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen.

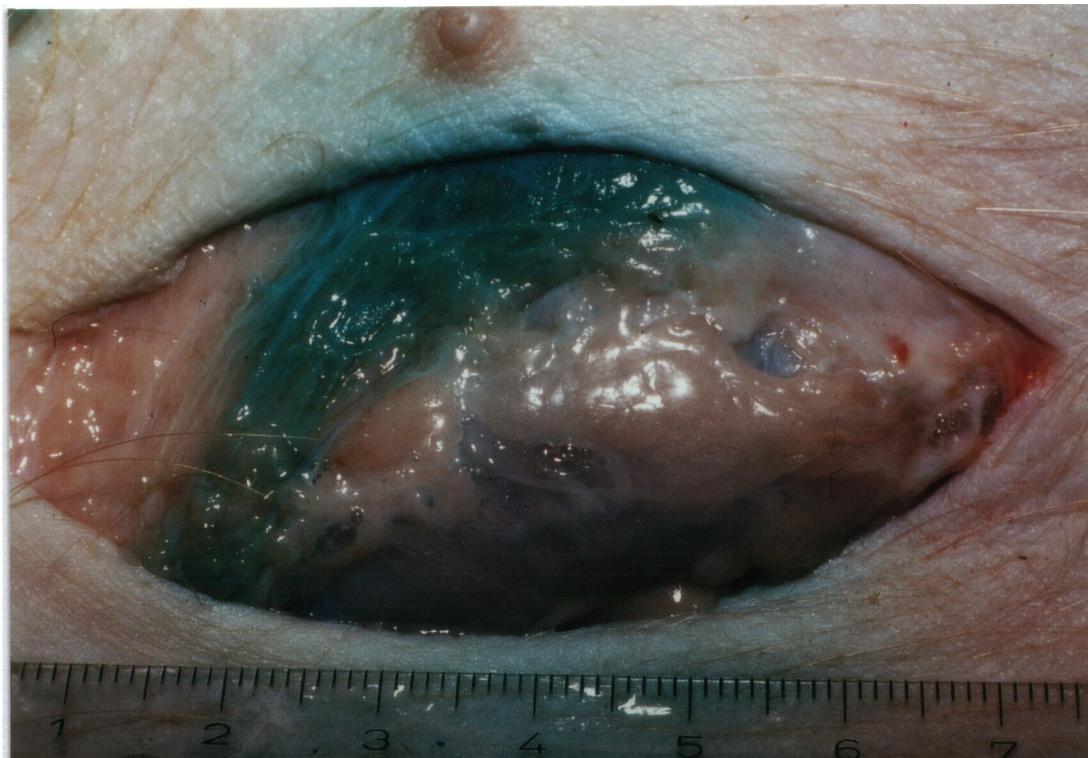


Abb. 19: Tier 4; Inguinale Lymphknoten der linken Seite in situ, 12 Stunden nach perimamillärer Injektion wässriger PBV Lösung.



Abb. 20: Tier 4; Zervikale Lymphknoten der linken und rechten Seite 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

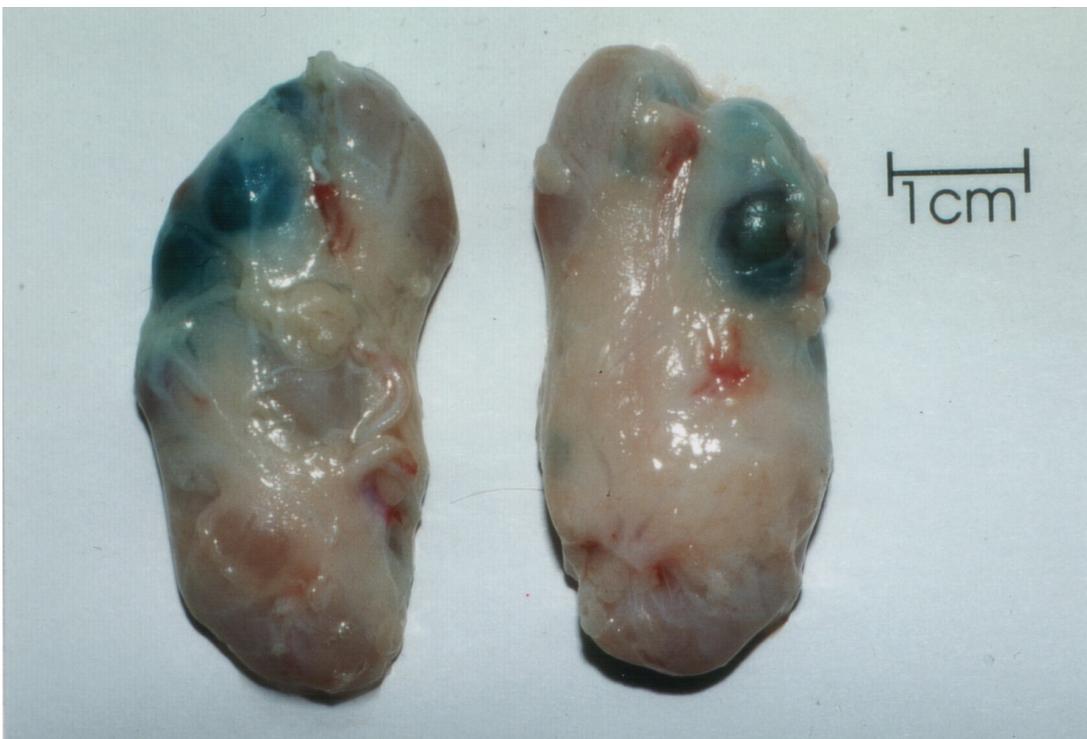


Abb. 21: Tier 4; Inguinale Lymphknoten der linken und rechten Seite 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.



Abb. 22: Tier 5; Zervikale Lymphknoten der linken und rechten Seite 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

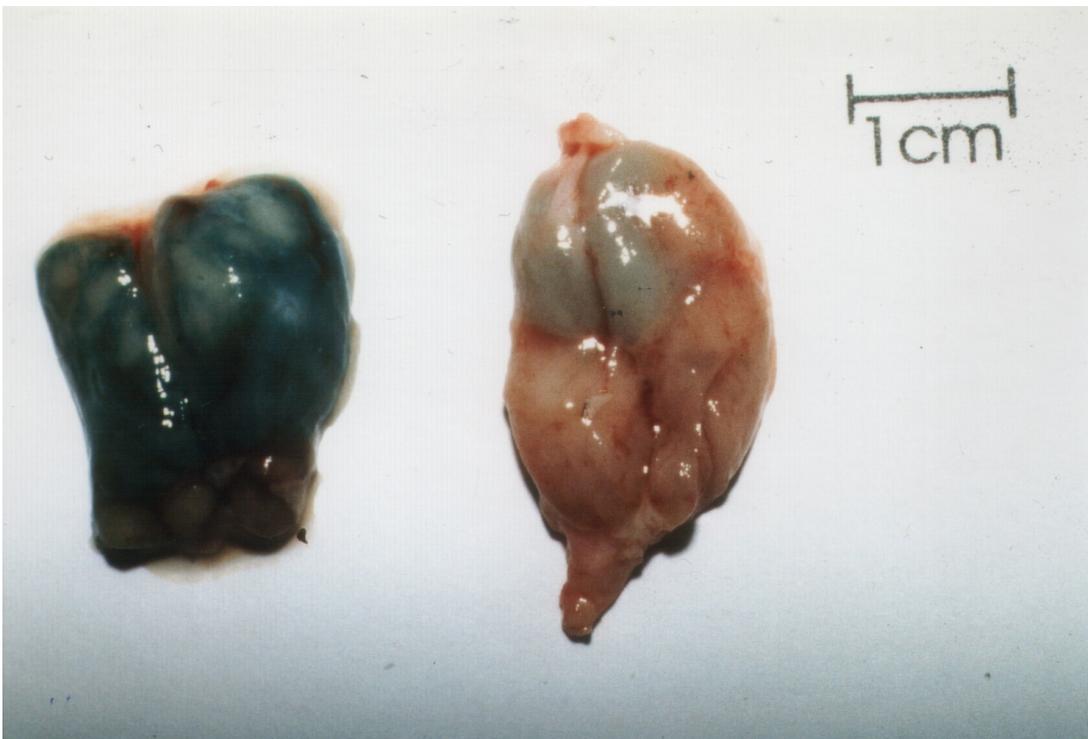


Abb. 23: Tier 5; Iliakale Lymphknoten der linken und rechten Seite 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

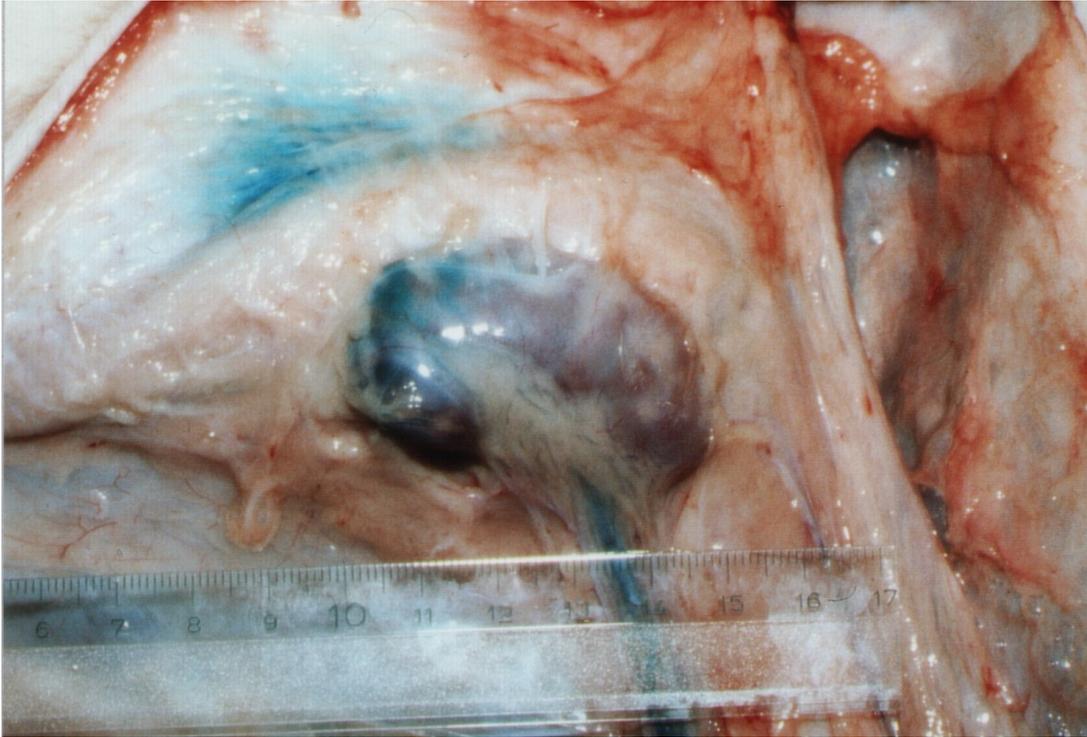


Abb. 24: Tier 5; Inguinale Lymphknoten der rechten Seite in situ, 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen.

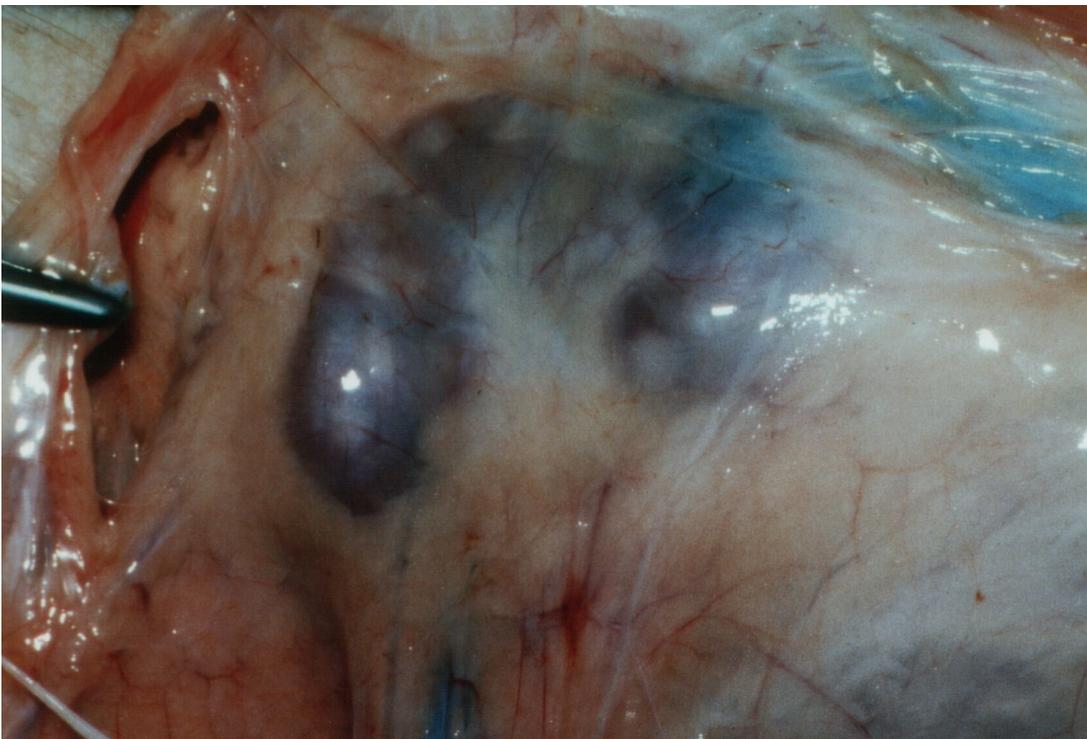


Abb. 25: Tier 5; Inguinale Lymphknoten der linken Seite in situ, 12 Stunden nach perimamillärer Injektion wässriger PBV Lösung.



Abb. 26: Tier 5; Inguinale Lymphknoten der linken und rechten Seite 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.



Abb. 27: Tier 6; Zervikale Lymphknoten der linken und rechten Seite 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.



Abb. 28: Tier 6; Inguinale Lymphknoten der rechten Seite in situ, 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen.

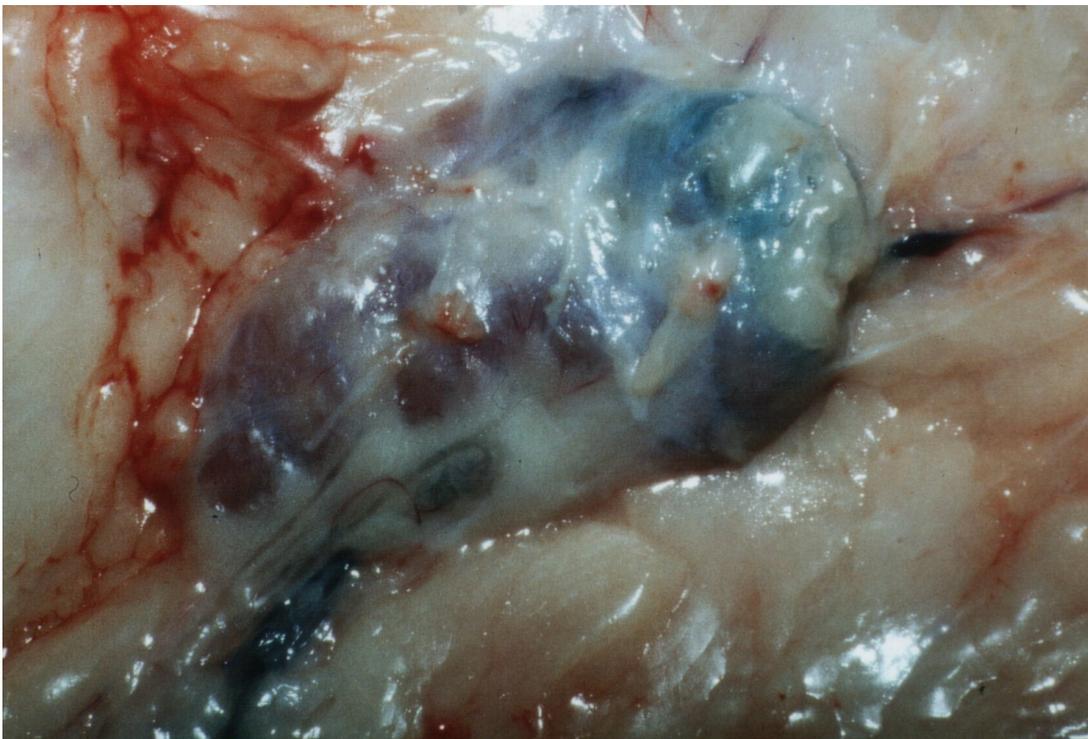


Abb. 29: Tier 6; Inguinale Lymphknoten der linken Seite in situ, 12 Stunden nach perimamillärer Injektion wässriger PBV Lösung.

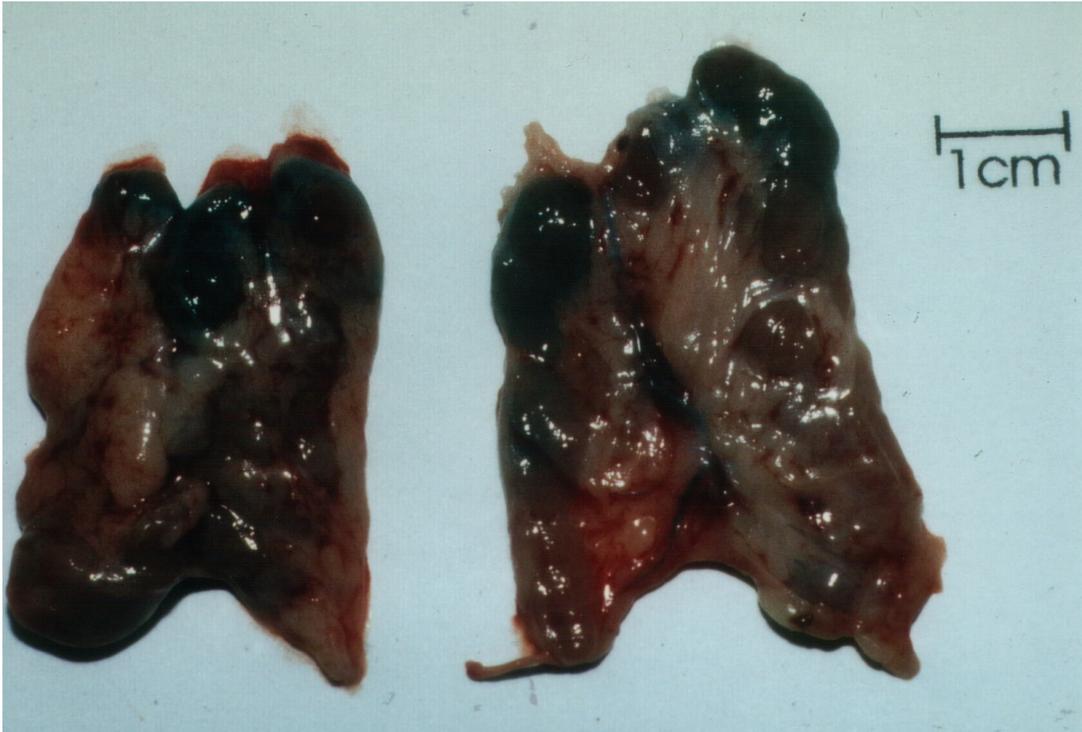


Abb. 30: Tier 6; Inguinale Lymphknoten der linken und rechten Seite 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

Vierundzwanzig Stunden nach der Injektion waren bei Tier 7 die zervikalen Lymphknoten wegen unzureichender Färbung nicht lokalisierbar. Die iliakalen Lymphknoten waren ebenfalls auf beiden Seiten nur schwach sehr gefärbt. Die inguinalen Lymphknoten waren nur auf der rechten Seite gut gefärbt (Abb. 31, 32, 33).

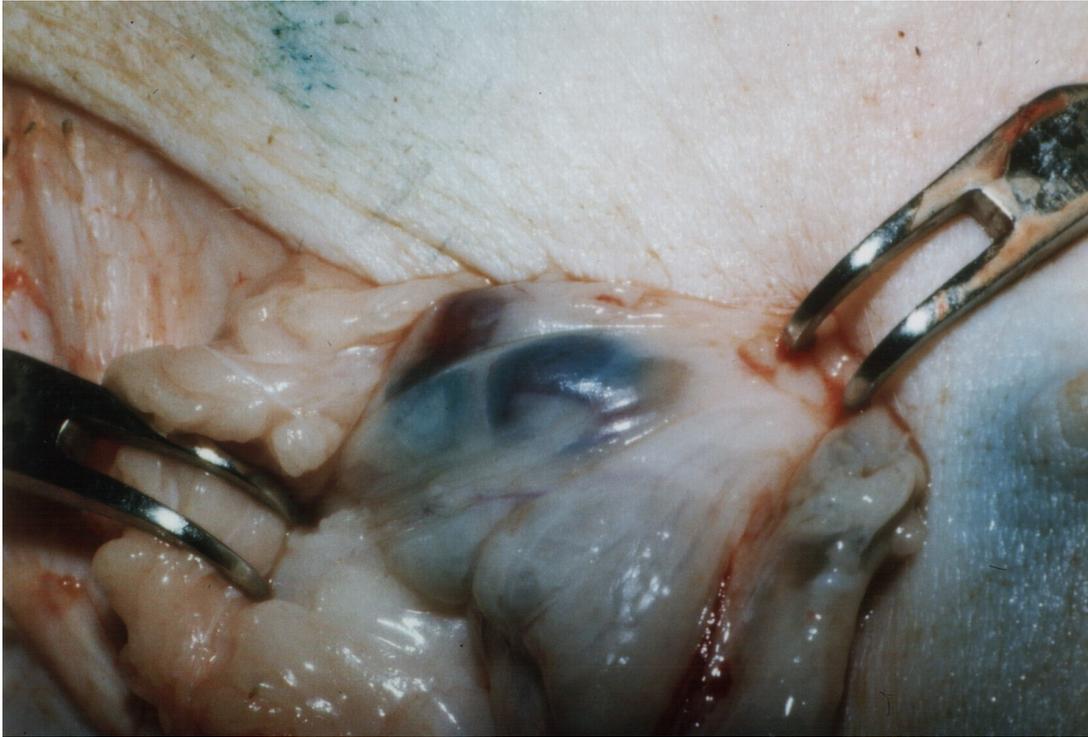


Abb. 31: Tier 7; Inguinale Lymphknoten der rechten Seite in situ, 24 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen.

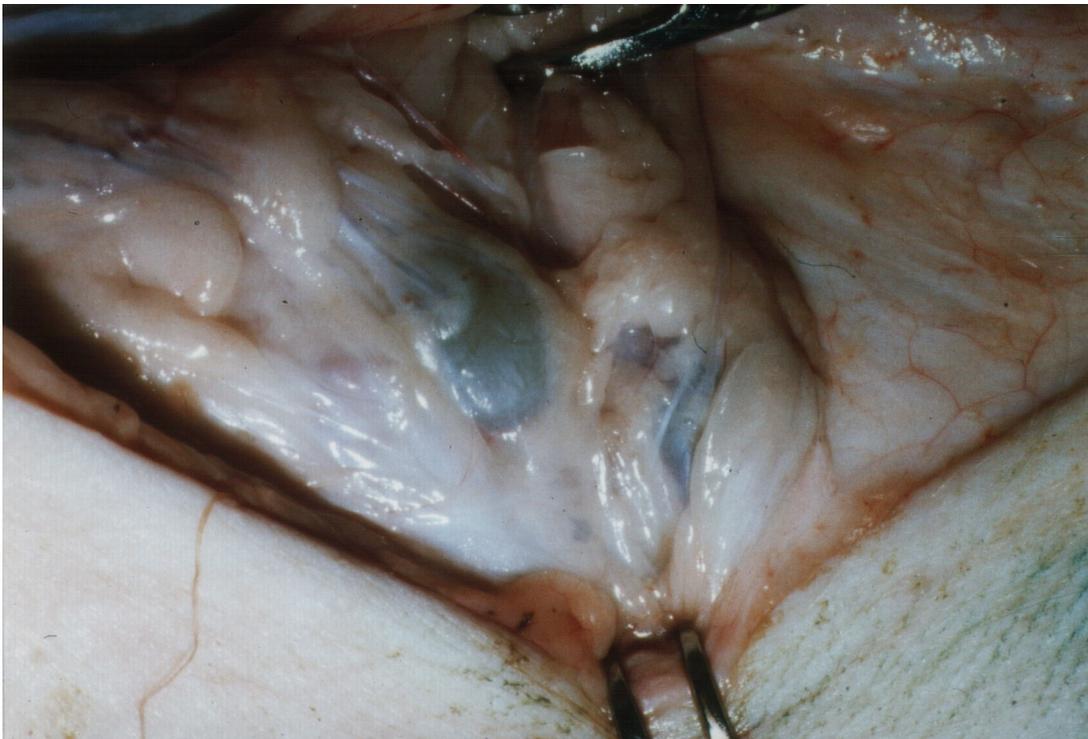


Abb. 32: Tier 7; Inguinale Lymphknoten der linken Seite in situ, 24 Stunden nach perimamillärer Injektion wässriger PBV Lösung.



Abb. 33: Tier 7; Inguinale Lymphknoten der linken und rechten Seite 24 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

3.2 Messergebnisse

Bei Tier 1 wiesen die zervikalen Lymphknoten der rechten Seite, 3 Stunden nach der Injektion, eine mehr als 160fach höhere Konzentration verglichen mit der linken Seite auf. Die iliakalen Lymphknoten der rechten Seite hatten eine 2.7fach höhere Konzentration gegenüber der linken Seite. Bei den inguinalen Lymphknoten wurde auf der rechten Seite eine Konzentration von beinahe 67 μg PBV/ g Gewebe erreicht und lag damit 4fach höher als auf der linken Seite. Die Menge an PBV war in den inguinalen Lymphknoten der rechten Seite 4,6fach höher als auf der linken Seite. In den Lymphknoten der Seite mit den Liposomen fand man insgesamt 531% des PBV Gehalts der Seite mit der wässrigen Präparation (Abb. 34, 35, 36).

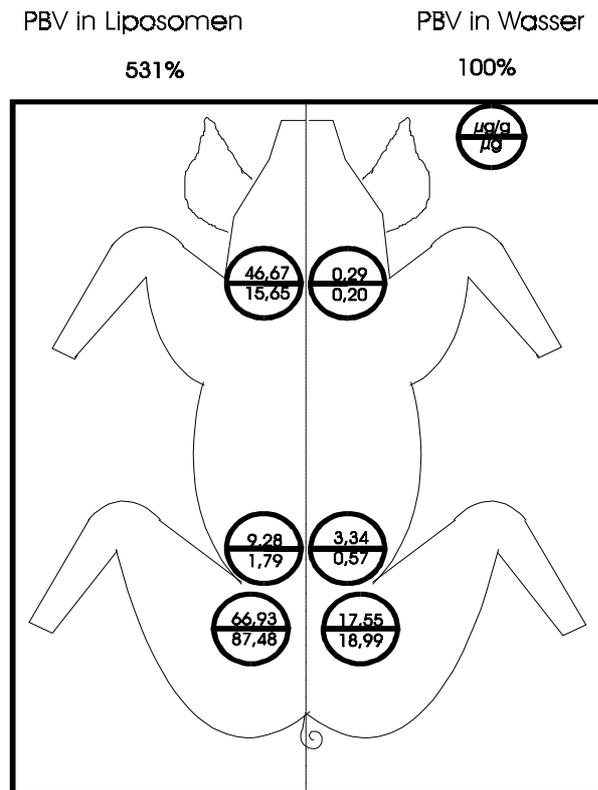


Abb. 34: Tier 1; PBV Konzentration ($\mu\text{g/g}$), Menge (μg) und Verhältnis links/rechts (%) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 3 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

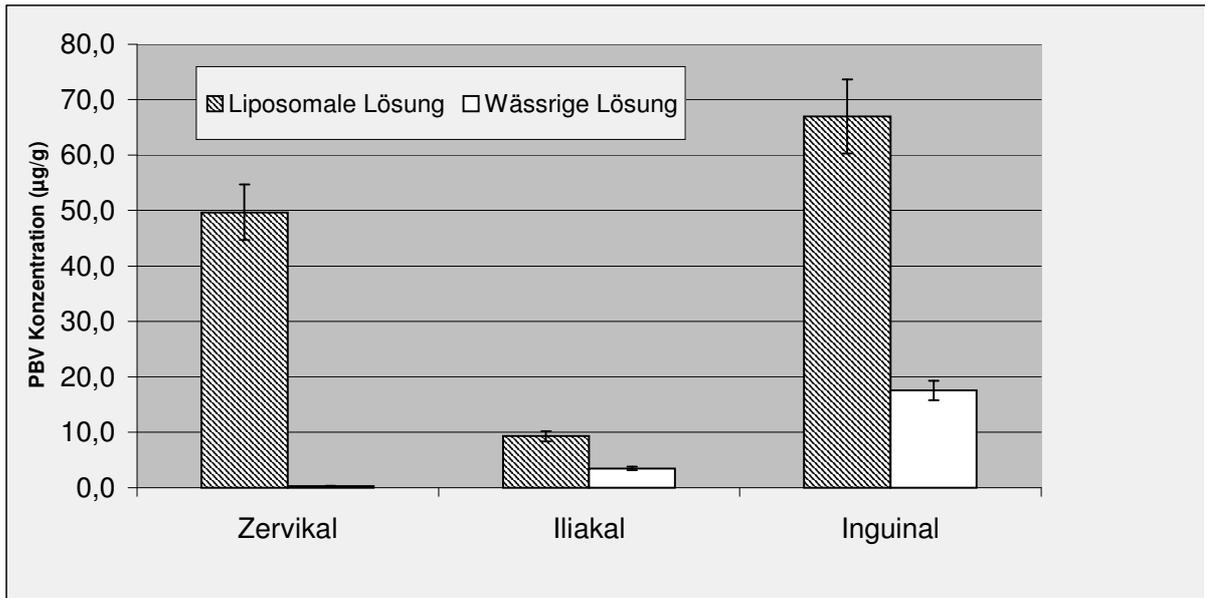


Abb. 35: Tier 1; PBV Konzentration ($\mu\text{g/g}$) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 3 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

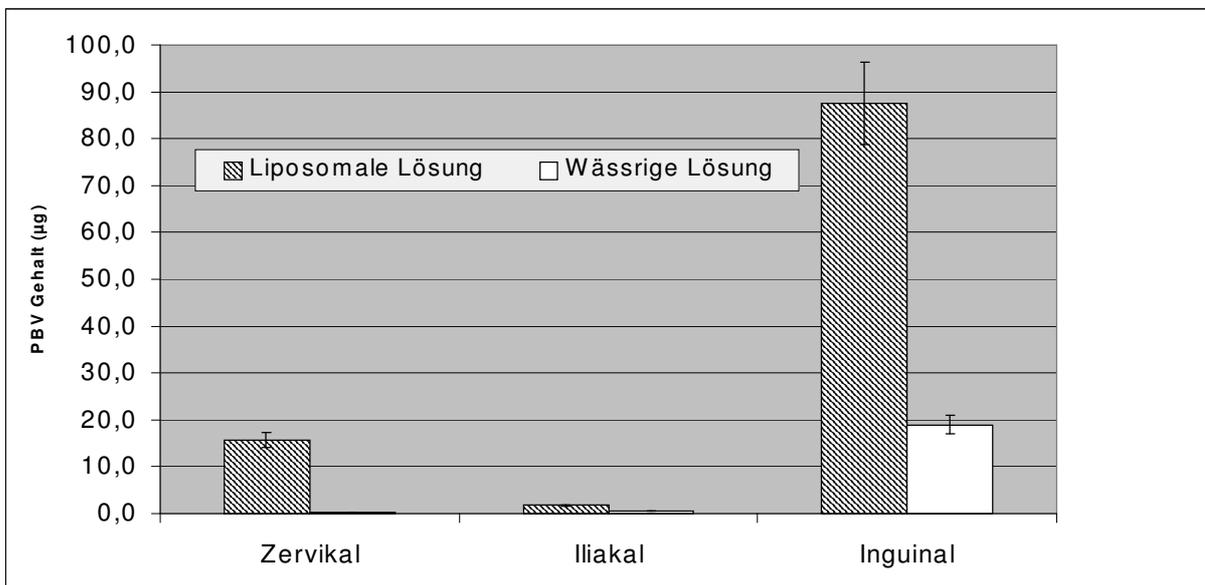


Abb. 36: Tier 1; PBV Menge (μg) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 3 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

Bei Tier 2 wiesen die zervikalen Lymphknoten der rechten Seite, 6 Stunden nach Injektion der Präparationen die 14fache PBV Konzentration verglichen mit der linken Seite auf. Die iliakalen Lymphknoten der rechten Seite hatten ebenfalls die ca. 30fache Menge an PBV gegenüber der linken Seite. In den inguinalen Lymphknoten wurde auf der rechten Seite die 20fache Menge an PBV gefunden. Die Gesamtmenge an PBV der rechten Seite lag bei 2195% der linken Seite (Abb. 37, 38, 39).

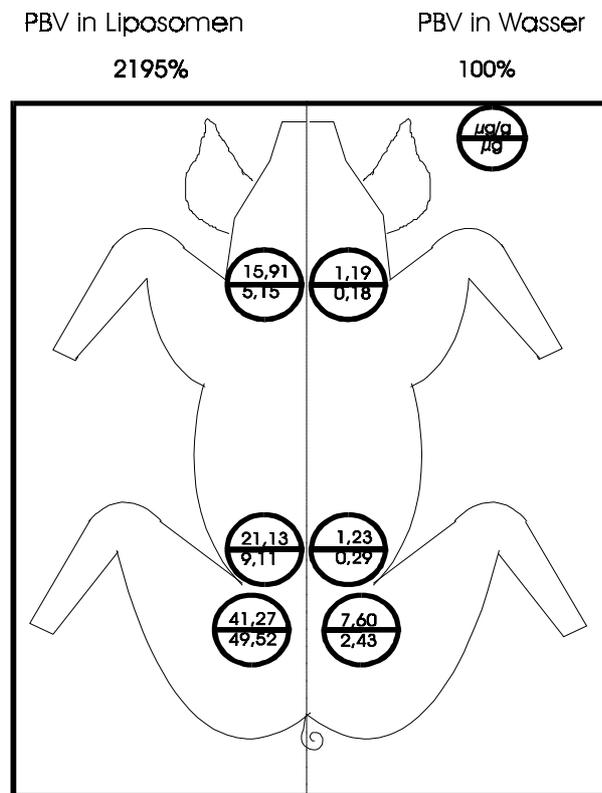


Abb. 37: Tier 2; PBV Konzentration (µg/g), Menge (µg) und Verhältnis links/rechts (%) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

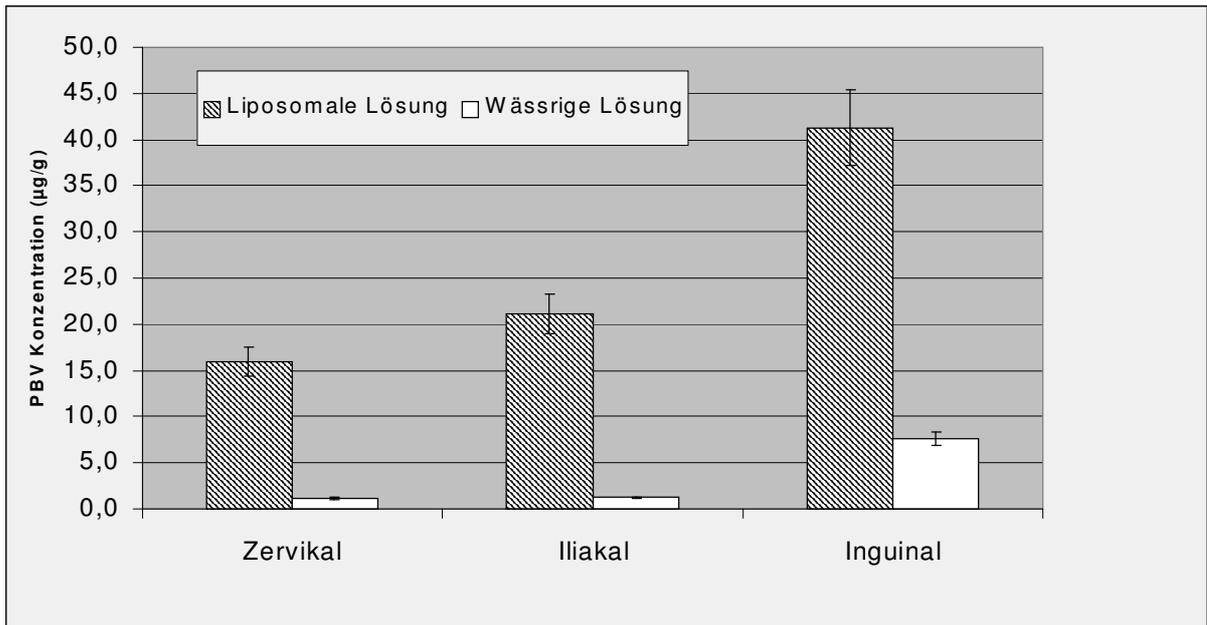


Abb. 38: Tier 2; PBV Konzentration ($\mu\text{g/g}$) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

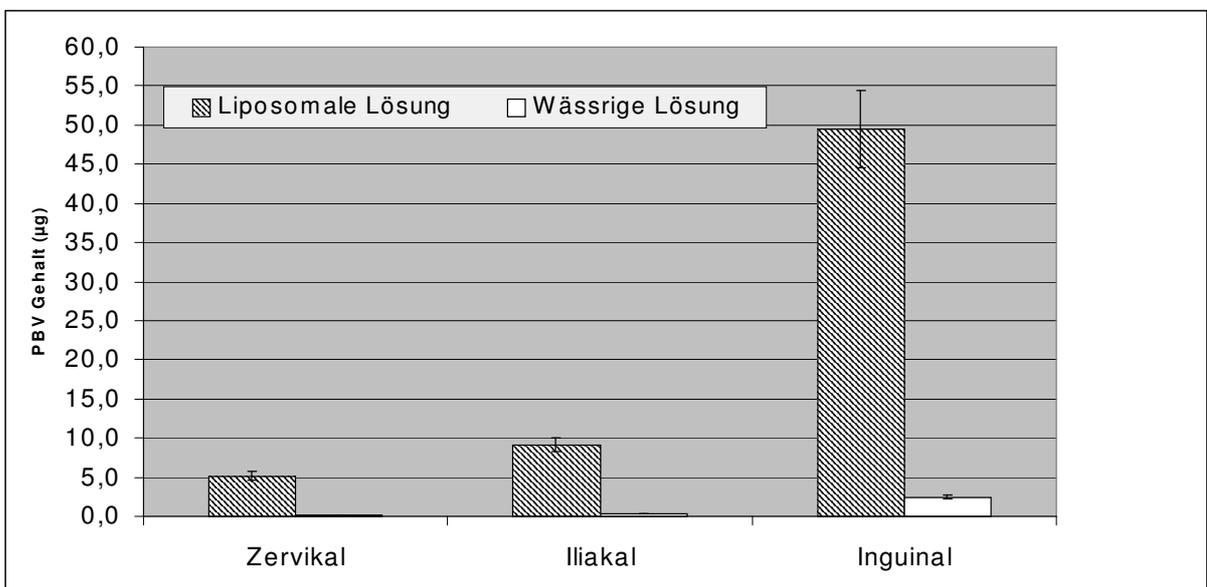


Abb. 39: Tier 2; PBV Menge (μg) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

Bei Tier 3 waren nach 6 Stunden die zervikalen Lymphknoten nicht lokalisierbar. Die iliakalen Lymphknoten der rechten Seite hatten die ca. 3fache PBV Menge und die 2.5fache PBV Konzentration gegenüber der linken Seite. In den inguinalen Lymphknoten wurde auf der rechten Seite die 4,5fache Menge an PBV gefunden. Die Gesamtmenge an PBV der rechten Seite lag bei 425% der linken Seite (Abb. 40, 41, 42).

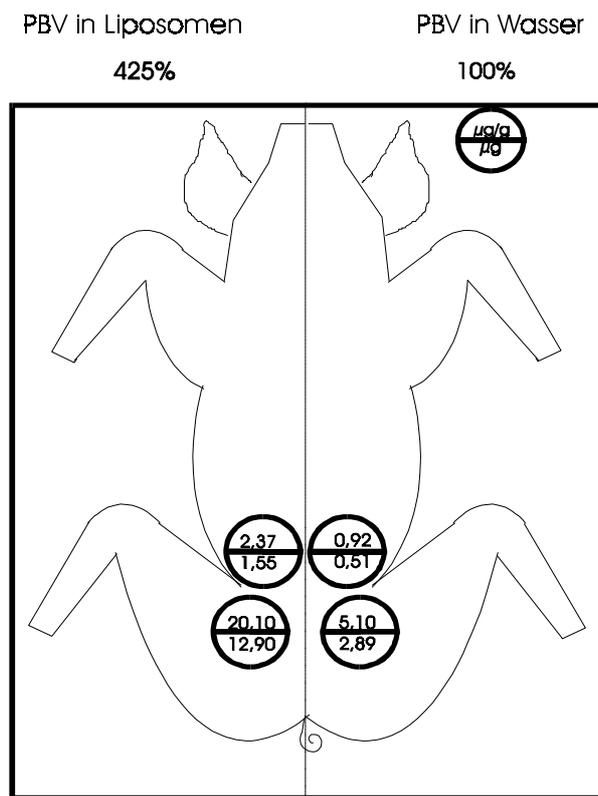


Abb. 40: Tier 3; PBV Konzentration (µg/g), Menge (µg) und Verhältnis links/rechts (%) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

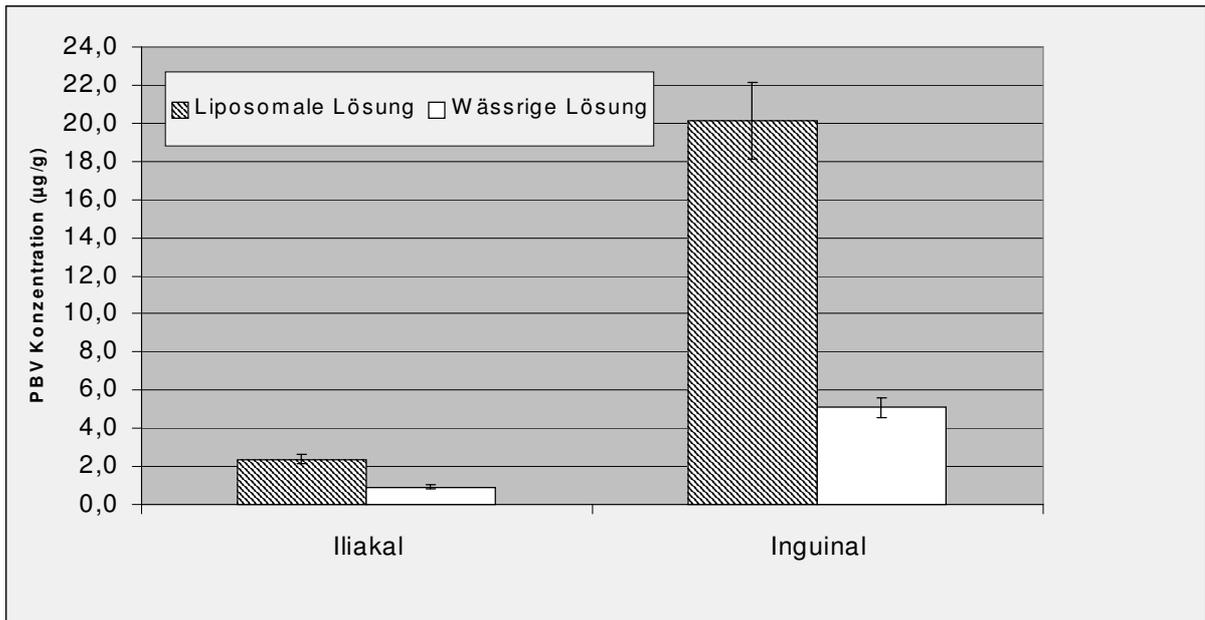


Abb. 41: Tier 3; PBV Konzentration ($\mu\text{g/g}$) der iliakalen und inguinalen Lymphknoten 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

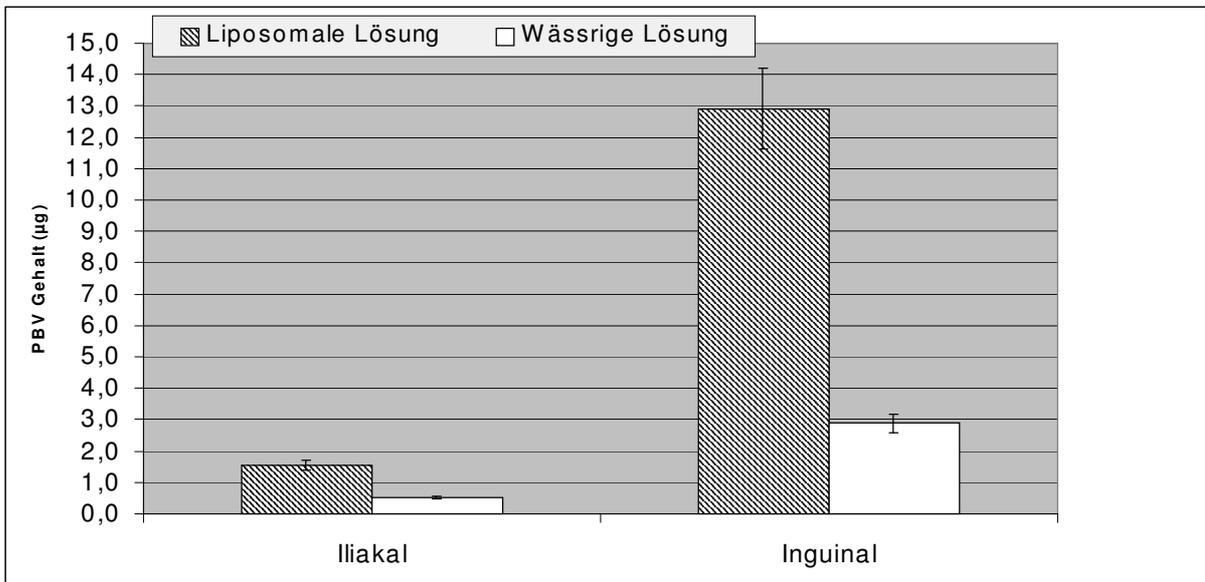


Abb. 42: Tier 3; PBV Menge (μg) der iliakalen und inguinalen Lymphknoten 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

Bei Tier 2 und 3 lag der Mittelwert der PBV Menge in den iliakalen Lymphknoten der rechten Seite ca. 9fach und in den inguinalen Lymphknoten ca. 12fach höher als in den Lymphknoten der linken Seite. Die rechten iliakalen Lymphknoten hatten eine 10fach höhere PBV Konzentration. Insgesamt lag der PBV Gehalt auf der rechten Seite bei 1285% des Gehalts der linken Seite (Abb. 43, 44, 45).

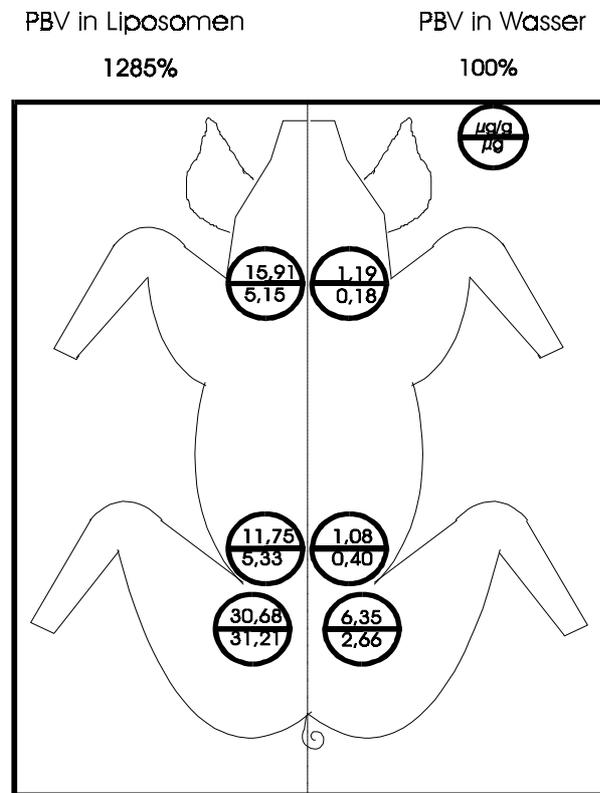


Abb. 43: Tier 2 und 3; Mittelwerte der PBV Konzentration ($\mu\text{g/g}$), Menge (μg) und Verhältnis links/rechts (%) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

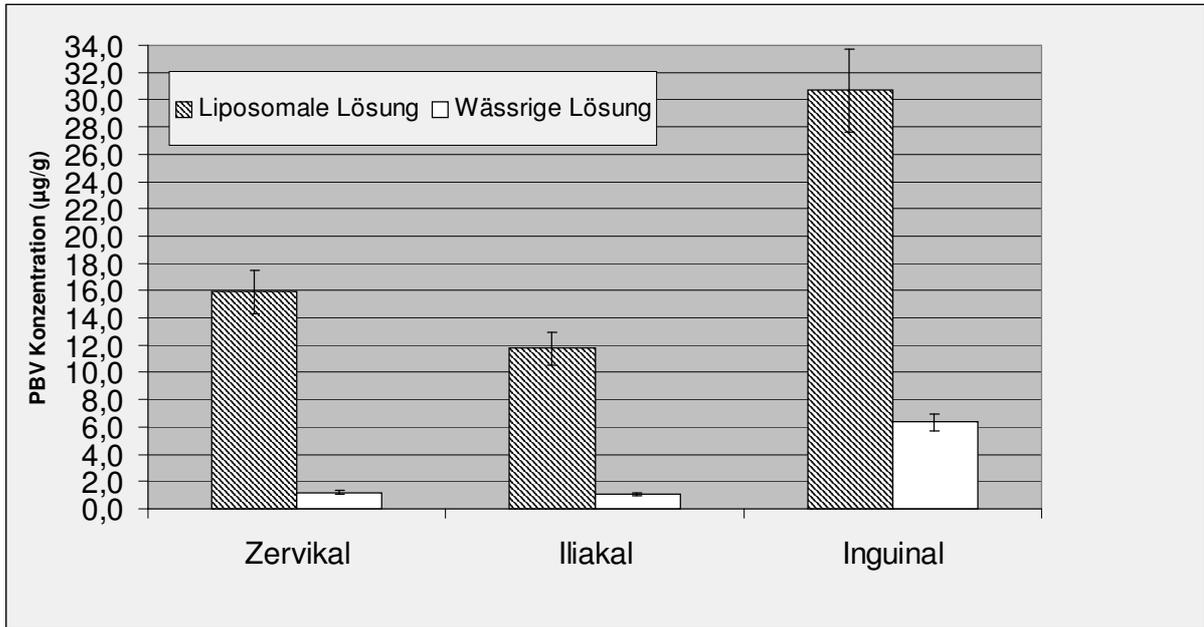


Abb. 44: Tier 2 und 3; Mittelwerte der PBV Konzentration ($\mu\text{g/g}$) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

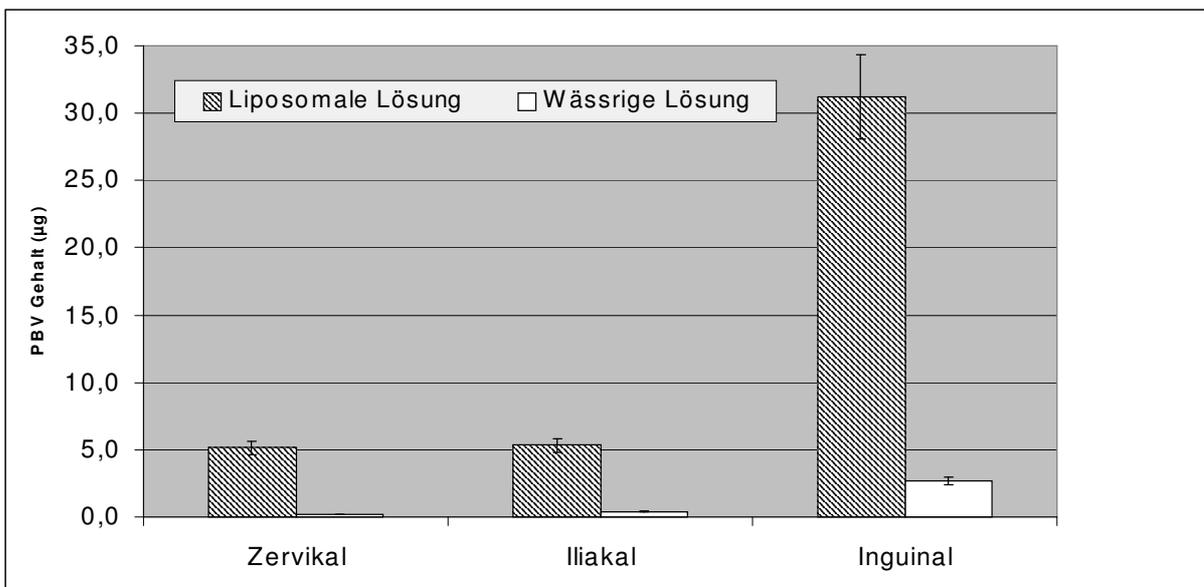


Abb. 45: Tier 2 und 3; Mittelwerte der PBV Menge (μg) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

Bei Tier 4 wiesen die zervikalen Lymphknoten der rechten Seite, 12 Stunden nach Injektion der Präparationen die 39fache PBV Konzentration verglichen mit der linken Seite auf. Die iliakalen Lymphknoten der rechten Seite hatten die doppelte Menge an PBV gegenüber der linken Seite. In den inguinalen Lymphknoten wurde auf der rechten Seite die 8fache Menge an PBV gefunden. Die Gesamtmenge an PBV der rechten Seite lag bei 785% der linken Seite (Abb. 46, 47, 48).

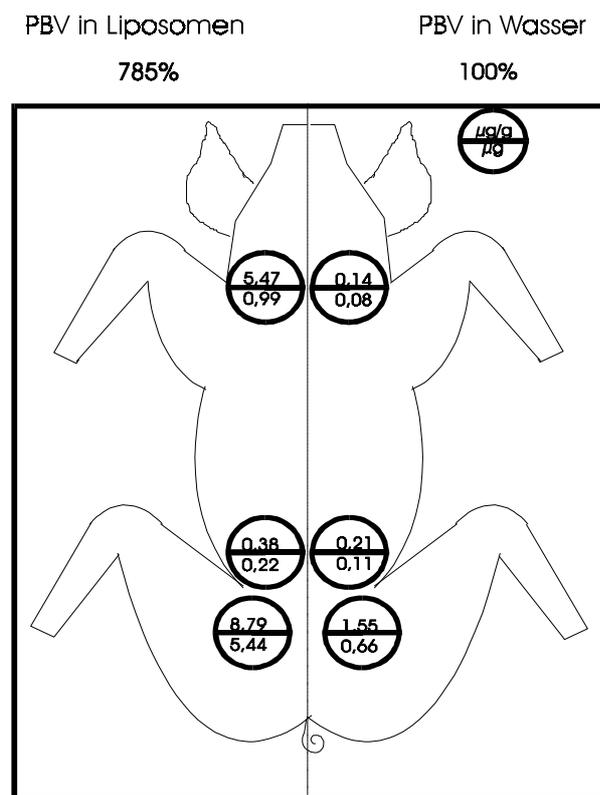


Abb. 46: Tier 4; PBV Konzentration (µg/g), Menge (µg) und Verhältnis links/rechts (%) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

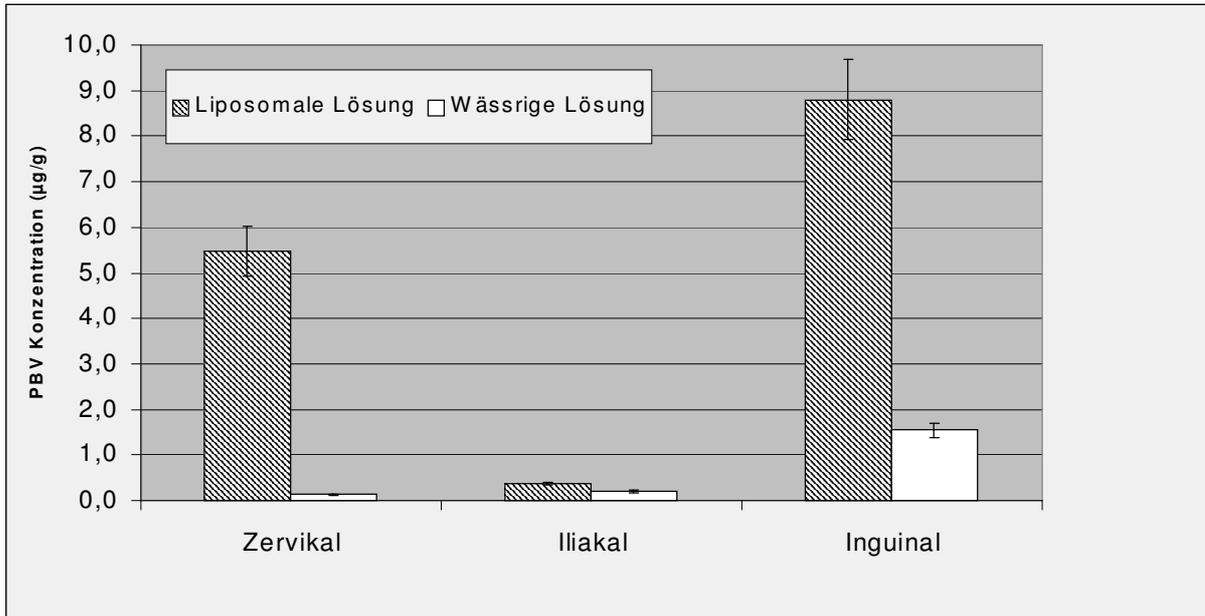


Abb. 47: Tier 4; PBV Konzentration ($\mu\text{g/g}$) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

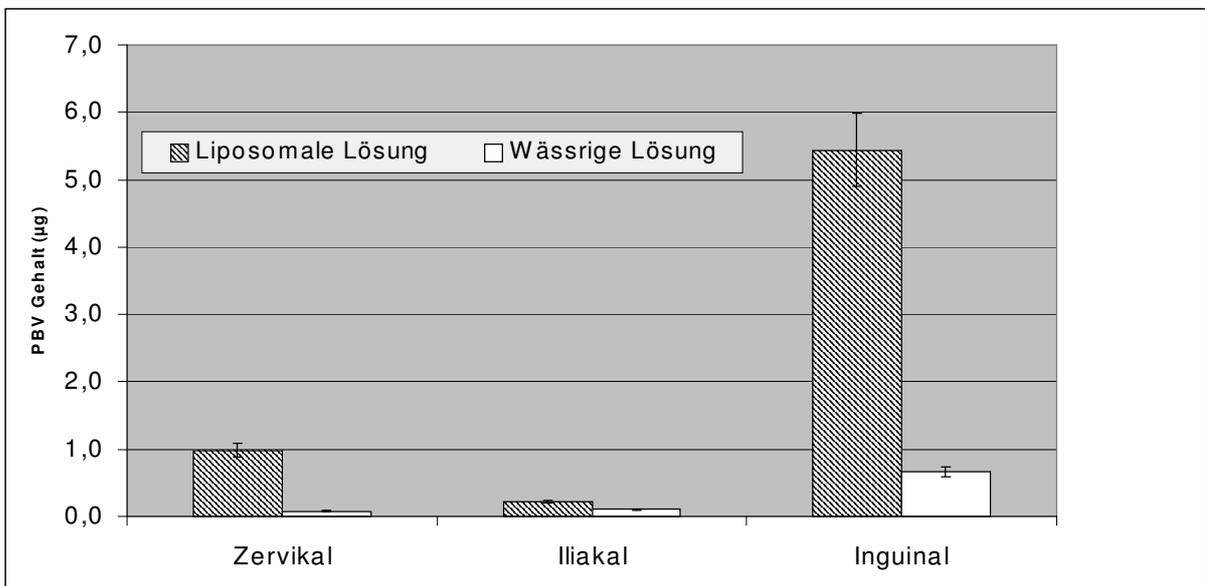


Abb. 48: Tier 4; PBV Menge (μg) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

Bei Tier 5 wiesen die zervikalen Lymphknoten der rechten Seite, 12 Stunden nach Injektion der Präparationen, die ca. 14fache PBV Menge verglichen mit der linken Seite auf. Die iliakalen Lymphknoten der rechten Seite hatten die 11fache PBV Konzentration gegenüber der linken Seite. In den inguinalen Lymphknoten wurde auf der rechten Seite die ca. 9fache PBV Menge im Vergleich zur linken Seite gefunden. Die Gesamtmenge an PBV der rechten Seite lag bei 1080% der linken Seite (Abb. 49, 50, 51).

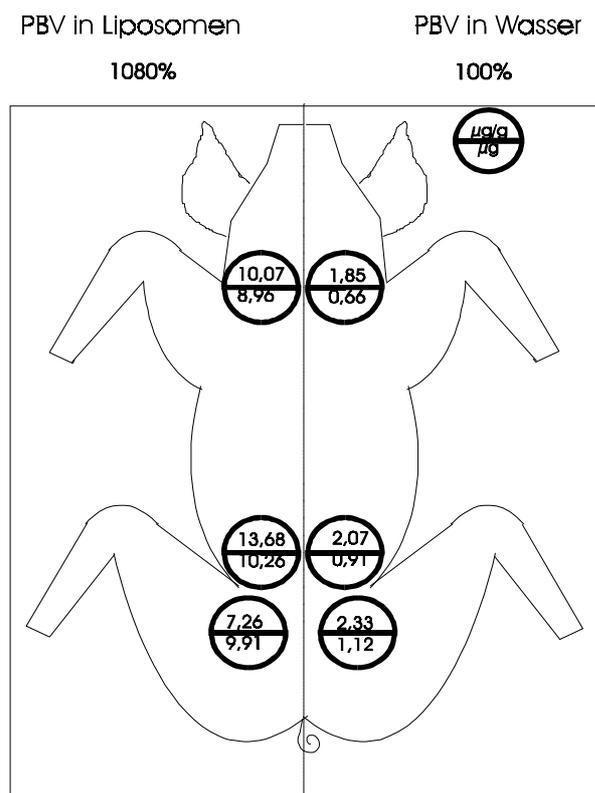


Abb. 49: Tier 5; PBV Konzentration ($\mu\text{g/g}$), Menge (μg) und Verhältnis links/rechts (%) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

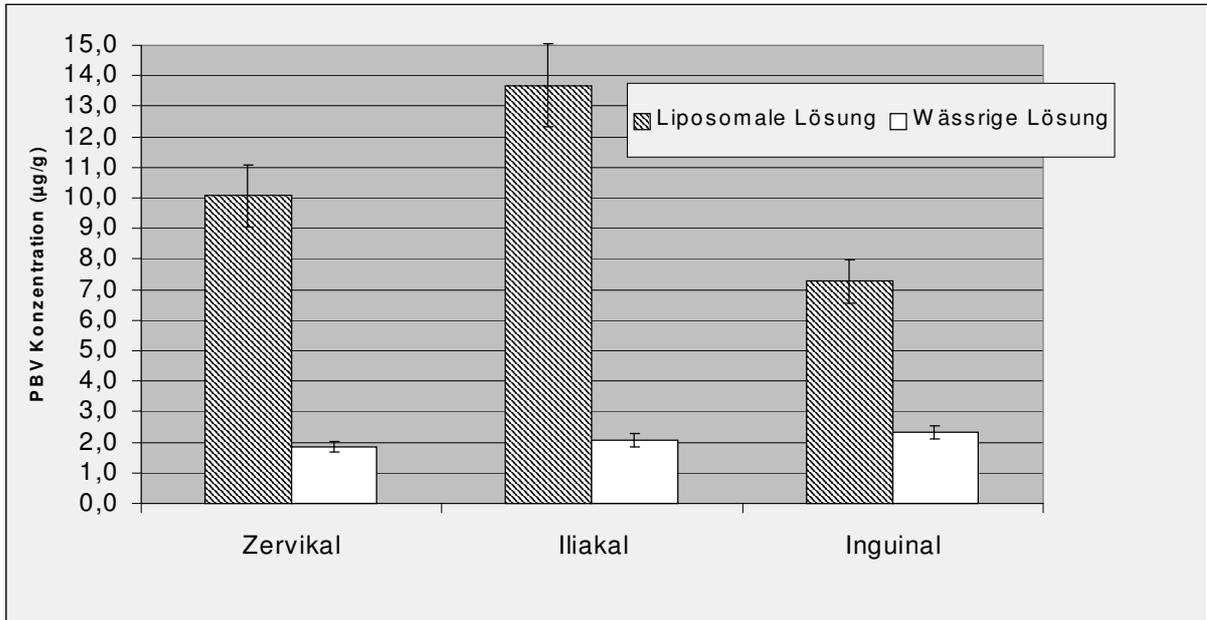


Abb. 50: Tier 5; PBV Konzentration ($\mu\text{g/g}$) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

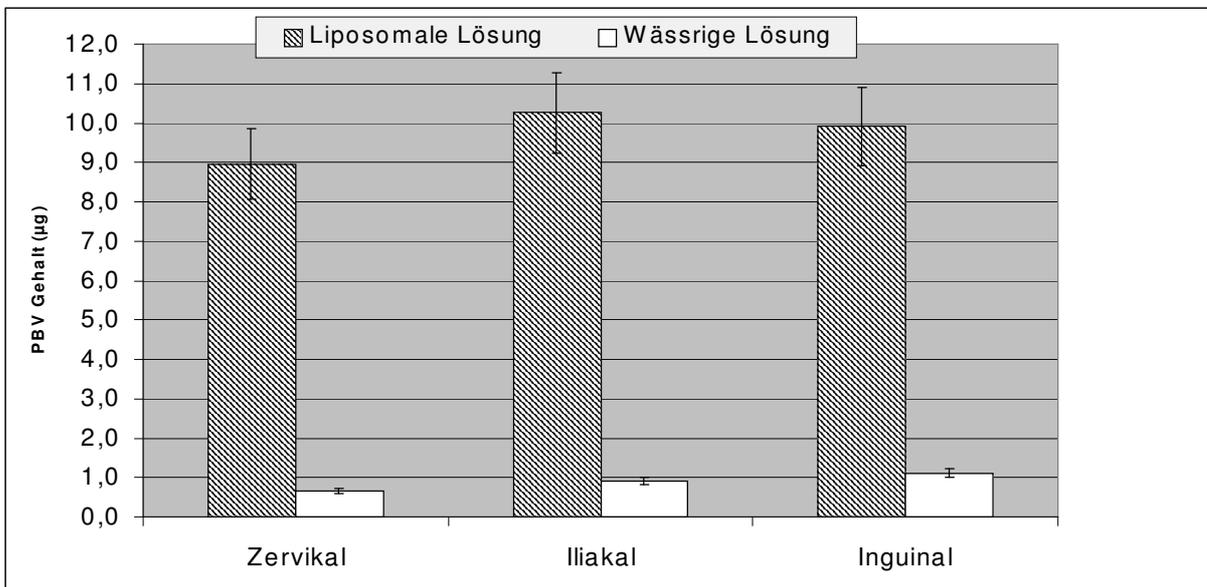


Abb. 51: Tier 5; PBV Menge (μg) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

Bei Tier 6 wiesen die zervikalen Lymphknoten der rechten Seite, 12 Stunden nach Injektion der Präparationen, die ca. 30fache PBV Menge und PBV Konzentration, verglichen mit der linken Seite, auf. Die iliakalen Lymphknoten der rechten Seite hatten eine beinahe doppelt so hohe Konzentration als auf der linken Seite. In den inguinalen Lymphknoten wurde auf der rechten Seite die ca. 10fache PBV Menge im Vergleich zur linken Seite gefunden. Die Gesamtmenge an PBV der rechten Seite lag bei 980% der linken Seite (Abb. 52, 53, 54).

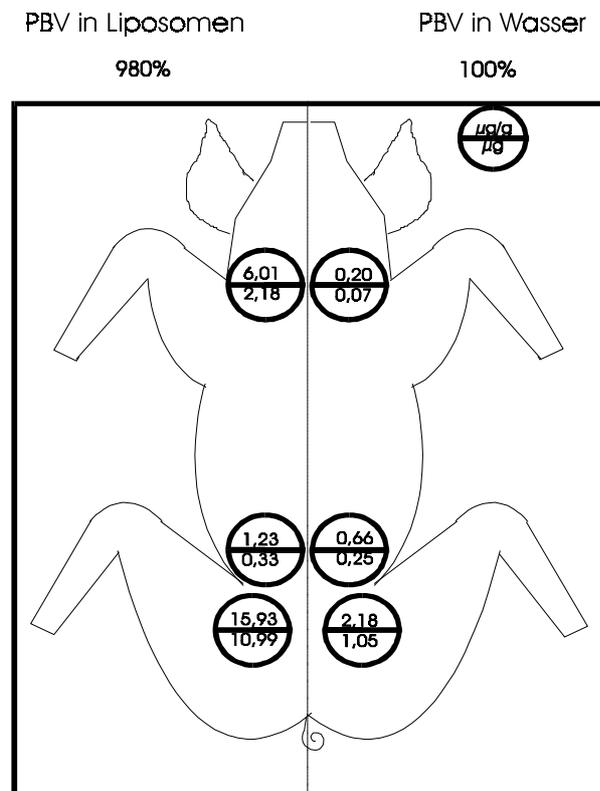


Abb. 52: Tier 6; PBV Konzentration ($\mu\text{g/g}$), Menge (μg) und Verhältnis links/rechts (%) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

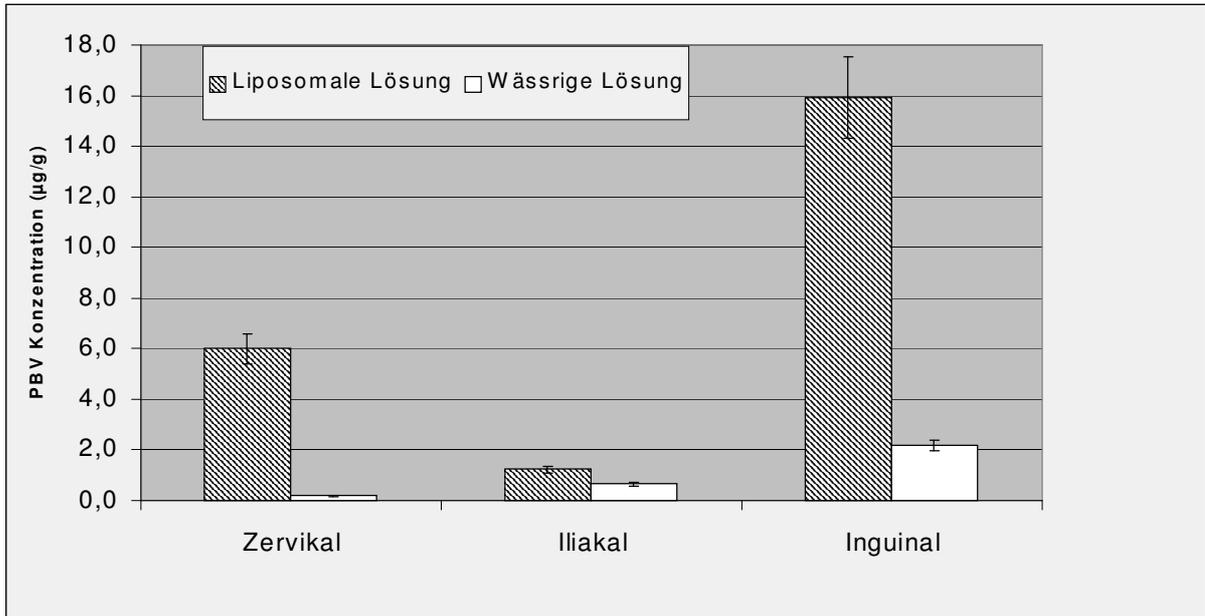


Abb. 53: Tier 6; PBV Konzentration ($\mu\text{g/g}$) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

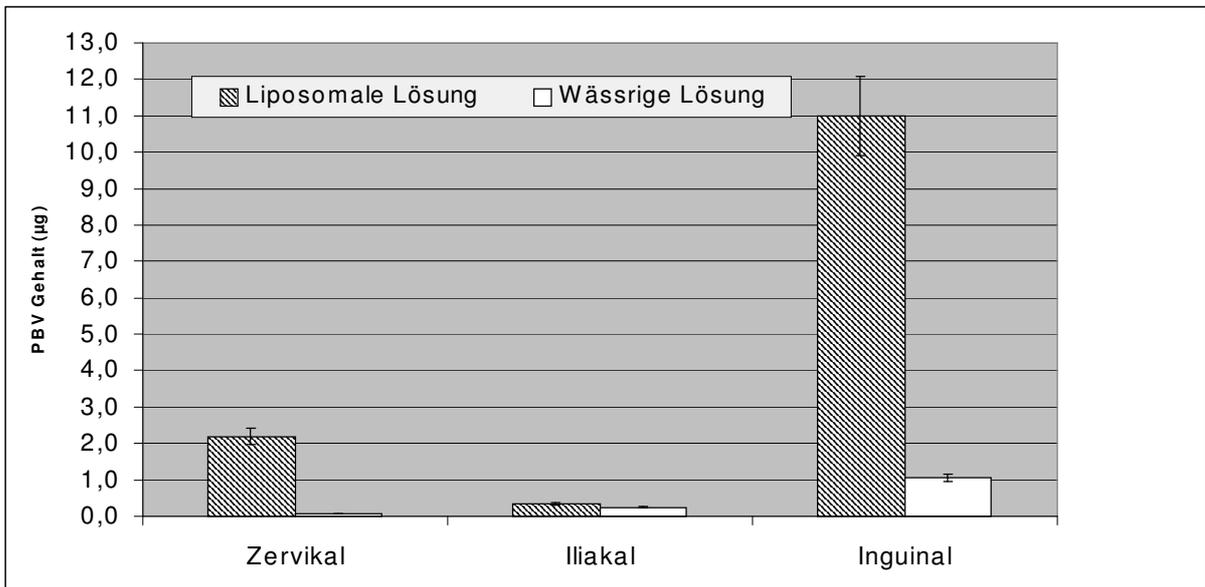


Abb. 54: Tier 6; PBV Menge (μg) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

Der Mittelwert der PBV Menge von Tier 4, 5 und 6 war, 12 Stunden nach Injektion, in den zervikalen Lymphknoten der rechten Seite etwa das 15fache, in den iliakalen Lymphknoten der rechten Seite etwa das 8,5fache und in den inguinalen Lymphknoten der rechten Seite etwa das 9fache der Menge in den Lymphknoten der linken Seite. Die PBV Konzentration der rechten zervikalen Lymphknoten lag 10fach höher als auf der linken Seite. Insgesamt lag der PBV Gehalt in den Lymphknoten der rechten Seite bei 1000% des Gehalts in den Lymphknoten der linken Seite (Abb. 55, 56, 57).

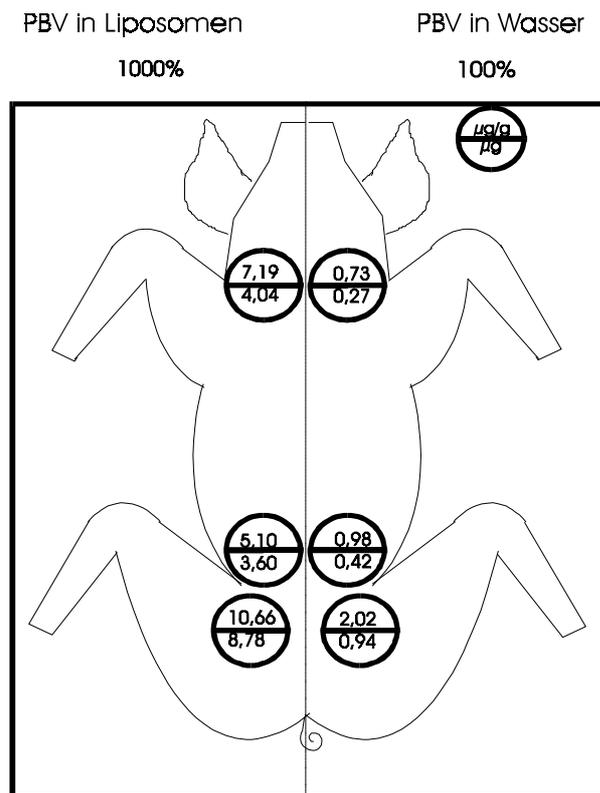


Abb. 55: Tier 4, 5 und 6; Mittelwerte der PBV Konzentration ($\mu\text{g/g}$), Menge (μg) und Verhältnis links/rechts (%) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

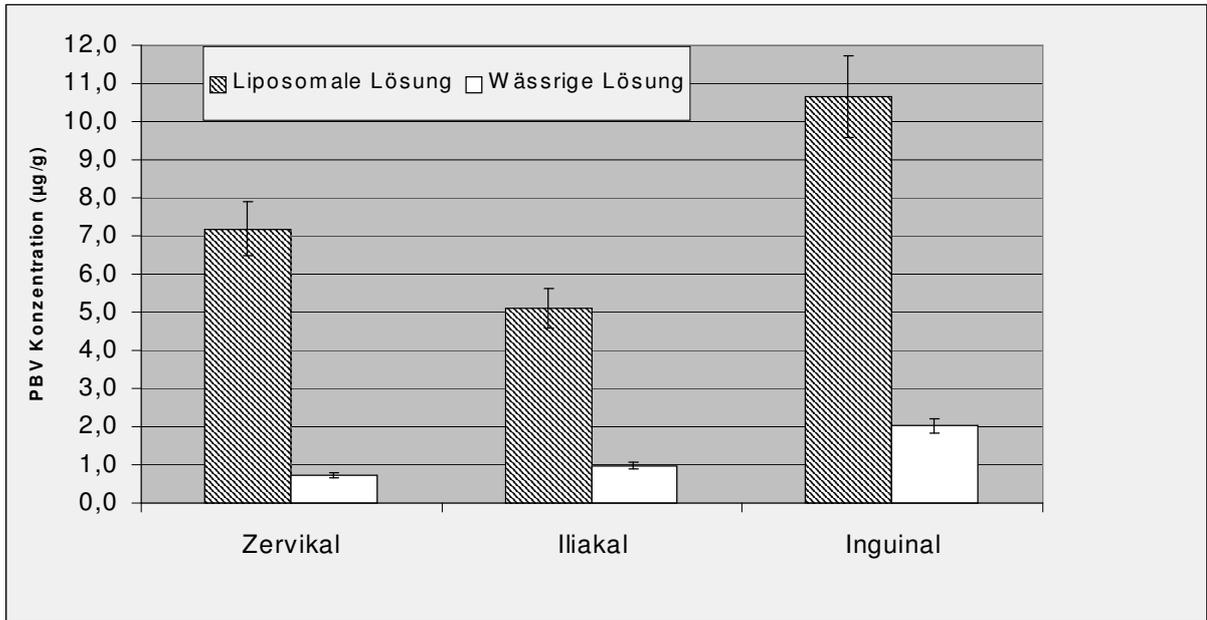


Abb. 56: Tier 4, 5 und 6; Mittelwerte der PBV Konzentration ($\mu\text{g/g}$) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

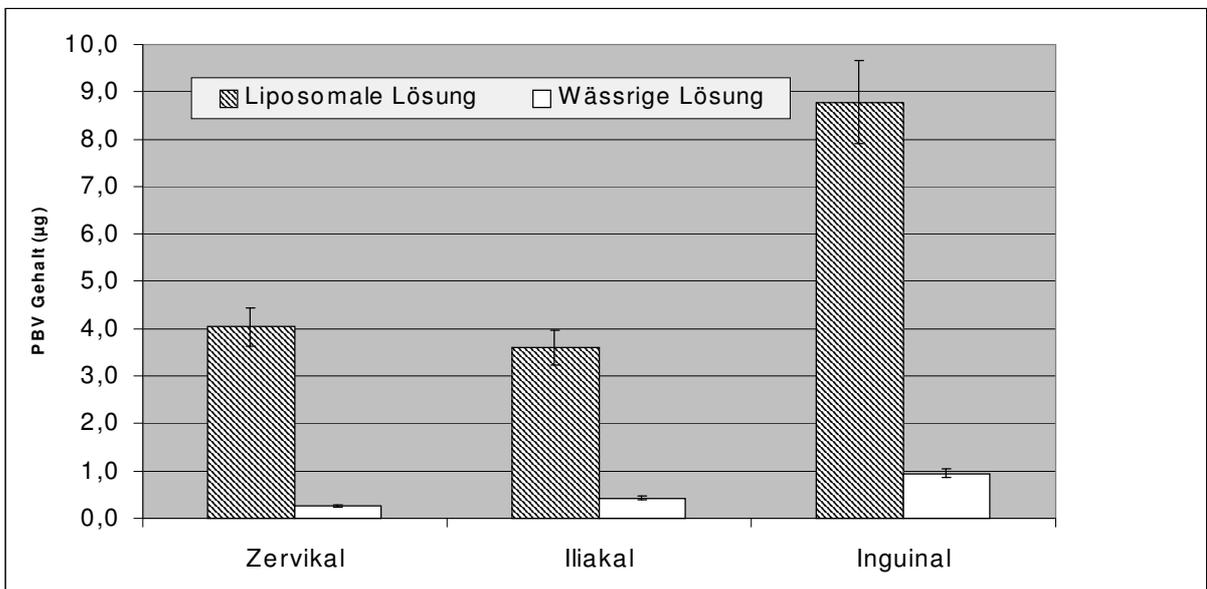


Abb. 57: Tier 4, 5 und 6; Mittelwerte der PBV Menge (μg) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 12 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

24 Stunden nach Injektion der Präparationen waren bei Tier 7 die zervikalen Lymphknoten beidseitig nicht lokalisierbar. Die iliakalen Lymphknoten der rechten Seite hatten eine ca. 16% höhere PBV Konzentration als die Lymphknoten der linken Seite. In den inguinalen Lymphknoten wurde auf der rechten Seite die 6fache PBV Menge im Vergleich zur linken Seite gefunden. Die Gesamtmenge an PBV in den Lymphknoten der rechten Seite lag bei 980% der Lymphknoten der linken Seite (Abb. 58, 59, 60).

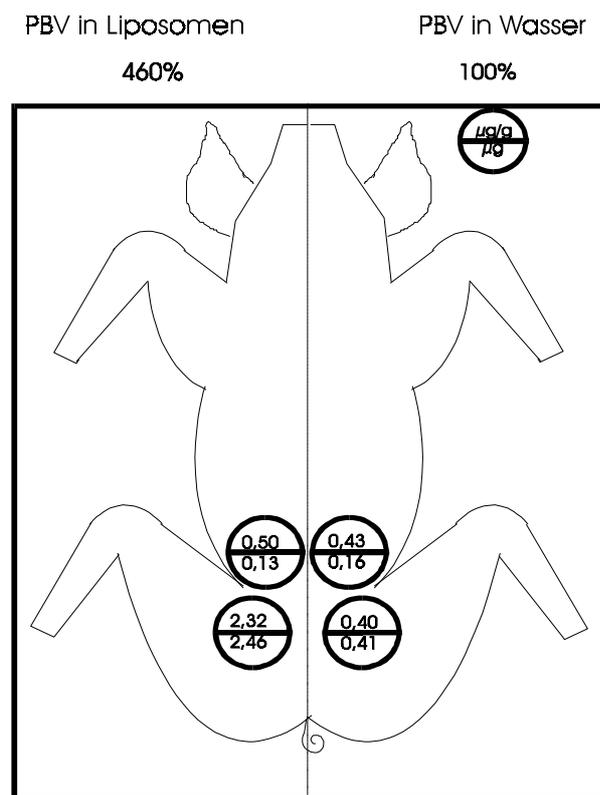


Abb. 58: Tier 7; PBV Konzentration (µg/g), Menge (µg) und Verhältnis links/rechts (%) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 24 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

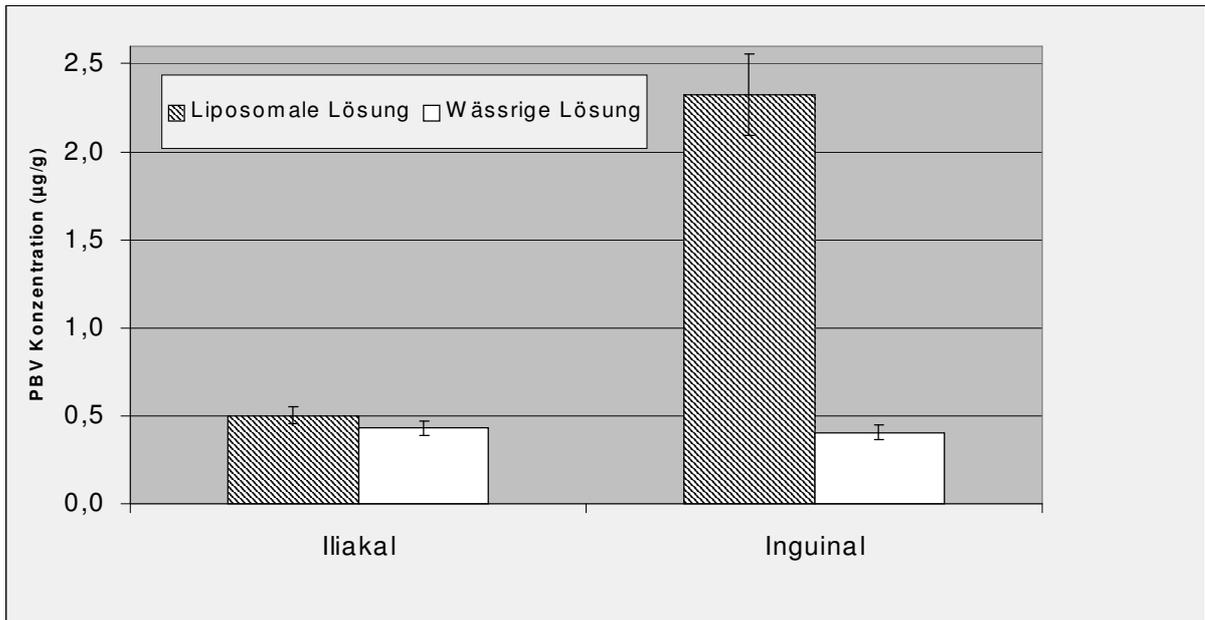


Abb. 59: Tier 7; PBV Konzentration (µg/g) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 24 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

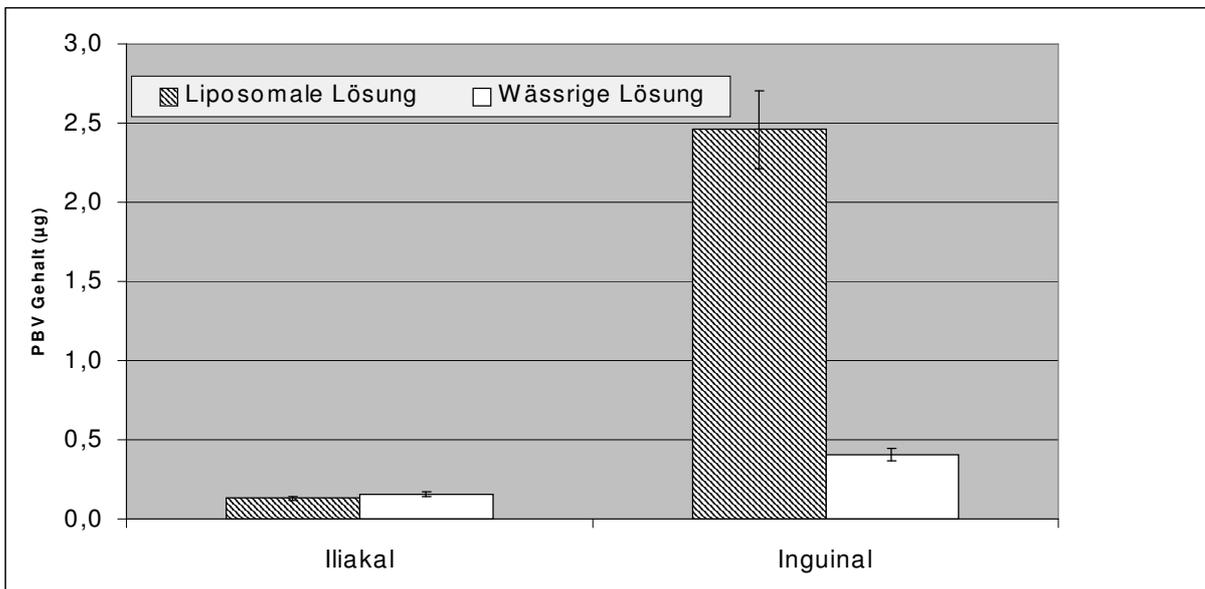


Abb. 60: Tier 7; PBV Menge (µg) der zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten 24 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links.

Die zervikalen Lymphknoten der linken Seite waren bei keinem der Tiere sichtbar gefärbt. Die PBV Konzentrationen und PBV Mengen, welche in den rechten, zervikalen Lymphknoten gemessen wurden, übertrafen deutlich die jeweiligen Werte der linken Seite (Abb. 61, 62).

Die PBV Konzentrationen und PBV Mengen der iliakalen Lymphknoten zeigten im Gegensatz zu den Werten der zervikalen und inguinalen Lymphknoten kein stetiges Abnehmen mit der Zeit. Die höchste Konzentration wurde nach 6 Stunden gemessen. Der PBV Gehalt welcher nach 3 Stunden gemessen wurde unterlag den Werten nach 6 beziehungsweise 12 Stunden. Die PBV Konzentrationen der linken Seite lagen jedoch stets unter den jeweiligen Konzentrationen der rechten Seite (Abb. 63, 64).

Die gemessenen PBV Konzentrationen und PBV Mengen der inguinalen Lymphknoten lagen auf der Seite mit der liposomalen Präparation deutlich über den Werten der Seite mit der wässrigen PBV Lösung. Die höchsten Werte wurden 3 Stunden nach Injektion der Präparationen gemessen (Abb. 65, 66).

Die PBV Konzentrationen und PBV Mengen aller Lymphknoten auf der Seite mit den PBV beladenen Liposomen der jeweilige Tiere übertrafen stets deutlich die Werte der linken Seite. (Abb. 67, 68).

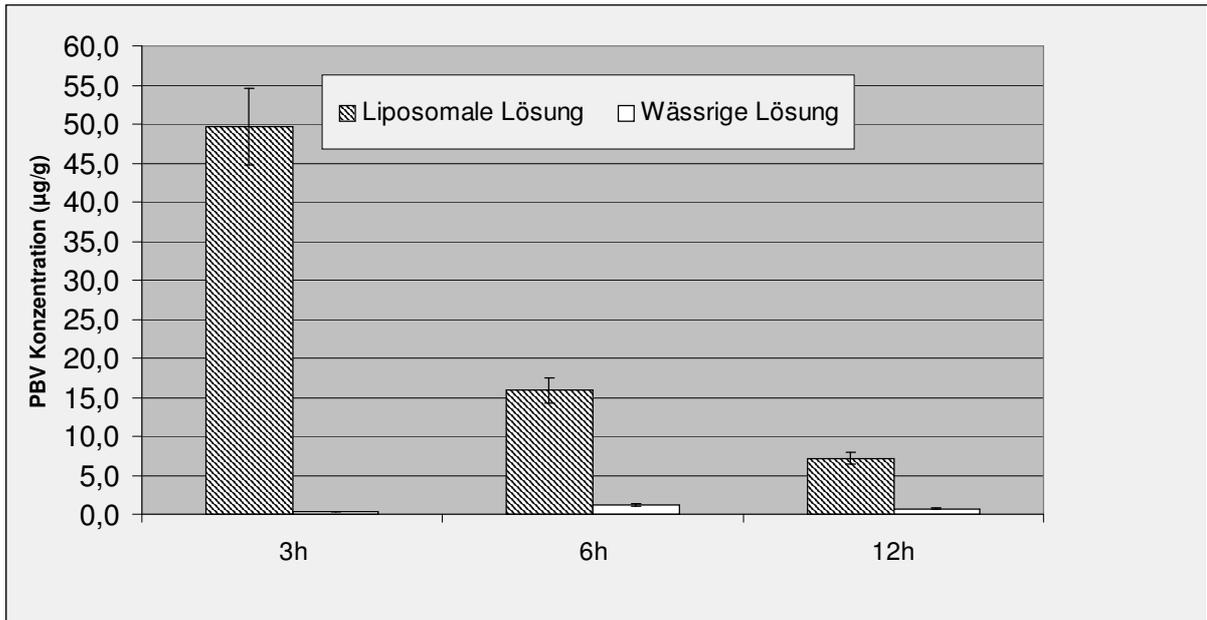


Abb. 61: Vergleich der PBV Konzentrationen ($\mu\text{g/g}$) der zervikalen Lymphknoten nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links. Die Werte 6h und 12h sind Mittelwerte der jeweiligen Tiere.

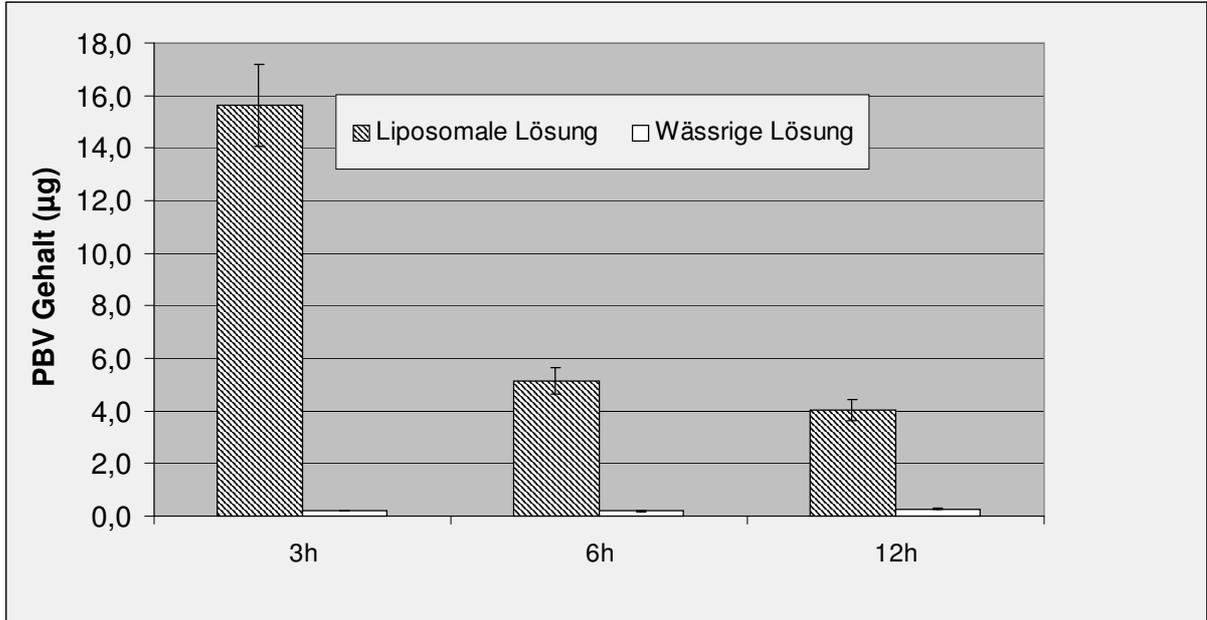


Abb. 62: Vergleich der PBV Mengen (μg) der zervikalen Lymphknoten nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links. Die Werte 6h und 12h sind Mittelwerte der jeweiligen Tiere.

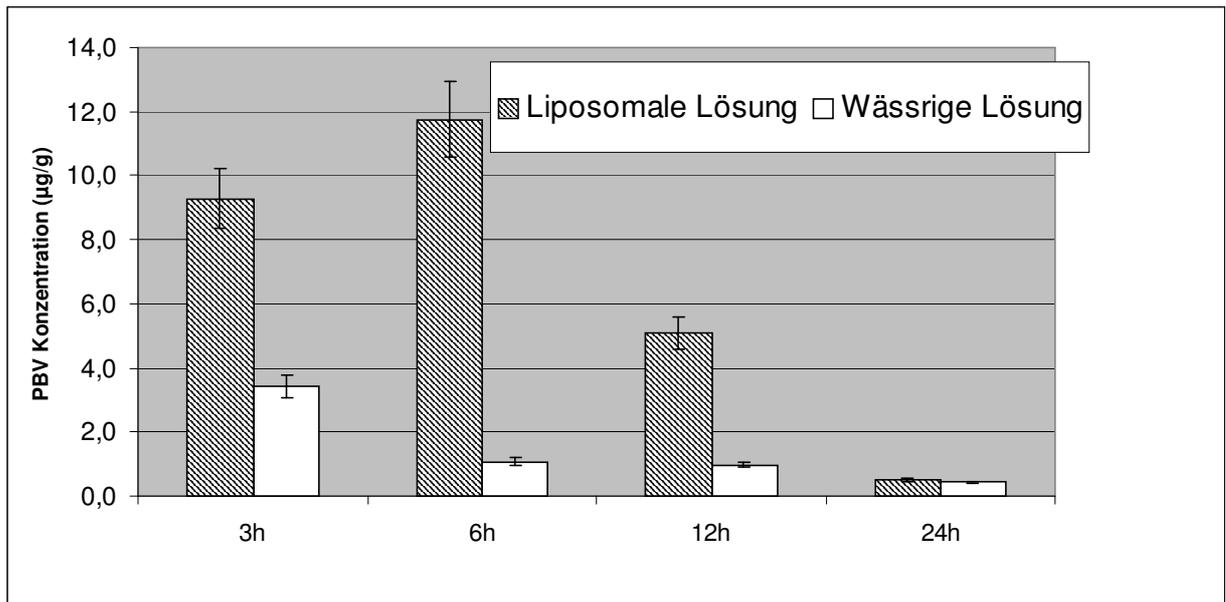


Abb. 63: Vergleich der PBV Konzentrationen ($\mu\text{g/g}$) der iliakalen Lymphknoten nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links. Die Werte 6h und 12h sind Mittelwerte der jeweiligen Tiere.

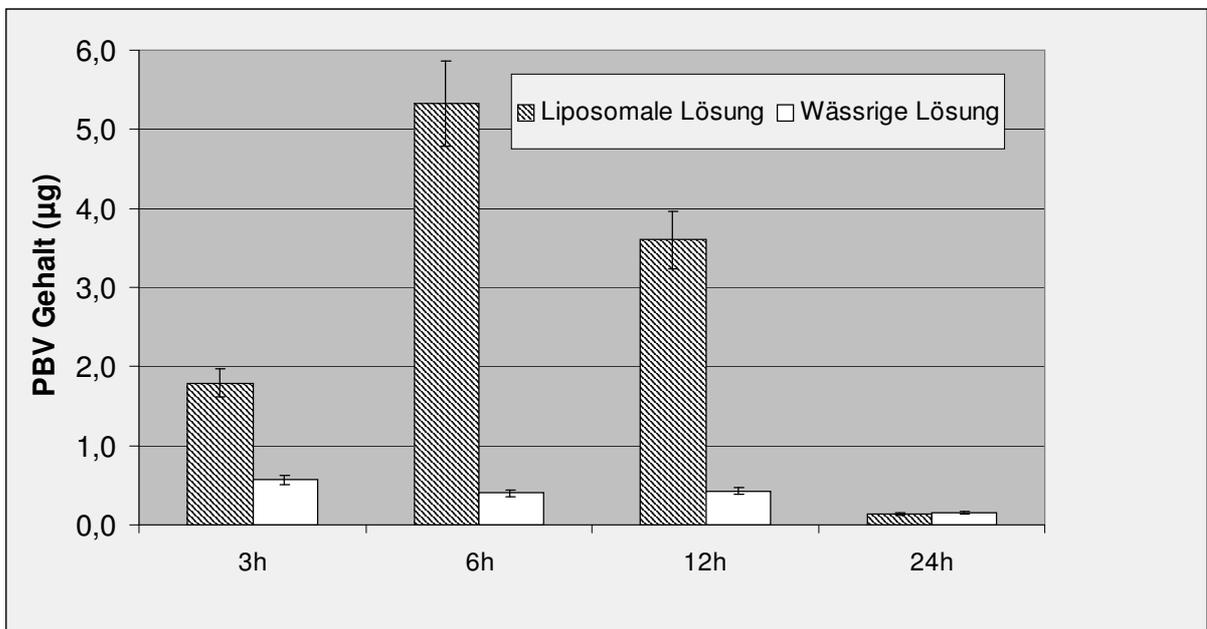


Abb. 64: Vergleich der PBV Mengen (μg) der iliakalen Lymphknoten nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links. Die Werte 6h und 12h sind Mittelwerte der jeweiligen Tiere.

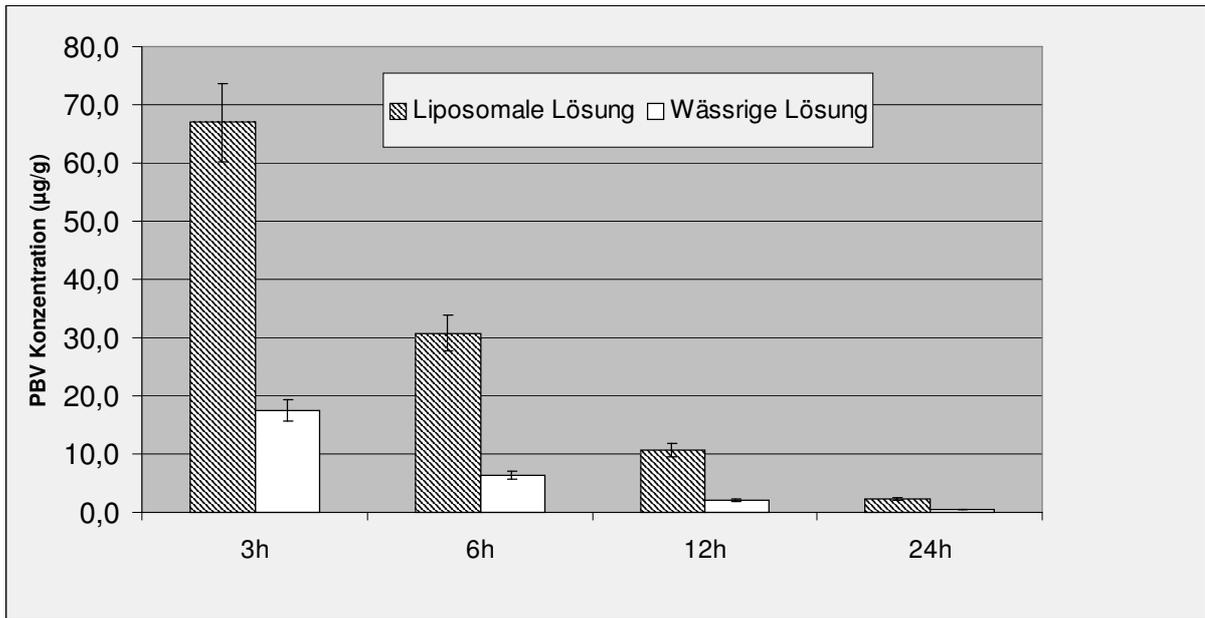


Abb. 65: Vergleich der PBV Konzentrationen ($\mu\text{g/g}$) der inguinalen Lymphknoten nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links. Die Werte 6h und 12h sind Mittelwerte der jeweiligen Tiere.

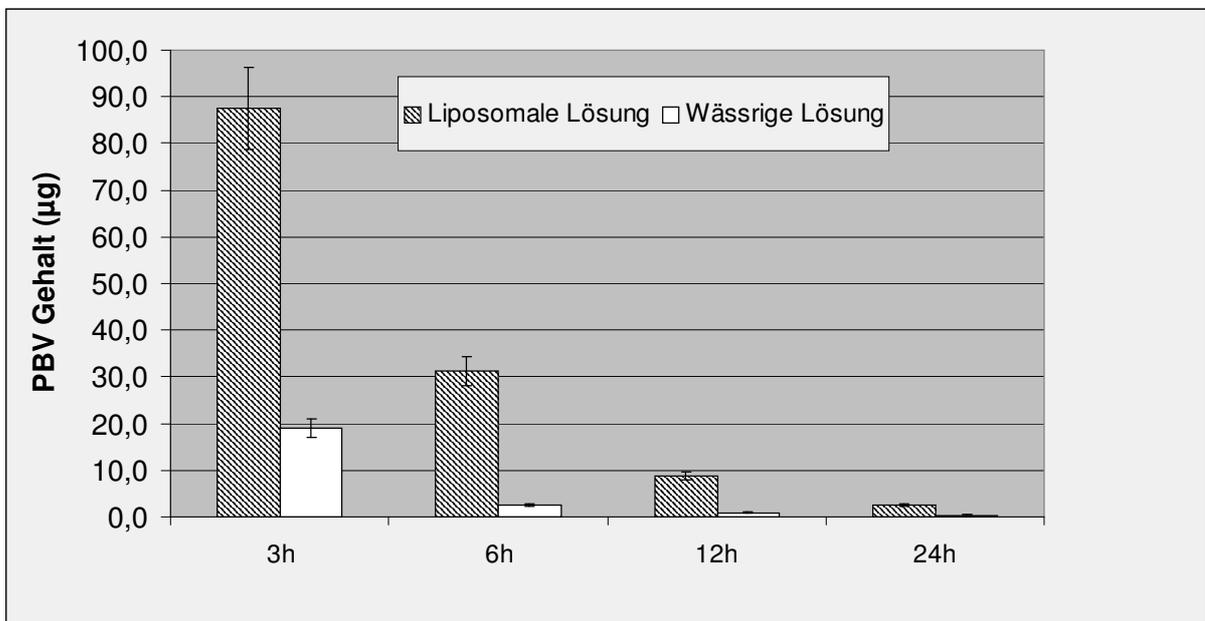


Abb. 66: Vergleich der PBV Mengen (μg) der inguinalen Lymphknoten nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links. Die Werte 6h und 12h sind Mittelwerte der jeweiligen Tiere.

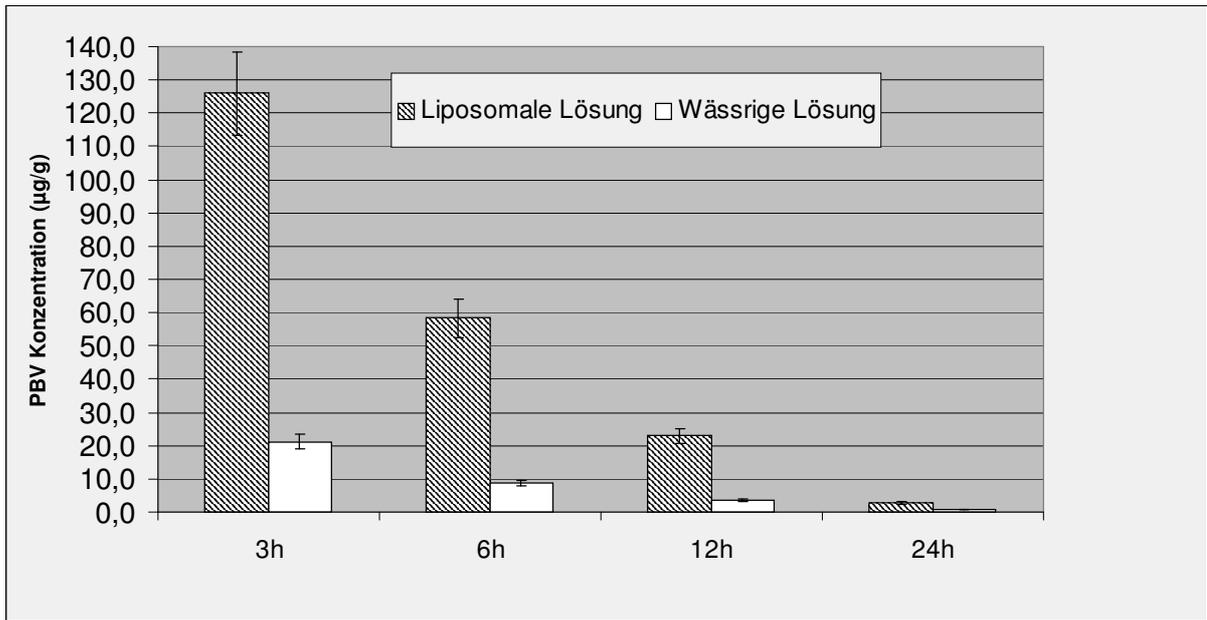


Abb. 67: Vergleich der PBV Konzentrationen ($\mu\text{g/g}$) aller Lymphknoten nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links. Die Werte 6h und 12h sind Mittelwerte der jeweiligen Tiere.

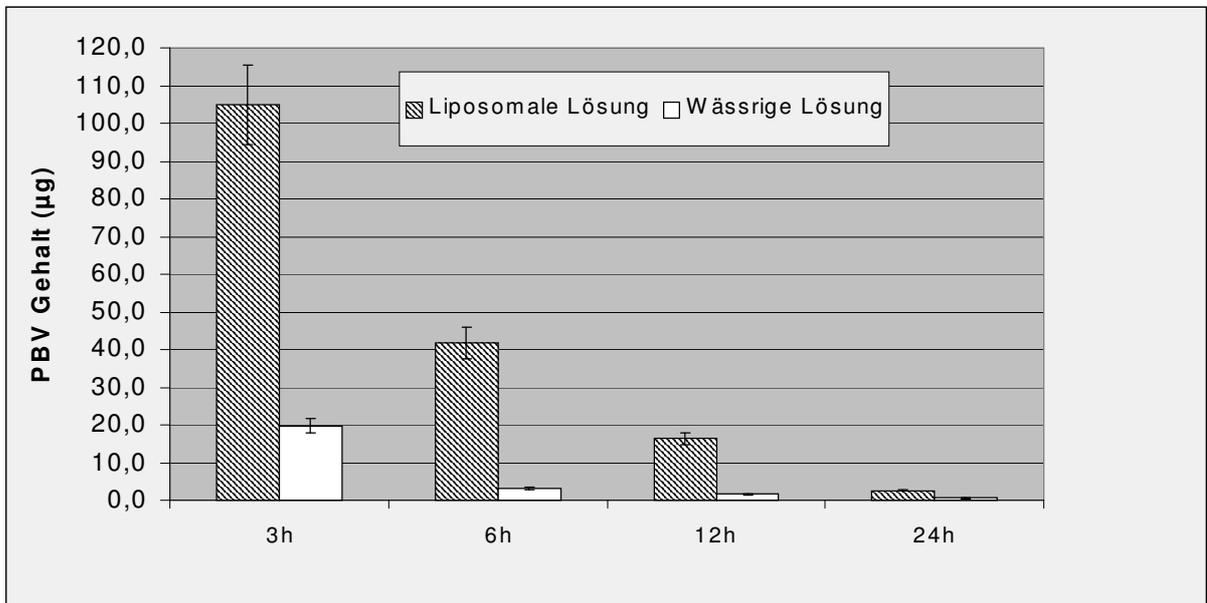


Abb. 68: Vergleich der PBV Mengen (μg) aller Lymphknoten nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen rechts und wässriger PBV Lösung links. Die Werte 6h und 12h sind Mittelwerte der jeweiligen Tiere.

3.3 Histologische Untersuchung

Die histologische Untersuchung zeigte keine Hinweise auf eine parenchym-schädigende Wirkung der PBV- Liposomen.

Das Lymphknotengewebe zeigte im Nativpräparat eine gute Blaufärbung (Abb. 67).

Durch die H.E.- Färbung wurde der blaue Farbstoff fast vollständig ausgewaschen (Abb. 68)..

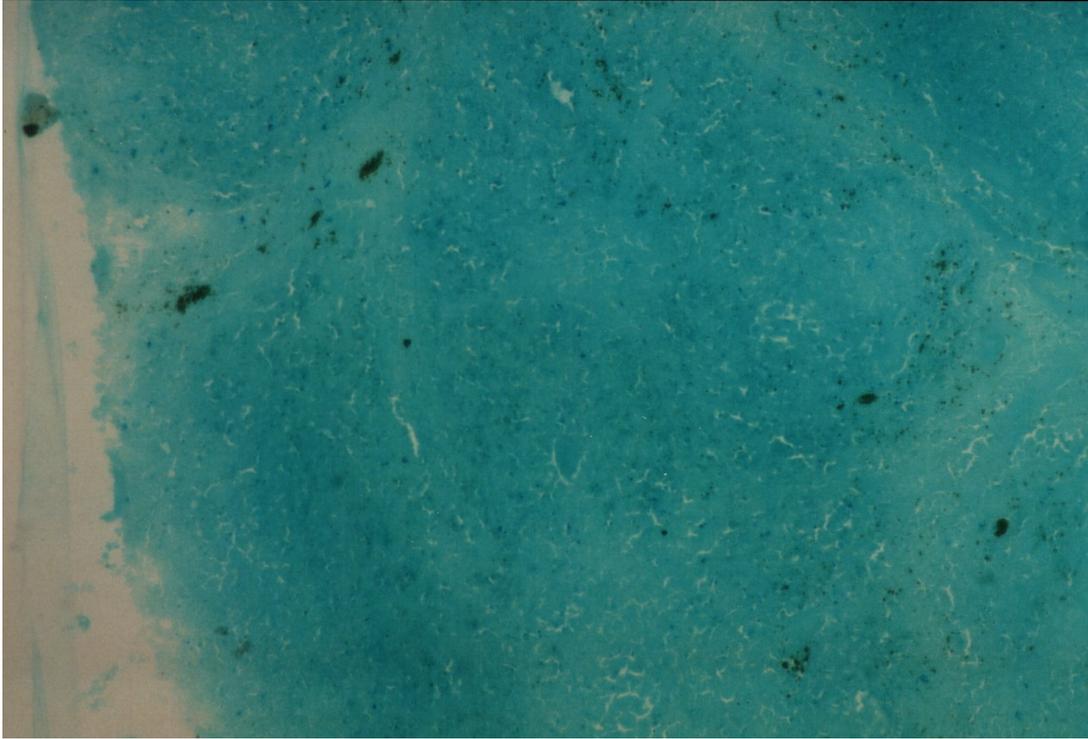


Abb. 67: Gefrierschnitt (nativ) eines inguinalen Lymphknotens der rechten Seite 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen.

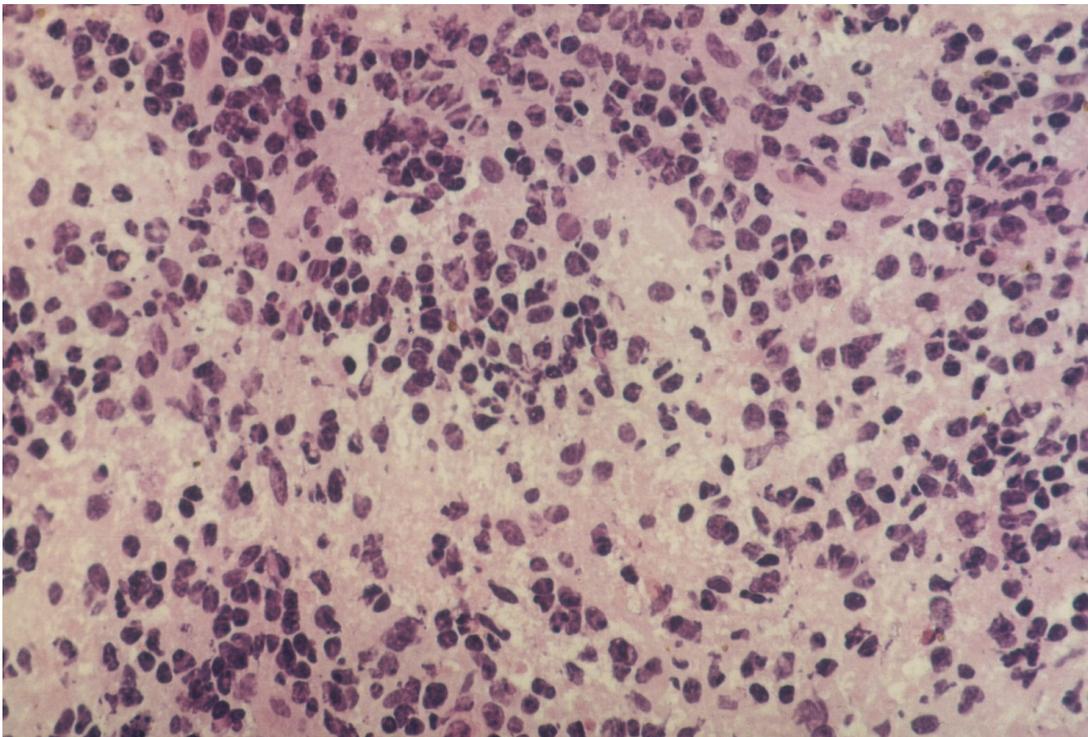


Abb. 68: Gefrierschnitt (H.E.- Färbung) eines inguinalen Lymphknotens der rechten Seite 6 Stunden nach perimamillärer Injektion von PBV Liposomen.

4. Diskussion

Die Entnahme des „sentinel“-Lymphknotens („SL“) gehört heute schon zur klinischen Routine bei der Behandlung einiger maligner Neoplasien

Die Identifikation des „SL“ erfolgt mit Hilfe von Farbstoffen (50,55,76), durch radioaktive Markierung (72,88) oder deren Kombination (26,86).

Eine Untersuchung ergab, dass die kostenintensive und komplexe Methode mit einer Kombination aus radioaktiver Markierung und eines blauen Farbstoffs keinen Vorteil gegenüber der alleinigen Anwendung des blauen Farbstoffs bringt (62).

Es wurde eine hohe Sensitivität der „SL“-Methode bei mehreren soliden Tumoren, insbesondere Mamma- und Penistumoren gezeigt (9,10,25,32,53,73,75). Allerdings wurde die Methode bei kolorektalen Karzinomen als nicht geeignet befunden (47).

Auch bei der Untersuchung an Vulvakarzinomen fand sich ein zu hoher falsch-negativ Wert (3). Bei Mammatumoren besitzt die „SL“-Methode nur bei frühen Stadien (pT1 - 2) eine hohe Sensitivität (68).

Die Sensitivität ist auch von der Lokalisation der „SL“ abhängig und kann bei ungünstigen Lokalisationen zu schlechten Ergebnissen führen (6).

Die Methode ist durch die pharmakodynamischen Eigenschaften des Farbstoffs limitiert. Patentblau V zeigt in seiner wässrigen Form nach interstitieller Injektion nur eine geringe Speicherung in den Lymphknoten.

Eine Lösung des Problems stellt die Bindung der wasserlöslichen Stoffe an einen lipoidalen Träger dar.

In vorausgehenden Versuchen wurde gezeigt, dass Liposomen optimale Eigenschaften als Träger wasserlöslicher Substanzen aufweisen (13).

Liposomen wurden hinsichtlich ihrer Eignung zur endolymphatischen Therapie als Träger für Zytostatika (42) und als Farbstoffträger (36,39) in vorausgehenden Versuchen getestet.

Eine direkte endolymphatische Applikation ist notwendig um eine therapeutisch ausreichend hohe Konzentration eines Medikamentes in Lymphknoten zu erreichen (38).

Die Methode der Lymphknotenfärbung mit PBV beladenen Liposomen nach endolymphatischer Injektion wurde bei einem Patienten mit Hodentumor erfolgreich angewandt (67). Nach Injektion der PBV- Liposomen konnten die paraaortalen Lymphknoten aufgrund guter Färbung komplikationslos entfernt werden. Es wurden während und nach dem Eingriff keine Nebenwirkungen beobachtet.

Auf der Suche nach einer weniger aufwendigen Applikationsform, wurde das Verhalten der Liposomen nach interstitieller Injektion untersucht (34,43).

Unabhängig von der hier besprochenen Anwendung werden die Liposomen immer häufiger für die Behandlung verschiedener Krankheiten als Substanzträger eingesetzt. Sie verbessern die Absorption, Penetration und Verweildauer der gebundenen Substanzen.

So wird durch den Einschluss in Liposomen eine Applikation von Zytokinen (49,84), Enzymen (7) und Nukleotiden (23) möglich.

Liposomen verbessern die orale Verfügbarkeit verschiedener Pharmazeutika, zum Beispiel von Barbituraten (60) oder Insulin (85).

Ein Versuch mit in Liposomen eingeschlossenen Proteinen und Peptiden zeigte eine steuerbare Freigabe der Wirkstoffe über Tage bis Wochen (91).

Liposomen ermöglichen einen Transfer pharmakologischer Wirkstoffe in Kupferzellen, Endothelzellen und subendothelialen Hepatozyten (77).

Es wurde mit Hilfe von Liposomen ein erfolgreicher Gen- Transfer in Makrophagen (48) und artikulären Chondrozyten (58) durchgeführt.

Bei der antimikrobiellen Therapie verbesserten Liposomen die Wirkung von Gentamycin (14), Penicillin G (65) und Amphotericin B (61).

Die entzündungshemmende Wirkung von Piroxicam (12) und Diclofenac (11) wurde durch die Verwendung von Liposomen gesteigert.

Die okuläre Applikation von Acyclovir wurde hinsichtlich Absorption, Penetration und Wirkdauer durch den Einschluss in Liposomen verbessert (54).

Nach Exposition ultravioletter Strahlung der Haut führte die dermale Anwendung von Liposomen beladen mit DNA-Reparaturenzymen zu einer Reduktion von Strahlenschäden (89).

Es wurde auch eine beschleunigte Wundheilung nach Anwendung von Liposomen beobachtet (71).

In der pharmakologischen Tumorthherapie veränderte die Anwendung von Liposomen die toxischen Eigenschaften und die Wirkung zahlreicher Chemotherapeutika (21,66).

So wurde eine bessere zytostatische Wirkung von Paclitaxel (16) und Adriamycin (2,92) und eine geringere Toxizität von Cisplatin (5), Doxorubicin (87) und Daunorubicin (44) durch den Einschluss in Liposomen erreicht.

Vielversprechende Ergebnisse liefert eine neue Therapieform mit thermosensitiven Liposomen kombiniert mit Zytostatika, welche dann durch lokale Hyperthermie im Tumorgebiet freigegeben werden und somit hohe Konzentrationen erreichen (45).

Alle diese Anwendungen beinhalten Aspekte, die für die Erweiterung des Spektrums der endolymphatischen Therapie nützlich sein können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung unterstreichen die in der Literatur beschriebenen guten Transport- und Speichereigenschaften der Liposomen. Die Ergebnisse der Färbungen mit Liposomen zeigen eindeutig die Überlegenheit gegenüber der herkömmlichen Färbung mit einer wässrigen PBV- Präparation.

Für eine eindeutige Identifikation der Lymphknoten ist eine PBV- Konzentration von mindestens 8,0 µg/g erforderlich. Diese Konzentration wurde bei der Verwendung der wässrigen PBV Lösung nur in einem Lymphknoten erreicht. Bei der Verwendung der PBV-Liposomen dagegen, konnte die Konzentration in elf Lymphknoten erreicht werden. Die höchsten PBV-Konzentrationen wurden nach drei Stunden gemessen. Der Versuch zeigte allerdings, dass der optimale Zeitpunkt für die Entnahme der Lymphknoten zwischen 6 und 12 Stunden nach der Injektion der Liposomen liegt. Die Lymphknoten zeigten zwar nach 3 Stunden die beste Färbung, aber zu diesem Zeitpunkt befand sich noch ein großer Teil der Liposomen in den Lymphgefäßen. Werden die Lymphgefäße bei der Lymphknotenentnahme verletzt, so wird das Operationsfeld durch den in den Gefäßen persistierenden Farbstoff kontaminiert (Abb. 9,10) und eine eindeutige Identifikation der Lymphknoten wird somit unmöglich.

Nach 6 Stunden lagen die gemessenen PBV-Konzentrationen immer noch deutlich über 8,0 µg/g, es befand sich allerdings noch ein kleiner Anteil der Liposomen in den Lymphgefäßen. Nach 12 Stunden waren die Lymphgefäße frei von Liposomen, die gemessenen PBV-Konzentrationen lagen aber zum Teil unter der Mindestkonzentration. Die bis jetzt noch mühsame Herstellung der Liposomen muss vereinfacht werden, damit die Methode bei der klinische Anwendung bestehen kann. Es wäre ebenfalls

wünschenswert eine Methode zu entwickeln welche die Haltbarkeit der Liposomen zu verlängert.

Eine Anwendung der PBV Liposomen bei der „SL“ Methode könnte dazu beitragen die Anwendungsmöglichkeiten zu erweitern und die Erfolgsrate zu verbessern.

Die Vorteile der Färbung retroperitoneal gelegener Lymphknoten bei einer chirurgischen Entfernung sind evident. Die guten Ergebnisse des vorliegenden Versuches könnten somit einen wichtigen Beitrag in der schwierigen Therapie der retroperitonealen Lymphknotenmetastasen leisten.

5. Zusammenfassung

Die Behandlung der im Verlauf maligner Erkrankungen häufig auftretenden Lymphknotenmetastasen stellt ein bis jetzt nur unzureichend gelöstes Problem dar. Eine neue vielversprechende Methode ist die Biopsie des „sentinel“-Lymphknoten („SL“). Der „SL“ drainiert direkt das vom Tumor befallene Gebiet. Es wurde postuliert, dass das Ergebnis der histologischen Untersuchung des „SL“ für alle anderen in der Region gelegenen Lymphknoten in Bezug auf die Metastasierung repräsentativ ist. Für eine eindeutige Identifikation des „SL“ ist eine Vitalfärbung unerlässlich. Zur Färbung des „SL“ wird bisher eine wässrige PBV Lösung verwendet, welche allerdings nur inkonstant eine erfolgreiche Färbung zeigt.

Es wurde ein Versuch an 7 Schweinen vorgenommen, die Farbstoffaufnahme in die Lymphknoten nach subkutaner Injektion einer Liposomen-Präparation mit einer wässrigen PBV Lösung zu vergleichen. Bei jedem Tier wurde auf der rechten Seite eine liposomale, und auf der linken Seite eine wässrige PBV Lösung perimammillär injiziert. Die zervikalen, iliakalen und inguinalen Lymphknoten wurden nach 3, 6, 12 und 24 Stunden aufgesucht, fotografiert und entnommen. Die PBV Konzentration der Lymphknoten wurde photometrisch bestimmt.

Mit der wässrigen PBV-Lösung konnte nur in einem Lymphknoten die Mindestkonzentration für eine ausreichende Färbung ($8,0 \mu\text{g/g}$) erreicht werden. Die liposomale Präparation dagegen brachte es auf elf erfolgreiche Färbungen.

Bei der histologischen Untersuchung wurden keine Hinweise auf Zellschäden gefunden.

Die Verwendung von Liposomen bei der „SL“-Biopsie könnte die Erfolgsquote erhöhen. Für die klinische Anwendung muss allerdings die Herstellung der Liposomen vereinfacht und ihre Haltbarkeit verlängert werden.

6. Literatur

1. Abraham R., Nagy T., Goss P.E., Crump M. (2000)
High dose chemotherapy and autologous blood stem cell support in women with breast carcinoma and isolated supraclavicular lymph node metastases
Cancer 88, 790-795.
2. Akamo Y., Mizuno I., Takeyama H., Mohri N., Ueda T., Shibata T., Yotsuyanagi T., Manabe T. (1997)
Chemotherapy targeting regional lymph nodes by gastric submucosal injection of liposomal adriamycin in patients with gastric cancer
Gan to Kagaku Ryoho 24, 1712-4.
3. Ansick A.C., Sie Go D.M.D.S., van der Velden J., Sijmons E.A., Lopes A.D., Monaghan J.M., Kenter G.G., Murdoch J.B., ten Kate F.J.W., Heintz A.P.M. (1999)
Identification of sentinel lymph node in vulvar carcinoma patients with the aid of a patent blue V injection; A multicenter study
Cancer 86, 652-656.
4. Ballon S.C., Berman M.L., Lagasse L.D., Petrilli E.S., Castaldo T.W. (1981)
Survival after extraperitoneal pelvic and paraaortic lymphadenectomy and radiation therapy in cervical carcinoma
Obstetrics and Gynecology 57, 90.
5. Bandak S., Goren D., Horowitz A., Tzemach D., Gabizon A. (1999)
Pharmacological studies of cisplatin encapsulated in long circulating liposomes in mouse tumor models
Anti Cancer Drugs 10, 911-920.
6. Bartolomei M., Testori A., Chinol M., Gennari R., De Cicco C., Leonardi L., Zoboli S., Paganelli G. (1998)
Sentinel node localization in cutaneous melanoma : lymphoscintigraphy with colloids and antibody fragments versus blue dye mapping
Eur. J. o. Nucl. Med. 25, 1489-1494.
7. Bernheim Grosswasser A., Ugazio S., Gauffre F., Viratelle O., Mahy p., Roux D. (2000)
Spherulites: a new vesicular system with promising applications; An example: Enzyme microencapsulation
Journal of Chemical Physics 112, 3424-3430.

8. Bilchik A.J., Giuliano A., Essner R., Bostick P., Kelemen P., Foshag L.J., Sostrin S., Turner R.R., Morton D.L. (1998)
Universal application of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy in solid neoplasms
Canc. J. f. Scient. Americ. 4, 351-358.
9. Bland K.I. (1999)
Refining the optimal technical approach for sentinel node localization in breast cancer patients
Annals of surgical oncology 6, 418-419.
10. Bostick P.J., Giuliano A.E. (2000)
Vital dyes in sentinel node localization
Seminars in nuclear medicine 30, 18-24.
11. Calpena A.C., Escribano E., San Martin H., Lauroba J., Obach R., Domenech J. (1999)
Influence of the formulation on the in vitro transdermal penetration of sodium diclofenac; Evaluation of the topical and systemic anti inflammatory activity in the rat
Arzneimittel Forschung Drug Research 49, 1012-1017.
12. Canto G.S., Dalmora S.L., Oliveira A.G. (1999)
Piroxicam encapsulated in liposomes: characterization and in vivo evaluation of topical anti inflammatory effect
Drug Development and Industrial Pharmacy 25, 1235.1239.
13. Ceruti M., Crossaso P., Brus P., Arpicco S., Dosio F., Cattel L. (2000)
Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing water soluble prodrugs of paclitaxel
Journal of Controlled Release 63, 141.153.
14. Cordeiro C., Wiseman D.J., Lutwyche P., Uh M., Evans J.C., Finlay B.B., Webb M.S. (2000)
Antibacterial efficiency of gentamicin encapsulated in ph sensitive liposomes against an in vivo *Salmonella enterica* serovar typhimurium intracellular infection model
Antimicrobial Agents and Chemothreapy 44, 533-539.
15. Covens A., Kirby J., Shaw p., Chapman W., Franseen E. (1999)
prognostic factors for relapse and pelvic lymph node metastases in early stage • adenocarcinoma of the cervix
Gynecologic Oncology 74, 423-427.
16. Crosasso P., Ceruti M., Brusa P., Arpicco S., Dosio F., Cattel L. (2000)
Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel containing liposomes
Journal of Controlled Release 63, 19-30.

17. Cserni G. (2000)
Mapping metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer
American journal of clinical pathology 113, 351-354.
18. Cserni G., Boross G., Baltas B. (2000)
Value of axillary sentinel nodal status in breast cancer
World journal of surgery 24, 341-344.
19. Davidson J.W., Clarke E.A., Walker D. (1967)
Radiographic appearances in chromolymphadenography
J. Canad. Ass. Radiol. 18, 316-320.
20. Derakhsani P., Neubauer S., Braun M., Bargmann H., Heidenreich A., Engelmann U. (1999)
Results and 10 year follow up in patients with squamous cell carcinoma of the penis
Urologica Internationalis 62, 238-244.
21. Drummond D.C., Meyer O., Hong K.L., Kirpotin D.B., Papahadjopoulos D. (1999)
Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors
Pharmacological Reviews 51, 691-743.
22. Elema J.D., Van Minde S.H., Oldhoff J. (1967)
Some experience with chromolymphography
Arch. Chir. Neer. 19, 291-302.
23. Fattal E., Delattre J., Dubernet C., Couvreur P. (1999)
Liposomes for the delivery of nucleotides and oligonucleotides
STP Pharma Sciences 9, 383-390.
24. Gajdos C., Tartter P.I., Bleiweiss I.J. (1999)
Lymphatic invasion, tumor size and age are independent predictors of axillary lymph node metastases in women with T1 breast cancers
Annals of Surgery 230, 692-696.
25. Gallegos Hernandez J.F., Gutierrez F., Barroso S., Labastida S., Resendiz J. (1998)
Identification of sentinel lymph node with patent blue V in patients with cutaneous melanoma
Gac. Med. Mex. 134, 419-422.
26. Gennari R., Stoldt H.S., Bartolomei M., Zurrada S., Testori A., Mazzarol G., Paganelli G., Veronesi U. (1999)
Sentinel node localisation: A new prospective in the treatment of nodal melanoma metastases
International Journal of Oncology 15, 25-32.

27. Gerteis W., Greuel H. (1967)
Kontrastmittelembolie der Lunge bei Lymphographie (Untersuchung bei physiologischem Lymphabfluss)
Fortschr. Geb. Röntgenstr. Nuklearmed. 108, 565-576.
28. Gonzalez Vela M.C., Garijo M.F., Fernandez F.A., Buelta L., Val Bernal J.F. (1999)
Predictors of axillary lymph node metastases in patients with invasive breast carcinoma by a combination of classical and biological prognostic factors
Pathology Research and Practice 195, 611-618.
29. Gregl A., Eydt M., Krack U., Fichtner H.J. (1968)
Chromolymphographie der oberen Extremität
Fortschr. Röntgenstr. 108, 565-576.
30. Gregl A., Kienle J., Steizner J., Yu D., Schoen H. (1969)
Morphologische Veränderungen in den Lymphknoten nach Lipiodolymphographie
Fortschr. Geb. Röntgenstr. Nuklearmed. 110, 297-306.
31. Häder D.P., Häder M. (1993)
Moderne Labortechniken
Thieme, Stuttgart, New York
32. Haigh P.I., Giuliano A.E. (2000)
Role of sentinel lymph node dissection in breast cancer
Annals of medicine 32, 51-56.
33. Harzmann R., Hirnle P., Geppert M. (1989)
Retroperitoneal lymph nodal visualization using 30% guajazulen blue (chromolymphography)
Lymphology 22, 147.149.
34. Hirnle E., Hirnle P., Wright J.K. (1991)
Distribution of liposome incorporated carboxyfluorescein in rabbit eyes
J. Microencapsulation 8, 391-399.
35. Hirnle P. (1985)
Endolymphatic application of bleomycin oil suspensions in dog model
Lymphology 18, 56.63.
36. Hirnle P. (1991)
Drug depots in lymph nodes: which carrier is most appropriate?
J. Microencapsulation 8, 103-119.

37. Hirnle P. (1991)
Histological findings in rabbit lymph nodes after endolymphatic injection of liposomes containing blue dye
J. Pharm. Pharmacol. 43, 217-218.
38. Hirnle P. (1997)
Liposomes for drug targeting in the lymphatic system
Hybridoma 16, 127-132.
39. Hirnle P., Harzmann R., Wright J.K. (1988)
Patent blue V encapsulation in Liposomes: potential applicability to endolymphatic therapy and preoperative chromolymphography
Lymphology 21, 187.
40. Hirnle P., Heide P.E. (1985)
Iodinated emulsions of cytostatic agents for combined diagnostic and therapeutic lymphography, 279-281
In: Casley Smith J.R., Piller N.B.: Progress in lymphography
University of Adelaide Press, Adelaide
41. Hirnle P., Jaroni H., Schmidt K.H. (1985)
Endolymphatic application of liposomes containing bleomycin in rabbits
Lymphology 18, 115.
42. Hirnle P., Jaroni H., Schubert R., Schmidt K.H. (1986)
Endolymphatic application of liposomal cytostatics for treatment of lymph node metastases: first animal experiments, 211
In: Schmidt K.H.: Liposomes as drug carriers
Thieme, Stuttgart, New York
43. Hirnle P., Schubert R. (1991)
Liposomes containing blue dye for preoperative lymph node staining: Distribution and stability in dogs after endolymphatic injection
International Journal of Pharmaceutics 72, 259-269.
44. Isaev V.G., Garmaeva T.T., Skorokhod A.A., Parovichnikova E.N., Tyurina N.G., Kucher R.A., Vitvitsky V.M., Ataulakhanov F.I., Savchenko V.G. (1999)
Immobilized forms of daunorubicin in patients with acute leukemia
Terapevticheskii Arkhiv 71, 32-37.
45. Ishida O., Maruyama K., Yanagie H., Eriguchi H., Iwatsuru M. (2000)
Targeting chemotherapy to solid tumors with long circulating thermo sensitive liposomes and local hyperthermia
Jap. J. o Canc. Res. 91, 118-126.

46. Joensuu H. (2000)
Novel cancer therapies: more efficacy, less toxicity and improved organ preservation
Annals of medicine 32, 31-33.
47. Joosten J.J.A., Strobbe L.J.A., Wauters C.A.P., Pruszczynski M., Wobbes T., Ruers T.J.M. (1999)
Intraoperative lymphatic mapping and the sentinel node concept in colorectal carcinoma
British Journal of Surgery 86, 482-486.
48. Kawakami S., Sato A., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M. (2000)
Mannose receptor mediated gene transfer into macrophages using novel mannosylated cationic liposomes
Gene Therapy 7, 292-299.
49. Kedar E., Gur H., Babai I., Samira S., Even Chen S., Barenholz Y. (2000)
Delivery of cytokines By Liposomes: hematopoietic and immunomodulatory activity of interleukin 2 encapsulated in conventional liposomes and in long circulating liposomes
Journal of Immunotherapy 23, 131-145.
50. Kern K.A. (1999)
Sentinel lymph node mapping in breast cancer using subareolar injection of blue dye
Journal of the American college of surgeons 189, 539-545.
51. Knippers R. (1995)
Molekulare Genetik
6. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York
52. Koehler P.R., (1977)
Complications of lymphography, 209-213
In: Mayall R.C., Witte M.H.: *Progress in lymphology*
Plenum Press. New York, London.
53. Kollias J., Gill P.G., Chatterton B.E., Hall V.E., Bochner M.A., Coventry B.J., Farshid G. (1999)
Reliability of sentinel node status in predicting axillary lymph node involvement in breast cancer
Med. J. o. Austral. 171, 461-465.
54. Law S.L., Huang K.J., Chiang C.H. (2000)
Acyclovir containing liposomes for potential ocular delivery, corneal penetration and absorption
Journal of Controlled Release 63, 135-140.

55. Lucci A., Turner R.R., Morton D.L. (1999)
Carbon dye as an adjunct to isosulfan blue dye for sentinel lymph node dissection
Surgery 126, 48-53.
56. Ludvic W. (1965)
Vitalfärbung von Lymphknoten als Hilfsmittel zur Lymphadenektomie
Urol. Int. 19, 390-409.
57. Luna Perez P., Huelga A.R., Almendaro S.L., Rodriguez Coria D.F., Macouzet J.G., Gallardo S.D. (1999)
The surgeon as prognostic factor for local recurrence and survival in the anal sphincter
Revista de Investigacion Clinica 51, 205-213.
58. Madry H., Tripple S.B., (2000)
Efficient lipid mediated gene transfer to articular chondrocytes
Gene Therapy 7, 286-291.
59. Melchert F. (1985)
Antineoplastische Chemotherapie (Prinzip, Möglichkeiten, Grenzen)
in: H Schmidt Mathiesen: Allgemeine gynäkologische Onkologie
Urban&Schwarzenberg, München
60. Molero Monfort M., Martin Bioska Y., Sagrado S., Villanueva Camanas R.M., Medina Hernandez M.J. (2000)
Micellar lipid chromatography for prediction of drug transport
J. o. Chromatog.A. 870, 1-11.
61. Moribe K., Maruyama K., Iwatsuru M. (1999)
Molecular localization and state of amphotericin B in PEG liposomes
International Journal of Pharmaceutics 193, 97-106.
62. Newton D.W., Breen P.J., Brown D.E., Mackie J.F., Kluza R.B. (1981)
Physicochemical characteristics of patent blue violet dye.
J. Pharm. Sci. 70, 122-126.
63. Numers C. (1965)
Durch Lymphographie hervorgerufene Veränderungen der Lymph und Blutgefäße
Ann. Chir. Gynaec. Fenn. 54, 232.236.
64. Peschka, R., Purmann, T., Schubert, R. (1994)
Tangential filtration preparation of liposomal drugs and liposome product thereof. U.S. Application No 08/333,790.

65. Pontes A.C.D., Caetano M.N.P., Sontos Magalhaes N.S. (1999)
Physicochemical characterization and antimicrobial activity of benzathine penicillin G liposomes
STP Pharma Sciences 9, 419-427.
66. Poujol S., Tilleul P., Astre C., Martel P., Fabbro M., Pinguet F. (1999)
Effect of mitoxantrone liposomes on multidrug resistant breast cancer cells
Anticancer Research 19, 3327-3331.
67. Pump B., Hirnle P. (1996)
Preoperative lymph node staining with liposomes containing Patent blue Violet;
A clinical case report
J. Pharm. Pharmacol. 48, 699-701.
68. Reuhl T., Haensch W., Markwardt J., Schlag P.M. (1998)
Sentinel lymph node detection in breast cancer
Zentralblatt für Chirurgie 123, 72-74.
69. Roberts R.H., Krige J.E.J., Bornman P.C., Terblanche J. (1999)
Pancreaticoduodenectomy for ampullary carcinoma
American Surgeon 65, 1043-1048.
70. Rodier J.F., Janser J.C., Routiot T., David E., Ott G., Schneegans O., Ghnassia J.P. (1999)
Sentinel node biopsy in vulvar malignancies : A preliminary feasibility study
Oncol. Reports 6, 1249-1252.
71. Roesken F., Uhl E., Curri S.B., Menger M.D., Messmer K. (2000)
Acceleration of wound healing by topical dru delivery via liposomes
Langenbecks Archives of Surgery 385, 42.49.
72. Roumen R.M., Geuskens L.M., Valkenburg J.G. (1999)
In search of the true sentinel node by different injection techniques in breast cancer patients
Eur. J. Surg. Oncol. 25, 347-351.
73. Rozenberg S., Liebens F., Ham H. (1999)
False- negative rates in sentinel node in breast cancer –reply
Lancet 354, 773-774.
74. Rozenberg S., Liebens F., Ham H. (1999)
The sentinel node in breast cancer: acceptable false-negative rate
Lancet 353, 1937-1938
75. Rummelhardt S. (1965)
Lymphographie mit Lipiodol Chlorophyll
Z. Urol. Neph. 58, 609-612.

76. Salvat J., Margonari H., Hardelin D. (1999)
Anaphylactic shock due to patent blue used to search for the sentinel node
J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. Paris 28, 393-394.
77. Scherphoff G.L., Romero E.L., Velinova M.J., Kamps J.A.A.M., Konig G.A.,
Meijer D.K.F., Swart P., Daemen T. (1999)
Endothelial and transendothelial delivery of pharmaceutically active agents;
potential of liposomes
Cells of the Hepatic Sinusoid 7, 73-78.
78. Schmidt Mende M., Mielke J., Eisenberg F., Spelsberg F. (1968)
Zur Verbesserung der radikalen abdominellen Lymphadenektomie bei
Hodentumoren
Münch. Med. Wschr. 109, 1417-1420.
79. Seigerwald P.A., Castenholz A., Schubert R., Hirnle P. (1994)
Uptake of liposomes by lymphatic vessels after interstitial injection into the
tongue of the rat
Lymphology 27, 335-338.
80. Shoaib T., Soutar D.S., Prosser J.E., Dunaway D.J., Gray H.W., Mc Currach
G.M., Besset R.G., Robertson A.G., Oliver R., Mac Donald D.G. (1999)
A suggested method for sentinel node biopsy in squamous cell carcinoma of the
head and neck
Head and Neck Journal for the Sciences and Specialities of the Head and Neck
21, 728-733.
81. Spelsberg F., Schmidt Mende M., Kuss R. (1968)
Experimentelle Untersuchung zur intravitalem Anfärbung von Lymphgewebe
Langenbecks Arch. Chir. 322, 835-843.
82. Tochi A., Lepre L., Costa G., Lotta G., Mazzoni G., Agostani N., Piccini M.
(1999)
Rectal cancer and inguinal metastases; Prognostic role and therapeutic
indications
Disease of the Colon and Rectum 42, 1464-1466.
83. Ung O.W., Wetzig N.R. (1999)
Sentinel node biopsy: evaluating a new technique
Med. J. o. Austral. 171, 452-453.
84. Van Slooten M.L., Storm G., Zoepfel A., Kupcu Z., Boerman O., Crommelin
D.J.A., Wagner E., Kircheis R. (2000)
Liposomes containing interferon gamma as adjuvant in tumor cell vaccines
Pharmac. Res. 17, 42-48.

85. Vauthier C., Seiller M., Weingarten C., Couvreur P. (1999)
Contribution to the development of oral dosage form for insulin delivery
STP Pharma Sciences 9, 391.396.
86. Wallace A.M., Vera D.R., Stadalnik R.C. (1999)
Blue dye and Tc-99m-labeled human serum albumin: Sentinel node detection by
magic bullets?
J. o. Nucl. Med. 40, 1149-1150.
87. Wang Y.Y., Eksborg S., Lewensohn R., Lindberg A., Liliemark E. (1999)
In vitro cellular accumulation and cytotoxicity of liposomal and conventional
formulations of daunorubicin and doxorubicin in resistant K562 cells
Anti Cancer Drugs 10, 921-928.
88. Wilhelm A.J., Mijnhout G.S., Franssen E.J.F. (1999)
Radiopharmaceuticals in sentinel lymph node detection – an overview
Eur. J. o. Nucl. Med. 26, 36-42.
89. Wolf P., Maier H., Mulleger R.R., Chadwick C.A., Hofmann Wellenhof R.,
Soyer H.P., Hofer A., Smolle J., Horn M., Cerroni L., Yarosh D., Klein J.,
Bucana C., Dunner K., Potten C.S., Honigsmann H., Kerl H., Kripke M.L.
(2000)
Topical treatment with liposomes containing T4 endonuclease V protects human
skin in vivo from ultraviolet induced upregulation of interleukin 10 and tumor
necrosis factor alpha
Journal of Investigative Dermatology 114, 149-156.
90. Yamoto J., Kosuge T., Shimada K., Yamasaki S., Moriya Y., Sugihara K. (1999)
Repeat liver resection for recurrent colorectal liver metastases
American Journal of Surgery 178, 275-281.
91. Ye Q., Asherman J., Stevenson M., Brownson E., Katre N.V. (2000)
Depo Foam technology: a vehicle for controlled delivery of protein and peptide
drugs
J. o. Contr. Release 64, 155-166.
92. Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y., Fukushima S., Okamoto K., Kataoka K.
(1999)
selective delivery of adriamycin to a solid tumor using a polymeric micelle
carrier system
Journal of Drug Targeting 7, 171.186.
93. Zerbino D., Gelfoot M.M., Kolbenstvedt A. (1976)
Chromolymphographie und Vitalfärbung von Lymphgefäßen und Lymphknoten
281-284
In: Lüning M., Wiljasalo M., Weissleder H.: Lymphographie bei malignen
Tumoren,
Thieme, Stuttgart

94. Zweifach B.W., Prather J.W. (1975)
Micromanipulation of pressure in terminal lymphatics in the mesentery
American Journal of Physiology 228, 1326.

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Peter Hirnle für die freundliche Überlassung des Themas. Ferner danke ich Herrn Professor Dr. nat. Rolf Schubert für die Herstellung der Liposomen und Herrn Dr. med. Jens Nefflen für die Unterstützung bei der Durchführung des Versuchs.