

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Achim Rody

**Bestimmung superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel im murinen Modell
zur MPI-Darstellung axillärer Sentinellymphknoten beim Mammakarzinom:
Experimenteller Vergleich von
Atomabsorptionsspektrometer und Magnetpartikelspektrometer**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

– Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von
Christina Lotta Sydow
Aus Göttingen

Lübeck 2020

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. habil. Dominique Finas
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Zwaan
Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2021
Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 18.02.2021
Promotionskommission der Sektion Medizin

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	3
2	EINLEITUNG	5
2.1	EPIDEMIOLOGISCHE DATEN ZUM MAMMAKARZINOM	5
2.2	MAMMAKARZINOM UND METASTASIERUNG	5
2.3	LYMPHONODEKTOMIE UND SENTINELLYMPHONODEKTOMIE	6
2.4	METHODEN DER SENTINELLYMPHKNOTENMARKIERUNG	8
2.4.1	<i>Technetium-99m</i>	9
2.4.2	<i>Patentblau V</i>	10
2.4.3	<i>Indocyaningrün</i>	10
2.4.4	<i>Sienna+[®] / SentiMag[®]</i>	11
2.5	MAGNETIC PARTICLE IMAGING	12
2.5.1	<i>Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel</i>	12
2.5.2	<i>Prinzip des Magnetic Particle Imaging</i>	13
3	FRAGESTELLUNG	16
3.1	HINTERGRUND	16
3.2	HYPOTHESE	17
4	MATERIAL UND METHODEN	19
4.1	REAGENZIEN UND GERÄTSCHAFTEN	19
4.1.1	<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterial</i>	19
4.1.2	<i>Geräte</i>	19
4.2	VERSUCHSTIERE UND TIERVERSUCHSANTRAG	20
4.2.1	<i>Tierversuchsantrag</i>	20
4.2.2	<i>Versuchstiere</i>	20
4.2.3	<i>Probengewinnung</i>	20
4.3	HISTOLOGIE	25
4.4	MAGNETPARTIKELSPEKTROMETRIE	25
4.4.1	<i>Kontrastmittel Resovist[®]</i>	25
4.4.2	<i>Magnetpartikelspektrometer</i>	27
4.5	ATOMABSORPTIONSSPEKTROMETRIE	28
4.5.1	<i>Gewebehomogenisierung</i>	28
4.5.2	<i>Eisenstandardlösung</i>	30
4.5.3	<i>Atomabsorptionsspektrometrie</i>	30
4.6	STATISTISCHE ANALYSE	31
4.6.1	<i>Prism 6 – GraphPad</i>	31
4.6.2	<i>XLStat</i>	32
5	ERGEBNISSE	33
5.1	ATOMABSORPTIONSSPEKTROMETRIE	33
5.1.1	<i>Bestätigung des Sentinellymphknoten-Konzeptes</i>	34
5.1.2	<i>Entnahmeregion C: Leiste, Lymphknoten (CRL/CLL) und Fettgewebe (CRF/CLF)</i>	36
5.1.3	<i>Entnahmeregion B: Brustgewebe (BRB/BLB)</i>	37
5.1.4	<i>Entnahmeregion A: Axilla, Lymphknoten Level I (ARL I/ALL I)</i>	39
5.1.5	<i>Entnahmeregion A: Axilla, Fettgewebe Level I (ARF I/ALF I)</i>	42
5.1.6	<i>Entnahmeregion A: Axilla, Lymphknoten Level II (ARL II/ALL II)</i>	44
5.1.7	<i>Entnahmeregion A: Axilla, Fettgewebe Gewebe Level II (ARF II/ALF II)</i>	45
5.2	MAGNETPARTIKELSPEKTROMETRIE	47
5.3	VERGLEICH DER ERGEBNISSE VON AAS UND MPS	51
5.4	HISTOLOGIE	54

6	DISKUSSION	56
6.1	EINZELBETRACHTUNG DER AAS-ERGEBNISSE.....	59
6.1.1	<i>Proben der Leistenregion.....</i>	59
6.1.2	<i>Brustdrüsengewebe.....</i>	60
6.1.3	<i>Umgebendes Gewebe der axillären Lymphknoten Level I (ARF I/ALF I).....</i>	61
6.1.4	<i>Axilläre Lymphknoten Level I (ARL I/ALL I).....</i>	63
6.1.5	<i>Axilläre Lymphknoten und umgebendes Gewebe Level II (ARL II/ALL II sowie ARF II/ALF II).....</i>	73
6.2	MPS-ERGEBNISSE	74
6.3	VERGLEICH VON AAS-DATEN MIT MPS-DATEN.....	77
6.4	HISTOLOGIE.....	79
7	AUSBLICK	80
8	ZUSAMMENFASSUNG	81
9	LITERATUR	83
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	89
11	ANHANG	91
11.1	ZULASSUNG TIERVERSUCHSANTRAG.....	91
12	DANKSAGUNG.....	93
13	LEBENS LAUF.....	95
14	FORSCHUNGSFÖRDERUNG / PREISE	96
15	EIGENE PUBLIKATIONEN.....	97
16	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	99

2 Einleitung

2.1 Epidemiologische Daten zum Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Frau mit einer weltweiten Erkrankungsrate von 1,4 Millionen Neuerkrankungen im Jahr 2008. Dies entspricht 23% aller malignen Erkrankungen der Frau.[1] Im Jahr 2002 lag die Zahl der Neuerkrankungen weltweit bei ca. 1,15 Millionen.[2] Nach den aktuellen Daten für Deutschland ist die Neuerkrankungsrate im Jahr 2014 bei 69.220 und die Anzahl der Sterbefälle bei ca. 17.670 Frauen gewesen.[3] Auf Basis dieser Zahlen ist davon auszugehen, dass etwa jede 8. Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom erkrankt. Von diesen erhalten ungefähr 30% die Diagnose vor dem 55. Lebensjahr. Die epidemiologische Prognose für 2018 sagt 71.900 Neuerkrankungen und 18.136 Sterbefälle für die weibliche Bevölkerung in Deutschland voraus.[3] Die realen Daten erhalten wir erst nach deren regulärer Veröffentlichung durch das Robert-Koch-Institut (RKI) und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (GEKID). Da auch Männer eine Brustdrüse haben, können auch sie am Mammakarzinom erkranken. Etwa 1% der Männer erkrankt in Deutschland jährlich am Mammakarzinom, das entspricht 650 Neuerkrankungen.[3]

2.2 Mammakarzinom und Metastasierung

Das Mammakarzinom verhält sich bei allen Geschlechtern nach derzeitigem Kenntnisstand gleich, weshalb im Folgenden nicht zwischen ihnen unterschieden wird. Der Tumor kann sich lokal ausbreiten (adjuvante Situation, heilbare Phase). Verlässt der Tumor den Bereich der Brust und der Axilla, kommt es zu einer Fernmetastasierung und damit zu einer systemischen Ausbreitung der Erkrankung (palliative Situation, auch: chronische, nicht mehr heilbare Phase). Eine Fernmetastasierung des Mammakarzinoms erfolgt entweder hämatogen (bevorzugt in Lunge, Leber, Knochen, ggf. auch Gehirn) oder lymphogen vom Primärtumor aus entlang der Lymphbahnen zur Axilla (Adjuvanz) und darüber hinaus (Palliation). Zur Detektion von Fernmetastasen erfolgt ein entsprechendes Staging mittels bildgebender Diagnostik durch Computertomografie (CT: Leber, Lunge, Knochen), Sonografie (Leber), Szintigrafie (Knochen), ggf. auch

Magnetresonanztomografie (MRT: Leber). Das Staging bildet u.a. die Basis bei der Beurteilung des Tumorstadiums.

Auf den Aspekt der Fernmetastasierung soll in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden, da unser Fokus auf Fragestellungen zur lokalen lymphogenen Filialisierung und der Detektion von axillären Lymphknotenmetastasen bzw. deren Ausschluss in der Primärsituation liegt. Die Primärsituation ist gerade dadurch gekennzeichnet, dass es noch nicht zu einer Fernmetastasierung gekommen ist, wohl aber eine lymphogene axilläre Filialisierung vorliegen kann. Dies hat Relevanz für das Tumorstadium, die Prognose und die Festlegung der onkologischen Therapie.

Bevor eine Therapie des Mammakarzinoms festgelegt werden kann, erfolgt eine lokale Evaluation von Brust und Axilla mittels klinischer Untersuchung (Inspektion, Palpation), Mammografie, Mamma-/Axillasonografie und ggf. Mamma-MRT. Im Rahmen dieses Stagings wird die Axilla im Hinblick auf eine lokale Metastasierung in axilläre Lymphnoten evaluiert, da der Lymphabfluss aus der Brustdrüse größtenteils über die Lymphbahnen in die Lymphknoten der Axilla erfolgt. Dieses und das o.g. Staging werden zum Ausschluss einer palliativen Situation durchgeführt, die eine lokale Intervention (Operation, Bestrahlung) meist nicht rechtfertigt. Nach Feststellung einer adjuvanten Situation erfolgt die Festlegung einer operativen Therapie vor oder nach einer Systemtherapie (adjuvant oder neoadjuvant, z.B. Chemotherapie, Antikörpertherapie etc.).

2.3 Lymphonodektomie und Sentinellymphonodektomie

In der Vergangenheit entsprach die Evaluation der axillären Lymphknoten der Entnahme allen in der Axilla vorhandenen Lymph-Fettgewebes aus den anatomischen Level I-III der Axilla (sogenannte ultra-radikale Axilladissektion oder ultra-radikale Lymphonodektomie). Später wurde die Radikalität eingeschränkt und die Entnahme von mindestens 10 Lymphknoten aus Level I-II der Axilla gefordert (sogenannte radikale Axilladissektion, auch: radikale Lymphonodektomie). Die anatomisch definierten Grenzen der Level I-III der Axilla sind wie in Tabelle 1 angegeben.

Durch dieses relativ ungerichtete Vorgehen kam es wegen der damit verbundenen Schädigung des Gewebes zu einer hohen Morbidität: Lymphödem von Arm und Brust/Thorax, neurologische Störungen (Schmerzen, Gefühlsstörungen,

Bewegungsstörungen), Bewegungseinschränkungen von Schulter und Arm, etc. und sekundären Effekten z.B. der Psyche oder/und soziale Beeinträchtigungen durch diese primäre Morbidität. Nach einer kompletten Lymphadenektomie der Axilla tritt beispielsweise in bis zu 30% der Fälle ein Lymphödem des Armes auf.[4-6]

Tabelle 1 Definition der anatomischen Grenzen der axillären Lymphstationen der Level I-III beim Menschen (mod. n. [7]).

Level	Anatomische Grenzen
I	latero-kaudal des M. pectoralis minor
II	dorsal des M. pectoralis minor medial des lateralen und lateral des medialen Randes des M. pectoralis minor, „darunter“
III	medio-kranial des M. pectoralis minor, in der Fossa infraclavicularis

Eine Axilladisektion wurde neben der diagnostischen Intention (Staging) auch durchgeführt, um axilläre Metastasen zu detektieren und bei deren Vorliegen eine therapeutische Entfernung derselben zu erreichen. Das bedeutete, dass ein nicht unerheblicher Anteil an Frauen die Radikalität der Operation und der daraus resultierenden Morbidität mit teils gravierender Einschränkung ihrer Lebensqualität durchlaufen musste, obwohl sie gar keine Lymphknotenmetastasen hatten. Um die gravierenden Nebenwirkungen des operativen Ansatzes zu reduzieren, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Radikalität der Evaluation der lymphogenen axillären Metastasierung zu reduzieren.

Die Vorstellung der Drainage der Lymphe der Brust folgt anatomisch dem im Folgenden beschriebenen Kaskadenmodell: Tumorzellen werden vom Primärtumor über die Lymphbahnen von der Brust in die axillären Lymphknoten transportiert, wo sie eine Metastase bildet. Dominante Lymphgefäße münden in der Axilla in erste Lymphknoten, die eine Wächterfunktion für alle nachgeordneten Lymphknoten ausüben (sog. Wächter- oder Sentinellymphknoten, SLN). Im Idealfall ist dies nur ein Lymphknoten. Könnte dieser selektiv gefunden, aufgesucht und zum histopathologischen Ausschluss einer Metastasierung entnommen werden, dann wäre bei Tumorfreiheit die Entnahme weiterer Lymphknoten verzichtbar. Es wurde ein Weg gefunden, der dies möglich macht: Mit der Markierung der Lymphflüssigkeit der Brust und dem Verfolgen dieser Markierung bis zum SLN, in dem diese kumuliert, wurde die Sentinellymphonodektomie (SLNB) möglich. Dass dieser Ansatz dem Modell

entsprechend funktioniert und onkologisch sicher ist, wurde inzwischen vielfach wissenschaftlich erwiesen.[4, 5, 8, 9] Allerdings muss der SLN intraoperativ sicher aufgefunden und entnommen werden können. Durch die Anwendung der SLNB profitieren ca. 70-80% der Patientinnen von einer deutlich geringeren Morbidität.[10]

Sind die Lymphknoten der Axilla vor Operation bereits suspekt (auffällig bei Tastuntersuchung oder Sonografie der Axilla), so kann z.B. eine gezielte Stanzbiopsie die Diagnose einer Metastasierung sichern. Eine SLNB kommt wegen des Nachweises einer Metastasierung dann nicht mehr in Frage und es erfolgt eine therapeutische Axilladisektion. Heute erfolgt alternativ die Implantation eines Markers in den auffälligen Lymphknoten (Coil, Ruß (Tätowierung) etc.), um diesen nach systemischer Therapie bei Operation gezielt aufzusuchen und zur Diagnostik zu entnehmen. An diesem sicher metastasierten Lymphknoten kann das Therapieansprechen beurteilt werden.

Ogleich die Radikalität der axillären Evaluation und der operativen Tumorreduktion in der jüngsten Vergangenheit deutlich abgenommen haben, ist der Status der axillären Lymphknoten (Nodalstatus) auch heute noch einer der wichtigsten Prognosefaktoren beim Mammakarzinom. Daher wird auch weiterhin der Nodalstatus evaluiert und das therapeutische Vorgehen am Befund orientiert (System- und Strahlentherapie). Dabei kommen verschiedene Verfahren der Sentinellymphonodektomie zur Anwendung, wie im Folgenden dargestellt.[10, 11]

2.4 Methoden der Sentinellymphknotenmarkierung

Allen Methoden der Sentinellymphknotenmarkierung liegt das gleiche Vorgehen zugrunde. Hierbei wird eine Markersubstanz unter die Haut (s.c.) der betroffenen Brust, um die Brustwarze herum (periareolär), in oder um den Tumor injiziert. Die Markersubstanzen werden auch Tracer genannt. Der Tracer wird über die Lymphe zum SLN transportiert und kann dort nach einer vorbestimmten Zeit in der Axilla detektiert werden. Es können einer oder mehrere SLNs gefunden werden, manchmal jedoch auch keiner (Methodenversager). Dann muss eine Axilladisektion erfolgen.

Als Tracer für das Auffinden des Sentinellymphknotens kommen verschiedene Substanzen in Frage, die bereits in Anwendung sind: Technetium-99m Kolloid (^{99m}Tc), Patentblau V, Indocyaningrün (ICG), superparamagnetische Eisenoxid-

Nanopartikel (SPION). Empfohlen wird von diesen derzeit durch die Organgruppe Mamma der Deutschen Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) nur das Technetium-99m Kolloid mit ‚++‘ als ‚Soll‘empfehlung, die anderen werden mit ‚±‘ als ‚Kann‘empfehlung für individuelle Einzelfälle eingestuft (kein Vorteil für Patientinnen erwiesen).[11] Im Folgenden werden die Marker und Methoden zur Übersicht dargestellt.

2.4.1 Technetium-99m

Technetium-99m (^{99m}Tc) ist eine radioaktive Substanz (Gammastrahler), die für den Einsatz extra frisch hergestellt werden muss. Diese kann nach Injektion im Gewebe nicht visuell, also nicht mit dem bloßen Auge nachverfolgt werden. Die Detektion erfolgt bei ^{99m}Tc daher unter Verwendung einer Gamma-Handsonde, die die freigesetzte Strahlung registriert.[12] Je höher die Konzentration des ^{99m}Tc im Gewebe, desto höher ist die gemessene Strahlung. Das Messgerät der Gamma-Handsonde generiert ein akustisches Signal, das der Operateur der Strahlungsintensität (Zählrate der Zerfälle pro Zeiteinheit) zuordnen kann: je höher der Ton, desto höher die Zählrate. Außerdem wird zur quantitativen Bestimmung in einem Display (Messwertanzeige) die Zahl der Zerfälle (Messwert der Zählrate) visualisiert.[12]

Lymphknoten, bei denen mindestens 10% der radioaktiven Ausgangsstrahlung gemessen werden kann, sind SLNs und werden nach deren Identifizierung operativ entfernt.[5, 8] Dazu wird mit der Gamma-Handsonde die Haut über der Axilla abgesucht und am Ort des höchsten Ausschlages (ungefähre Lage des SLN) ein Hautschnitt gesetzt. Unter fortwährendem Messen wird in der Tiefe der SLN aufgesucht und möglichst selektiv und gewebeschonend herauspräpariert.

Obgleich die SLNB Methoden eindeutige Vorteile bietet, muss auch auf nicht zu vernachlässigende Nachteile der Methode unter Verwendung einer radioaktiven Substanz eingegangen werden[13]: Für die Markierung mit Radionukliden muss eine Nuklearmedizinische Abteilung in oder an dem operierenden Krankenhaus vorhanden sein und es müssen vielfältige strahlenschutztechnische Sicherheitsregeln eingehalten werden, was den Einsatz dieses Verfahrens an kleineren Krankenhäusern ausschließt oder doch deutlich erschwert.[9] Ein weiterer Nachteil ist die Tatsache, dass die Markierung mittels ^{99m}Tc 12-24 Stunden vor OP durchgeführt werden muss. Eine präoperative szintigraphische Darstellung ist laut den neuen Empfehlungen der Organgruppe Mamma der AGO

nicht mehr zwingend notwendig („±“ Empfehlung).[11] Des Weiteren birgt der Umgang mit radioaktiven Produkten Risiken für alle beteiligten Personen, wie insbesondere der Patientin, aber in geringerem Maße auch des OP-Personals und des Pathologen, wie weiterer an dem Transport- und Verarbeitungsprozess der Probe beteiligter Personen. Dieses Risiko wird allerdings heute eher gering eingeschätzt.[14]

2.4.2 Patentblau V

Anders, als ^{99m}Tc , erfolgt die Detektion von Patentblau V visuell. Der Eisen-freie Farbstoff wird meist intraoperativ intradermal in die Periareolarregion injiziert. Es erfolgt eine kurze Massage der Brust zur Verteilung des Farbstoffes. Danach können gelegentlich die Lymphbahnen, die zum SLN führen an der Haut verfolgt werden. Oft liegen diese aber tiefer im Gewebe, weshalb primär die Haut der Axilla willkürlich eröffnet werden muss. Die Präparation muss vorsichtig erfolgen, da bei Verletzung der Lymphbahnen das austretende Blau durch farbliche Kontamination des Gewebes das Auffinden des SLN erschwert. Lymphknoten, die makroskopisch Farbe aufnehmen, sind SLNs und werden nach Identifizierung gezielt operativ entfernt.[5, 8] Bessere Detektionsergebnisse werden durch die Kombination von Patentblau V mit ^{99m}Tc erzielt.[9]

Unter der Anwendung von Patentblau V zur visuellen Markierung des SLN kann es bei Patientinnen zu Überempfindlichkeitsreaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock kommen. Hinzu kommt, dass es bei der Markierung mittels Farbe zu Fettgewebsnekrosen und einem permanenten Tätowierungseffekt der Haut kommen kann, welche ein ästhetisches Problem für die betroffenen Patientinnen darstellen kann.[15]

2.4.3 Indocyaningrün

Bei Indocyaningrün (ICG) handelt es sich um einen grün fluoreszierenden Farbstoff, der durch ein Licht von bestimmter Wellenlänge zum Leuchten angeregt werden muss. Auch ICG wird meist intraoperativ intradermal in die Periareolarregion injiziert. Nach einer Brustmassage zur Verteilung des Farbstoffs erfolgt die Detektion der Lymphbahnen und des markierten Sentinellymphknotens mittels einer speziellen Kamera, welche die Fluoreszenz detektiert. Die Techniken zur Detektion von ICG sind Gegenstand aktueller Forschungen von verschiedener Arbeitsgruppen.[16-18] Dennoch wird das Verfahren zur SLNB beim Mamma-,

Vulva-, Endometrium- und Zervixkarzinom bereits angewendet. Prinzipiell zeichnet sich diese Technik durch eine niedrige Nebenwirkungsrate sowie in Studien durch eine mit ^{99m}Tc vergleichbare Effizienz der SLN-Markierung aus. Limitationen der Methode sind die geringen Eindringtiefe des Lichtes in das Gewebe von nur 1,5 bis 2 cm und darin, dass zur Darstellung des fluoreszierenden Farbstoffs das Abschalten der OP-Beleuchtung oder Darstellung auf einem Bildschirm, sowie spezielle Gerätschaften zur optischen Anregung erforderlich sind.

2.4.4 Sienna+[®] / SentiMag[®]

Die SLNB unter Verwendung des SentiMag[®] (Endomagnetics Ltd., UK, Cambridge) wird nicht als Standard zur Darstellung des oder der SLN angesehen.[19] Dennoch wird diese Methode bereits beim Mammakarzinom angewendet. Beim SentiMag[®] handelt es sich um eine Magnetometer-Handsonde welche die magnetische Antwort superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel (SPIONs) misst.[19-23] Der Tracer (Sienna+[®]) besteht aus einer dunkelbraunen Suspension Carboxydextran beschichteter SPIONs mit einem hydrodynamischen Durchmesser von ca. 60 nm (Herstellerangaben).[24] Der Tracer wird kurz vor oder nach Einleitung der Narkose in den Tumor, um den Tumor herum oder in die Periareolarregion der betroffenen Brust injiziert. Die Messung kann 20 Minuten später beginnen, da zu diesem Zeitpunkt der Tracer die Axilla infiltriert hat. Wie bei den Farbstoffen, kann die bräunliche Färbung des Tracers als visuelles Signal zum Auffinden des SLN additiv hilfreich sein. Mittels der SentiMag[®] Magnetometer-Handsonde, welche wie die Gamma-Handsonde aus einem Handstück und einem Messgerät besteht,[19, 25, 26] wird intraoperativ nach Entfernung aller chirurgischen Instrumente aus Metall, welche mit der Messung interferieren könnten, die Region der höchsten Eisenaufnahme aufgesucht und der SLN entfernt. Das Messgerät des Magnetometers generiert ein akustisches Signal, das der Operateur der gemessenen Eisenkonzentration zuordnen kann: je höher der Ton, desto höher die Konzentration. In einigen Studien wird dieses Verfahren der SLNB mit ^{99m}Tc gleichwertig erachtet.[27] Wie bei den Farbstoffen kann es wegen der Eigenfärbung auch hier zu unerwünschten Tätowierungseffekten kommen.[27] Limitation der Methode ist die Eindringtiefe der Detektion bei erhöhtem BMI, da die Messung des magnetischen Signals von der Entfernung zwischen Handstück und Signalgeber (SPION) abhängt.[28] Wie bei den zuvor beschriebenen Verfahren muss nach Anlegen eines Hautschnittes im

Gewebe der SLN aufgesucht werden. Auch hier ist eine räumliche Orientierung im Organismus nicht möglich.

2.5 Magnetic Particle Imaging

Das Magnetic Particle Imaging (MPI) ist ein von Gleich und Weizenecker 2005 erstmals publiziertes bildgebendes Verfahren mit dem Potential einer Ortsauflösung, die dem eines Computertomografen entspricht, jedoch mit einer viel schnelleren Bildakquise (zeitliche Auflösung).[29] Beim MPI wird nicht das Gewebe selbst in ein Bildsignal umgewandelt, sondern es werden SPIONs zur Darstellung verwendet, die das Bildsignal erzeugen. Anders als die bisher dargestellten Methoden, ist das MPI in der Lage eine räumliche Orientierung zu ermöglichen, da die Signale ein dreidimensionales Bild generieren. Eine derzeit am Institut für Medizintechnik der Universität zu Lübeck in Entwicklung befindliche MPI-Handsonde könnte im Operationssaal eingesetzt werden.[30] Sie könnte aber auch schon eingesetzt werden, bevor eine Operationssituation entsteht. Zur Lymphknotendiagnostik wäre z.B. zur Entnahme einer Stanzbiopsie aus einem Lymphknoten die MPI-Handsonde verwendbar. Dabei würde das Verfahren zur SLN Darstellung wie oben beschrieben angewendet, aber der Lymphknoten nur mit einer Stanznadel aufgesucht und keine offene Operation erfolgen. Ein möglicher Tumorbefall könnte minimalinvasiv stanzbiopsisch verifiziert werden. Eine Operation wäre dann überflüssig und die Morbidität würde noch mehr reduziert. Durch die räumliche Detektion des SLN wird das Durchsuchen des Gewebes mit einer Sonde überflüssig und dieses maximal geschont. Es wird eine Stereotaxiesituation möglich, in der ein Punkt oder Volumen mittels Koordinaten bzw. bildgesteuert visuell gezielt angesteuert und eine Biopsie gezielt entnommen werden kann. Die anderen hier geschilderten Verfahren sind zwar deutlich weniger gewebetraumatisierend als die konventionelle Axilladisektion, wegen deren geringer Ortsauflösung und geringen Eindringtiefe ist es dennoch meist nicht zu vermeiden mehr Gewebe zu traumatisieren, als bei direkter Detektion erforderlich wäre. Wir sind der Meinung, dass die Verbindung von SPIONs und MPI die Nachteile der bisher bestehenden SLNB-Methoden verringern oder gar gänzlich aufheben kann.

2.5.1 Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel

Die kristalline Struktur des Kerns superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel (SPION) setzt sich aus $\text{Fe}_2^{3+}\text{O}_3\text{M}^{2+}\text{O}$ zusammen, wobei M^{2+} für ein divalenten

Metallion steht und in unserem Falle Fe^{2+} ist. Hierbei handelt es sich um sogenanntes Magnetit (Fe_3O_4).[31-33] Ihr hydrodynamischer Durchmesser (Kern und Hülle) beträgt ca. 20-150 nm. Die magnetischen Eigenschaften des SPION sind die Basis für die Bilderzeugung beim Magnetic Particle Imaging. Dabei ist ihre Partikelgröße von besonderer Bedeutung, denn größere Partikel gleichen Materials verhalten sich physikalisch anders.[34] Bei Raumtemperatur weisen SPIONs keine ferromagnetischen Eigenschaften auf, sondern verhalten sich superparamagnetisch. Elementares Eisen ist ferromagnetisch und bildet kleinste Elementarmagnete, die in gleicher Magnetisierungsrichtung spontan ausgerichtet sind. Diese werden Weißsche Bezirke oder Domänen genannt.[35] In einem angelegten Magnetfeld richten sich die Bezirke (ca. 10 μm) alle gleichartig aus (Magnetisierung) und diese Ausrichtung persistiert überwiegend bei Entfernung des äußeren Magnetfeldes (Remanenz).[35, 36] Dies drückt sich in einer Magnetisierungskurve aus (Hystereseschleife).[36] Wenn die ferromagnetischen Eisenpartikel bis auf einen einzigen Weißschen Bezirk verkleinert werden, entsteht Superparamagnetismus.[37] SPIONs weisen so ein nicht-lineares Magnetisierungsverhalten auf. Die Ausrichtung der Weißschen Bezirke kann mit der thermischen Energie bei Zimmertemperatur (18-22°C) wieder aufgehoben werden.[32] Da im Idealfall des Superparamagnetismus keine Restmagnetisierung der Partikel vorliegt, wenn das äußere Magnetfeld abgeschaltet wird, entsteht auch keine Hysterese (Hysterese-freie Magnetisierungskurve bedeutet, dass die Kurve durch den Ursprung des Koordinatensystems verläuft).[38]

Die physikalischen Eigenschaften der SPIONs waren die Basis für deren Entwicklung als Kontrastmittel zur magnetischen Bildgebung (MRT).[39, 40] Der superparamagnetische Eisenoxidkern wird von einer eisenfreien Hülle umgeben (z.B. Dextran). Diese Hülle verhindert eine Agglomeration der Eisenkerne. Durch dieses Aneinanderlegen würden die Kerne ihre superparamagnetischen Eigenschaften verlieren, da dann nicht mehr nur ein Weißscher Bezirk vorliegen würde.

2.5.2 Prinzip des Magnetic Particle Imaging

Das Magnetic Particle Imaging ist ein bildgebendes Verfahren, bei dem die Konzentration und räumliche Verteilung von SPIONs in einem Körper gemessen werden, wobei das nicht-lineare Magnetisierungsverhalten der SPIONs ihrer Darstellung im MPI dient. Dazu werden starke Magnetfelder in einer speziellen

Spulenordnung angelegt: ein statisches magnetisches Gradientenfeld (Selektionsfeld, selection field), das den feldfreien Punkt (FFP, field-free point) generiert und ein sinusförmig oszillierendes magnetisches Wechselfeld (Anregungsfeld, drive field, Abbildung 1: linke Grafik, rote Kurve), in dem die magnetischen Teilchen in Sättigung gebracht werden. In den Empfangsspulen (receive coils) wird die Magnetisierungsantwort gemessen. Werden SPIONs einem externen oszillierenden Magnetfeld ausgesetzt, so nehmen sie nicht nur die Anregungsschwingungen auf, sondern bilden noch höhere harmonische Schwingungen (sog. Harmonische in Frequenz und Amplitude). Durch die Fouriertransformation lässt sich die induzierte Spannung als Spektrum der höheren Harmonischen darstellen (Abbildung 1: linke Grafik, Graphen rechts oben und unten).[36, 37] Diese lassen sich räumlich zuordnen und messen indem ein magnetisches Feld angelegt wird, das einen FFP enthält (Abbildung 1, linke Grafik). Nur im FFP lassen sich die Harmonischen messen, da sich alle magnetischen Teilchen außerhalb dieses Punktes durch das statische Magnetfeld in Sättigung befinden (Abbildung 1: rechte Grafik). Die Harmonischen sind ganzzahlige ungerade Vielfache der Grundfrequenz [41] und korrelieren mit der Konzentration an SPIONs im Messvolumen.[42] Das MPI erzeugt eine hohe räumliche – also dreidimensionale – Auflösung im Submillimeterbereich, wenn der FFP über den Körper bewegt wird.[43] Außerdem bietet es eine schnelle Bildakquisition im Subsekundenbereich.[44]

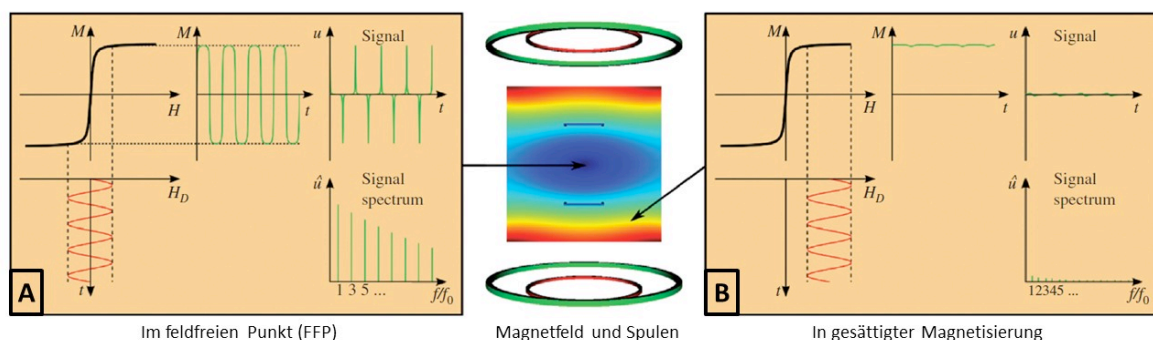


Abbildung 1: Prinzip des MPI: Ein oszillierendes Magnetfeld $H(t)$ (A+B, rote Kurve) wirkt auf die SPIONs ein und löst eine nicht-lineare magnetische Antwort aus $M(t)$ (A+B Mitte, grüne Kurve), die ein Signal ergibt $u(t)$ (A+B rechts, grüne Kurve).
 A im FFP (grün, rechts unten): die nicht-lineare magnetische Antwort erzeugt Harmonische.
 B in gesättigter Magnetisierung (grün, rechts unten): keine höheren Harmonischen messbar. (mod. n. [45]).

Das Magnetic Particle Imaging ist ein bildgebendes Verfahren, das derzeit weltweit intensiv beforscht wird und noch nicht kommerzialisiert verfügbar ist. Ein präklinisch einsetzbarer MPI-Kleintierscanner für die Forschung wurde inzwischen entwickelt und von der Firma Bruker auf den Markt gebracht (<https://www.bruker.com/products/preclinical-imaging/magnetic-particle-imaging-mpi/overview.html>). Dieser war zu unseren Messungen noch nicht an der Universität zu Lübeck etabliert und wurde daher nicht in die Studie einbezogen. Durch das an der Universität zu Lübeck etablierte Verfahren der Magnetpartikelspektrometrie war dies auch nicht erforderlich, denn dessen Funktionsweise beruht technisch auf den Prinzipien des MPI. Im Jahr 2009 gelang eine real time 3D in vivo Darstellung des schlagenden Mausherzens mittels SPIONs (Resovist[®]) durch MPI.[43] In dieser Versuchsanordnung wurden die SPIONs i.v. appliziert und nicht, wie in der hier vorgelegten Arbeit s.c. direkt ins Gewebe. Außerdem wurde ein höheres Tracervolumen in einer verdünnten Lösung eingesetzt, als es in unserem Versuch der Fall war (20 µl i.v. in 2,5-10%iger Resovist[®]-Lösung vs. 5 µl unverdünntes Resovist[®]). Die Versuche sind demnach methodisch vollständig nicht vergleichbar. Der Versuch mit dem schlagenden Mausherzen zeigt aber eindrucksvoll das Potential dieser neuen funktionell-bildgebenden Modalität in zeitlicher und räumlicher Auflösung. Gegenstand der aktuellen Diskussion ist die Übertragbarkeit auf die humane Anwendung von MPI. Dabei sind beispielsweise Fragen zur Gewebeerwärmung und Nervenstimulation in starken Magnetfeldern zu klären.[43]; [46]

3 Fragestellung

3.1 Hintergrund

In Zusammenarbeit zwischen der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe (UFK) des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck und dem Institut für Medizintechnik (IMT) der Universität zu Lübeck soll eine MPI-fähige Handsonde entwickelt werden. Sattel et al. präsentierten die Ideen hierfür im Jahr 2008.[47-49] Mit dieser Handsonde soll der Zugang zur Patientin erleichtert werden und es könnte intraoperativ eine Darstellung der zu untersuchenden Strukturen, in diesem Fall der Axillarregion und des SLN, erfolgen (Abbildung 2).[50]

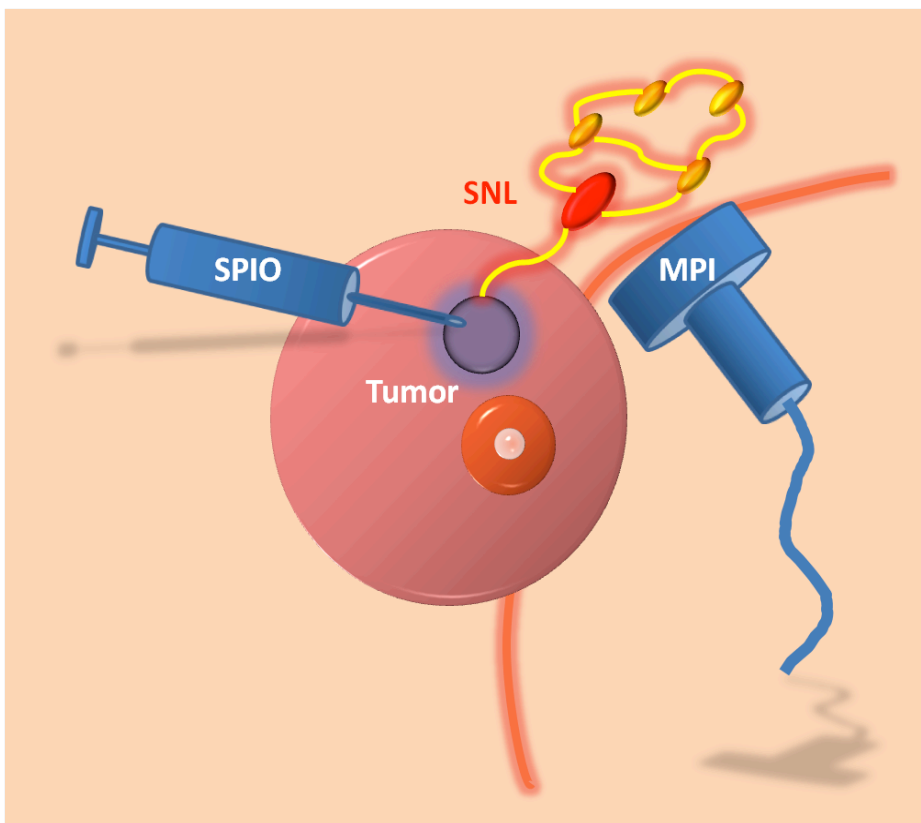


Abbildung 2, Prinzip der Verwendung einer MPI-Handsonde zur SLNB bei Mammakarzinom: Intraoperative peritumorale Tracer Injektion (SPIONs) in die Tumorregion der Brust, Migration der SPIONs zum SLN und Detektion desselben mittels MPI-Handsonde (aus: [51, 52]).

Ziel der Zusammenarbeit ist die Etablierung der SLNB unter Einsatz von Resovist[®] mittels einer MPI-Handsonde. Hierzu ist es wichtig, das Verhalten und die Migration von SPIONs im Gewebe, insbesondere im Lymph-Fettgewebe zu untersuchen. Dabei ist die Anreicherung von SPIONs im axillären Lymphknoten von besonderem Interesse. Da wir aus der Erfahrung mit i.v. SPIONs beim MRT bereits wissen, dass sich diese im tumorfreien Lymphknoten anders verhalten als im tumortragenden, müssen diese Situationen getrennt voneinander betrachtet werden. Das unterschiedliche Verhalten liegt an dem Vorhandensein bzw. nicht-Vorhandensein des Retikuloendothelialen Systems und der Prozessierung der SPION durch ortsansässige Makrophagen.[26, 32, 40, 53, 54]

Vorteile der SLNB mittels MPI wären:

1. Leichter Zugang zu Tracern (Beschaffung, Lagerung).
2. Eine radioaktive Belastung kann vermieden werden.
3. Keine lange Vorlaufzeit nach Tracerapplikation und vor Operationsbeginn.
4. Tätowierungseffekte treten nicht auf.
5. Das Zielvolumen kann stereotaktisch angesteuert werden.
6. Weitere Morbiditätsabsenkung im Vergleich zur konkurrierenden SLNB Prozeduren, da SLN direkt isoliert und entnommen werden kann.
7. Mögliche OP vermeidende Prozedur durch Biopsie des SLN per Stanze ohne Narkose und außerhalb des Operationssaals.
8. Prinzipiell ließe sich bei Erfolg die Methode auch auf andere solide Tumoren übertragen.

3.2 Hypothese

Zum Zweck der Erprobung des SLNB-MPI Ansatzes soll zunächst der Transport des Tracers Resovist[®] nach Gewebeinjektion von der Brust über die Lymphbahnen der Mamma in die Axilla und dessen Anreicherung in den axillären Lymphknoten (SLN) im gesunden Maus-Modell (tumorfrei) dargestellt und nachvollzogen werden. Zur Verifikation des Sentinellymphknotens dient die gleichzeitige Injektion von eisenfreiem Patentblau V an gleicher Stelle. Als Kontrolle dient die ausschließliche Injektion von eisenfreier Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, phosphate buffered saline). In weiteren Versuchen unseres

Projektes sollen die in dieser ersten Arbeit gefundenen Ergebnisse auf ein tumortragendes Maus-Modell angewandt werden, um somit die Grundlagen für eine zukünftige Anwendung der Methode bei Mammakarzinom am Menschen zu legen. Diese Versuche sind nicht Gegenstand der hier vorgelegten Arbeit.

Die folgenden Fragen sollen mit unserer hier vorgelegten Arbeit im murinen Modell beantwortet werden:

1. Ist eine Anreicherung von Resovist[®] in den Lymphknoten der Axilla mit dem SLN gleichzusetzen?
2. Welche Laufzeit ist notwendig, um den Tracer nach intramammärer Injektion im axillären SLN nachzuweisen?
3. Welche Eisenkonzentration (AAS) nach intramammärer Resovist[®] Injektion muss in den unterschiedlichen Geweben vorhanden sein, damit ein Nachweis signalgebender Partikel im Magnetpartikelspektrometer (MPS) gelingt?
4. Ist das MPS ein valides Messinstrument? Dies soll mittels Vergleiches zwischen Atomabsorptionsspektrometer (AAS) und MPS überprüft werden.

4 Material und Methoden

4.1 Reagenzien und Gerätschaften

4.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die zur Aufbereitung und Analyse der aus den Mäusen entnommenen Gewebe verwendeten Materialien und Chemikalien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2 Material und Chemikalien zur Aufarbeitung und Analyse der entnommenen Gewebe.

Material	Hersteller	
Deionisiertes Analysewasser	Merck, Darmstadt	
SINGLE ELEMENT, AAS-Standard-Solution ROTI-Star	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	
Kollagenase	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA	
Trypsin		
BSA (bovine serum albumin)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg	
Tween Lösung	Merck KGaA, Darmstadt	
Resovist®	Bayer AG, Berlin	
PBS (phosphate buffered saline)	Biochrom GmbH, Berlin	
Patentblau V 25%	Guerbet, Roissy CdG, France	
Salpetersäure (HNO ₃), 10,3 mol/l, 65%ig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	
Eppendorf Microloader™, steril, 0,5- 20 µl	Eppendorf AG, Hamburg	
Eppendorf Safe-Lock Tubes		1,5 ml
		2,0 ml
		0,5 ml
Graphit-Messröhrchen, unbeschichtet, HIT 180-7400	Uwe Binniger Analytik, Schwäbisch Gmünd	
Alphagaz® Argon-Gas, Alpha 1 Ar 50l 200b	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf	
Micro-Tubes	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	

4.1.2 Geräte

Die Gerätschaften zur Aufarbeitung und Analyse der aus den Mäusen entnommenen Gewebe finden sich in Tabelle 3.

Tabelle 3 Geräte zur Aufarbeitung und Analyse der entnommenen Gewebe

Gerät		Hersteller		
Schüttler und Inkubator, Eppendorf Thermomixer compact®		Eppendorf AG, Hamburg		
Ultraschall-Bad		EMAG AG, Mörfelden-Walldorf		
180-80 Polarized Zeeman, Atomabsorptionsspektrometer (AAS)		Hitachi Ltd., Tokyo, Japan		
Magnetpartikelspektrometer (MPS)		Universität zu Lübeck		
Hohlkathodenlampe, Device WL22810, Kathode: Fe, Gas: Ne		Uwe Binniger Analytik, Schwäbisch Gmünd		
Pipette	10 ml	Einkanal	fix, 10 µl	Eppendorf Reference®, Eppendorf AG, Hamburg
	100 ml		Variabel 10-100 µl	
	1.000 ml		Variabel 100-1.000 µl	

4.2 Versuchstiere und Tierversuchsantrag

4.2.1 Tierversuchsantrag

Der Verwendung von Versuchstieren wurde vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein auf Antrag des Arbeitsgruppenleiters Priv.-Doz. Dr. med. habil. Dominique Finas zugestimmt. Registrierungsnummer ist V 312-72241.122-10 (35-3/09). Die Genehmigung durch das Ministerium befindet sich im Anhang (Abbildung 18, Seite 92).

4.2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Mäuse der Sorte Balb/c (weiblich, 18-20 g, Charles River, Inc., Sulzfeld, Germany) verwendet. Es wurden ausschließlich weibliche, nicht schwangere Tiere im Alter von sechs bis acht Wochen genutzt. Mäuse dieses Alters gelten als ausgewachsen. Die Mäuse durften nicht schwanger sein, da die Durchblutung und das Volumen der Milchleiste in der Schwangerschaft zunehmen. Das Auftreten von Mammakarzinomen kommt vor, ist jedoch selten. Alle Mäuse wurden auf entsprechende Hinweise hin untersucht. Keine der eingesetzten Mäuse hatte Hinweise auf ein Mammakarzinom. Damit entsprachen die Mäuse der üblichen humanen Situation im gesunden Status vor Entstehung eines Mammakarzinoms.

4.2.3 Probengewinnung

Alle an den Versuchstieren durchgeführten Handlungen wurden von qualifizierten Medizinern oder einer erfahrenen medizinisch-technischen Assistentin (K. H.)

durchgeführt. Es wurde streng darauf geachtet, den Tieren unnötiges Leiden zu ersparen. Durch den professionellen Umgang konnten außerdem technische Fehler und Durchführungsfehler vermieden werden. K.H. hat sich während des Projektes durch Förderung aus Projektmitteln in einem "Kompaktseminar Maus/Ratte" (06.-10.12.2010, Berlin) weiterqualifizieren können.

Die Untersuchung wurde an insgesamt 80 Versuchstieren durchgeführt. Acht von diesen Tieren konnten nicht für den Versuch verwendet werden, da sie bereits vor Beginn des Versuchs verstorben sind, Zeichen von Krankheit oder Verletzungen aufwiesen, so dass insgesamt 72 Mäuse untersucht wurden. Die Handhabung und Durchführung unseres Versuchs sind der Publikation von Robe et al. angelehnt.[55] Modifikationen erfolgten nach den Anforderungen unserer Fragestellung. In unserem Versuch wurden die Mäuse wie folgt behandelt (Tabelle 4):

Tabelle 4 Versuchsanordnung über die Anzahl verwendeter Versuchstiere nach injizierter Substanz und Lebenszeit nach Injektion.

Tiere [n]	Lebenszeit [h]	Resovist® [5 µl]	Patentblau V [2 µl]	PBS [1 µl]
15	4	Ja	Nein	Nein
1	4	Ja	Ja	Nein
15	3	Ja	Nein	Nein
1	3	Ja	Ja	Nein
15	2	Ja	Nein	Nein
1	2	Ja	Ja	Nein
15	1	Ja	Nein	Nein
2	4	Nein	Nein	Ja
3	3	Nein	Nein	Ja
3	2	Nein	Nein	Ja
1	1	Nein	Nein	Ja

Die Applikation von Resovist®, eisenfreiem Patentblau V oder eisenfreiem PBS erfolgte bei allen Mäusen an der gleichen anatomischen Region: die Substanzen wurden im vorderen Drittel (kranial, Kopf-nah) der Bauchseite (ventral, Axilla-nah) beidseits in die Milchleiste injiziert (Abbildung 3, Seite 23: Region B). Nach Sacrificium durch Genickbruch wurden umgehend die Gewebe entnommen, so dass es zu keiner relevanten weiteren Verteilung der applizierten Substanzen im Gewebe kommen konnte. Alle Handlungen an den Mäusen wurden unter

Isoflurananästhesie durchgeführt, um unnötiges Leiden der Tiere zu vermeiden. Insgesamt 60 Mäusen wurden ausschließlich 5 µl unverdünntes Resovist[®] in die Brustdrüse jeder Seite injiziert. Zu den Zeitpunkten eine, zwei, drei und vier Stunden nach Injektion erfolgte bei jeweils 15 Mäusen das Sacrificium. Drei weiteren Mäusen wurde außer Resovist[®] noch 2 µl einer 1%igen Lösung aus Patentblau V 2,5% in gleicher Lokalität injiziert. Bei diesen Tieren erfolgte das Sacrificium nach zwei, drei und vier Stunden. Alle Mäuse, die Resovist[®] erhalten haben, inklusive derer die zusätzlich Patentblau V bekamen, bilden die Resovist[®] Gruppe (RG). Als SPION-freie Kontrolle wurde neun weiteren Tieren ausschließlich 1 µl PBS injiziert und das Sacrificium ebenfalls nach einer, zwei, drei und vier Stunden durchgeführt. Diese Mäuse bilden die PBS Gruppe (PG).

Den Tieren wurden nach Sacrificium die in Tabelle 5 beschriebenen Gewebe entnommen. Die entnommenen Gewebe wurden umgehend in vorher beschriftete und auf Eis liegende Micro-Tubes gebracht. Die Kühlung diente dem sofortigen Stopp der Stoffwechselprozesse bzw. deren deutliche Verlangsamung und der Verhinderung der Autolyse. So gelangten sie zur MPS Messung. Anschließend wurden sie bei -20°C eingefroren, um sie für die weitere Verarbeitung frisch zu erhalten und den natürlichen Abbauprozess zu unterbinden. Es folgte die weitere Verarbeitung für das AAS nach zeitgerechtem Auftauen der Proben.

Im Verlauf der Milchleiste sind bei der Maus Zitzen zwischen Axilla und Leiste ausgebildet, die alle ausreichend Drüsengewebe zur Milchbildung besitzen.[56] Die Maus säugt ihre Nachkommen demnach in deren gesamtem Verlauf. Der Mensch besitzt ebenfalls eine Milchleiste in gleicher Art, jedoch sind zwei der vordersten Milchdrüsen beim Menschen prominent ausgebildet und entsprechen den weiblichen Brüsten, die beim Menschen auch der Milchbildung und dem Nähren des Säuglings dienen. Die Lymphe der vorderen Milchdrüsen drainiert bei Maus und Mensch hauptsächlich in die Axilla. Der restliche Verlauf der Milchleiste ist normalerweise beim Menschen nicht bzw. nur rudimentär ausgebildet. Als Normvariante können jedoch auch axillär, abdominal und inguinal prinzipiell Drüsengewebe und Mamillen vorkommen. Ein Lymphabfluss aus den humanen Brüsten in die Leiste ist unwahrscheinlich. Die Milchleiste der Maus ist durchgehend gleich ausgebildet und so kann ein Abtransport von in das vordere Drittel der Milchleiste injizierten Substanzen über die Lymphbahnen in die Leiste nicht vollständig ausgeschlossen werden. Da wir bei unseren Mäusen die Injektion

in die Milchleiste kranial (in Richtung Kopf) vornahmen und auch bei der Maus der Lymphabfluss hier überwiegend in die Axilla erfolgt, gehen wir von einem geringen Eisennachweis in der Leistenregion aus, der am ehesten durch das dort physiologisch vorkommende Eisen z.B. aus Hämoglobin zu erklären ist. Diese Annahme wird durch unsere Beobachtung unterstützt, dass bei der Entnahme die Leistenlymphknoten visuell frei von Resovist[®] waren (nicht braun gefärbt).

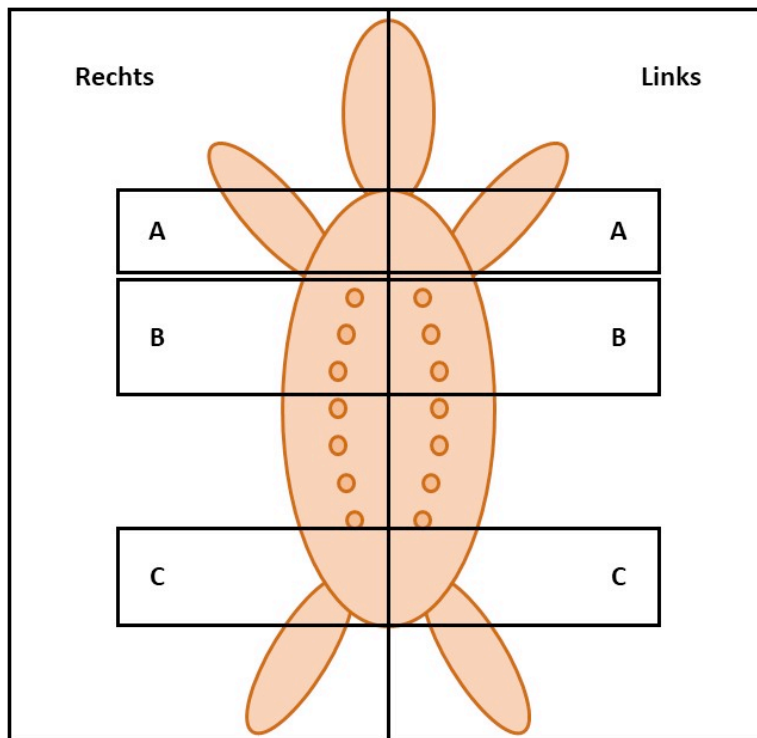


Abbildung 3: Mausmodell in Rückenlage: Ventrale Ansicht der anatomischen Regionen der Gewebeentnahme, schematische Übersicht. Die dunklen Punkte entsprechen der paarigen Milchleiste.

Entnahmeregionen (Region): A = Axilla, B = Brust, C = Leiste/Unterbauch. Die Injektion der Substanzen erfolgte in Region B auf beiden Körperseiten.

Die Entnahme von Gewebe aus der Leistenregion diente demnach der Evaluation der kaudalen Lymphabflusswege (kaudal = Richtung Schwanz im Gegensatz zu kranial = Richtung Kopf). Das Gewebe der Milchleiste dient als Äquivalent des humanen Brustdrüsengewebes. Der kraniale Lymphabfluss sollte durch die getrennte Entnahme, der gut erkennbaren axillären Lymphknoten und deren umgebendem Fettgewebe evaluiert werden.[57, 58] Diese erfolgte nach axillärem Level: Level I = Milchleisten-nah und Level II = Milchleisten-fern. Die Einteilung erfolgte in Analogie zu der beim Menschen. Bedingt durch die Anatomie der Maus und die Ergebnisse der klinischen Beobachtung in unserem Versuch wurden

jedoch nur zwei axilläre Level definiert und nicht drei, wie beim Menschen üblich (Tabelle 1, Seite 7).[59] Durch die Eigenfarbe von Resovist® war der SLN an der intensiven Braunfärbung gut erkennbar. Alle Mäuse wurden nach Resovist®-Laufzeit systematisch nummeriert und durch einen Buchstabencode gekennzeichnet, wodurch sich jede Probe einer bestimmten Maus, Entnahmeregion und Laufzeit zuordnen ließ (Abbildung 3 und Tabelle 5).

Die Proben von jeweils 3 Mäusen (n = 12) pro Laufzeit wurden für ein anderes Teilprojekt unserer Arbeitsgruppe zur histologischen Aufarbeitung gegeben. Diese Mäuse finden sich daher in der Auswertung der hier vorgelegten Studie nicht in der Resovist® Gruppe. Die restlichen 60 Gewebeproben wurden erst mit dem MPS gemessen, dann für die Messung im AAS vorbereitet: Alle ausschließlich mit Resovist® behandelten (n = 12 Mäuse/Laufzeit = 48), alle zusätzlich mit Patentblau V (n = 3) oder ausschließlich mit PBS (n = 9) behandelten Tiere.

Tabelle 5 Systematik der Probenbeschriftung (Buchstabencode). Die Durchnummerierung der einzelnen Mäuse erfolgte chronologisch (hier nicht dargestellt).
Position 1: Entnahmeregion (Abbildung 3: Region A = Axilla, B = Brust, C = Leiste/Unterbauch), Position 2: Entnahmeseite (R=rechts, L=links), Position 3: entnommenes Gewebe, Position 4: axilläres Level der Lymphknotenstation.

Position	1	2	3		4
Beschriftung	Region	Seite	Gewebeart		Level Axilla
CRL	C	R	L	Lymphknoten	
CLL		L			
CRF	C	R	F	Fettgewebe	
CLF		L			
BRB	B	R	B	Brustdrüse	
BLB		L			
ARL I	A	R	L	Lymphknoten	I
ALL I		L			
ARF I	A	R	F	Fettgewebe	I
ALF I		L			
ARL II	A	R	L	Lymphknoten	II
ALL II		L			
ARF II	A	R	F	Fettgewebe	II
ALF II		L			

Die Auswertung der Messungen erfolgt nicht nach Körperseite getrennt, da eine anatomische Vergleichbarkeit der interessierenden Regionen zugrunde gelegt wird. Die Nummerierung und Markierung der Proben nach Körperseite erlaubt die Nachverfolgung und Prüfung im Falle von Messwertausreißern. Die Injektion in beide Seiten erhöht die Anzahl messbarer Proben nach Gewebeentnahme und

damit die Datenausbeute und deren statistische Validität. Das Gewebe pro Entnahmegebiet und Seite wurde als jeweils eine Probe gemessen und beim AAS verfahrensbedingt vollständig verbraucht. Daher wurden die Proben erst mit dem MPS und dann dem AAS gemessen.

4.3 Histologie

Die für die Histologie bestimmten Proben wurden nach MPS Messung in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach dem Schneiden aus dem Paraffinblock erfolgte die Färbung der Präparate mit Hämatoxylin-Eosin, Nuclear Fast Red und Eisen-spezifischem Preußisch-Blau. Diese Proben waren für ein anderes Teilprojekt unserer Arbeitsgruppe bestimmt und werden hier nicht weiter behandelt, jedoch exemplarisch zum Nachweis von Eisen im Lymphknoten im Ergebnisteil dargestellt (Kapitel 5.4, Seite 54).

4.4 Magnetpartikelspektrometrie

In der hier vorgelegten Arbeit wurde ein Magnetpartikelspektrometer (MPS) verwendet. Dessen Funktionsweise beruht auf den Prinzipien des MPI (Kapitel 2.5.2, Seite 13 ff.). Die Magnetpartikelspektrometrie besitzt im Gegensatz zum MPI keine räumliche Darstellungskompetenz, die für unsere Fragestellung auch nicht relevant ist.[41] Mit dem MPS kann das magnetische Materialverhalten geprüft und damit auch untersucht werden, ob eine Messung mit MPI erfolgreich möglich wäre.[60] Diese Testung ist in der Weiterentwicklung unserer Fragestellung für die Arbeitsgruppe außerhalb dieser Arbeit allerdings relevant, da im Weiteren das MPI zur Lokalisation im Messvolumen eingesetzt werden soll. Die Ergebnisse der MPS Messungen wurden semi-quantitativ mit den Ergebnissen aus den Gewebemessungen im Atomabsorptionsspektrometer (AAS) verglichen (Kapitel 5, Seite 33 ff.).

4.4.1 Kontrastmittel Resovist®

In den hier vorgelegten Untersuchungen wird Ferucarbotran (Resovist®) als Kontrastmittel (Tracer) verwendet. Dieses SPION wurde von der Schering AG als i.v.-Kontrastmittel zur Darstellung von Lebertumoren im MRT entwickelt (SH U 555A).[32, 40] Das Kernmaterial von Resovist® ist Magnetit (Fe_3O_4), es besteht aus Eisen(II)- und Eisen(III)-oxid. Es besitzt die von uns gewünschten Eigenschaften und ist kommerziell erhältlich. Tracer für das MPI mit Zulassung für den Einsatz am Menschen sind am Markt noch nicht erhältlich. Mehrere

Arbeitsgruppen experimentieren weltweit mit unterschiedlichen selbst hergestellten SPIONs bei der Erforschung des MPI.[61, 62] Der Aufwand für Herstellung und Testung konnte durch den Ankauf von Resovist® eingespart werden. Obwohl nur etwa 3-30% seiner Partikel für das MPI geeignet scheinen und für die Messung von Relevanz sind, ist es derzeit der am häufigsten genutzte Tracer für MPI und daher der aktuelle Goldstandard.[45, 63-65]

Resovist® wird von den Makrophagen des retikulo-endothelialen Systems (RES) aufgenommen, was zu einer Signalminderung im MRT-Bild führt.[31, 38, 40] Ein RES ist in Tumoren nicht vorhanden, so dass es hier nicht zu einer entsprechenden Signalminderung kommt. Es ist außer in der Leber auch in der Milz, im Knochenmark und in Lymphknoten gut entwickelt. Bisher wurde das Verhalten und die Anreicherung von Resovist® direkt im gesunden wie im metastatischen Lymphknoten im Zusammenhang mit MPI noch nicht untersucht. Die Verwendung von SPIONs im Rahmen der SLNB wird unter Einsatz einer Magnetometer-Handsonde von einigen Gruppen betrieben (Kapitel 2.4.4, Seite 11). Sie fanden eine Anreicherung von SPIONs im Lymphknoten, so dass diese zur SLN-Markierung geeignet erscheinen.[13, 20, 66] Allerdings wurde die tatsächliche Anreicherung der SPIONs im Gewebe von diesen Arbeitsgruppen zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Studie nicht untersucht. Es wurde auch nicht explizit Resovist® verwendet, sondern Sienna+®, dessen Beschreibung einer Hülle mit Carboxydextran und einer Partikelgröße von ca. 60 nm in etwa der von Resovist® entspricht (Resovist®: mittlerer hydrodynamischer Durchmesser von ca. 57 nm (45-60 nm) beschichtet mit einer Carboxydextranhülle.[31, 32, 67]) In der Literatur sind die Angaben zur optimalen Partikelgröße für die Darstellung von Lymphknoten im MRT uneinheitlich: 10-20 nm [68] oder 20-40 nm.[32] Diese Angaben beziehen sich auf die i.v. Gabe und nicht auf die Applikation in Gewebe, wie es in der vorliegenden Studie durchgeführt wurde. Für die Darstellung von SLN kommt die i.v. Gabe nicht in Betracht (Kapitel 2.4, Seite 8). Eine subcutane Applikation wird jedoch als erfolgversprechend angesehen, wenn Applikationsort und Lymphknoten eng benachbart sind, ohne nähere Angaben zur Methodik zu machen (Menge, Partikelgröße, Laufzeit).[32] Cousins et al. geben in ihrer Metaanalyse zu bedenken, dass alle neue Verfahren zur SLN Darstellung ihre Superiorität gegenüber dem bestehenden Goldstandard mit ^{99m}Tc noch beweisen müssen – das gilt auch heute noch.[13]

4.4.2 Magnetpartikelspektrometer

Das für unsere Messungen verwendete Magnetpartikelspektrometer wurde vom Institut für Medizintechnik der Universität zu Lübeck entwickelt. Das MPS beruht auf den für das MPI entwickelten physikalischen Theorien.[29] Anders als dieses ist es jedoch 0-dimensional, hat also keine räumliche Auflösung. Es wird ein homogenes, oszillierendes magnetisches Wechselfeld von 25 kHz und $20 \text{ mT}/\mu_0$ mittels einer Sendespule erzeugt (Anregungsfeld, drive field).[60] Durch Platzierung der Probe in der Sendespule, werden alle Teilchen in der Probe dem gleichen magnetischen Feld ausgesetzt und gleichartig gesättigt (gesättigte Magnetisierung). Aufgrund der Tatsache, dass SPIONs ein nicht-lineares Magnetisierungsverhalten haben, erzeugen sie bei Anregung höhere und damit deutlich messbare harmonische Frequenzen, auch „Harmonische“ genannt. Diese Magnetisierungsänderung geht demnach von den Nanopartikeln aus. Mit einer Empfangsspule des MPS lassen sich die von den SPIONs ausgehenden Harmonischen messen. Die Anzahl der gemessenen Harmonischen, deren Signalspektrum exponentiell abfällt und ihre Signalamplitude können über die Zeit beschrieben werden.[45] Bei dem hier verwendeten MPS war es möglich, bis zu 100 Harmonische zu messen.[60] Die Signalamplitude der Harmonischen ist direkt proportional zur Konzentration signalgebender SPIONs. Allerdings sind nur 3-30% der Partikel im Resovist[®] signalgebend und zur Messung im MPS geeignet.[29, 65] Zur vergleichenden Quantifizierung der SPIONs in den Proben ist es erforderlich, dass die gemessenen Proben gleiche Volumina aufweisen. Da wir die Zielvolumina in Sinne der Fragestellung jedoch vollständig entnommen haben, waren diese unterschiedlich groß und eine quantifizierende Messung der Konzentrationen mit dem MPS nicht möglich. Als alternatives quantifizierendes Verfahren haben wir daher das AAS eingesetzt.

Verzerrungen können die Auswertung der Harmonischen stören. Das Grundrauschen (Störung), das unter anderem durch die Erdmagnetisierung erzeugt wird, kann unter Verwendung eines sog. Bandstopp-Filters herausgefiltert werden.[41] Die verbleibenden Harmonischen bilden das verwertbare MPS Signal.[42] Erst ab dem Nachweis der 3. Harmonischen liegt ein Messsignal für das Vorhandensein signalgebender Eisenpartikel vor. In Abbildung 4 sieht man die Auswertung von 3 Proben mit deutlichem Nachweis von Resovist[®] im MPS. Die grüne Linie stellt hierbei die gefittete Grade der Maxima der 3. Harmonischen dar.

Mit ihrer Hilfe ist eine Abschätzung möglich, wie viele Harmonische noch zu messen sind. Hierbei gilt vereinfacht, je mehr, desto besser. Unterhalb dieser Graden registrierte Ergebnisse wurden, wurden als negativ bewertet. In diesem Fall lagen keine signalgebenden Eisenpartikel vor. Resovist[®] war in der gemessenen Probe also nicht nachweisbar. Lag die Probe mit der 3. Harmonischen deutlich oberhalb der Geraden, wurde die Anwesenheit von Resovist[®] in der Probe ausgegangen (Abbildung 4). Da eine Eisenkonzentrationsmessung mit dem MPS aus den genannten Gründen im Rahmen dieser Studie nicht möglich war, wurden die Proben im Hinblick auf signalgebende SPIONs als qualitativ "positiv" (enthält Resovist[®]) oder "negativ" (enthält kein Resovist[®]) bewertet.

Alle unsere MPS Messungen wurden mittels einer eigens dafür programmierten Software gespeichert und zur Darstellung gebracht.[41] Nach gemeinsamer Ergebnisanalyse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizintechnik der Universität zu Lübeck (K. L.-B.) die Bewertung, ob eine Probe als positiv oder negativ für das Vorhandensein signalgebender SPIONs (Resovist[®]) anzusehen ist.

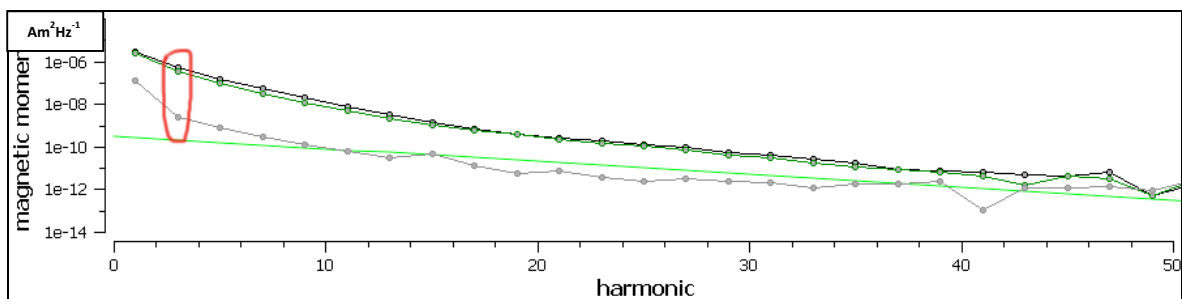


Abbildung 4: Dargestellt ist Probenauswertungen von 3 MPS Messungen. Die durchgezogene grüne Linie (ohne Punkte) stellt die gefittete Gerade der Maxima der 3. Harmonischen dar. Da die 3. Harmonische aller 3 hier dargestellten Proben (roter Kreis) über dem Fit lagen, wurden die Proben als positiv für signalgebende SPIONs bewertet, d.h. sie enthielten Resovist[®].

4.5 Atomabsorptionsspektrometrie

4.5.1 Gewebehomogenisierung

Um den Eisengehalt einer Probe im Atomabsorptionsspektrometer (AAS) messen zu können, musste diese vollständig homogenisiert und in einer 0,05 molaren Salpetersäure (HNO₃)-Lösung vorliegen. Dies wurde durch die im Folgenden beschriebenen Schritte erreicht.

In Vorversuchen war die Homogenisierung der Gewebe von Lymphknoten und Fettgewebe in 2 ml Eppendorfgefäßen ausschließlich mit reiner 10,3 molarer Salpetersäure nicht zufriedenstellend verlaufen. Daher wurden die Proben zuerst durch die Verdauungsenzyme Trypsin und Kollagenase angedaut, um dann mittels Ultraschallbad, Tween-Zugabe und hochmolarer Salpetersäure vollständig homogenisiert werden zu können. Hierbei zeigten sich die Proben zufriedenstellend homogenisiert, so dass für diesen Gewebeverdau eine Standard Operation Procedure (SOP) angefertigt wurde, nach der alle Proben bearbeitet wurden und die die Basis der folgenden Beschreibung ist.[69, 70]

Nach dem Auftauen der Proben, welche etwa 2 mm (Lymphknoten) bis 4 mm (Fett- / Drüsengewebe) groß waren, wurden diese zuerst manuell mit dem Skalpell in etwa 0,1 mm große Gewebestücke zerkleinert und dann in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß für 48 Stunden bei 37°C in 50 µl Kollagenaselösung 0,1% inkubiert. Größere Stücke aus dem Brustdrüsengewebe wurden gleichsam zerkleinert und daraufhin mit 100 µl 0,1%iger Kollagenaselösung ebenfalls bei 37°C in den Inkubator gegeben.

Nach 48 Stunden wurden jeder Probe 50 µl beziehungsweise 100 µl (Brustdrüsengewebe) Trypsinlösung 0,5% zugegeben und für weitere 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach diesem Prozedere waren die Lymphknotenproben gut homogenisiert. Bei den Proben, die Fettgewebe enthielten, waren jedoch noch deutliche Gewebereste zu erkennen. Deshalb wurde, wie oben beschrieben, der Verdauungsprozess wie folgt erweitert.

Die Proben wurden aufgeschüttelt, zentrifugiert und für zehn Minuten zum weiteren Aufschluss in das Ultraschallbad gebracht. Nach der Sonifizierung wurde jeder Probe 10 µl bzw. 20 µl (Brustdrüsengewebe) Tween untergemischt und darauffolgend wurden sie für 30 Minuten bei 99°C aufgeschüttelt. Tween ist ein hydrophiler Emulgator, der bewirkt, dass sich Fett besser in wässrigen Lösungen löst. Hierdurch konnten die fetthaltigen Gewebereste sehr gut in Lösung gebracht werden. Zum Schluss folgte die Zugabe von 100 µl bzw. 200 µl 10,3 molarer Salpetersäure, woraufhin die Proben für 24 Stunden bei 37°C inkubiert wurden. Dies führte zu endgültig homogenen Lösungen. Zum Abschluss wurden die Probenlösungen noch einmal aufgeschüttelt, zentrifugiert und zuletzt noch mit deionisiertem H₂O 1:100 verdünnt, so dass die endgültigen Proben zur Messung im AAS eine Salpetersäurekonzentration von 0,05 mol/l enthielten und der

Eisengehalt der Proben im Messbereich des AAS lagen. Falls die Werte bei der Messung im AAS zu hoch ausfielen, wurden die Proben mit Salpetersäure 0,05 mol/l soweit verdünnt, dass sie im Messbereich der vorher angelegten Kalibrationskurve lagen.

4.5.2 Eisenstandardlösung

Die Eisenstandardlösung für die Kalibrationskurve wurde in den Konzentrationen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 und 10 µmol/l Fe in einer 0,05 mol/l Salpetersäure angesetzt. Mit dieser für jeden Messtag frisch hergestellten Standardlösung wurde vor der Messung der Proben eine Kalibrationskurve gemessen, um die Messergebnisse aller Versuchstage vergleichbar zu machen. In gleicher Weise wurde eine Messreihe mit einer Resovist®-Lösung (Resovist® in 0,05 mol/l Salpetersäure) erstellt, um einen Überblick über das Verhalten von Resovist® im AAS zu bekommen. In Tabelle 6 stellen wir beispielhaft die Ergebnisse von zwei Messungen einer definierten Resovist®-Lösung dar.

Tabelle 6 Beispielhafte Darstellung der AAS-Messergebnisse von definierten Eisenstandardlösungen (Fe in 0,05 mol/l Salpetersäure) an zwei verschiedenen Tagen (06.06.2012 und 29.05.2013) im Vgl. zur AAS-Messung einer Resovist®-Standardlösung (Resovist® in 0,05 mol/l Salpetersäure).

Standard	Eisen-Lösung		Resovist®-Lösung
Messdatum	06.06.2012	29.05.2013	
Eisenkonzentration im AAS [µmol/l]	1,85	2,17	2,0
	4,12	4,29	4,0
	5,81	6,35	6,0
	8,68	8,93	8,0

4.5.3 Atomabsorptionsspektrometrie

Die Atomabsorptionsspektrometrie wurde als Vergleichsmethode zur Magnetpartikelspektrometrie ausgewählt. Sie ist sehr geeignet, die Eisenkonzentration von Lösungen quantitativ schon in geringen Mengen zu messen. In der hier vorgelegten Arbeit wurde ein Graphitrohrföfen-AAS verwendet.

Das Spektrometer nutzt den Effekt der Absorption von Licht. Das zu messende Element absorbiert Licht einer bestimmten, vorgegebenen Wellenlänge. Bei den meisten Elementen gibt es viele verschiedene Wellenlängen, auf denen sie Licht absorbieren. Bei Eisen sind dies unter anderem 248,3 nm, 248,8 nm, 252,3 nm und 271,9 nm. Trifft nun Licht einer dieser Wellenlängen auf eine atomisierte Probe die Eisen enthält, so schwächt diese das einfallende Licht um einen

Faktor x ab. Dieser Faktor x ist abhängig von der Eisenkonzentration der Probe, das heißt: je mehr Eisen in der Probe enthalten ist, desto mehr Licht wird absorbiert. Daher lässt sich mit Hilfe einer Kalibrierlösung und der daraus erstellten Kalibrierungskurve die Eisenkonzentration einer Probe mit unbekanntem Eisengehalt bestimmen. Hier wurden die Messungen bei einer Wellenlänge von 248,3 nm durchgeführt, welche die am häufigsten genutzte Resonanzlinie von Eisen darstellt.[71]

Das AAS atomisiert die zu messende Probe durch einen schnellen Temperaturanstieg, wobei zuvor durch einen stufenweisen Anstieg ein Großteil der Begleitsubstanzen entfernt wird. Dies erfolgt unter kontinuierlichem Edelgasstrom, hier unter Verwendung von Argon-Gas.[71] Zur Anregung und Emission der zu messenden Wellenlänge wurde eine Fe-Hohlkathodenlampe verwendet.

Nach dem Aufwärmen des AAS, wurden zuerst einige Leermessungen durchgeführt, um etwaige Partikelrückstände und Ablagerungen im Graphitröhrchen zu entfernen. Hierauf folgend fand die Messung der Kalibrationslösung statt, beginnend mit 0 $\mu\text{mol/l}$ bis zu 10 $\mu\text{mol/l}$ Fe in der Lösung. Daraufhin wurden die Proben gemessen. Der Eisenstandard und jede Probe wurde mindestens doppelt gemessen, um Mess- oder Ergebnisfehler zu minimieren. Bei offensichtlichen Ausreißern oder Diskrepanzen wurden weitere Messwiederholungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden gemittelt, Ausreißer wurden dann nicht mit einbezogen. Um Ergebnisverzerrungen durch Abnutzung des Graphitröhrchens möglichst klein zu halten, wurde dies nach ca. 120 Messvorgängen gewechselt. Das Probenvolumen betrug stets 10 μl . Um die Verunreinigung durch Eisen in der Luft möglichst klein zu halten, wurden die autoklavierten Pipettenspitzen stets verschlossen gelagert und das AAS stets abgedeckt, wenn es nicht in Benutzung war.

4.6 Statistische Analyse

4.6.1 Prism 6 – GraphPad

Zur Umrechnung der mittels AAS erhaltenen Ergebnisse wurde das Programm Prism 6[®] von GraphPad Software Inc. (La Jolla, CA, USA, 2015) verwendet. Hierfür wurden die Ergebnisse zuerst gemittelt, wobei Ausreißer ausgeschlossen wurden und dann anhand der ihnen zugehörigen Kalibrationskurve mittels einer

x-y-Transformation berechnet. Der Verdünnungsfaktor der Proben wurde mit einbezogen.

4.6.2 *XLStat*

Die weitere statistische Auswertung wurde mittels XLStat (Addinsoft, Paris, Frankreich, 2015) durchgeführt. Die quantitativen Daten wurden mittels deskriptiver Statistik dargestellt. Die Daten wurden mittels Box-Whiskers-Plot oder in Liniendiagrammen veranschaulicht. Dargestellt wird jeweils der Median, die 25% und 75% Perzentile. Die Ergebnisse der AAS Messungen werden tabellarisch angegeben: Median, 1. und 3. Quartil (25% und 75% Quartil; Q_1 und Q_3), Varianz, Standardfehler, Minimum und Maximum. In Einzelfällen wird auch der Mittelwert aufgeführt. Da es sich bei den Ergebnissen aber um Daten mit Ausreißern oder weiter Streuung handelt, wurde in der Auswertung der Median als Vergleichsinstrument ausgewählt.

Zum Vergleich der Ergebnisse von AAS und MPS wurde mittels ROC-Kurve der Schwellenwert bestimmt. Mittels einer Kontingenztafel und des McNemar-Testes wurden dann Spezifität, Sensitivität, der positive prädiktive und der negative prädiktive Wert bestimmt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert $<0,05$ definiert.

5 Ergebnisse

Gegenstand dieser Arbeit ist der Nachweis von SPIONs nach definierten Laufzeiten in definierten Zielgeweben. Dabei liegt ein Fokus auf deren Nachweis in axillären Lymphknoten und deren Laufzeit vom Injektionsort zum SLN im Sinne des Sentinellymphknoten-Konzeptes. Daher sind die Mäuse der Resovist® Gruppe (RG) im Vergleich zu denen der SPION-freien Kontrollgruppe, die ausschließlich PBS erhalten haben (PG), von besonderem Interesse. Neben der Eisenanreicherung (gemessen mit AAS) resp. SPION Anreicherung (gemessen mit MPS) in den Axillae sollen die Messungen zeigen, ob und wieviel Eisen in die Leistenregion gelangte resp. ob SPIONs in der Leistenregion nachweisbar sind.

5.1 Atomabsorptionsspektrometrie

Die Daten der Ergebnisse der AAS Messungen sind nach den Resovist®-Laufzeiten und den Entnahmestellen aufgeteilt. Proben der linken bzw. rechten Körperseite werden gemeinsam ausgewertet. Einen Überblick über die Mediane der Gewebeeisenkonzentrationen an verschiedenen Entnahmestellen nach Ausbreitung von Resovist® gibt Abbildung 5. In dieser Grafik werden die Ergebnisse aus Brustdrüsengewebe als Injektionsort von Resovist® nicht berücksichtigt, da hier eine Laufzeit nicht sinnvoll ermittelt werden kann. Die im Brustdrüsengewebe gemessenen Werte liegen weit über dem Konzentrationsbereich derer aus anderen Entnahmeregionen (Tabelle 10, Seite 38).

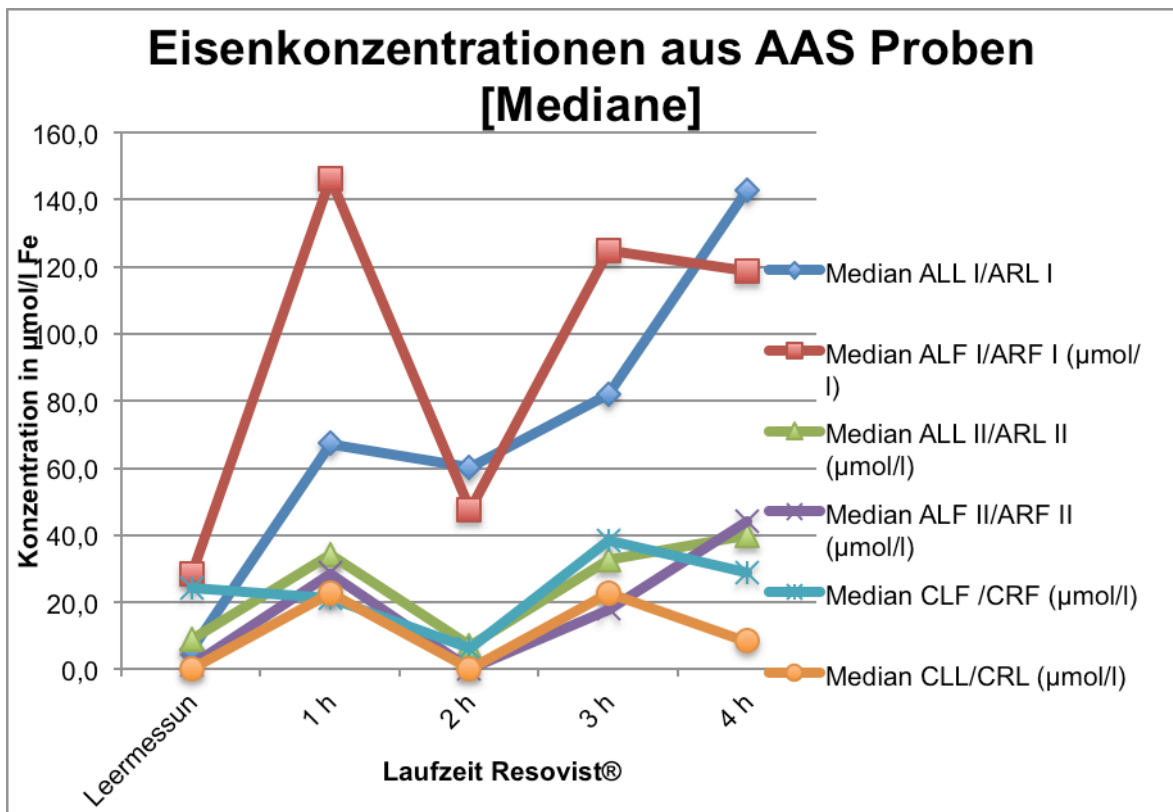


Abbildung 5: Mediane der Gewebeeisenkonzentration aus AAS Messungen der PG (Leerprobe/Leermess.) und RG zu definierten Zeitpunkten. Nicht dargestellt sind die Messergebnisse aus Brustdrüsengewebe (Injektionsort), da diese für die Ausbreitung von Resovist® nicht relevant sind. Leerprobe = PG 1-4 Stunden, Resovist® = RG bei 1, 2, 3 und 4 Stunden.

Die in Abbildung 5 und im Folgenden dargestellten Daten fokussieren auf die Fragestellung, welche Resovist®-Laufzeit von der Brustdrüse (Injektionsort) zur Axilla (SLN) für spätere, weiterführende Versuche geeignet scheint. Alle Ergebnisse werden in ihren jeweiligen Unterkapiteln im Folgenden ausführlich dargestellt und besprochen. Es zeigt sich schon in dieser ersten Übersicht, dass eine höhere Eisenkonzentration in der Lymphknotenregion des axillären Level I (Milchleisten-nah) gemessen werden kann als in den anderen Entnahmeregionen.

5.1.1 Bestätigung des Sentinellymphknoten-Konzeptes

Zur Bestätigung des axillären SLN haben einige Mäuse neben Resovist® (RG) auch Patentblau V erhalten (n = 3). Patentblau V ist ein Eisen-freier Farbstoff. Daher legen wir unseren Daten die Annahme zugrunde, dass die AAS Messergebnisse durch die gleichzeitige Gabe von Patentblau V und Resovist® in eine Maus durch den Farbstoff nicht beeinträchtigt werden. In allen drei Fällen injizierter Mäuse stimmten die blau markierten SLN mit dem Nachweis von

Resovist[®] im Lymphknoten visuell (gleichzeitige Braunfärbung) und im AAS (erhöhte Eisenkonzentration) überein. Diese Lymphknoten wurden im AAS gesondert gemessen und die Ergebnisse in Tabelle 7 wiedergegeben.

Tabelle 7 Eisenkonzentrationen aller entnommenen Gewebe der Mäuse, die Resovist[®] (PG) und Patentblau V erhalten haben (n = 3; je Laufzeit eine Maus). Es handelt sich hier um absolute Werte, da es sich jeweils um Einzelergebnisse handelt (je entnommenem Gewebe eine Messung). In der rechten Spalte sind die Tabellen mit den Messergebnissen aller Mäuse, die Resovist[®] erhalten haben zum Vergleich angegeben.

Entnahmeregion [je n = 1]	Laufzeit [h]			Vergleiche
	4	3	2	
CRL	7,3	0,0	24,5	Tabelle 8, S. 37
CLL	0,0	14,1	6,7	
CRF	0,0	29,0	0,0	Tabelle 9, S. 37
CLF	0,0	58,7	43,8	
BRB	4.459,9	10.902,8	5.837,6	Tabelle 10, S. 38
BLB	6.821,7	8.704,3	19.383,9	
ARL I	20,9	262,2	121,1	Tabelle 11, S. 40
ALL I	198,0	323,1	182,0	
ARF I	777,5	112,1	2.235,5	Tabelle 12, S. 42
ALF I	42,5	598,6	79,5	
ARL II	41,3	37,9	57,2	Tabelle 13, S. 44
ALL II	0,0	46,7	64,6	
ARF II	0,0	29,0	52,2	Tabelle 14, S. 46
ALF II	0,0	46,7	0,7	

Der Vergleich der Messungen von Proben der Mäuse, die eine kombinierte Gabe erhalten haben, mit denen aller Mäuse die Resovist[®] erhielten, ergibt keine erhöhte Eisenkonzentration in den Geweben durch zusätzliche Gabe von Patentblau V. Hierbei sind vor allem der Median, sowie die Streubreite mit Minimum und Maximum in den Vergleichstabellen zu beachten. Es zeigt sich bei kombinierter Gabe eine erwartete höchste Eisenkonzentration am Injektionsort, der vorderen Milchleiste (BRB/BLB). Im Vergleich aller vom Injektionsort distanter Gewebe wurden in Level I die höchsten Werte gemessen (ARL I/ALL I und ARF I/ALF I). In Level I war gleichzeitig die Blaufärbung durch Patentblau V gegeben und am intensivsten. Durch die Übereinstimmung der größten Anreicherung von Patentblau V und Eisen (Resovist[®]) im gleichen Lymphknoten konnte gezeigt werden, dass dies die Region des axillären SLN ist. Damit entspricht die Lymphknotenstation des Level I unserem SLN. In Abweichung der

Ergebnisse aus Tabelle 11 (Seite 40) findet sich bei den Einzelmessungen (Tabelle 7) in den Lymphknoten des Level I (ARL I/ALL I) ein Konzentrationsmaximum nach 3 Stunden (absolut 262,2/323,1 $\mu\text{mol/l}$ vs. Median 142,7 $\mu\text{mol/l}$) und nicht nach 4 Stunden. Dieses Ergebnis ist durch die höhere Probenzahl in der Gesamtauswertung erklärbar, die die Streuung verringert (Variationskoeffizient für 3 und 4 Stunden von 0,8), womit die Validität der Ergebnisse bei der Gesamtheit der Mäuse mit Resovist[®] höher ist.

5.1.2 Entnahmeregion C:

Leiste, Lymphknoten (CRL/CLL) und Fettgewebe (CRF/CLF)

Die aus der Leiste kaudal entnommenen Proben (Lymphknoten sowie umgebendes Fettgewebe) sind von Interesse, da die Leiste nicht im primären Lymphabflussgebiet des kranialen Brustdrüsengewebes liegt, so dass es hier nicht zu einer relevanten Resovist[®]-Anreicherung nach dessen Injektion in die kraniale Milchleiste kommen sollte. Ein Eisennachweis in der Leiste ist demnach wohl als physiologisch vorkommendes Eisen (z.B. aus Hämoglobin) zu werten. Eine Resovist[®]-Anreicherung in der Leiste kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, da lymphatische Verbindungen von der vorderen Brustdrüse über die Bauchdecke zur Leiste möglich sind.

Nach Injektion von PBS (PG) ist der Median der Eisenkonzentration in den Leistenlymphknoten (CRL/CLL) über vier Stunden 0 $\mu\text{mol/l}$ und das 3. Quartil 11,2 $\mu\text{mol/l}$ (Tabelle 8). Dies bestätigt eine sehr geringe physiologische Eisenkonzentration über die Zeit von vier Stunden in dieser Region. Nach Injektion von Resovist[®] (RG) steigt die Eisenkonzentration in den Leistenlymphknoten gering an und beträgt über vier Stunden im Median 9,4 $\mu\text{mol/l}$ bei einer SD von 27,7 $\mu\text{mol/l}$. Diese Beobachtung korreliert mit der angenommenen möglichen lymphatischen Verbindung im Sinne einer Lymphdrainage vom Injektionsort in die Leistenlymphknoten, die jedoch nicht dominant ist.

Bei dem die Lymphknoten umgebenden Gewebe (CRF/CLF) ist der Median in der PBS Gruppe 24,2 $\mu\text{mol/l}$ (Tabelle 9). Die Standardabweichung von 27,3 $\mu\text{mol/l}$ schließt auch den Bereich des Leistenlymphknotens mit ein. Daher ist hier nicht von einem relevanten Unterschied auszugehen. Die Mediane der Proben der Leistenlymphknoten von Resovist[®] Mäusen unterscheiden sich zwar von dem der PBS Mäuse, allerdings schließen auch hier die Standardabweichungen den Median der Leerproben (PG) mit ein.

Tabelle 8 Eisenkonzentrationen der Leistenlymphknoten (CRL/CLL) aus AAS Messungen.

Gruppe		RG					PG
Laufzeit [h]		4	3	2	1	1-4	1-4
Proben [n]		26	26	24	22	98	18
Median	[µmol/l]	8,3	22,7	0,0	22,5	9,4	0,0
SD		28,6	34,5	17,4	21,6	27,7	9,2
Min.		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max.		95,7	151,7	70,2	68,5	151,7	33,2
Q ₁		0,0	5,1	0,0	0,8	0,0	0,0
Q ₃		29,3	34,1	7,7	37,0	29,8	11,2
MW		21,8	29,0	9,1	23,4	21,0	5,8
VarK		1,3	1,2	1,9	0,9	1,3	1,6

Die Mediane der RG in dem die Leistenlymphknoten umgebenden Gewebe liegen sehr dicht beieinander. Ausnahmen bilden die Werte bei 2 und 3 Stunden von 6,0 bzw. 38,3 µmol/l. Auch hier sind die Standardabweichungen dergestalt (SD 18,4 resp. 34,3 µmol/l), dass die Ergebnisse keinen relevanten Unterschied zur PG ergeben (Tabelle 9). Daher ist nicht von einer nennenswerten Menge migrierter SPIONs in die Leistenlymphknoten bzw. die Leistenregion auszugehen.

Tabelle 9 Eisenkonzentrationen des die Leistenlymphknoten umgebenden Gewebes (CRF/CLF) aus AAS Messungen.

Gruppe		RG					PG
Laufzeit [h]		4	3	2	1	1-4	1-4
Proben [n]		25	26	23	22	96	18
Median	[µmol/l]	28,6	38,3	6,0	21,1	25,2	24,2
SD		30,8	34,3	18,4	50,0	36,5	27,3
Min.		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max.		92,8	128,6	56,3	245,6	245,6	103,5
Q ₁		16,6	12,6	0,0	9,9	3,6	8,0
Q ₃		58,7	59,2	29,4	38,1	50,2	41,3
MW		39,9	41,7	14,6	33,0	32,8	29,6
VarK		0,7	0,8	1,3	1,5	1,1	0,9

5.1.3 Entnahmeregion B: Brustgewebe (BRB/BLB)

Die Mediane der Eisenkonzentrationen in Brustdrüsengewebe der Proben der Resovist® Gruppe liegen deutlich höher als der Median der PBS Gruppe (Tabelle

10). Dies liegt daran, dass der Tracer (Resovist®) den Versuchstieren in die Milchleiste gespritzt wurde, welche das Brustdrüsengewebe repräsentiert.

Tabelle 10 Eisenkonzentrationen des Brustdrüsengewebes (BRB/BLB) aus AAS Messungen.

Gruppe		RG					PG
Laufzeit [h]		4	3	2	1	1-4	1-4
Proben [n]		26	26	23	21	96	18
Median	[µmol/l]	6.348,4	5.687,7	4.740,7	6.329,3	5.903,9	110,2
SD		5.766,3	4.907,9	2.786,8	3.721,7	4.589,3	70,2
Min.		154,9	481,3	389,2	46,3	46,3	0,0
Max.		23.543,3	19.825,9	11.848,6	11.421,9	23.543,3	254,9
Q ₁		3.562,9	3.677,5	3.803,7	2.309,3	3.397,7	69,5
Q ₃		11.112,8	6.554,5	6.944,8	8.353,7	8.433,2	170,3
MW		7.479,8	6.515,5	5.469,4	5.663,9	6.339,8	118,0
VarK		0,8	0,8	0,5	0,7	0,7	0,6

In der PBS Gruppe liegt der Median bei 110,2 µmol/l Eisen (Abbildung 6). Dieser Median ist höher als bei Proben aus der Leiste der PG (Kapitel 5.1.2, Seite 36). Dies könnte durch das nur an der Milchleiste größere entnommene Probenvolumen erklärt werden. Eine weitere Erklärung könnte die stärkere Durchblutung der Milchleiste im Vergleich zu dem der Leiste entnommenen Gewebe sein. Dies bedingt eine höhere Hämoglobinkonzentration im entnommenen Gewebe der Milchleiste und damit einen höheren Eisengehalt.

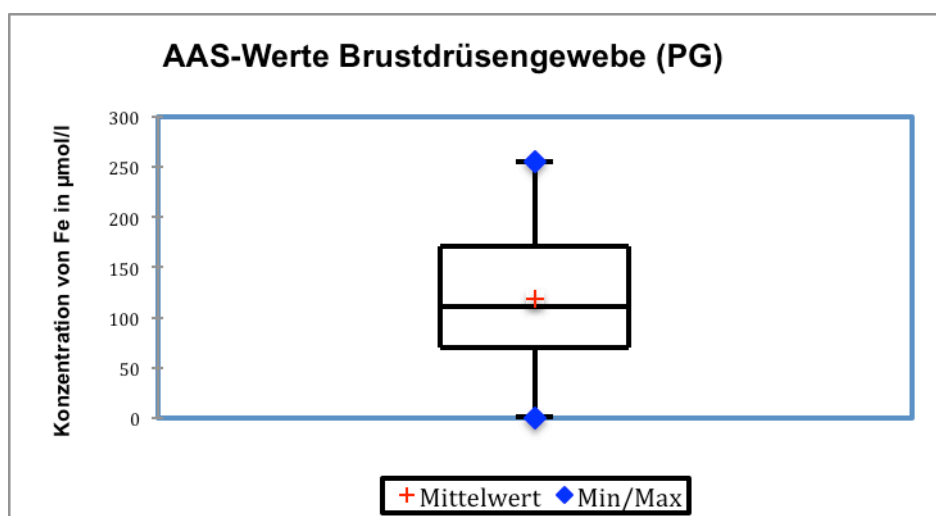


Abbildung 6: Box-Plot der Eisenkonzentration des Brustdrüsengewebes (BRB/BLB) aus AAS Messungen der PBS Gruppe.

Im Vergleich hierzu sind die Mediane des Eisengehalts der Resovist[®]-Proben sehr viel höher (Tabelle 10). Der gemittelte Median dieser Proben liegt bei 5.903,9 $\mu\text{mol/l}$ mit einer Standardabweichung von 4.589,3 $\mu\text{mol/l}$ (Abbildung 7). Die Standardabweichung dieser Proben ist sehr hoch, da die Minima und Maxima der Ergebnisse weit auseinander liegen. Die Streubreite der Ergebnisse ist mit 0,5-0,8 mäßig (VarK). Für die Fragestellung in Bezug auf die bestmögliche Resovist[®]-Laufzeit sind diese Proben des Brustdrüsengewebes jedoch ohne Belang, da die Injektionsstelle Ausgang und nicht Ziel der Verteilung von Resovist[®] ist.

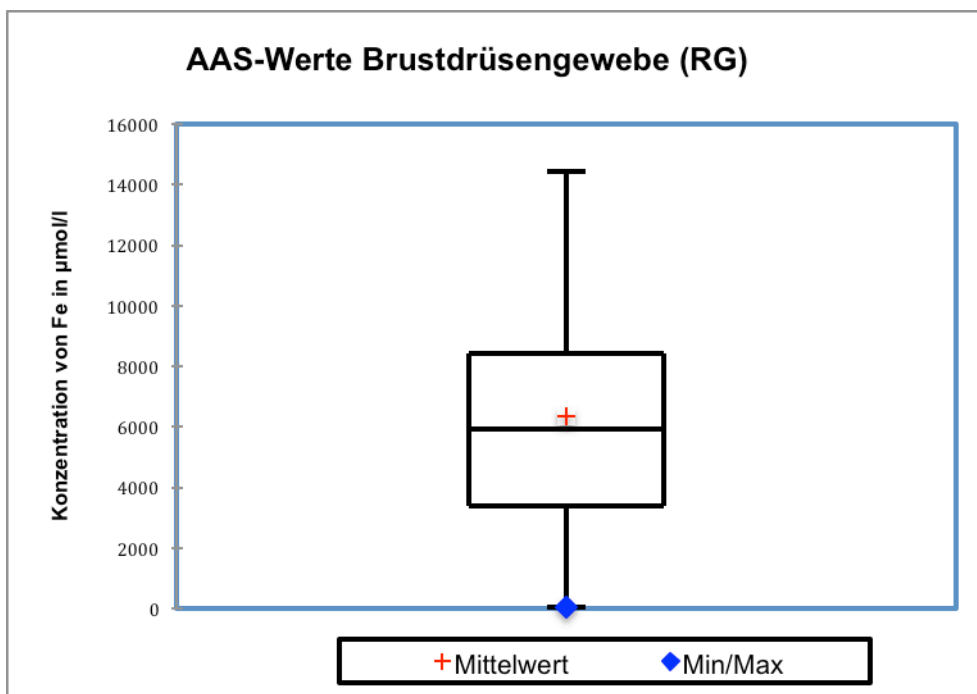


Abbildung 7: Box-Plot der gemittelten Eisenkonzentrationen des Brustdrüsengewebes (BRB/BLB) aus AAS Messungen der Resovist[®] Gruppe. Das Maximum ist aufgrund der Skalierungsbegrenzung nicht mit angegeben (23.543,3 $\mu\text{mol/l}$).

5.1.4 Entnahmeregion A: Axilla, Lymphknoten Level I (ARL I/ALL I)

Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind die Ergebnisse des Eisengehaltes und somit auch der Resovist[®]-Aufnahme in den Level I Lymphknoten der Axilla (Milchleisten-nah). Diese Lymphknoten sind die erste Station des Lymphabflussgebiets aus dem Brustdrüsengewebe und damit der sogenannte

Sentinellymphknoten. Für die Frage der Laufzeitlänge von Resovist® sind diese Ergebnisse daher von entscheidender Bedeutung (Tabelle 11).

Tabelle 11 Eisenkonzentrationen der axillären Lymphknoten Level I (ARL I/ALL I) aus AAS Messungen.

Gruppe		RG					PG
		4	3	2	1	1-4	1-4
Laufzeit [h]							
Proben [n]		26	26	25	22	98	18
Median	[µmol/l]	142,7	81,9	60,3	67,2	74,3	5,6
SD		127,9	96,5	73,9	133,3	114,7	19,3
Min.		0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0
Max.		472,8	355,2	272,0	550,2	550,2	66,8
Q ₁		50,5	51,2	24,1	35,9	39,1	0,0
Q ₃		256,1	127,4	114,6	108,8	168,7	15,8
MW		165,9	114,1	77,3	112,5	118,5	13,8
VarK		0,8	0,8	1,0	1,2	1,0	1,4

Die Mediane der RG und der PG unterscheiden sich deutlich voneinander (Abbildung 8). Der Median der Kontrollgruppe beträgt über 4 Stunden nur 5,6 µmol/l. Er ist also ähnlich niedrig, wie der Median der Eisenkonzentration der Leistenlymphknoten der Resovist® Gruppe (Tabelle 8, Seite 36).

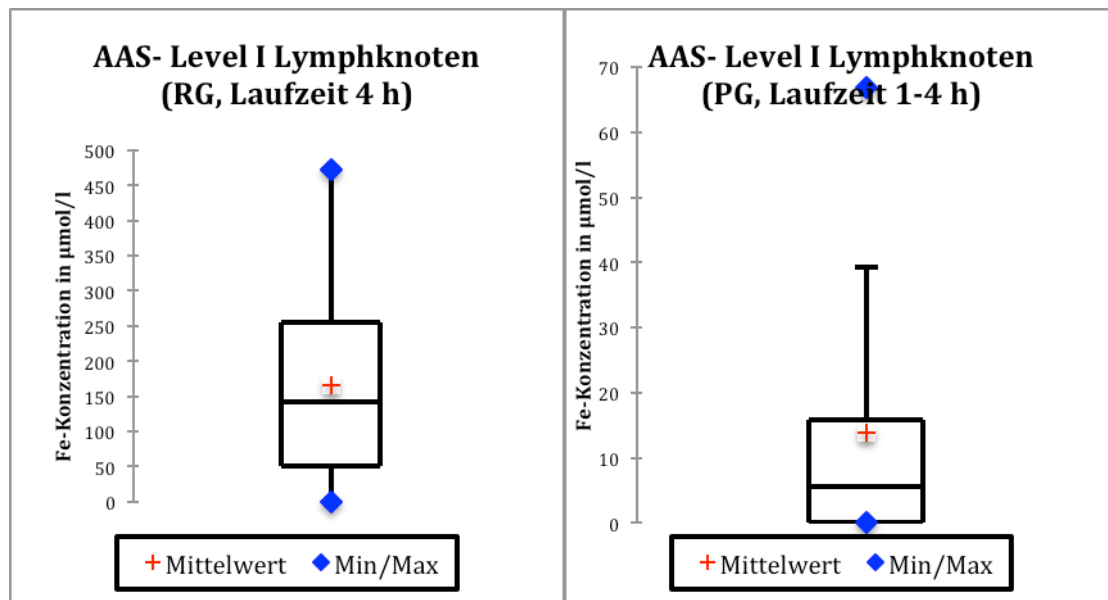


Abbildung 8: Box-Plots der AAS Messergebnisse der axillären Lymphknoten Level I (ARL I/ALL I) nach 4 Stunden Resovist®-Laufzeit (RG links) und der Leerproben (PG rechts). Beachte die unterschiedliche Skalierung der y-Achse.

Die Mediane der Eisenkonzentrationen der RG zu den verschiedenen Probenentnahmezeitpunkten zeigen deutliche Unterschiede und sind über die Zeit ansteigend. Die Eisenkonzentration der axillären Lymphknoten Level I der mit Resovist® behandelten Mäuse steigt im Median wie folgt: nach 1 Stunde Laufzeit 67,2 µmol/l, nach 3 Stunden 81,9 µmol/l und nach 4 Stunden 142,7 µmol/l (Abbildung 9). In Q₃ zeigt sich eine Plateaubildung zwischen dem 1- und 2-Stundenwert (108,8 resp. 114,6 µmol/l, Tabelle 11). Der Variationskoeffizient zeigt allerdings eine höhere Streuung der Werte an (1,2 resp. 1,0). Ausgehend vom 1-Stundenwert ist eine eindeutige Entwicklung daher erst ab dem 3-Stundenwert festzustellen, wo die VarKs niedriger (0,8) und die Daten stabiler sind.

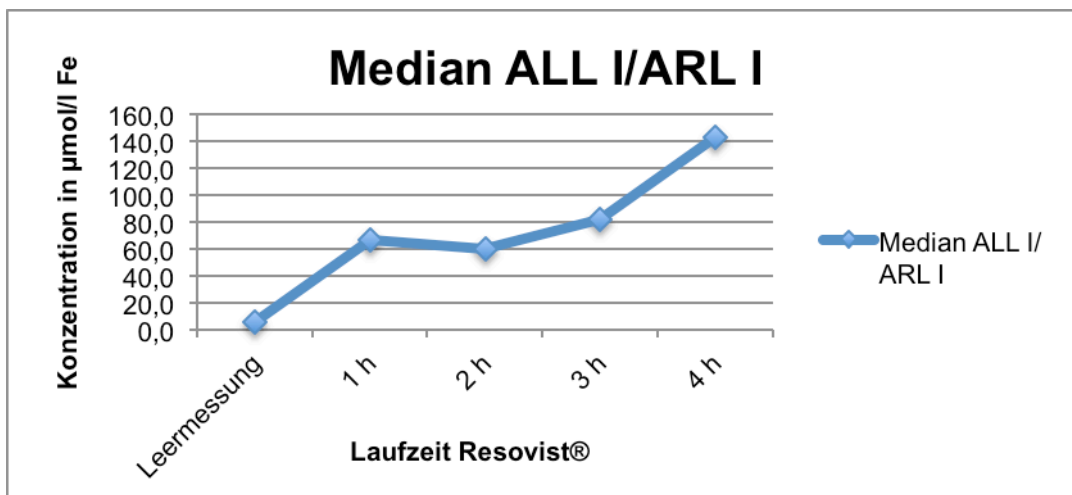


Abbildung 9: Mediane der Eisenkonzentrationen der axillären Lymphknoten aus Level I (ARL I/ALL I), gemessen im AAS. Leerprobe = PG 1-4 Stunden, Resovist® = RG bei 1, 2, 3 und 4 Stunden.

Von besonderem Interesse ist, dass die Mittelwerte jeweils dicht bei den Medianen sind (Tabelle 11, Seite 40). Auch der Verlauf der Quartile (Q₁ und Q₃) ist bemerkenswert. Diese zeigen einen Verlauf in relativer Nähe zum Median. Die in Q₃ repräsentierten Werte entsprechen 75% der Werte, die kleiner oder gleich der jeweils angegebenen Konzentration sind. Diese steigen über die Zeit mit dem Mittelwert und dem Median an (Tabelle 11).

**5.1.5 Entnahmeregion A:
Axilla, Fettgewebe Level I (ARF I/ALF I)**

Die Messung der Eisenkonzentration der Proben ARF I und ALF I in der Resovist® Gruppe ergeben im Median eine abnehmende Eisenmenge über die Zeit (Tabelle 12). Diese Proben stammen aus dem die Lymphknoten aus Level I umgebenden Gewebes. Damit weist deren Eisenkonzentration ein tendenziell umgekehrtes Verhalten im Vergleich zu den Messungen aus ARL I und ALL I auf (Abbildung 9). Der Median der Eisenkonzentration ARF I und ALF I der Leerproben (PG) ist 28,3 µmol/l. Der im Vergleich zu dem Median der Lymphknoten des Level I der PBS Gruppe (Tabelle 11) höhere Eisenwert ist möglicherweise damit zu erklären, dass das den Lymphknoten umgebende Gewebe stärker durchblutet ist (mehr Blutgefäße bzw. Hämoglobin) als er selbst, was in einer höheren Eisenkonzentration im Gewebe zum Ausdruck kommt.

Tabelle 12 Eisenkonzentrationen des Gewebes um die axillären Lymphknoten aus Level I (ARF I/ALF I).

Gruppe		RG					PG
Laufzeit [h]		4	3	2	1	1-4	1-4
Proben [n]		26	26	24	21	97	18
Median	[µmol/l]	118,8	124,8	47,4	146,2	112,1	28,3
SD		265,5	728,9	554,9	450,9	541,3	34,0
Min.		0,0	4,4	0,0	18,9	0,0	0,0
Max.		1.071,5	2.422,7	2.749,0	1.596,3	2.749,0	139,8
Q ₁		69,0	75,9	24,5	71,7	48,7	7,3
Q ₃		203,0	238,2	188,5	629,1	290,8	43,7
MW		203,1	441,7	239,2	423,6	323,7	33,2
VarK		1,3	1,7	2,3	1,1	1,7	1,0

Die abnehmende Eisenkonzentration im umliegenden Gewebe der axillären Lymphknoten aus Level I der Resovist® Gruppe drückt sich in folgenden Medianwerten bei zunehmender Laufzeit aus: nach 1 Stunde 146,2 µmol/l, nach 3 Stunden 124,8 µmol/l und nach 4 Stunden 118,8 µmol/l (Abbildung 10). Der 2-Stundenwert ist ein deutlicher Ausreißer nach unten. Allerdings ist der Variationskoeffizient mit 2,3 hier besonders hoch (Tabelle 12). Damit liegt eine starke Streuung der Messwerte vor und die Messung bei 2 Stunden ist daher kaum zu verwerten.

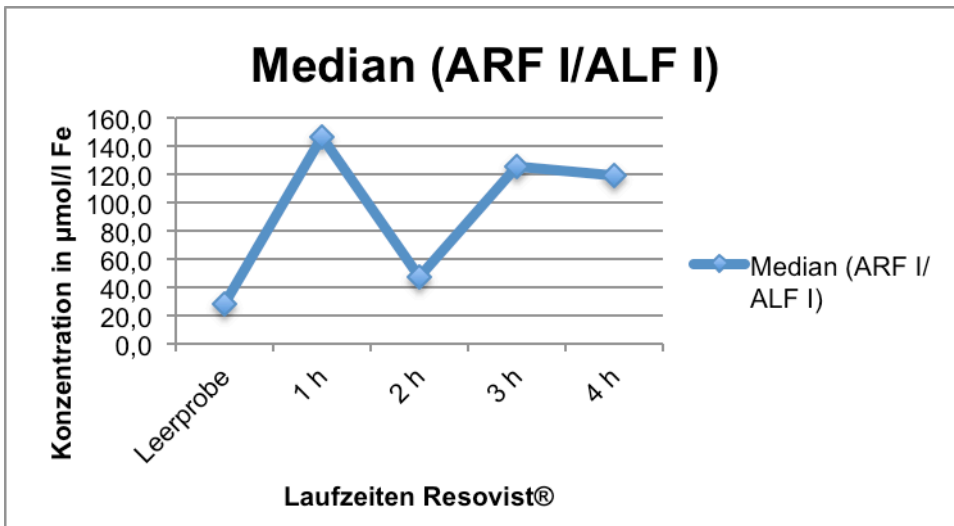


Abbildung 10: Mediane der Eisenkonzentrationen des Gewebes um die axillären Lymphknoten aus Level I (ARF I/ALF I), gemessen im AAS. Leerprobe = PG 1-4 Stunden, Resovist® = RG bei 1, 2, 3 und 4 Stunden.

Der Abfall der medianen Eisenkonzentration über die Zeit spiegelt den lymphatischen Abtransport der SPIONs aus dem umliegenden Gewebe in die Lymphknoten wider.

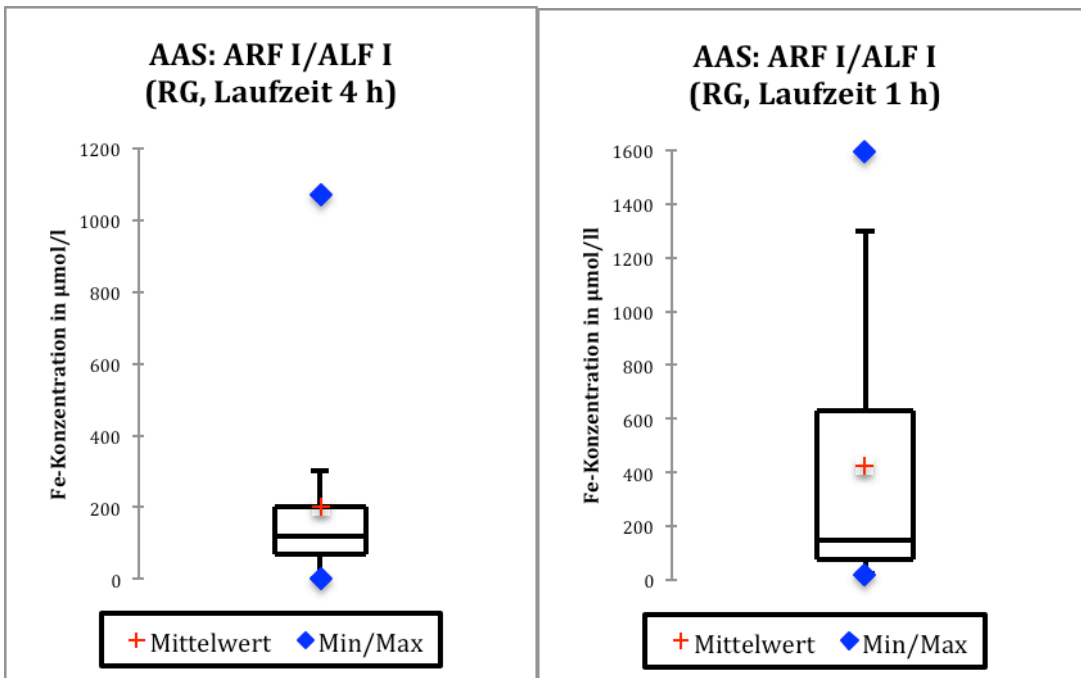


Abbildung 11: Box-Plots der AAS Messergebnisse des Gewebes um die axillären Lymphknoten aus Level I (ARF I/ALF I) der Resovist® Gruppe nach 4 Stunden (links) und 1 Stunde (rechts) Laufzeit. Beachte die unterschiedliche Skalierung der y-Achse.

Daher ist der gleichzeitige zeitabhängige Anstieg der Eisenkonzentration in den axillären Lymphknoten gut nachvollziehbar. Wegen der Streuung der Ergebnisse, ist die Interpretation der Daten jedoch sensibel (Abbildung 11). Die Variationskoeffizienten der Werte bei 1, 3 und 4 Stunden ist zwar nicht so hoch, wie bei dem 2-Stundenwert (1,1, 1,7, 1,3 resp. 2,3), jedoch auch nicht niedrig womit auch diese Werte einer gewissen Streuung unterliegen.

**5.1.6 Entnahmeregion A:
Axilla, Lymphknoten Level II (ARL II/ALL II)**

Der axilläre Lymphknoten des Level II stellt die nachgeordnete, zweite Drainagestation des Lymphabflusses aus dem Brustdrüsengewebe dar (Milchleisten-fern). Die Ergebnisse der AAS Messungen aus Level II spiegeln die hierarchische Situation nach Level I durch eine geringere Resovist®-Konzentration wider. In den Lymphknoten der PBS Gruppe ist im Median 8,9 µmol/l Eisen enthalten. Die höchste Eisenkonzentration wurde in den Proben der Resovist® Gruppe nach einer Laufzeit von 4 Stunden nachgewiesen. Im Median konnten wir zu diesem Zeitpunkt 39,9 µmol/l Eisen messen (Tabelle 13). Der 2 Stundenwert der RG stellt einen deutlichen Ausreißer dar. Hier liegt der Median nur bei 7 µmol/l Eisen.

Tabelle 13 Eisenkonzentrationen der axillären Lymphknoten Level II (ARL II/ALL II) aus AAS Messungen.

Gruppe		RG					PG
Laufzeit [h]		4	3	2	1	1-4	1-4
Proben [n]		26	26	24	22	98	18
Median	[µmol/l]	39,9	32,5	7,0	34,0	32,2	8,9
SD		28,1	55,3	27,7	125,5	70,4	11,6
Min.		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max.		98,8	250,6	104,4	616,6	616,6	36,5
Q ₁		25,2	24,7	0,0	20,8	12,3	0,0
Q ₃		64,4	63,9	33,0	40,8	49,7	21,3
MW		43,1	52,1	20,1	60,2	43,7	11,3
VarK		0,7	1,1	1,4	2,1	1,6	1,0

Betrachtet man die Mediane der 1 und 4 Stundenwerte, scheint auch in den Lymphknoten des Level II eine Steigerung der Eisenkonzentration vorzuliegen (Abbildung 12). Die Quartile (Q₁ und Q₃ Werte) geben diese Entwicklung in der RG über die Zeit ebenfalls wieder (Tabelle 13). Auch hier ist der 2 Stundenwert

deutlich abweichend. Das abweichende Verhalten dieser Proben ist nicht erklärbar, denn alle Proben wurden nach SOP gleichbehandelt und Abweichungen sind nicht dokumentiert.

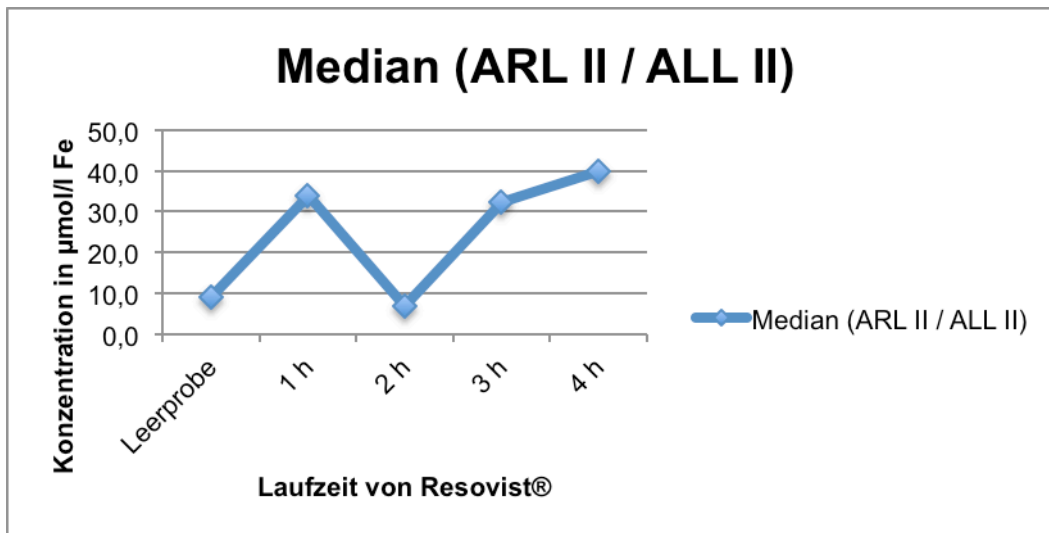


Abbildung 12: Mediane der Eisenkonzentrationen der axillären Lymphknoten aus Level II (ARF II/ALF II), gemessen im AAS. Leerprobe = PG 1-4 Stunden, Resovist® = RG bei 1, 2, 3 und 4 Stunden.

5.1.7 Entnahmeregion A:

Axilla, Fettgewebe Gewebe Level II (ARF II/ALF II)

Die Proben ARF II und ALF II sind das die axillären Lymphknoten von Level II umgebende Gewebe. Hier haben wir eine analoge Entwicklung der Eisenkonzentration, wie in Level I erwartet. Wegen der größeren Entfernung zum Injektionsort gingen wir von geringeren Werten aus. Diese Erwartung wurde auch erfüllt (vergleiche Tabelle 14 mit Tabelle 12, Seite 42. Der Vergleich der Eisenkonzentrationen zu den Zeitpunkten 1 Stunde und 4 Stunden repräsentiert eine zunehmende Kumulation des Eisens im Gewebe um die Lymphknoten aus Level II. Wiederum weicht der Wert der 2 Stundenlaufzeit von Resovist® deutlich von dieser Beobachtung ab (Median 0,0 µmol/l). Hier ist die Streuung der Werte größer als zu den anderen Zeitpunkten (VarK 1,9). Sogar der Wert der PG über 1-4 Stunden ist höher (1,3 µmol/l).

Tabelle 14 Eisenkonzentrationen des Gewebes um die axillären Lymphknoten aus Level II (ARF II/ALF II).

Gruppe		RG					PG
Laufzeit [h]		4	3	2	1	1-4	1-4
Proben [n]		26	25	23	19	93	18
Median	[µmol/l]	44,2	17,9	0,0	28,7	16,9	1,3
SD		47,6	27,8	16,5	24,0	35,2	10,1
Min.		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Max.		218,5	103,5	57,0	69,7	218,5	29,1
Q ₁		8,7	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0
Q ₃		77,1	32,2	6,4	51,1	46,8	7,9
MW		48,6	24,5	8,5	28,1	28,0	7,1
VarK		1,0	1,1	1,9	0,9	1,3	1,4

Die Darstellung der Mediane in Abbildung 13 zeigt einen Anstieg der Eisenkonzentration im Gewebe zu den Resovist®-Laufzeiten von 1 auf 4 Stunden. Dies gilt allerdings nur, wenn die Messpunkte nach 2 und 3 Stunden Laufzeit außeracht gelassen werden (Tabelle 14). Eine tatsächliche zeitliche Dynamik der Gewebekonzentrationen kann also nicht beobachtet werden.

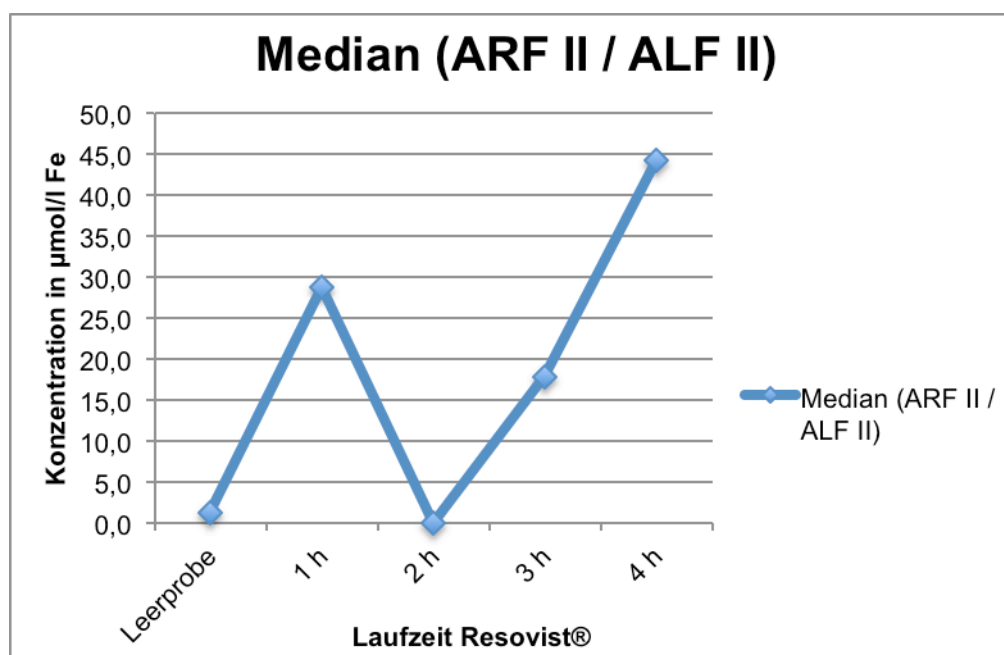


Abbildung 13: Mediane der Eisenkonzentrationen des Gewebes um die axillären Lymphknoten aus Level II (ARF II/ALF II), gemessen im AAS. Leerprobe = PG 1-4 Stunden, Resovist® = RG bei 1, 2, 3 und 4 Stunden.

5.2 Magnetpartikelspektrometrie

Die Ergebnisauswertung aus der Magnetpartikelspektrometrie erfolgte aus den genannten Gründen nicht quantitativ (Kapitel 4.4.2, Seite 27). Bei qualitativem Nachweis von signalgebenden SPIONs in der MPS Messung der Probe durch Vorhandensein von Harmonischen über der SNR wurde sie als "positiv" (enthält Resovist®) bewertet, ansonsten als "negativ" (enthält kein Resovist®). Beispielhaft für eine MPS-positive Messung sind in Abbildung 14 die Ergebnisse aus drei Proben derselben Maus 3 Stunden nach Resovist® Injektion dargestellt. Die Positivität ergibt sich dadurch, dass mindestens die 3. Harmonische über dem Fit der Messung lag. Bei einem negativen Messergebnis wären alle Harmonischen unterhalb der SNR-Linie.

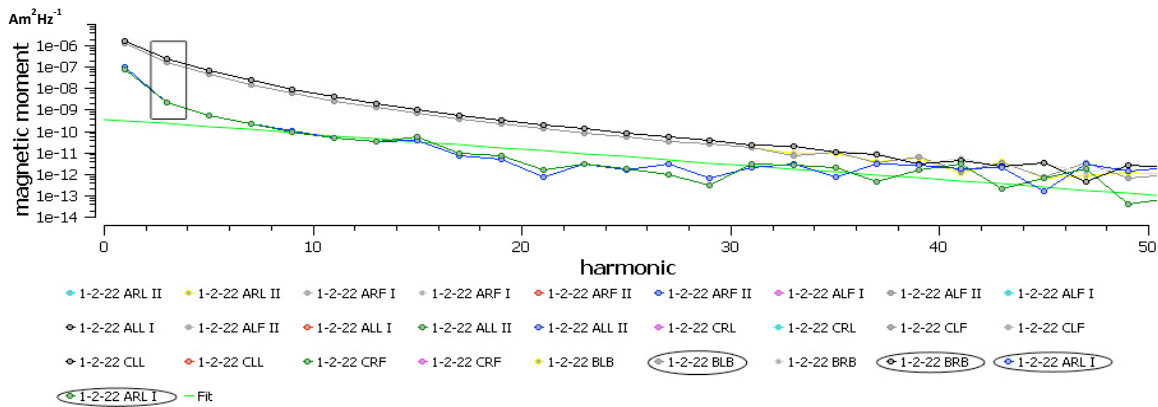


Abbildung 14: MPS-positive Messergebnisse einer RG-Maus (1-2-22) der Proben BLB, BRB und ARL I (Umkreisungen) nach 3 Stunden Laufzeit. Die 3. Harmonische wird durch das Kästchen hervorgehoben. Die grüne durchgezogene Linie markiert die gefittete Gerade der Maxima der 3. Harmonischen.

Die Ergebnisse der Messungen nach 1, 2, 3 und 4 Stunden werden im Weiteren besprochen und in den folgenden Tabellen mit Bezug auf die Entnahmeorte der Proben aufgeführt (Seite 50 f.:, Tabelle 16, Tabelle 17, Tabelle 18, Tabelle 18).

Alle Proben der PBS Gruppe zeigten kein MPS Signal bzw. keine Harmonischen über der SNR und waren damit negativ für das Vorhandensein signalgebender Partikel (MPS-negativ). Dies entsprach unseren Erwartungen, da diese Mäuse keine SPIONs erhalten hatten (Resovist®-freie Gruppe). In der Resovist® Gruppe dienten die Proben aus der Leistenregion, also der Lymphknoten und des umgebenden Gewebes (CRL/CLL und CRF/CLF) der Prüfung, ob neben der

Verteilung in die Axillaregion auch eine Partikelverteilung in andere Regionen stattfindet. Es zeigte sich, dass nur eine sehr geringe Anzahl dieser Proben MPS-positiv war. Die meisten Proben waren nach einer Resovist[®] Laufzeit von 3 Stunden MPS-positiv (CRL/CLL n = 1/24, CRF/CLF n = 5/24, Tabelle 17). Nach 2 Stunden waren nur je eine Probe positiv (CRL/CLL n = 1/20, CRF/CLF n = 1/20, Tabelle 16), nach 1 und 4 Stunden waren alle Proben MPS-negativ (CRL/CLL n = 0/20, CRF/CLF n = 0/20, Tabelle 15 resp. CRL/CLL n = 0/24, CRF/CLF n = 0/24, Tabelle 18). Eine Verteilung von signalgebenden SPIONs in die Leistenregion findet demnach in nur sehr geringem Maße statt, wobei der maximale Nachweis nach 3 Stunden in dem den Lymphknoten umgebenden Gewebe gelang (Abbildung 15).

Der Injektionsort von Resovist[®] ist die Region mit der höchsten Partikeldichte und die Verteilung der Partikel beginnt hier. Daher erwarteten wir auch eine dauerhaft hohe Konzentration an SPIONs an diesem Ort. Die Ergebnisse der MPS Messungen bestätigten die Erwartung mit dem Nachweis dauerhaft positiver Befunde signalgebender Partikel im injizierten Brustdrüsengewebe über die Zeit (Abbildung 15). Mit Ausnahme von zwei MPS-negativen Proben nach einer Laufzeit von 1 Stunde (BRB/BLB n = 2/20, Tabelle 15) waren alle Proben MPS-positiv. Dieser Befund drückt lediglich aus, dass kein ausreichendes Signal bei der MPS Messung dieser Proben erfasst werden konnte, nicht aber die Abwesenheit von Resovist[®] am Injektionsort bzw. in den beiden Proben. Da alle Proben mehrmals gemessen wurden, ist nicht von Fehlmessungen auszugehen.

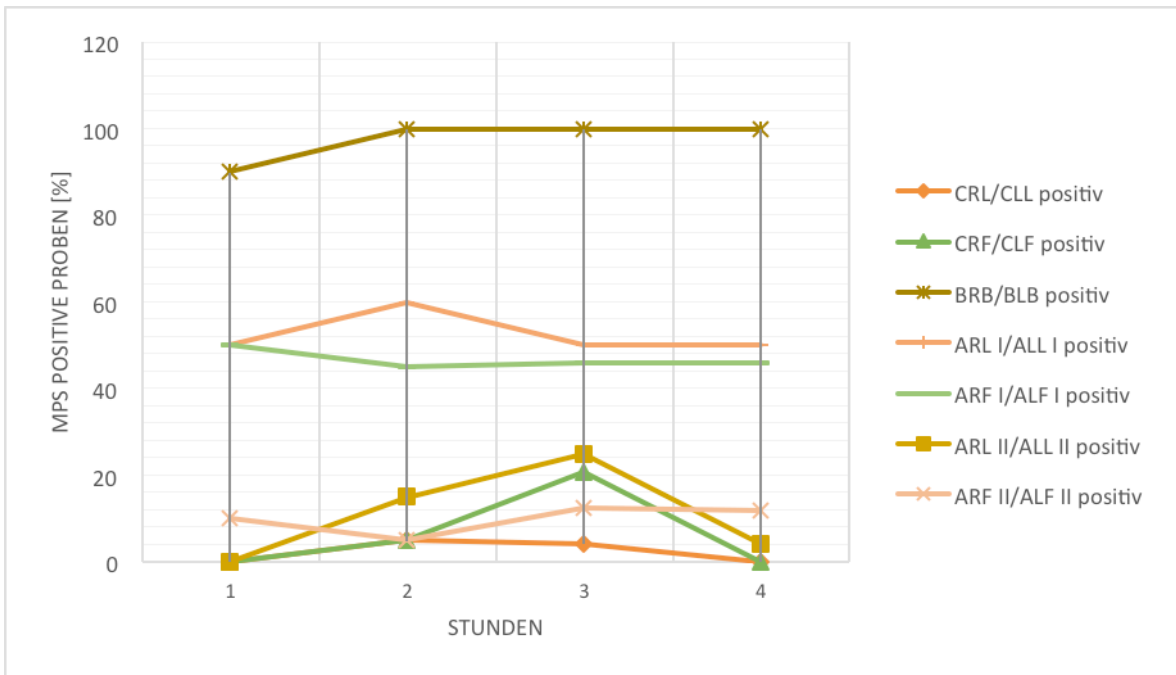


Abbildung 15: Dargestellt ist ausschließlich der prozentuale Anteil MPS-positiver Proben der Resovist® Gruppe nach Laufzeit und Entnahmemeort. Die Prozentangabe bezieht sich auf den MPS-positiven Anteil der Proben der jeweiligen Entnahmeregion. Erwartungsgemäß hoch ist der Anteil MPS-positiver Proben im Brustdrüsengewebe (BRB/BLB). Eine klare Anreicherung findet sich in den Proben der Axilla in Level I (ARL I/ALL I resp. ARF I/ALF I). Deutlich geringer ist der Nachweis responsiver SPIONs im Level II der Axilla (ARL II/ALL II resp. ARF II/ALF II) und der Leiste (CRL/CLL resp. CRF/CLF).

Die Ergebnisse der Proben des axillären Lymphknotens aus Level I (ARL I/ALL I), des SLN (Kapitel 5.1.1, Seite 34) sind uneinheitlich. Von den 88 Proben aller vier Resovist® Laufzeiten waren 46 Proben positiv und 42 negativ. Einzig nach 2 Stunden Laufzeit waren – gemessen an der LK-Gesamtzahl – mehr Proben MPS-positiv als negativ ($n = 12/20$ vs. $n = 8/20$, Tabelle 16, Seite 50). Über alle anderen Laufzeiten war die Verteilung MPS-positiv vs. negativ ausgeglichen (4 Stunden: $n = 12/24$, 3 Stunden: $n = 12/24$, 1 Stunde: $n = 10/20$). Die Proben aus dem umgebenden Gewebe (ARF I/ALF I) verhielten sich ähnlich uneinheitlich. Bei wiederum 88 Proben über alle Laufzeiten waren 41 Proben MPS-positiv vs. 47 Proben MPS-negativ. Nach 3 und 4 Stunden Resovist® Laufzeit waren je 11/24 Proben MPS-positiv und nach 2 Stunden 9/20 Proben MPS-positiv. Nach 1 Stunde zeigte sich eine Gleichverteilung mit 10/20 MPS-positiven Proben. Die Proben des umgebenden Gewebes der Lymphknoten aus Level I waren demnach überwiegend MPS-negativ.

Die Proben der nachgeschalteten Lymphknoten aus Level II (ARL II/ALL II) weisen ein eindeutiges Ergebnis auf. Die Messungen zeigten einen deutlich höheren Anteil MPS-negativer Proben (n = 78/88). Als möglicher Ausdruck einer hierarchischen Anordnung der Lymphknoten baute sich der Nachweis MPS-positiver Proben im Zeitraum 1-3 Stunden Resovist® Laufzeit im Sinne einer Partikelanflutung auf und nahm nach 4 Stunden als Zeichen des Abflutens der Partikel wieder ab (1 Stunde: n = 0/20, 2 Stunden n = 3/17, 3 Stunden: n = 6/18, 4 Stunden n = 1/24, Abbildung 15). Es zeigt sich eine nivellierte Dynamik MPS-positiver Proben des umgebenden Gewebes der Lymphknoten aus Level II (ARF II/ALF II) über alle Laufzeiten (1 Stunde: n = 2/20, 2 Stunden: n = 1/20, 3 Stunden: n = 3/24, 4 Stunden: n = 2/24). Lediglich 8 der 88 Proben waren MPS-positiv.

Tabelle 15 Ergebnisse der Messungen im MPS nach einer Resovist® Laufzeit von 1 Stunde, angeordnet nach Entnahmeort.

Entnahmeort	Resovist® Proben (1 h)	
	negativ [n]	positiv [n]
CRL/CLL	20	0
CRF/CLF	20	0
BRB/BLB	2	18
ARL I/ALL I	10	10
ARF I/ALF I	10	10
ARL II/ALL II	20	0
ARF II/ALF II	18	2

Tabelle 16 Ergebnisse der Messungen im MPS nach einer Resovist® Laufzeit von 2 Stunden, angeordnet nach Entnahmeort.

Entnahmeort	Resovist® Proben (2 h)	
	negativ [n]	positiv [n]
CRL/CLL	19	1
CRF/CLF	19	1
BRB/BLB	0	20
ARL I/ALL I	8	12
ARF I/ALF I	11	9
ARL II/ALL II	17	3
ARF II/ALF II	19	1

Tabelle 17 Ergebnisse der Messungen im MPS nach einer Resovist® Laufzeit von 3 Stunden, angeordnet nach Entnahmeort.

Entnahmeort	Resovist® Proben (3 h)	
	negativ [n]	positiv [n]
CRL/CLL	23	1
CRF/CLF	19	5
BRB /BLB	0	24
ARL I/ALL I	12	12
ARF I/ALF I	13	11
ARL II/ALL II	18	6
ARF II/ALF II	21	3

Tabelle 18 Ergebnisse der Messungen im MPS nach einer Resovist® Laufzeit von 4 Stunden, angeordnet nach Entnahmeort.

Entnahmeort	Resovist® Proben (4 h)	
	negativ [n]	positiv [n]
CRL/CLL	24	0
CRF/CLF	24	0
BRB/BLB	0	24
ARL I/ALL I	12	12
ARF I/ALF I	13	11
ARL II/ALL II	23	1
ARF II/ALF II	22	2

5.3 Vergleich der Ergebnisse von AAS und MPS

Zur Bewertung der Aussagekraft eines MPS-positiven Ergebnisses ist die Ermittlung der Validität des Messverfahrens von großer Bedeutung. Dem Vergleich der quantitativen Messergebnisse im AAS (in $\mu\text{mol/l}$) mit denen der qualitativen Messergebnisse im MPS (Ergebnisparameter „enthält Resovist®“ resp. „enthält kein Resovist®“) wird die Ermittlung eines Schwellenwertes zugrunde gelegt. Aufgrund dieses Schwellenwertes werden die AAS Ergebnisse als positiv oder negativ qualifiziert, um diese in einem zweiten Schritt mit den ebenfalls qualitativen MPS Ergebnissen vergleichen zu können. Durch die Erstellung einer Grenzwertoptimierungskurve – besser bekannt als ROC-Kurve (receiver-operating-characteristic-curve) – kann der Schwellenwert ermittelt und quantifiziert werden. Steigt die ROC-Kurve steil und nahe der Ordinate (y-Achse) an und liegt sie deutlich oberhalb der Diagonalen, ist eine zufällige Anordnung der Messergebnisse durch eine niedrige falsch-positiv Rate sicher ausgeschlossen.

Mittels einer ROC-Kurve wird jedes gemessene Ergebnis als Schwellenwert gewertet. Dann wird ermittelt wie die Sensitivität und die Spezifität wären, falls

dieser Schwellenwert der Cut-off-Point wäre. Der Wert, bei dem Sensitivität und Spezifität zusammen am höchsten sind, wurde hier als Schwelle ausgewählt. Alle Werte, die kleiner als dieser Schwellenwert waren, wurden als negativ gewertet. Bei einer ausreichenden Menge an Daten kann der Schwellenwert sehr genau und statistisch signifikant ermittelt werden. Das Signifikanz-Niveau α wurde auf 95% festgesetzt. Bei einem p-Wert $\leq 0,05$ wurde das Ergebnis als statistisch signifikant gewertet.

Zusätzlich haben wir die Fläche unter der Kurve (AUC) ermittelt, die mit dem negativen prädiktiven Wert übereinstimmt. Die AUC sagt etwas über die Präzision eines Tests aus und kann Werte zwischen 0 und 1 einnehmen. Je näher der Wert bei 1 liegt, desto näher kommt die Methode dem Goldstandard. In Abbildung 16 sind die ROC-Kurve zur Schwellenwert Ermittlung und die berechnete AUC dargestellt.

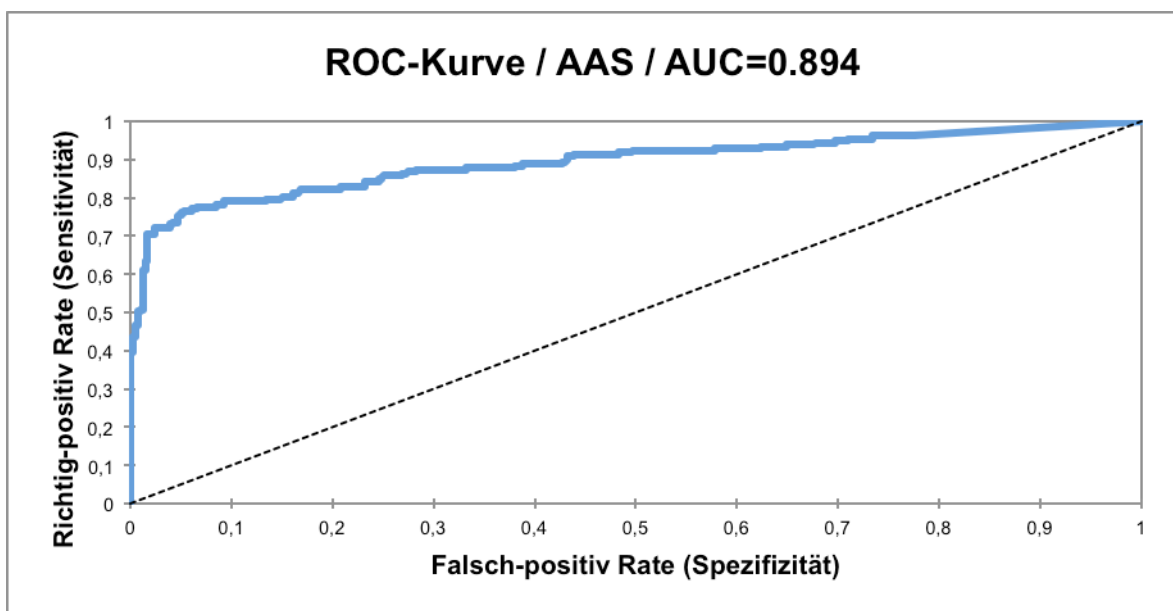


Abbildung 16: ROC-Kurve zur Schwellenwertermittlung beim Vergleich von MPS mit AAS. Für die AAS Ergebnisse ist der Schwellenwert $\geq 106,9 \mu\text{mol/l}$.

Die Berechnung der ROC-Kurve erfolgte ausschließlich auf der Basis der Messergebnisse aus Proben von Mäusen die mit Resovist[®] behandelt wurden, da das MPS nur die responsiven SPIONs im Resovist[®] nicht aber körpereigenes Eisen misst. Im Gegensatz hierzu misst das AAS auch das im Gewebe physiologisch enthaltene Eisen. Die Beschränkung des Methodenvergleichs auf

die RG entspricht im Übrigen der Fragestellung nach Anreicherung von Resovist® im SLN und deren späterer Nutzung im MPI zur SLNB. Proben ohne Ergebnis im AAS resp. MPI wurden selbstverständlich nicht in die Berechnung einbezogen. Insgesamt wurden die Werte von 607 Proben der Resovist® Gruppe verwendet.

Die Signifikanzberechnung unseres Tests ergab einen p-Wert von $<0,0001$. Die hohe Präzision des Tests findet Ausdruck in einer AUC von 0,894 (Abbildung 16). Der ermittelte Schwellenwert für die AAS-Ergebnisse war $\geq 106,9 \mu\text{mol/l}$. Bei diesem Wert wurde nach Auswertung der Kontingenztafel (Tabelle 19) eine Sensitivität von 0,766 und eine Spezifität von 0,946 erreicht (Tabelle 20). Die Sensitivität wird definiert als der Quotient aus richtig-positiven Testergebnissen und der Summe aus richtig-positiven und falsch-negativen Testergebnissen. Sie beschreibt welcher Anteil der AAS Proben, die über dem Schwellenwert lagen, auch als MPS-positiv Proben erkannt wurden. Die Spezifität wird definiert als der Quotient aus richtig-negativen Testergebnissen und der Summe aus falsch-positiven und richtig-negativen Testergebnissen. Dies ist der Anteil der Proben mit negativem Testergebnis im AAS von denen, die auch im MPS-negativ sind.

Tabelle 19 Vergleich der Messergebnisse der Resovist® Gruppe aus Proben im AAS mit denen im MPS – Kontingenztafel.

	AAS-positiv	AAS-negativ	Gesamt MPS
MPS-positiv	151	22	173
MPS-negativ	46	388	434
Gesamt AAS	197	410	

Der negative prädiktive Wert, also die Wahrscheinlichkeit bei einem negativen MPS Ergebnis auch ein negatives AAS Ergebnis zu erhalten, liegt bei 0,894 oder 89,4%. Der positive prädiktive Wert, also die Wahrscheinlichkeit bei einem positiven MPS Ergebnis auch tatsächlich ein positives Ergebnis im AAS zu haben, liegt bei 0,873 oder auch 87,3%.

Tabelle 20 Vergleich der Messergebnisse der Resovist® Gruppe aus Proben im AAS mit denen im MPS – Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert auf der Basis der Kontingenztafel (Tabelle 19).

Parameter	Wert
Sensitivität	0,766
Spezifität	0,946
Positiver prädiktiver Wert	0,873
Negativer prädiktiver Wert	0,894

Die Proben der Mäuse die kein Resovist[®] erhielten (SPION-freie PBS-Gruppe) zeigten negative Messergebnisse im MPS. Unter Anwendung des von uns ermittelten Schwellenwertes wäre bei 10 Messungen dieser Gruppe ein positives Ergebnis zu erwarten gewesen. Auf den ersten Blick scheint es also überraschend, dass diese Proben dennoch alle negativ gemessen wurden. Das Ergebnis ist dennoch plausibel, da die im AAS gemessene Eisenkonzentration nicht alleine SPIONs, sondern auch – im Falle der PBS-Gruppe ausschließlich – physiologisches Eisen (z.B. Hämoglobin) repräsentiert.[71] Entsprechend widersprechen die Ergebnisse der AAS-Messungen nicht den Aussagen über Sensitivität und Spezifität.

5.4 Histologie

Unsere Arbeitsgruppe hat in anderen Projekten die Verteilung der SPIONs im Gewebe morphologisch untersucht. Hierzu wurde Gewebe mit dem Transmissionselektronenmikroskop und histologisch betrachtet. Da einige Lymphknoten der in der hier vorgelegten Arbeit eingesetzten Resovist[®] Mäuse für histologische Untersuchungen verwendet wurden, möchten wir diesen Aspekt nur exemplarisch darstellen. Es handelt sich demnach nicht um Ergebnisse der Autorin, aber um Ergebnisse von Mäusen aus ihren Versuchen.

Zur morphologischen Verfolgung der Verteilung der Eisenpartikel in Lymphknoten, wurden diese mit der Eisen-spezifischen Preußisch-Blau-Färbung behandelt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Nuclear Fast Red Aluminiumsulphat. Damit konnte unverändertes Lymphknotengewebe rot und die Eisenpartikel blau identifiziert werden. Es zeigte sich, dass die SPIONs sich insbesondere im Kortex und am Hilus der axillären Level I Lymphknoten anreicherten (Abbildung 17).

Histologisch konnte eine Anreicherung von SPIONs im Lymphknoten nachvollzogen werden. Die Ergebnisse aus AAS und MPS Messungen konnten dadurch auch morphologisch belegt werden.

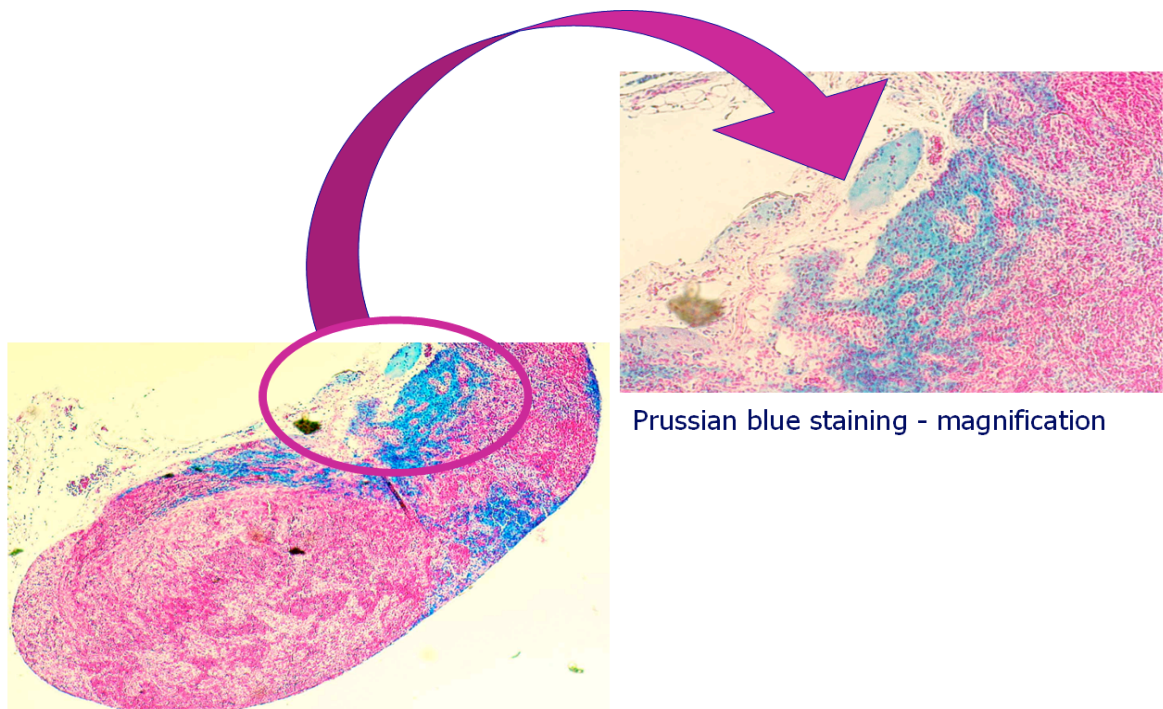


Abbildung 17: Darstellung eines vollständigen Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten axillären Lymphknotens. Färbung mit Nuclear Fast Red Aluminiumsulphat sowie Eisen-spezifischem Preußisch-Blau. Mod. n. [54].

6 Diskussion

Die Einführung der Sentinellymphonodektomie hat als Weiterentwicklung der konventionellen radikalen Axilladissektion zur Reduktion der operationsbedingten Morbidität eine deutliche Verbesserung für Patientinnen mit Mammakarzinom erbracht. Das bislang erfolgreichste Modell der SLNB ist die Markierung der SLN mit ^{99m}Tc und Patentblau V[®]. Die Nachteile dieser Prozedur, insbesondere der Verwendung eines Radiopharmakons könnten durch Einsatz eines magnetischen Markierungs- und Detektionsverfahrens reduziert werden. Zada et al. konnten nach einem systematischen Review der Literatur in einer Metaanalyse sieben in einem prospektiven Design angelegte Studien identifizieren und auswerten, die eine SLNB unter Verwendung von SPIONs und einer Magnetometer-Handsonde mit der konventionellen SLNB mit ^{99m}Tc und Patentblau V[®] verglichen.[72] Die Auswertung zeigte, dass das magnetische Verfahren dem konventionellen nicht unterlegen war ($z = 3,87$, $P < 0,001$). Die Detektion von SPIONs im SLNB Konzept ist unter Verwendung verschiedener Magnetometer erfolgreich durchführbar.[66, 73] Der Ansatz der hier vorgelegten Studie wird durch diese Publikationen unterstützt. Wir verwenden jedoch kein Magnetometer, sondern wir möchten die SLNB unter Einsatz des MPI zur Detektion der SLNs entwickeln. Die Intention der Entwicklung dieses Vorgehens ist eine weitere Verbesserung der Operationstechnik und zusätzlichen Verringerung der operationsbedingten Morbidität unter Verwendung eines leichter verfügbaren Tracers mit magnetischen Eigenschaften.

Die im Hypothesenteil der hier vorgelegten Grundlagenarbeit explorierte Fragestellung umfasst vier Einzelfragen, die durch diese Studie beantwortet werden sollen. Erstens sollte geklärt werden, ob der axilläre Lymphknoten mit einer Anreicherung von Resovist[®] mit dem Sentinellymphknoten gleichzusetzen sei. Dies konnte eindeutig positiv beantwortet werden, denn die Verifikation des SLN erfolgte durch gleichzeitige Injektion von eisenfreiem Patentblau V[®] an gleicher Stelle und Nachweis des Farbstoffs im gleichen Lymphknoten. Eine ausschließliche Injektion von eisenfreier PBS Lösung diente als Kontrolle. Die Übereinstimmung des Sentinellymphknotens zwischen den Markierungsverfahren zeigte sich visuell durch gleichzeitige Braunfärbung (Eigenfarbe von Resovist[®]) und Blaufärbung (Patentblau V[®]) der SLNs sowie durch eine im AAS gemessen

erhöhte Eisenkonzentration (Resovist[®]) im gleichen Lymphknoten. Der Nachweis von SPIONs im SLN ist beim Mammakarzinom mehrfach in der Literatur belegt. Beispielhaft sei hier nur die Arbeit von Johnson et al. genannt, in der die zuvor subcutan am Tumor injizierte SPIONs mittels MRT in den axillären Lymphknoten nachgewiesen und histologisch verifiziert werden konnten.[74] Die Übereinstimmung von SPION-tragendem Lymphknoten als anzunehmender SLN und tatsächlichem SLN wird in unserer Studie durch den Nachweis von Patentblau-V[®] im Sentinel gezeigt, da die Markierung des SLN durch den Nachweis des Farbstoffes im Lymphknoten anerkanntermaßen den SLN identifiziert.[21, 68, 72, 75]

Mit den Fragen zwei und drei sollte im Mausmodell der gesunden Maus untersucht werden welche Laufzeit notwendig ist, um den Tracer nach intramammärer Resovist[®]-Injektion im axillären SLN nachzuweisen und welche im AAS gemessene Eisenkonzentration in den unterschiedlichen Geweben vorhanden sein muss, damit ein Nachweis signalgebender Partikel im MPS gelingt. Damit verbunden ist die Frage nach der optimalen Laufzeit zur Erreichung der maximalen SPION Konzentration im SLN. In der hier vorgelegten Studie deuten die Messergebnisse des 1. axillären Lymphknotens (SLN) mit einer medianen Konzentration von 143 $\mu\text{mol/l}$ auf eine optimale Laufzeit von 4 Stunden hin (vgl. Kapitel 5.1.4, Seite 39). Zur Beantwortung der beiden Fragen erfolgte die Bestimmung einer Schwellenwert-Konzentration. Das ist der Schwellenwert, ab welchem die Eisen- resp. Resovist[®]-Konzentration im entnommenen Gewebe bzw. der Probe ein positiver Ausschlag im MPS zu detektieren ist. Hierfür wurde eine ROC-Kurve verwendet, welche jeden einzelnen Messwert als Cut-Off-Punkt setzt und für diesen gesondert Sensitivität und Spezifität berechnet. An dem Punkt mit der besten Sensitivität und Spezifität wurde der Cut-Off-Punkt gesetzt. Dieser liegt bei größer oder gleich 106,8 $\mu\text{mol/l}$ Fe. Dies ist der Wert, der mindestens in einer Probe von 10 μl enthalten sein musste, damit ein positiver Ausschlag im MPS gemessen werden konnte.

Für die Betrachtung der MPS-Ergebnisse ist es wichtig zu beachten, dass unklar ist welcher Anteil des Resovist[®] ein Signal im MPS auslöst (Kapitel 4.4.1, Seite 25). Des Weiteren weisen verschiedene Chargen an Resovist[®] Unterschiede in ihrer MPS-Tauglichkeit auf.[45] Daher können keine genauen Konzentrationsangaben mit dem MPS bei einem in-vivo Tierversuch ermittelt

werden. Wir konnten daraus die qualitative Aussage „Resovist[®]-positiv“ oder „Resovist[®]-negativ“ treffen. Aus diesem Grunde wurden die Proben zuerst mittels MPS gemessen (Kapitel 4.4, Seite 25 ff.), im Anschluss lysiert und dann mittels AAS der Eisengehalt der Proben quantitativ bestimmt (Kapitel 4.5, Seite 28 ff.).

Mit der vierten Frage sollte geklärt werden, ob das MPS ein valides Messinstrument zum Nachweis von SPIONs ist. Hierzu wurde der Vergleich der Signale zwischen Atomabsorptionsspektrometer (AAS) und MPS herangezogen. Wir konnten durch die Ermittlung von ROC und AUC nachweisen, dass das MPS ein geeignetes Instrument ist. Die ROC Kurve steigt steil an und liegt deutlich über der Diagonalen, womit eine zufällige Anordnung der Messergebnisse ausgeschlossen ist und eine niedrige falsch-positiv Rate vorliegt. Die AUC von 0.894 liegt zudem nahe der 1 und damit am Optimum. Diese hohe Präzision unseres Testergebnisses spiegelt sich außerdem im Signifikanzniveau mit einem p-Wert von <0,0001.

In einer aktuellen Publikation von van de Loosdrecht et al. aus der Arbeitsgruppe um Bennie Ten Haken wird die Frage, ob das MPS eine valides Messinstrument zum Nachweis von SPIONs ist indirekt ebenfalls beantwortet und bestätigt damit unsere eigenen zuvor erhobenen und hier dargestellten Ergebnisse.[76] Zur gleichen Zeit haben wir unsere Daten auf dem International Workshop on MPI in New York 2019 vorgestellt.[77] Der von der Arbeitsgruppe um Bennie Ten Haken entwickelte Superparamagnetic Quantifier (SPaQ) sollte der Charakterisierung des Verhaltens bzw. der Detektion von SPIONs in biologischer Umgebung wie in Blut, Gewebe und Lymphknoten dienen. Dazu wird die Magnetisierungskurve der Partikel gemessen, die eine non-lineare Antwort auf die externen Magnetfelder aufzeigt. Hierzu können unterschiedliche Messverfahren angewendet werden. Die Gruppe hat in ihrer Publikation die Effizienz ihres neuen SPaQ mit der Vibrating Sample Magnetometry (VSM) [78] und der in unserer Studie verwendeten MPS [60, 79] unter Verwendung zweier SPIONs (Resovist[®] und SHP-25 (Ocean Nanotech, Kerndurchmesser 25 nm)) verglichen. Es zeigte sich eine Überlegenheit von SPaQ und MPS gegenüber VSM in Bezug auf die Messgenauigkeit der Magnetisierungskurve und die Schnelligkeit des Messvorgangs. Das MPS hat sich jedoch als am geeignetsten zur Vorhersage des Verhaltens der SPIONs unter Verwendung von MPI erwiesen.[76]

Die Resultate des Ergebnisteils (Kapitel 5, Seite 33 ff.) werden im Folgenden diskutiert und sind daher diesem entsprechend gegliedert.

6.1 Einzelbetrachtung der AAS-Ergebnisse

6.1.1 Proben der Leistenregion

Als interne Negativ-Kontrollen dienten in der hier vorgelegten Arbeit die Proben der Leistenlymphknoten und dessen umgebenden Fettgewebes (CRL/CLL). Nach Injektion des Tracers Resovist[®] in den kranialen Anteil der Milchleiste der Versuchstiere war davon auszugehen, dass es von hier aus nicht zu einer relevanten lymphatischen Verteilung des Tracers in die Leiste der Mäuse kommen würde. Selbst bei systemischer Gabe von Nanopartikeln lagern sich diese kaum in den Leistenlymphknoten ab.[80] Die Mediane der beiden Entnahmestellen aus der Leiste verlaufen parallel (Abbildung 5, Seite 34). Im Fettgewebe der Leiste war minimal mehr Eisen zu messen als im Lymphknoten. Die SPIONs werden nach der Injektion über die Lymphe zu den Lymphknoten der Leiste transportiert und sind offensichtlich überwiegend im Fettgewebe angereichert worden, bevor sie die Lymphknoten erreicht haben. Dass sich überhaupt Eisen in diesen Proben messen lässt liegt daran, dass das AAS nicht spezifisch nur das Eisen im Resovist[®] misst, sondern auch natürliches Körpereisen, wie zum Beispiel das Eisen im Hämoglobin.[71]

Bei Betrachtung der Leerproben der PG zeigt sich, dass deren Mediane noch etwas weniger Eisen abbilden als die der Proben aus der Leiste der mit Resovist[®] behandelten Mäuse. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass ein geringer Teil des Resovist[®] über die Blutbahn in diese Region gelangte und dort von Makrophagen aufgenommen und akkumuliert wurde.[32, 40] Diese Mengenunterschiede zeigen sich allerdings als nicht relevant, da sich die Standardabweichungen der verschiedenen Proben und Laufzeiten deutlich überlappen (Kapitel 5.1, Seite 33 ff.).

Eine kleine Menge Eisen kann in den Proben immer nachgewiesen werden und es ist anzunehmen, dass diese in den Kontrollproben minimal ansteigt, wenn dem Tier Resovist[®] gespritzt wird. Hierbei handelt es sich allerdings nicht um eine für die Fragestellung relevante Menge, so dass neben den Leerproben auch die Proben aus der Leiste als Negativprobe genutzt werden können.

6.1.2 Brustdrüsengewebe

Die Messergebnisse des Brustdrüsengewebes zeigen hohe Eisenwerte bis zu 23,5 mmol/l mit einer breiten Messwertstreuung bei allen Laufzeiten der mit Resovist® behandelten Tiere (Maximalwert der Streuung des 4 Stundenwertes der RG, Tabelle 10, Seite 38). Diese hohen Konzentrationen über die Zeit ergeben sich daraus, dass der Tracer direkt in das gemessene Gewebe appliziert wurde und der größere Anteil des Tracers persistierte an dieser Stelle, während sich eine geringere Menge über die Lymphe verteilt hat. Eine hämatogene Verteilung ist erst bei Gefäßöffnung durch Verletzung oder Punktion wahrscheinlich, z.B. durch die Injektionsnadel bei Applikation des Tracers.[81, 82] Auch makroskopisch konnte die lokale Anreicherung und Persistenz gut visualisiert werden. Das Brustdrüsengewebe wurde durch die originäre Farbe vom Resovist® deutlich braun gefärbt. Robe et al. berichteten unter Verwendung von fluoreszierenden Nanopartikeln, den Quantum Dots als Tracer über ähnliche Beobachtungen.[55] In ihrem Versuch mit gesunden, immunsupprimierten weiblichen Mäusen zur Untersuchung des SLNB Konzeptes wurde die Verteilung der Quantum Dots im gesamten Organismus evaluiert. Die Nanopartikel wurden subcutan in die Vorderpfote injiziert. Dort waren sie mit einer hohen Anreicherung über 24 Stunden nachweisbar. Die Autoren folgerten daraus, dass der größte Teil des injizierten Nanopartikelvolumens an der Injektionsstelle verbleibt.[55] Dieses Verhalten ist auch bei der Verwendung von ^{99m}Tc zu beobachten, wo am Tage nach der Injektion an der Injektionsstelle noch hohe Zerfallsraten messbar sind.[83, 84] Unsere Konzentrationsmessungen im Brustdrüsengewebe weisen eine breite Ergebnisstreuung auf. Bei kritischer Betrachtung könnte als mögliche methodische Begründung für diese Streubreite (1) bei der Injektion des Resovist® nicht in jedem Fall die volle Dosis im Zielgewebe verblieben sein, (2) die Konzentration des SPIONs im applizierten Probenvolumen nicht konstant gewesen sein, (3) in den Verum-Proben ein sehr hoher Verdünnungsfaktor nach der Aufbereitung des Gewebes bei der Messung vorgelegen haben. Die Behandlung der Mäuse und die Dosierung des applizierten Probenvolumens unterlag in unserem Versuch einer strengen internen Kontrolle durch die Mitglieder der Arbeitsgruppe. Daher ist die Vermutung zu (1) eine unwahrscheinliche Begründung. Die Begründung (2) ist zu einem nicht unerheblichen Teil abhängig von der Qualitätskontrolle des Herstellers. Vor dem Aufziehen des Applikationsvolumens wurde die Entnahmeflasche geschüttelt, um eine möglichst

optimale Verteilung zu erreichen und Fehler zu vermeiden. Die Begründung (3) könnte aufgrund anfänglicher Schwierigkeiten des Fettgewebsverdaus (Kapitel 4.5.1, Seite 28 ff.) gelten. Da aber auch hier mit hoher Genauigkeit und Kontrolle innerhalb der Arbeitsgruppe gearbeitet wurde, sind methodische Fehler nicht wahrscheinlich.

Die AAS Messungen des Brustdrüsengewebes unserer mit Resovist[®] behandelten Mäuse ergaben eine Eisenkonzentration von deutlich mehr als 1 mmol/l (Tabelle 10, Seite 38). Erwartungsgemäß war die Eisenkonzentration im Brustdrüsengewebe der mit PBS behandelten Mäuse mit 110 µmol/l viel niedriger. Dies ist bemerkenswert, da die medianen Messwerte der Leistenregion der PG Mäuse noch niedriger liegen (Tabelle 7, Seite 35), die Messergebnisse sich aber gleichen sollten. Physiologischerweise hat die Milchleiste eine ausgeprägtere Durchblutung mit einer höheren Anzahl von Blutgefäßen und einer höheren Konzentration an Blutzellen. Wir nehmen daher an, dass die höhere gemessene Eisenkonzentration im PG Brustdrüsengewebe durch eine höhere Menge an lokal vorhandenem physiologischem Eisen (v.a. Hämoglobin) im Probenvolumen erklärbar ist. Für die Fragestellung zur Laufzeit von Resovist[®] über die Lymphbahnen sind die Beobachtungen in der PG allerdings von keinem besonderen Interesse, so dass wir sie im Weiteren nicht verfolgen.

6.1.3 Umgebendes Gewebe der axillären Lymphknoten Level I (ARF I/ALF I)

Unsere ausführliche Literaturrecherche hat ergeben, dass das Gewebe um die Lymphknoten, die nach SPIO Applikation als primäre Abstromstationen aus dem injizierten Gewebe angesehen, werden bislang von keiner anderen Arbeitsgruppe untersucht wurde. Dieses die Sentinellymphknoten umgebende Gewebe war für uns von besonderem Interesse um das in vivo Verhalten von Resovist[®] besser zu verstehen und zu evaluieren, ob Störgrößen bei der Interpretation des Detektionsergebnisses in der Axilla zur SLNB möglich sind. In der hier vorgelegten Versuchsreihe wurde das perinodale Gewebe daher separat untersucht.

In der Literatur wird der Schwerpunkt bei der Untersuchung des Verhaltens von Tracern auf deren Verteilung in die Lymphknoten gelegt. In einer dieser Publikationen wird als Nebenbeobachtung beschrieben, dass es bei der MRT Bildgebung des lymphnodalen Abstromgebietes zu Bildverzerrungen kommen kann, wenn der interstitiell applizierte Tracer überdosiert sei.[85] Die Untersuchung erfolgte im Hasenmodell an gesunden Tieren. Der Durchmesser

des verwendeten Tracers wird mit 47 ± 13 nm angegeben und die Bezugsquelle war die Schering AG, Berlin. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich um Resovist[®] gehandelt hat, obgleich dies nicht explizit angegeben wird. Die s.c. Injektion des Tracers erfolgte in den Zehenzwischenraum der Hinterpfote. Um den Lymphabstrom zu stimulieren wurde die Pfote in ca. 38°C warmem Wasser gebadet und eine Pfotenmassage über 20 Minuten durchgeführt.[85] Das ist bemerkenswert, da in anderen Studien nach Tracerapplikation keine Wärmeanwendung erfolgt nur eine deutlich kürzere Massage des injizierten Gewebes mit einer Dauer von 1-5 Minuten vorgenommen wird.[20, 22, 26, 86] Unsere Mäuse wurden nach Injektion nicht massiert, die Tracer (Patentblau V[®] und Resovist[®]) verteilten sich ohne Gewebetraumatisierung durch Massage oder Weitstellung der Gefäße durch Wärme frei im Gewebe zu und in den Lymphbahnen. Die Studie von Taupitz et al. verfolgte das Ziel der Ermittlung einer optimalen interstitiellen Eisendosis des Tracers für die MRT Diagnostik von Lymphknoten. Für die Poplitealregion wurde diese mit einer optimalen Eisenmenge von 2 und 5 μmol ermittelt und für die Iliakalregion mit 20 und 30 μmol absolut. Bei einer Überdosierung (>5 μmol resp. >30 μmol Eisen) kam es zu gravierenden Bildverzerrungen im MRT im Bereich der Lymphknotenstationen und deren umgebendem Gewebe, die als metallartige Artefakte beschrieben werden.[85] Im Rahmen dieser Studie wurden auch histologische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurde ausschließlich die Eisenverteilung im Lymphknoten beschrieben. Es ist also unklar, ob die Verzerrungen bei Überdosierung durch eine hohe Anreicherung nur im Lymphknoten oder möglicherweise auch im umliegenden Gewebe zu erklären sind. Diese würde bedeuten, dass das Eisen auch interstitiell perinodal abgelagert und nicht ausschließlich in den Lymphknoten transportiert wurde. Wir konnten Hinweise auf die Möglichkeit einer perinodalen Anreicherung von Resovist[®] in Level I (ARF I/ALF I) finden. In Abbildung 10 (Seite 43) zeigt sich, dass die mediane Konzentration von Resovist[®] im Gewebe im Zeitverlauf kontinuierlich abnimmt (1-, 3-, 4-Stundenwert). In Analogie zu der Beschreibung des SPIO-Abstroms aus den Lymphknoten bei Shiozawa et al. kann hier von einem wash out Phänomen[66] im perinodalen Fettgewebe ohne Nachstrom aus dem Injektionsgebiet gesprochen werden. Unklar ist, ob bei verlängerter Beobachtungszeit ein weiterer Influx von SPIONs in die Lymphknoten (ARL I/ALL I) messbar gewesen wäre. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der relativ hohen Eisenkonzentration im perinodalen Gewebe wäre analog zu den

Beobachtungen von Taupitz et al. [85], dass es zu einer Überdosierung von Resovist[®] gekommen ist.

Der mediane 2-Stundenwert der perinodalen Eisenkonzentration ist mit 47,4 µmol/l ein Ausreißer nach unten (Tabelle 12, Seite 42). Im Ergebnisteil zu den AAS Messungen von ARF I/ALF I wurde bereits eine Interpretation versucht (Kapitel 5.1.5, Seite 42 ff.). Bei diesem Messzeitpunkt war die Streuung der einzelnen Messwerte sehr breit. Mess- oder Verfahrensungenauigkeiten könnten die Werte ebenso erklären, wie eine zufällige Ungleichverteilung der Partikel im Situs. Im Vergleich zu den Proben ohne Resovist[®] (PG) konnten wir eine deutliche Mehranreicherung von Eisen im Gewebe, um die Lymphknoten messen. Über alle Zeiträume (1-4 Stunden) lag der Median der PG lag bei 28,3 µmol/l, wohingegen der Median der mit Resovist[®] behandelten Proben (RG) mit 112,1 µmol/l höher war (Tabelle 12, Seite 42). Aus dieser im perinodalen Fettgewebe gemessenen Differenz der Eisenkonzentrationen zwischen PG und RG schließen wir, dass das Resovist[®] auch interstitiell vom Brustdrüsengewebe zum Lymphknoten gelangt bzw. von Gewebsmakrophagen zu diesen transportiert wird.[40, 53] Der Abfall der Eisenmesswerte des perinodalen Fettgewebes in Level I (ARF I/ALF I) in der RG über die Zeit stützt diese Annahme.

6.1.4 Axilläre Lymphknoten Level I (ARL I/ALL I)

Bei der Untersuchung unserer Versuchstiere erwies sich der axilläre Lymphknoten aus Level I nach Injektion von Resovist[®] durch dessen braune farbliche Markierung zu 100% als der Sentinellymphknoten. Diese Beobachtung wurde durch die Injektion von Patentblau V[®] zur Markierung des SLN übereinstimmend verifiziert. Nach Applikation von Resovist[®] sind die Ergebnisse der AAS Messungen aus den axillären Lymphknoten Level I für die Fragestellung daher von besonderer Bedeutung. Die Messergebnisse sollen den Zeitraum determinieren, den der Tracer von der Injektionsstelle bis zu dessen Nachweis im SLN benötigt. Dadurch wird der Zeitpunkt festgelegt, an dem das Resovist[®] vor einer Operation für eine SLNB bei Mammakarzinom appliziert werden sollte, um den Sentinellymphknoten mit dem höchstmöglichen Signal zu markieren.

Unter Verwendung von Resovist[®] als Tracer zur Markierung des SLN zeigte sich in unserer Studie eine optimale Mindestlaufzeit von 4 Stunden nach Injektion. Die Betrachtung von Median und Mittelwert der Eisenkonzentration belegen diese Annahme, denn am 4 Stunden Messzeitpunkt steigt die Konzentration von Eisen

in den axillären Lymphknoten Level I (SLN) gegenüber allen vorherigen Messzeitpunkten an (Abbildung 9, Seite 41). In Bezug auf die optimale Laufzeit kommen Robe et al. in ihrer SLNB Studie unter Verwendung von Quantum Dots (QD, Nanopartikel von 16 nm Durchmesser) als Tracer und einer Laser-induzierten In vivo Fluoreszenzspektroskopie zur Detektion der QD zu abweichenden Ergebnissen: Sie fanden mit 5-60 Minuten deutlich kürzere Laufzeiten zur Markierung des SLN.[55] Die Gruppe verwendete ebenfalls ein murines Model. In Abweichung zu unserem Versuchsaufbau wurde der Tracer jedoch in die Vorderpfote appliziert. Der Abstand von kranialem Anteil der Milchleiste (eigene Untersuchung) ist kürzer als der vom distalen Ende der vorderen Extremität (Robe et al.). Dennoch konstatierte die Arbeitsgruppe um Robe et al. mit 60 Minuten eine deutlich kürzere optimale Laufzeit zur Markierung des SLN, als wir.[55] Sie räumen ein, dass die QDs sehr schnell in den Lymphknoten lokalisierbar sind und sich damit von anderen Tracern unterscheiden. Im Vergleich mit Resovist[®] haben die Carboxyl-ummantelten QDs einen deutlich geringeren Durchmesser (57 nm vs. 16 nm). Dies könnte die kürzere Migrationszeit erklären. Taupitz et al. injizierten Resovist[®] interdigital s.c. in die Hinterläufe von gesunden Hasen und maßen die Signalminderung im MRT in den poplitealen und den iliakalen Lymphknoten als Zeichen der Traceranreicherung.[85] Nach 6 Stunden zeigte sich eine erste signifikante und nach 12 Stunden die maximalen Signalminderung in beiden Lokalisationen. Die Arbeitsgruppe interpretierten die Lymphknotenstationen im Sinne von Sentinellymphknoten. Eine Laufzeit von mindestens 6 Stunden bis zur Kontrastierung der ersten Lymphknotenstation ist unter Beachtung, dass der Abstand von distalem Hinterlauf bis in die Poplitealregion (Kniekehle) beim Hase größer ist als der von kranialer Milchleiste bis in Axilla bei der Maus vergleichbar mit unseren Beobachtungen. Beim Menschen ist der Abstand zwischen einem Mammatumor und den axillären Lymphknoten – je nach Lokalisation des Tumors in Relation zur Axilla – auch weiter. In einem SLNB Versuch bei 102 Frauen mit tastbarem Mammakarzinom untersuchten Motomura et al. die Eigenschaften von Resovist[®] als Tracer zur Bildgebung von axillären Lymphknoten im MRT.[86] Die Frauen hatten eine klinisch unauffällige Axilla, also palpatorisch und bildmorphologisch keinen Verdacht auf tumorbefallene Lymphknoten und durften weder an der Brust noch der Axilla voroperiert sein um einen ungestörten Lymphabfluss aus der Tumorregion zu gewährleisten. Der Tracer wurde

intradermal über dem Tumor und subareolär appliziert und die Axilla im MRT evaluiert. Dazu wurden innerhalb einer Laufzeit von 18-24 Stunden zwischen der Applikation der SPIONs und der MRT-Untersuchung (1,5 T) die Messungen wiederholt durchgeführt. Neben dieser SLN Markierung erhielten die Frauen auch eine intradermale Markierung mit Radionuklid- (^{99m}Tc), Jod-haltigem Kontrastmittel (Iopamiron 370; Bayer Schering Pharma, Osaka, Japan) und dem Farbstoff ICG. Die Detektion erfolgte mittels Gammakamera, CT-Lymphographie resp. visuell. Die Ergebnisse der SLNB nach Verwendung von Resoist[®] wurden mit denen der alternativ markierten SLN verglichen und in der Routine histologisch bestätigt. Es zeigte sich, dass unter dieser Laufzeit die Detektion von tumorbehafteten Sentinellymphknoten der Axilla mit einer hohen Sensitivität, Spezifität und Zuverlässigkeit gelang (84,0% (95% CI 64-95%), 90,9% (95% CI 82-96%), 89,2% (95% CI 82-94%)).[86] Im MRT wurden die Lymphknoten nach den von Harisinghani et al. publizierten Kriterien visuell beurteilt. Demnach wurden die Signalintensitäten der Lymphknoten in den MRT Aufnahmen vor und nach SPION Applikation verglichen. Ein Lymphknoten galt als nicht metastasiert, wenn er nach SPION Applikation ein homogenes Bild mit niedriger Signalintensität aufwies und als metastasiert, wenn der gesamte Lymphknoten oder Teile davon keine niedrige Signalintensität aufwies.[87] Eine Laufzeit von mindestens 18 Stunden ist nach diesen Daten beim Menschen eine ausreichende Dauer zur SPION geführten Detektion von SLNs.[86] Kürzere Zeiträume wurden in diesem Versuchsaufbau nicht untersucht, sodass keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob nicht kürzere Laufzeiten ebenfalls gute Ergebnisse erbracht hätten.

Ein inzwischen zur MRT Darstellung von Lymphknoten bekanntes Kontrastmittel ist das intravenös applizierte ultra-small SPION (USPION) Sinerem[®] (Ferumoxtran, mittlerer Durchmesser: 39 nm). Im Jahr 2000 untersuchte die Gruppe um Rety et al. dessen Ausbreitung in den lymphatischen Organen des Organismus in einem Rattenmodell.[80] Die Applikation von Sinerem[®] (mittlerer Durchmesser 39 nm) erfolgte in die Schwanzvene von 24 weiblichen Ratten. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1,5, 3, 6, 12 und 24 Stunden) wurden bei 18 dieser Ratten (je 3 Tiere pro Zeitpunkt zuzüglich 3 Tiere als Kontrolle) die Leber, die Milz und sämtliche Lymphknotenstationen, aufgeteilt in fünf Regionen (zöliakal, mesenterial, inguinofemoral, andere sub-diaphragmatische LKs (popliteal, iliosacral, lumbal, splenisch), supra-diaphragmatische LKs (mandibular, cervical

(superficial, profundal) axillär, thorakal, mediastinal)) entnommen und deren Eisengehalt mittels Relaxometrie im MR-Spektrometer (0,47 T) gemessen und anschließend mittels AAS verifiziert. Bei weiteren 6 Ratten erfolgte eine zytologische Untersuchung des Zellsediments der Lymphe an den gleichen Zeitpunkten. Die Lymphknoten der zöliakalen und der sub-diaphragmatischen Stationen nahmen am meisten Eisen auf und erreichten ein Plateau der Aufnahme nach 12 Stunden. Von diesen hatten die inguinalen LKs die geringste Aufnahme.[80] Der Tracer wurde in dieser Studie i.v. appliziert. Erst nach hämatogener Perfusion des Organismus gelangte dieser in die lymphatischen Organe und reichte sich dort durch Inkorporation in organbezogene Makrophagen in messrelevanten Konzentrationen an. Dieser Verteilungsprozess erklärt die späte Anreicherung des Tracers in den lymphatischen Organen in dieser Studie. Bei unserem Versuchsaufbau wurde Resovist® direkt lokal interstitiell in das Drüsengewebe der Milchleiste injiziert. Die Injektion erzeugt im Gewebe einen Druck, der das SPIONs in die lymphatischen Räume transportiert.[88] Von dort werden die SPIONs einerseits von Makrophagen aufgenommen und zum Lymphknoten transportiert.[40, 89, 90] Andererseits gelangen die SPIONs auch extrazellulär über die Lymphabflusswege zu den LKs und werden erst dort von Makrophagen aufgenommen.[26, 40, 53, 80, 91] Anhand unserer Untersuchung können wir keine Aussage darüber machen, ob bei 4 Stunden ein Plateau aufgetreten wäre, wie bei Rety et al. nach 12 Stunden.[80] Unsere Messreihe endete nach 4 Stunden mit dem maximal gemessenen Eisenwert in den axillären LKs des Level I (SLN). Die weitere Entwicklung der Eisenkonzentration über die Zeit könnte in einer Protokollerweiterung Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. In der hier vorgelegten Studie zeigte sich allerdings, dass bei einem Maximum der Eisenkonzentration im SLN nach 4 Stunden im AAS die Eisenkonzentration im umliegenden Gewebe wieder abnahm. Die Annahme, dass es sich hier tatsächlich um das absolute Maximum handelt wird durch die Beobachtung gestützt, dass im perinodalen Gewebe Level I die Eisenkonzentration nach 1 Stunde am höchsten war und dann wieder abfiel (Kapitel 5.1, Seite 33 ff.). Dies interpretieren wir als Abfluten der SPIONs, sodass für eine weitere Akkumulation derselben im SLN kein Material in der Umgebung mehr vorhanden wäre.

Die zuvor beschriebenen Unterschiede in den Verteilungs- und Anreicherungscharakteristika der Tracer könnten durch die unterschiedlichen Partikelgrößen von USPIO und SPIO begründet sein (Sinerem[®] = 39 nm vs. Resovist[®] = 57 nm und Sienna+[®] = 60 nm). Es wäre auch denkbar, dass der Unterschied der Partikelgröße zwischen ^{99m}Tc (8 nm), Quantum Dots (16 nm) und Resovist[®] zu Unterschieden in der SLN Detektion führen. Zur Verifikation dieser Annahme führten Pouw et al. eine Untersuchung in einem porcinen Modell an 18 Minipigs durch.[91] Hierbei wurden drei SPIONs zur SLNB miteinander verglichen: Feraheme[®]/Rienso[®] (Ferumoxytol, hydrodynamischer Durchmesser = 32 nm), Sienna+[®] (hydrodynamischer Durchmesser = 59 nm), Endorem[®]/Feridex[®] (Ferumoxide, hydrodynamischer Durchmesser = 111 nm). Die magnetischen Tracer wurden zur Applikation alle auf eine Eisenkonzentration von 11,2 mg Fe/ml homogenisiert. In die dritte Areola der inguinalen Milchdrüse von je 6 Schweinen wurde bilateral einer der drei Tracer injiziert. Zur transcutanen Detektion der Tracer wurde eine Magnetometer-Handsonde verwendet (SentiMag[®], Endomagnetics Ltd, UK). Da die Injektion caudal erfolgt, wurde eine Drainage der SPIONs in die Inguinalregion angenommen und diese mit der Handsonde epiutan zu folgenden Zeitpunkten nach Injektion abgesucht: 5, 10, 15, 30, 45, 60, 240 Minuten. Falls die Detektion transcutan nicht gelang, wurde die Haut blind inzidiert und die Inguinalregion mit der Magnetometer-Handsonde in vivo nach SLNs abgesucht. Nach Detektion des durch den Tracer markierten SLN erfolgte die bilaterale inguinale SLNB. Die Bestimmung des Tracergehalts der SLNs (Eisengehalt: Maghemit/Magnetit im LK) erfolgte mittels VSM (4,0 T). Die Messamplitude der SPION Sättigung wurde hierzu mit einer bekannten Kalibrationskurve der einzelnen Tracer verglichen. Die meisten SLNs wurden mit dem kleinsten SPION detektiert, gefolgt von Sienna+[®] und dem größten SPION (n = 35, 22, 20, p = 0,0099). Demgegenüber wurden in vivo die meisten Magnetometercounts durch Sienna+[®] erzeugt (SPION: 59 nm > 111 nm > 32 nm, p = 0,001). Dies scheint in Deckung mit dem jeweils ex vivo mittels VSM gemessenen mittleren Eisengehalt der SLNs zu sein: 265 µg (SD 206 µg), 179 µg (SD 159 µg), 106 µg (SD 70 µg), p = 0,0014. Es zeigt sich allerdings, dass die Sensitivität des Magnetometers (gemessene Counts bei gleichem Eisengehalt einer Probe) für die einzelnen SPIONs ebenfalls deutlich unterschieden. Für die einzelnen SPIONs waren die gemessenen Counts bei 59 nm 2,8-fach höher als 111 nm und bei 32 nm 1,3-fach höher als für 111 nm. Bei allen SPIONs gelang die

Detektion der ersten SLNs nach 10 Minuten. Unter Verwendung von Sienna+[®] waren alle SLNs nach 30 Minuten detektiert. Bei den beiden anderen SPIONs war der letzte SLN erst nach 240 Minuten detektiert. Am besten gelang demnach die SLN Detektion mit Sienna+[®], da das Magnetometer hier die höchste Sensitivität aufwies. Die signifikant höhere Anzahl entnommener SLNs beim kleinsten SPION wird von den Autoren als Durchlaufen der SPIONs in höher Lymphknotenlevel interpretiert.[91] Damit ist gemeint, dass die SPIONs nicht in den tatsächlichen SLNs kumulieren, sondern sich in nachgeordneten Lymphknoten anreichern. Durch die Entnahme dieser Lymphknoten wird die diagnostische Sicherheit nicht erhöht. Dies führt zu einer zu hohen Zahl entnommener Lymphknoten und hebt damit den angestrebten Effekt der Morbiditätssenkung durch die SLNB auf. Dieser Versuch zeigt deutlich, dass die Eigenschaften des verwendeten SPIONs und die Sensitivität des Messgerätes bei der Detektion von SLNs von besonderer Bedeutung sind. Der von uns verwendete SPION ist vergleichbar mit Sienna+[®]. Resovist[®] ist von etwa gleicher Größe und ebenfalls umhüllt von einer Carboxydextranhülle und kann sich somit gut in vivo verteilen.[85, 91] Die beiden hier vorgestellten Studien mit Resovist[®] an Hase und Mensch (Taupitz et al. und Motomura et al.) weisen ein Detektionsmaximum für den SLN von 12 resp. 24 Stunden auf, ein signifikanter erster Nachweis des SPIONs gelang Taupitz et al. im MRT beim Hasen bereits nach 6 Stunden.[85, 86] In beiden Studien wurde das interstitiell applizierte SPION mit dem MRT detektiert. Der deutliche Zeitunterschied für das Detektionsmaximum zwischen diesen Studien und im Vergleich zu unserem Ergebnis könnte durch die Spezies und die unterschiedliche Laufdistanz erklärt werden. Dabei wäre es nachvollziehbar, dass in unserem Mausmodell das ebenfalls interstitiell applizierte SPION bei der kürzesten Laufdistanz auch die kürzeste Laufzeit aufweist. Auffällig ist bei Pouw et al., dass die Verwendung von Sienna+[®] eine deutlich kürzere Detektionszeit von maximal nur 30 Minuten ergibt.[91] Die Injektion erfolgte hier beim Minipig ebenfalls interstitiell und in einer dem humanen Model vergleichbaren Laufstrecke vom Injektionsort hintere Milchdrüse zum Messort Leiste. Auch das SPION weist vergleichbare Eigenschaften auf (Sienna+[®] vs. Resovist[®]). Motomura et al. geben in ihrer Publikation eine Mindestlaufzeit von 18 Stunden im humanen Modell von Mamma zu Axilla an wohingegen die früheste Detektion bei Pouw et al. schon nach 30 Minuten gelang.[86, 91] Möglicherweise ist diese deutlich unterschiedliche Detektionszeit bei Pouw et al. durch die Verwendung einer

Magnetometer-Handsonde (SentiMag®) anstelle eines MRT als Detektionsinstrument zu erklären.

Schon vor Pouw et al. publizierten Shiozawa et al. 2013 eine SLNB Studie unter Verwendung einer anderen Magnetometer-Handsonde (Kyoushin, Tochigi, Japan).[66] Die Untersuchung wurde an 30 Patientinnen mit Mammakarzinom und klinisch negativen Lymphknoten durchgeführt. Bei 2 Tumoren handelte es sich um ein nicht invasives ductales Carcinoma in situ (DCIS). Dieser Tumor wird nach der aktuellen deutschen AWMF Leitlinie und den Empfehlungen der Organgruppe Mamma der AGO nur mit einer Lymphonodektomie operiert, wenn eine Mastektomie geplant ist (AGO Empfehlung '+').[10, 11] Daher sind die Aussagen der Autoren bzgl. onkologischem Vorgehen und zur SLNB nicht ganz auf deutsche Verhältnisse übertragbar. Da in der hier vorgelegten Arbeit der Schwerpunkt auf der Bestimmung des Verhaltens der SPIONs in Bezug auf mammäre Injektion und Laufwege bzw. Laufzeiten liegt, ist diese onkologisch-methodische Einschränkung nicht von Bedeutung. Im Rahmen der Studie von Shiozawa et al. erhielten alle Patientinnen zur Markierung der SLNs eine subareoläre Injektion von Resovist® und Patentblau V® in die betroffene Brust. Zu Beginn der Studie erfolgte die transdermale axilläre Detektion der SLNs mit der Magnetometer-Handsonde 20 Minuten nach Injektion der SPIONs. Es zeigte sich aber, dass in einigen Fällen das magnetische Signal schon innerhalb der Wartezeit von 20 Minuten schwächer wurde und dann oft nicht mehr messbar war. Die Autoren deuteten das als Abfließen der SPIONs aus den LKs ohne Nachstrom aus dem Injektionsgebiet (wash out Phänomen).[66] Daher wurde die Zeit bis zur SLN Detektion verkürzt, was zu einer besseren Detektionsrate führte. Es wurde während des Studienverlaufes ein neues Standardintervall von 5 Minuten etabliert. Die SLNs wurden entnommen und alle Patientinnen erhielten dann noch eine Axilladisektion. Bei 27 der 30 Patientinnen konnte durch die Kombination von beiden Markierungsmethoden mindestens ein SLN dargestellt werden (n = 1,6 SLN/Patientin). Für die einzelnen Markierungsverfahren ergaben sich folgende Erfolgsraten der SLN Detektion: 90% bei Kombination von Resovist® und Patentblau®, 77% bei alleiniger Verwendung von Resovist® und 80% bei alleiniger Verwendung Patentblau®.[66] In dieser Studie wurde mit 5 Minuten die kürzeste Laufzeit von Brust zu Axilla zur SLN Detektion als Standard postuliert. Das ist kürzer, als die Mindestlaufzeit von 10 Minuten mit Sienna+® beim Minipig.[91] Die

Verwendung unterschiedlicher Handsonden bei den beiden Versuchsaufbauten ist möglicherweise ein Einflussfaktor für diese Beobachtung.

Die gleiche Magnetometer-Handsonde wie Pouw et al.[91] verwendete die zentraleuropäische SentiMag[®] Studiengruppe.[20] In einer prospektiven und multizentrischen Studie ohne Randomisierung untersuchte diese Studiengruppe den Einsatz von Sienna+[®] mit einem Partikeldurchmesser von 60-nm bei der SLNB unter Verwendung der SentiMag[®] Magnetometer-Handsonde bei 150 Patientinnen mit Mammakarzinom. Die Patientinnen hatten eine klinisch unauffällige Axilla, also keinen präoperativen Nachweis befallener axillärer Lymphknoten bei der Palpation und der sonografischen Evaluation. Gegebenenfalls wurde zum Ausschluss von Lymphknotenmetastasen eine präoperative Feinnadelaspiration oder eine Stanze aus suspekten Lymphknoten entnommen. Da im Rahmen dieser Studie ebenfalls Patientinnen mit nicht invasivem Tumor (2,6% DCIS) eingeschlossen wurden, gelten die gleichen wie bei der weiter oben geführten Diskussion der Untersuchung von Shiozawa et al.[66] bereits erläuterten methodischen Einschränkungen. Alle Patientinnen erhielten im 1- oder 2-Tagesprotokoll – d.h. am Tag vor der Operation oder am Operationstag (>2 Stunden vor der Operation) – eine konventionelle SLN Markierung mit ^{99m}Tc durch peritumorale oder periareoläre Injektion des Tracers. Zusätzlich erhielten sie eine intraoperative subareoläre Injektion von Sienna+[®]. Die Detektion der SLN sollte 20 Minuten nach intraoperativer Injektion durch transcutane und in situ Detektion der SLN mittels Gamma-Handsonde und Magnetometer-Handsonde erfolgen und dann die SLNB. Die Untersuchung war als Nichtunterlegenheitsstudie in Bezug auf die Detektionsrate für das magnetische Verfahren angelegt. Dieses Studienziel konnte mit einer Detektionsrate pro Patientin von 97,3% für das Radionuklid vs. 98,0% für das SPION erreicht werden. Die mittlere Migrationszeit von Sienna+[®] wurde in Abhängigkeit vom operativen Prozedere angegeben: sie betrug 26±1 Minuten bei zuerst ausgeführter SLNB und 66±4 Minuten wenn die Chirurgie der Brust vor SLNB erfolgte. Die letzte SLN Entnahme erfolgte nach 160 Minuten. Ein höherer Body-Mass-Index erschwerte wegen der Gewebe-bedingten transcutanen Abschwächung des magnetischen Signals das Auffinden von SLNs mittels Magnetometer-Handsonde. Das Design der ebenfalls im Jahr 2014 publizierten multizentrischen Studie von Douek et al. war nahezu identisch zu der zuvor beschriebenen Studie.[26] Die Markierung der

SLNs von 160 Frauen mit Mammakarzinom und klinisch unauffälliger Axilla erfolgte auch hier mit Sienna+[®] und ^{99m}Tc. Zusätzlich konnte auch eine Markierung mit blauem Farbstoff erfolgen. Die Detektion der SLNs erfolgte mittels SentiMag[®] Magnetometer-Handsonde, Gamma-Handsonde resp. visuell wobei die Detektionsraten ebenfalls hoch waren (95,0 vs. 94,4%) und eine Nichtunterlegenheit des magnetischen Verfahrens gegenüber der Radionuklidmethode konstatiert wurde.[26] Rubio et al.[92] publizierten ein Jahr später eine weitere Studie in gleichem Design: 120 Frauen mit Mammakarzinom, klinisch unauffällige Axilla, Verwendung von SPIONs subareolär im Vergleich mit ^{99m}Tc zur SLNB. Die Detektionsraten für SPIONs vs. ^{99m}Tc waren 98,3% resp. 95,5% woraufhin auch hier eine Nichtunterlegenheit für die Verwendung von SPIONs und eine onkologische Sicherheit des Verfahrens konstatiert wurde.[92]

In mehreren Studien zur Zuverlässigkeit und Machbarkeit wurden vor und nach der Publikation der letztgenannten Studien die Methode der magnetischen SLN Detektion nach Applikation von SPIONs untersucht.[93-96] Sie kamen alle zu dem Ergebnis, dass die Methode anwendbar und sicher sei. Besonders interessant ist, dass auch später noch weitere Studien zur Eindringtiefe von Magnetometern unter Verwendung von Sienna+[®] durchgeführt wurden.[28, 96] Diese Nachuntersuchungen schienen trotz der bereits am Menschen durchgeführten Versuche zur Absicherung der Methode in der Absicht einen neuen Standard für die SLNB zu etablieren erforderlich zu sein.

Die zentraleuropäische SentiMag[®] Studiengruppe schlussfolgerte schon vor diesen Publikationen aus ihren eigenen Ergebnissen auch unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Douek et al.[26], dass ihre Methode das Potential habe, der neue Standard zur SLNB werden zu können.[20] Präklinische Studien, wie die hier vorgelegte sollten einer klinischen Evaluation vorgeschaltet werden, um einen Standard zu definieren. Diese ist die einzige publizierte ihrer Art zur Verwendung eines SPIONs zur SLNB unter Verwendung der Magnetpartikelspektrometrie MPS in Vorbereitung weiterer Untersuchungen mit dem Magnetic Particle Imaging MPI. Die IMAGINE Studie von Pinero-Madrona et al. wurde im Jahr 2015 publiziert.[97] Sie ist ebenfalls als Nichtunterlegenheitsstudie für die SLNB mit Sienna+[®] und dem SentiMag[®] vs. ^{99m}Tc und Gamma-Handsonde beim Mammakarzinom im humanen Model angelegt und ergab bei 180 Patientinnen wiederum eine Nichtunterlegenheit des magnetischen Verfahrens mit einer transcutanen

Detektionsrate von 97,2% vs. 95,5% und einer intraoperativen Detektionsrate von 97,8% vs. 97,2% und einer Konkordanzrate von >97%. [97] Eine im gleichen Jahr von Ghilli et al. publizierte prospektive, multizentrische Studie an 193 Frauen mit Mammakarzinom und klinisch unauffälliger Axilla zur Nichtunterlegenheit des magnetischen vs. Radionuklid-basierten Verfahrens (Sienna+[®]/SentiMag[®] vs. ^{99m}Tc) kommt zum gleichen Ergebnis: Detektionsrate 97,9% vs. 99,0% bei einer Konkordanzrate von 97,9%. [98] Eine Eisenmessung oder eine Laufzeitbestimmung wurden auch bei diesen beiden Studien nicht durchgeführt. Wie bei den anderen genannten Studien handelt sich vom Charakter her auch hier eher um eine Anwendungsbeobachtung. Ghilli et al. schlussfolgern im Gegensatz zur zentraleuropäische SentiMag[®] Studiengruppe nicht, dass sich der Standard der SLNB Technik durch das magnetische Verfahrens ändern könnte, sondern dass die Radionuklid-basierte SLNB Technik weiterhin den Standard darstellt. [20, 98]

Die Ergebnisse der Studiengruppen zur Verwendung von SPIONs und Magnetometern bei der SLNB [20-23, 26, 92, 97] und auch die Metaanalyse von Zada et al. [72] führten bislang nicht zu einer positiven Bewertung bzw. Empfehlung für den Einsatz von SPIONs zur intraoperativen Routinediagnostik des SLN in der aktuellen deutschen AWMF Leitlinie. [10] Die Organgruppe Mamma der AGO vergibt derzeit für die Verwendung von SPIONs nur eine ‚±‘ Empfehlung. [11] Dies bedeutet, dass in der Anwendung von SPIONs, insbesondere unter Einsatz eines Magnetometers kein Vorteil für die Patientinnen gesehen wird. Die SLN Diagnostik mittels ^{99m}Tc wird dagegen mit einer ‚++‘ Empfehlung ohne Einschränkung empfohlen und soll wegen ihres hohen Benefits für die Patientin angewendet werden. [11]

Aufgrund der Ergebnisse unserer grundlegenden Arbeit ist von einer Resovist[®]- Laufzeit von 4 Stunden zur Erreichung eines Konzentrationsmaximums der SPIONs im SLN der Axilla bei der Maus auszugehen. Möglicherweise reicht schon eine geringere Konzentration der SPIONs im Lymphknoten, um mittels MPI in der Axilla als SLN detektiert werden zu können. Dann wäre eine kürzere Laufzeit für die SLNB denkbar. Unsere Untersuchungen lassen nicht den Schluss zu, dass längere Laufzeiten z.B. von 12 Stunden oder mehr vielleicht noch bessere Ergebnisse in Bezug auf die SLN-Identifikation erbringen könnten. Da Tumortragende Lymphknoten wegen ihres möglicherweise geringeren

Makrophagenbesatzes und deren veränderter Verteilung im Lymphknoten ein anderes Verteilungsmuster der SPIONs aufweisen[85], könnte dies auch Auswirkungen auf die Detektion von SPIONs im MPI haben. Demgegenüber wird von Motomura et al. sogar vorgeschlagen, dass Lymphknoten, die nach Applikation von SPIONs im MRT unauffällig erscheinen als Tumor-frei angesehen werden sollten.[86] Möglicherweise trifft das auch auf die Diagnostik mittels MPI zu und die Morbidität der Axilla könnte durch Verzicht auf eine SLNB bis zu ihrer vollständigen Vermeidung weiter abgesenkt und sogar vermieden werden. Weitere Untersuchungen müssen diese offenen Fragen klären.

6.1.5 Axilläre Lymphknoten und umgebendes Gewebe Level II (ARL II/ALL II sowie ARF II/ALF II)

Bei der Sektion der Mäuse unserer Studie zeigte sich die Drainage der Lymphe aus der Milchleiste in die Axilla über zwei Level. Diese Level-Differenzierung wird in der Literatur im Allgemeinen bei der Maus nicht getroffen.[56, 59] Wir konnten die beiden Lymphknotenstationen jedoch eindeutig über die Verteilung von Patentblau V[®] und Resovist[®] von der Injektionsstelle der kranialen Milchleiste zum axillären Gewebe visualisieren. Eine differenzierte Betrachtung des axillären Gewebes ist für die Beurteilung der in vivo Verteilung der SPIONs wichtig, insbesondere da beim Mammakarzinom die lymphogene Ausbreitung des Tumors über die einzelnen Lymphknotenstationen der Axilla erfolgt. Morphologisch erwies sich demnach bei unseren Mäusen eine zweite Lymphknotenstation (Level II) hinter dem axillären Lymphknotenlevel I. Eine genauere Betrachtung des lymphatischen Systems erfolgte auch durch andere Autoren, die bei ihren Arbeiten wegen der systemischen Beurteilung dieses jedoch allgemeiner beschrieben und daher keine Levelteilung der Axilla vornahmen.[57, 58] Beim Menschen erfolgt die Einteilung der Lymphknotenlevel morphologisch deskriptiv, um das Level der Lymphknotenentnahme anatomisch zu beschreiben (Tabelle 1, Seite 7). In gleicher Funktion haben wir die Levelteilung in unserer Arbeit für die Lymphstationen der Maus übernommen und ein Level I und II definiert.

Eine zusätzliche Betrachtung des Level II als Einheit von Lymphknoten und perinodalem Gewebe ist von Interesse, um die Frage zu klären, ob der Tracer direkt vom Level I zum Level II fortgeleitet wird oder vom Sentinellymphknoten des Level I aufgenommen und in diesem Level zurückgehalten wird. Die in den Kapiteln zu den Entnahmeregionen ARL II/ALL II (Kapitel 5.1.6, Seite 44 f.) und

ARF II/ALF II (Kapitel 5.2, Seite 47 ff.) dargestellten Ergebnisse der AAS Messungen für die RG Mäuse zeigen Werte, die nur gering höher sind als die Eisenkonzentrationen in den Leerproben (PG und CRL/CLL bzw. CRF/CLF, Abbildung 5, Seite 34). Die RG Proben von ARL II/ALL II weisen eine diskrete Steigerung der Anreicherung von Eisen über die Zeit auf (1-Stundenwert: 34,0 $\mu\text{mol/l}$, 4-Stundenwert: 39,9 $\mu\text{mol/l}$). Dies könnte dafür sprechen, dass der Tracer mit der Zeit über die Lymphbahn zu den nachfolgenden Lymphstationen weiter transportiert wird. Die gemessenen Eisenkonzentrationen des die Lymphknoten des Level II umgebenden Fettgewebes sind nur geringfügig höher als die der Leerproben. Auch im Gewebe von ARF II/ALF II ist eine Steigerung der Eisenkonzentration über die Zeit messbar (1-Stundenwert: 28,7 $\mu\text{mol/l}$, 4-Stundenwert: 44,2 $\mu\text{mol/l}$). Der 4-Stundenwert liegt in ARF II/ALF II dann sogar etwas höher als der von ARL II/ALL II. Das scheint die Vermutung einer Migration der SPIOs im Gewebe von Level I zu Level II zu stützen. Gleichzeitig nimmt die mediane Eisenkonzentration im perinodalen Fettgewebe von Level I (ARF I/ALF I) ab (1-Stundenwert: 146,2 $\mu\text{mol/l}$, 4-Stundenwert: 118,8 $\mu\text{mol/l}$), was diese Annahme ebenfalls unterstützt. Allerdings sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant und damit nicht beweisend, sondern nur hinweisend für unsere Vermutung.

Die in unserem Versuch gezeigte Eignung des Tracers Resovist[®] zur Markierung des Sentinellymphknotens und dessen stabile Anreicherung im Sentinellymphknoten erlaubt dessen eindeutige Identifizierung und Minimierung der Wahrscheinlichkeit einer falsch-positiven Markierungen.

6.2 MPS-Ergebnisse

Die MPS Messungen aller Mäuse der PG, die entsprechend kein Resovist[®] erhielten waren erwartungsgemäß negativ. Bei den Mäusen der RG erwarteten wir bei der Messung des Gewebes aus den Leisten (CRL/CLL und CRF/CLF) wegen der bevorzugten Drainage der Lymphe aus der cranialen Milchleiste in die Axilla nur wenige MPS-positive Fälle. Entsprechend haben wir nur bei 8 Proben im MPS ein positives Ergebnis gemessen (Seite 51 ff.). Dabei zeigte sich eine Dynamik über die Zeit mit einem Maximum bei 3 Stunden: 1-Stundenwert: n = 0/40 (Tabelle 15), 2-Stundenwert: n = 2/40 (Tabelle 16), 3-Stundenwert: n = 6/48 (Tabelle 17), 4-Stundenwert: n = 0/48 (Tabelle 18). Die diesen Ergebnissen entsprechenden AAS-Messwerte aus der Leiste liegen im Median zwischen 0-38,3 $\mu\text{mol/l}$, (Tabelle

8 und Tabelle 9, Seite 37). Damit liegen die Werte unterhalb des Schwellenwertes, weshalb die als negativ für den Nachweis von Resovist[®] zu werten sind (Kapitel 5.3, Seite 51). Dass dennoch MPS-positive Proben vorliegen ist leicht durch die Maximalwerte bis 151,7 µmol/l bei der AAS Messung zu erklären. Die Streuung könnte an der inhomogenen Partikelverteilung und deren Eigenschaften im Resovist[®] mit wechselndem MPS-Verhalten liegen.[45] Eine weitere Erklärung für die Differenz könnte eine Veränderung des magnetischen Verhaltens von magnetischen Nanopartikeln nach Aufnahme in Zellen, wie beispielsweise Makrophagen sein. Poller et al. konnten dieses Verhalten bei VSOPs (very small superparamagnetic iron oxide particles) in einem Zellkulturversuch nachweisen. Hier wurde die Eisenkonzentration in definierten Probenvolumina mittels MPS gemessen und mit der applizierten Eisenmenge abgeglichen. Es zeigten sich nach Vergleich der Messwerte zu hohe Eisenkonzentrationen im MPS.[99] Teeman et al. berichteten demgegenüber von einem 20%igen Abfall der magnetischen Performance von SPIONs im MPS nach deren Internalisierung in Zellen.[100] Dies würde wohl eher für eine geringere Rate MPS-positiver Befunde in unserem Probenkollektiv sprechen, vorausgesetzt die Partikel würden überwiegend internalisiert.

Die qualitative Messung unserer RG Proben zeigte bereits nach 1 Stunde Laufzeit der SPIONs den Nachweis des Tracers in ARL I/ALL I und ARF I/ALF I. Der Nachweis von Resovist[®] kann im entnommenen Gewebe konstant bis zum 4-Stundenwert geführt werden. Dabei zeigt sich ein leichtes Maximum an positiv gemessenen Lymphknoten von 12/20 beim 2-Stundenwert (Abbildung 15, Seite 49). Wie bereits ausgeführt ist eine quantitative Bestimmung des Tracers im MPS nicht möglich (Kapitel 4.4.2, Seite 27 ff.). Eine wichtige Einschränkung ist hierbei, dass die für das MPS signalgebende Partikelfraktion nur 3-30% im Resovist[®] entspricht.[29, 65] Darüber hinaus ist es für eine Quantifizierung des SPION Gehaltes erforderlich, dass die Probenvolumina für die MPS Messung gleich sind. Diese Bedingung konnten wir nicht erfüllen, da wir der Biologie der Partikelverteilung in vivo im Gewebe diese Gewebe vollständig entnehmen und messen mussten. Aus diesem Grunde haben wir zur Quantifizierung des Eisengehaltes in den Geweben das AAS eingesetzt. Da nur ein Teil der Partikel im Resovist[®] im MPS signalgebend, aber der gesamte Eisengehalt der SPIONs im Resovist[®] im AAS gemessen werden konnte, entspricht das MPS Signal nicht

einem Cut-off Wert der Eisenkonzentration. Es besteht also nur eine relationale Beziehung der Messergebnisse der beiden Verfahren zueinander.

Betrachtet man die Rate der positiven MPS Messungen am 1-Stundenwert die mit jeweils 50% in den Geweben aus ARL I/ALL I und ARF I/ALF I am höchsten ist, könnte es durchaus sein, dass schon vorher ein positives Signal im MPS messbar gewesen wäre (Abbildung 15, Seite 49). Diese Vermutung wird durch die beiden nach 1 Stunde in den anatomisch nachgeordneten Gewebeproben aus ARF II/ALF II MPS-positiven Messungen unterstützt. Nur die beiden Gewebefractionen ARL I/ALL I und ARF I/ALF I sind auch nach 4 Stunden noch zu ca. 50% positiv. Alle anderen Messwerte fallen zu diesem Zeitpunkt bereits relevant ab. Es ist daher zu vermuten, dass die Positivmessungen nach 4 Stunden auch in ARL I/ALL I und ARF I/ALF I seltener werden würden. Aufgrund des Versuchsaufbaus der hier vorgelegten Arbeit können wir hierzu keine Aussage treffen. Für eine klinische Anwendung wäre eine kurze SPION Laufzeit wünschenswert, da hierdurch der präoperative Vorlauf im Vergleich zur SLN Markierung mittels Radionuklid verringert werden könnte.

Zur Bestimmung von SLNs muss bei diesen unter Verwendung von Radionukliden mindestens 10% der radioaktiven Ausgangsstrahlung messbar sein.[5, 8] Eine quantitative Messung der SPIONs im Gewebe wäre daher für die SLNB hilfreich. Es würden dann nur die Lymphknoten mit den höchsten MPS bzw. MPI Signalen als SLNs entnommen. Eine solche quantitative Bestimmung von magnetischen Nanopartikeln wurde von Löwa et al. versucht.[101] Die Gruppe inkubierte hierzu in einem in vitro Versuch non-adhärenente THP-1 Zellen (human acute monocytotic leukemia cells) mit den beiden magnetischen Nanopartikeln VSOP und Resovist®. Nach einer Inkubationszeit von 0-24 Stunden wurden die Zellen in einem kommerziellen MPS (Bruker BioSpin, Deutschland) gemessen. In einem in allen Messungen konstanten Probenvolumen (50 µl) gelang es ihnen, die jeweilige Menge an Nanopartikeln anhand der 3. Harmonischen im Abgleich zu einer Referenzquelle mit einer bekannten Eisenmenge zu bestimmen. Gleichzeitig stellten sie heraus, dass das MPS in der Lage sei, die magnetischen Nanopartikel zu erkennen, ohne von Eisenverunreinigungen in den Proben oder körpereigenem Eisen beeinflusst zu werden.[101] Für unseren in vivo Ansatz, ist das MPS zur Messung also besonders geeignet, da unsere Proben unvermeidbar körpereigenes Eisen enthielten. Es ist jedoch offensichtlich, dass ein definiertes

Probenvolumen die Voraussetzung für die Quantifizierung durch Abgleich mit einer Referenzquelle in diesem Versuchsaufbau war und dass wir diese aufgrund der Fragestellung in unserem Versuchsaufbau nicht umsetzen konnten.

6.3 Vergleich von AAS-Daten mit MPS-Daten

Die hier vorgelegte Arbeit zur Entwicklung der SPION basierten SLNB unter Verwendung zunächst des MPS und später des MPI ist ein Beitrag zur Erreichung des Ziels, die bisher bestehenden SLNB Verfahren der Radionuklid- und Farbstoff-Markierung zu ersetzen.[8, 48, 102] Wir gehen davon aus, dass damit das Potential einer weiteren relevanten Morbiditätssenkung z.B. beim Mammakarzinom verbunden ist (Kapitel 3.1, Seite 16). Die Invasivität könnte insbesondere unter Verwendung einer MPI-Handsonde [30, 50] reduziert werden oder möglicherweise auf die Anwendung invasiver bzw. operativer Verfahren ganz verzichtet werden (Kapitel 2.5, Seite 12).

Vorarbeiten zur Evaluation des MPS mit der Intention der Überführung eines Versuchsaufbaus mit SPIONs in die Anwendung von MPI sind bislang nicht publiziert. Mit den Ergebnissen aus unseren MPS und AAS Messungen, konnten wir eine Schwellenwert-Konzentration für eine positive MPS Messung bestimmen. Für ein positives MPS-Messergebnis muss in einem Probenvolumen von 10 µl demnach $\geq 106,8$ µmol/l Eisen resp. Resovist[®] enthalten sein (p-Wert $< 0,0001$; Kapitel 6.3 Seite 77 ff.). Mit der Bestimmung der Schwellenwert-Konzentration ist ein wichtiges Ziel der Arbeit erreicht worden, denn wir konnten so evaluieren wie sicher das MPS in einer Probe die SPIONs in Relation zum AAS Eisen misst und so die Eignung des MPS zur Detektion von SLNs nach SPION Applikation belegen. Bei gleichem technischem Prinzip lässt sich diese Aussage auf das MPI übertragen[60] und daher auch mit dem MPI der SLN für die SLNB auffinden (Kapitel 2.5, Seite 12 ff. und Kapitel 4.4, Seite 25 ff.). Die hier vorgelegte Arbeit ist in sich abgeschlossen, aber auch als Vorarbeit für weitere Studien am MPI zu verstehen, deren Planung u.a. Versuche im humanen Model vorsieht.

Die Sensitivität unserer Schwellenwert-Konzentration liegt nach Kontingenztafel bei 0,766 und die Spezifität bei 0,946 (Tabelle 20, Seite 53). Ein idealer Test hat mit jeweils $> 0,9$ eine hohe Sensitivität und gleichzeitig eine hohe Spezifität. In der Realität wird meistens zur Optimierung der Sensitivität jedoch eine Absenkung der Spezifität in Kauf genommen und vice versa. Wenn man eine höhere Sensitivität

(durch Absenkung des Schwellenwertes) erreichen möchte, so dass möglichst alle richtig-positiven Ergebnisse erfasst werden, geschieht das in der Regel auf Kosten der Spezifität. Es kommt zu mehr falsch-positiven Ergebnissen. Aus diesem Grund werden bei der ROC-Kurven Analyse zur Wahl einer geeigneten Schwellenwert-Konzentration diese beiden Werte miteinander addiert. Beim höchsten Wert erhält man gleichzeitig das bestmögliche Ergebnis resp. die bestmöglichen Werte für Sensitivität und Spezifität. Der hier durchgeführte Vergleich zeigt, dass bei einem negativen MPS-Ergebnis sehr gut nachgewiesen werden kann, dass $<107 \mu\text{mol/l}$ Eisen in der Probe enthalten ist. Die Rate an richtig-negativen Ergebnissen ist also sehr gut.

Etwa ein Viertel der Proben mit einem Eisengehalt von $>107 \mu\text{mol/l}$ wurde im MPS nicht als positiv (also als "falsch-negativ") erkannt. Das könnte daran liegen, dass es unklar ist wie hoch der signalgebende Anteil an SPIONs im Resovist[®] selbst[29, 65] und damit in diese Proben bei gleichzeitiger Kenntnis des Eisengehaltes letztendlich ist. Der im MPS signalgebende SPION Gehalt könnte leicht unter der Messschwelle des MPS liegen. Der Eisengehalt der Proben wird neben den injizierten SPIONs durch körpereigenes Eisen z.B. aus Blut und Muskulatur (Hämoglobin, Myoglobin) beeinflusst. Es kann im AAS gemessen werden, gibt im MPS aber kein Signal.[101] Es ist daher möglich, dass körpereigenes Eisen kein MPS Signal erzeugt hat, jedoch im AAS mit einem höheren Wert gemessen wurde und diese damit falsch-negativ waren. Allerdings sind diese körpereigenen Eisenmengen an den Entnahmestellen sehr gering und sollten keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben. Dennoch könnte der Eisengehalt der falsch-negativen Proben so erhöht worden sein. Für diese These spricht, dass bei 10 der 126 Proben der PG Mäuse (kein Resovist[®]) mit dem AAS auch Eisenwerte z.T. deutlich über $107 \mu\text{mol/l}$ gemessen wurden (Tabellen auf Seite 35 ff.). Der Median der Eisenkonzentration überschreitet die Schwellenwert-Konzentration jedoch nur in den Proben aus BRB/BLB mit $110,2 \mu\text{mol/l}$ bei einem Maximalwert von $254,9 \mu\text{mol/l}$ (Tabelle 10, Seite 38,) . Im MPS ergaben die 10 Proben ein negatives Messergebnis. Das ist nachvollziehbar, da das MPS ausschließlich die Magnetisierungsänderung der SPIONs, nicht aber natürliches Eisen misst.[60] Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass das AAS den tatsächlichen Eisengehalt inklusive Resovist[®] zwar richtig einschätzt, der Anteil signalgebender SPIONs in den Proben jedoch geringer ist.[80] Diese

Einschätzung lässt sich auch durch die Ergebnisse, der Messungen einer Resovist[®]-Standardlösung belegen (Tabelle 6, Seite 30). Hierbei zeigt sich, dass das AAS die Eisenkonzentration der verdünnten Resovist[®]-Lösung (2,4,6 und 8 µmol/l Fe) mit kleinen Abweichungen richtig misst.

Das MPS zeigt sich als geeignetes Mittel, um auch kleine Mengen Resovist[®] zu detektieren. Dies war vorher auch schon von anderen Arbeitsgruppen postuliert worden.[60, 91, 101, 103] In unserer Arbeit konnte dies nicht nur bestätigt werden, sondern es konnte auch die Schwellenwert-Konzentration zur Differenzierung für MPS-positiv und -negativ bei Mäusen bestimmt werden. Allerdings entspricht Resovist[®] aus den genannten Gründen als Tracer für die vorgesehene Untersuchungsmethode nicht den Idealvorstellungen für ein SPION. Daher wird in einigen Arbeitsgruppen an neuen, für das MPI besser geeigneten Tracern geforscht.[45, 62, 104] Es ist also zu erwarten, dass zukünftig geeignetere Tracer sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität deutlich erhöhen werden.

6.4 Histologie

Der in Abbildung 17 (Seite 55) beispielhaft gezeigte Lymphknoten aus Level I der mit Resovist[®] behandelten Mäuse weist deutlich erkennbar das durch eine Eisen-spezifische Preußisch-Blau Färbung sichtbar gemachte Eisen nach Anreicherung in der Kortex- und der Hilusregion auf.[54] USPIONs zeigen eine ähnliche Verteilung von im Lymphknoten der Ratte nach i.v. Gabe von Sinerem[®] (mittlerer Durchmesser: 39 nm).[80] Nach interstitieller Injektion von Resovist[®] in den distalen Hinterlauf beim Hasen beschreiben Taupitz et al. nach 12 Stunden eine Eisenanreicherung bevorzugt in den medullären Sinus der poplitealen Lymphknoten.[85] Nach Erhöhung SPION Dosis fanden sie diese auch in den Makrophagen der marginalen, intermediären und medullären Zone der Lymphknoten. Insgesamt unterstützen unsere eigenen hier vorgelegten und die diskutierten Ergebnisse weiterer Arbeitsgruppen, dass Resovist[®] zur Markierung von Lymphknoten geeignet ist. Das SPION wird erst in die nächstgelegenen Lymphknoten transportiert und dort von Makrophagen aufgenommen.[26, 40, 53, 105]

7 Ausblick

Die Auswertung der mit dem AAS in unserem Modell an der gesunden Maus gewonnenen Ergebnisse zeigt, dass Eisen aus Resovist[®] schon nach 1 Stunde im SLN nachweisbar ist. Die maximale Konzentration ist dort nach 4 Stunden erreicht. Das umliegende Gewebe weist zu diesem Zeitpunkt bereits in ein wash out Phänomen auf, eine weitere Erhöhung der Eisenkonzentration nach 4 Stunden erscheint im SLN daher nicht wahrscheinlich. Dennoch steigt zu diesem Zeitpunkt die mediane Eisenkonzentration im axillären Lymphknoten Level I über die Schwellenwert-Konzentration von 107 $\mu\text{mol/l}$ an. Ähnliche Ergebnisse beschreiben auch andere Arbeitsgruppen bei ihren Versuchen mit Nanopartikeln zur Lymphknotenmarkierung.[80, 85, 86] Das MPS (0-dimensionales MPI) erwies sich als ein geeignetes Verfahren, um Resovist[®] markierte Lymphknoten zu detektieren. MPS-positive Proben waren bereits nach 1 Stunde Laufzeit nachweisbar. Weitere Versuche im Tumor-Mausmodell werden zeigen, ob eine SLN Detektion bei befallenen Lymphknoten nach interstitieller Injektion von SPIONs mit dem MPS resp. MPI ebenfalls erfolgreich sein kann. Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass dies mit anderen magnetischen Detektionsverfahren und SPIONs erfolgreich gelingt.[20, 22, 26, 38, 66, 85, 91, 92, 97, 98] Wenn es auch bei Tumor-befallenem SLN möglich ist, mit dem MPS resp. MPI diesen zu detektieren könnte eine neu entwickelte MPI-Handsonde zur SLNB im Operationssaal eingesetzt werden oder außerhalb desselben dazu beitragen, dass es nicht zu einer Operation kommen muss. Außerdem wäre die Verbesserung der Eigenschaften der SPIONs speziell für unsere Fragestellung wünschenswert. Derzeit ist der Anteil der magnetischen Partikel im Resovist[®], die zu einem MPI Signal beitragen nicht stabil bzw. ausreichend hoch. [29, 65] Die Entwicklung von Verfahren für verbesserte Tracer mit homogener Partikelgröße und möglicherweise geringerem Eisengehalt bei besserer Darstellbarkeit wäre sinnvoll.[43]

8 Zusammenfassung

Beim Mammakarzinom handelt es sich um den häufigsten bösartigen Tumor der Frau. Etwa jede 8.-10. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens daran. Die Sentinellymphonodektomie (SLNB) mit Sicherung des oder der Sentinellymphknoten (SLN) stellte einen wichtigen Schritt zur Diagnostik und Therapie von Lymphknotenmetastasen dar. Der aktuelle Goldstandard und die Empfehlung der Organgruppe Mamma der AGO zum Auffinden der SLNs ist die Markierung mittels ^{99m}Tc 12-24 Stunden vor dem operativen Eingriff. Die Markierung mittels ^{99m}Tc hat jedoch auch nicht zu vernachlässigende Nachteile, wie die Strahlenbelastung von Patientin und Personal, die schwierige Beschaffbarkeit und der streng kontrollierte Umgang.

Aus diesem Grund wird an verschiedenen, anderen Möglichkeiten der Sentinellymphknotenmarkierung, wie z.B. dem Magnetic Particle Imaging (MPI), dem SentiMag[®] und der SLN-Darstellung mittel Indocyaningrün (ICG) geforscht.

Das MPI kann superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPIONs) in Echtzeit in einem Körper nachweisen. Zur Überprüfung seiner Eignung erfolgte ein Grundlagenversuch am murinen Modell unter der Verwendung von Resovist[®] (SPION) als Tracer. Es sollte durch semiquantitativen Vergleich zwischen der Untersuchung mittels Magnetpartikelspektrometer (MPS) sowie dem Atomabsorptionsspektrometer (AAS) eine grundsätzliche Eignung des Verfahrens zur SLN-Detektion nachgewiesen werden sowie ein Schwellenwert des MPS zum Nachweis von Resovist[®] im Gewebe ermittelt werden.

Eine definierte Menge Resovist[®] wurde den Mäusen in die vordere Milchleiste gespritzt und diese wurden nach 1, 2, 3 und 4 Stunden sakrifiziert. Daraufhin erfolgte die Entnahme der axillären Lymphknoten, des umgebenden Gewebes, der Einspritzstelle in der Milchleiste sowie der inguinalen Lymphknoten und dessen umgebenden Fettgewebes. Diese wurden zunächst mit dem MPS untersucht, im Weiteren erfolgte entweder die histologische Untersuchung des Gewebes oder die Homogenisierung zur Messung des Eisengehalts mittels AAS.

Histologisch ließ sich Resovist[®] in den untersuchten Lymphknoten in der Kortex- und Hilusregion nachweisen. Mittels AAS ließ sich eine Zunahme der Eisenkonzentration im ersten axillären Lymphknoten über die Zeit nachweisen.

Mittels MPS ließen sich die Proben des Brustdrüsengewebes, welche die größte Menge an Resovist[®] enthielten zu 97,7% als positiv (Resovist[®]-enthaltend) werten. Bei den Proben der Axilla kam es zu gemischten Ergebnissen. Der Schwellenwert, welche Konzentration von Eisen im AAS mit einem positiven Ausschlag im MPS einhergeht lag nach Berechnungen mittels ROC-Kurve bei $\geq 106,8 \mu\text{mol/l}$. Der p-Wert betrug hierbei $< 0,0001$. Die Sensitivität lag bei 0,766 und die Spezifität bei 0,946.

Im murinen Modell zeigt sich Resovist[®] als geeigneter Tracer zur Auffindung des SLN nach Injektion in die Milchdrüse. Ein Nachweis der SPIONs gelingt mittels MPS in den Lymphknoten der Axilla bereits nach 1 Stunde Laufzeit. Auch der Eisengehalt ist zu diesem Zeitpunkt im AAS bereits erhöht messbar. Im Semiquantitativen Vergleich von AAS mit dem MPS zeigt sich, dass das MPS ein valides Messinstrument zum Nachweis von Resovist[®] ist.

9 Literatur

1. Youlden, D., et al., *The descriptive epidemiology of female breast cancer: An international comparison of screening, incidence, survival and mortality*. Cancer Epidemiology, 2012. **36**: p. 237 - 48.
2. Veronesi, U., et al., *Breast Cancer*. The Lancet, 2005. **365**: p. 1727 - 41.
3. Robert-Koch-Institut and GEKID, eds. *Krebs in Deutschland 2013/2014*. 11. ed. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes, ed. ZKD, GEKID, and RKI. Vol. 11. 2017, Ruksaldruck, Berlin: Berlin. 153.
4. Janni, W., et al., *Sentinel Node Biopsy and Axillary Dissection in Breast Cancer*. Deutsches Ärzteblatt International, 2014. **111**(14): p. 244 - 9.
5. Roaten, J.B., et al., *Identifying risk factors for complications following sentinel lymph node biopsy for melanoma*. Arch Surg, 2005. **140**(1): p. 85-89.
6. Khatcheressian, J.L., et al., *American Society of Clinical Oncology 2006 update of the breast cancer follow-up and management guidelines in the adjuvant setting*. J Clin Oncol, 2006. **24**(31): p. 5091-7.
7. Berg, J.W., *The significance of axillary node levels in the study of breast carcinoma*. Cancer, 1955. **8**(4): p. 776-8.
8. Motomura, K., *Sentinel node biopsy for breast cancer: past, present, and future*. Breast Cancer, 2015. **22**(3): p. 212-20.
9. Kuehn, T., et al., *A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance*. Cancer, 2005. **103**(3): p. 451-61.
10. AWMF, *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms (032-045OL)*, in *Langversion 4.3*, DKG, DKH, and AWMF, Editors. 2020, AWMF online. p. 454.
11. AGO-Mamma, *Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome*. 1 ed, ed. AGO, DGGG, and DKG. 2020, München: Zuckschwerdt Verlag. 603.
12. Wengenmair, H., et al., *Gammasonden zur intraoperativen Lokalisierung von radioaktiv markierten Wächterlymphknoten, Tumoren und Metastasen*. Nuklearmediziner, 2006. **29**(2): p. 76-83.
13. Cousins, A., et al., *Clinical relevance of novel imaging technologies for sentinel lymph node identification and staging*. Biotechnol Adv, 2014. **32**(2): p. 269-79.
14. Vogt, H., et al., *[Procedure guideline for sentinel lymph node diagnosis] (german)*. Nuklearmedizin, 2010. **49**(4): p. 167-72; quiz N19.
15. Kang, S.S., et al., *Methylene blue dye-related changes in the breast after sentinel lymph node localization*. J Ultrasound Med, 2011. **30**(12): p. 1711-21.
16. Murawa D, H.C., Dresel S, Hünerbein M., *Sentinel lymph node biopsy in breast cancer guided by indocyanine green fluorescence*. British Journal of Surgery, 2009. **96**(1289 - 1294).
17. Sorrentino, L., et al., *A Novel Indocyanine Green Fluorescence-Guided Video-Assisted Technique for Sentinel Node Biopsy in Breast Cancer*. World J Surg, 2018. **42**(9): p. 2815-2824.

18. Takada, M., et al., *Real-time navigation system for sentinel lymph node biopsy in breast cancer patients using projection mapping with indocyanine green fluorescence*. Breast Cancer, 2018.
19. SysmexEuropeGmbH. *Sentimag Magnetometer (Produktinformation)*. Endomagnetics Ltd. [Pharmaceutical Information] 2020; Available from: <https://http://www.sysmex-mea.com/>.
20. Thill, M., et al., *The Central-European SentiMag study: sentinel lymph node biopsy with superparamagnetic iron oxide (SPIO) vs. radioisotope*. Breast, 2014. **23**(2): p. 175 -179.
21. Ahmed, M., et al., *Magnetic sentinel node and occult lesion localization in breast cancer (MagSNOLL Trial)*. Br J Surg, 2015. **102**(6): p. 646-52.
22. Houpeau, J.L., et al., *Sentinel lymph node identification using superparamagnetic iron oxide particles versus radioisotope: The French Sentimag feasibility trial*. J Surg Oncol, 2016. **113**(5): p. 501-7.
23. Pouw, J.J., et al., *Pre-operative sentinel lymph node localization in breast cancer with superparamagnetic iron oxide MRI: the SentiMAG Multicentre Trial imaging subprotocol*. Br J Radiol, 2015. **88**(1056): p. 20150634.
24. SysmexEuropeGmbH. *Sienna+ Tracer (Produktinformation)*. Endomagnetics Ltd. [Pharmaceutical Information] 2020; Available from: <https://http://www.sysmex-mea.com/>.
25. Endomag. *Sentimag*. 2015; Available from: <http://www.endomag.com/sentimag>.
26. Douek, M., et al., *Sentinel node biopsy using a magnetic tracer versus standard technique: the SentiMAG Multicentre Trial*. Ann Surg Oncol, 2014. **21**(4): p. 1237-45.
27. Karakatsanis, A., et al., *The Nordic SentiMag trial: a comparison of super paramagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles versus Tc(99) and patent blue in the detection of sentinel node (SN) in patients with breast cancer and a meta-analysis of earlier studies*. Breast Cancer Res Treat, 2016. **157**(2): p. 281-294.
28. Pouw, J.J., et al., *Phantom study quantifying the depth performance of a handheld magnetometer for sentinel lymph node biopsy*. Phys Med, 2016. **32**(7): p. 926-31.
29. Gleich, B. and J. Weizenecker, *Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles*. Nature, 2005. **435**: p. 1214 - 1217.
30. Sattel, T., et al., *Single-sided device for magnetic particle imaging*. J Phys D: Appl Phys, 2009. **42**: p. 1-5.
31. Lawaczek, R., et al., *Magnetic iron oxide particles coated with carboxydextran for parenteral administration and liver contrasting: pre-clinical profile of SH U555A*. Acta Radiologica, 1997. **38**: p. 584 - 597.
32. Wang, Y.X., S.M. Hussain, and G.P. Krestin, *Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging*. Eur Radiol, 2001. **11**(11): p. 2319-31.
33. Krishnan, K.M., *Biomedical Nanomagnetism: A Spin Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy*. IEEE Trans Magn, 2010. **46**(7): p. 2523-2558.
34. Buzug, T.M., et al., *Magnetic particle imaging: introduction to imaging and hardware realization*. Z Med Phys, 2012. **22**(4): p. 323-34.
35. Stöcker, H., *Magnetische Eigenschaften*, in *Taschenbuch der Physik: Formeln, Tabellen, Übersichten*. 2010, Verlag Harry Deutsch. p. 1110.
36. Lindner, H., *Magnetisches Feld*, in *Physik für Ingenieure*. 2014, Carl Hanser Verlag: München. p. 795.

37. Chikazumi, S., *Dynamic magnetization processes*, in *Physics of Ferromagnetism*. 1997, Oxford University Press: New York.
38. Taupitz, M., S. Schmitz, and B. Hamm, [*Superparamagnetic iron oxide particles: current state and future development*]. *Rofo*, 2003. **175**(6): p. 752-65.
39. Renshaw, P.F., et al., *Immunospecific NMR contrast agents*. *Magn Reson Imaging*, 1986. **4**(4): p. 351-7.
40. Reiser, M.F., W. Semmler, and H. Hricak, eds. *Magnetic resonance tomography*. 2008, Springer: Berlin Heidelberg.
41. Biederer, S., *Magnet-Partikel-Spektrometer: Entwicklung eines Spektrometers zur Analyse superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel für Magnetic-Particle-Imaging*, in *Institut für Medizintechnik2012*, Universität zu Lübeck: Wiesbaden. p. 215.
42. Buzug, T.M., *Magnetic Particle Imaging - from particle science to imaging technology*. *Biomed Tech (Berl)*, 2013. **58**(6): p. 489-91.
43. Weizenecker, J., et al., *Three-dimensional real-time in vivo magnetic particle imaging*. *Phys Med Biol*, 2009. **54**(5): p. L1-L10.
44. Gleich, B., J. Weizenecker, and J. Borgert, *Experimental results on fast 2D-encoded magnetic particle imaging*. *Phys Med Biol*, 2008. **53**(6): p. N81-4.
45. Ludtke-Buzug, K., et al., *Comparison of commercial iron oxide-based MRI contrast agents with synthesized high-performance MPI tracers*. *Biomed Tech (Berl)*, 2013. **58**(6): p. 527-33.
46. Wust, P., et al., *Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy--feasibility, tolerance and achieved temperatures*. *Int J Hyperthermia*, 2006. **22**(8): p. 673-85.
47. Sattel, T., et al., *Single-sided device for magnetic particle imaging*. *Journal of Physics D: applied physics*, 2008. **42**: p. 022001 - 022005.
48. Mrongowius, J., K. Grafe, and T.M. Buzug, *Simulation Study of a Single-Sided Magnetic Particle Imaging Device*. *Biomed Tech (Berl)*, 2013.
49. Buzug, T.M., et al. *Novel hardware developments in magnetic particle imaging*. in *Medical Imaging 2011: Biomedical applications in molecular, structural, and functional imaging*. 2011. Orlando, Florida, USA: SPIE - The International Society of Optics and Photonics.
50. Sattel, T.F., et al. *Single-sided magnetic particle imaging device for the sentinel lymph node biopsy scenario*. in *Medical Imaging 2011: Biomedical applications in molecular, structural, and functional imaging*. 2012. San Diego, California, USA: SPIE - The International Society of Optics and Photonics.
51. Finas, D., et al., *SPIO detection and Distribution in biological tissue - a murine MPI-SNLB breast cancer model (Abstract/Poster P55)*, in *4th International Workshop on MPI IWMPI 2014*, T. Buzug and J. Borgert, Editors. 2014: Berlin, Germany. p. 166.
52. Finas, D., et al., *Sentinel lymphnode detection in breast cancer by magnetic particle imaging using superparamagnetic nanoparticles*, in *Magnetic Nanoparticles. Particle science, imaging technology, and clinical applications*, T. Buzug, et al., Editors. 2010, World Scientific Publishing: New Jersey. p. 205-210.
53. Finas, D., et al., *Processing of SPIO in macrophages and tumor tissue for MPI lymph node imaging in breast cancer*. *International Journal on Magnetic Particle Imaging*, 2017. **2**(2).

54. Finas, D., et al., *SPIO detection and distribution in biological tissue - a murine MPI-SLNB breast cancer model*. IEEE Transactions on Magnetics, 2015. **51**(2): p. Article#: 5400104.
55. Robe, A., et al., *Quantum dots in axillary lymph node mapping: Biodistribution study in healthy mice*. BMC Cancer, 2008. **8**(111).
56. Whary, M.T., et al., *Biology and disease of mice*, in *Laboratory animal medicine*, J.G. Fox, et al., Editors. 2015, Academic Press/Elsevier Inc. p. 43-149.
57. Betka, J., et al., *Fine needle aspiration biopsy proves increased T-lymphocyte proliferation in tumor and decreased metastatic infiltration after treatment with doxorubicin bound to PHPMA copolymer carrier*. J Drug Target, 2013. **21**(7): p. 648-61.
58. Van den Broeck, W., A. Derore, and P. Simoens, *Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice*. J Immunol Methods, 2006. **312**(1-2): p. 12-9.
59. Dunn, T.B., *Normal and pathologic anatomy of the reticular tissue in laboratory mice, with a classification and discussion of neoplasms*. J Natl Cancer Inst, 1954. **14**(6): p. 1281-433.
60. Biederer, S., et al., *Magnetization response spectroscopy of superparamagnetic nanoparticles for magnetic particle imaging*. Journal of Physics D: applied physic, 2009. **42**: p. 205007.
61. Kratz, H., et al., *Synthetic routes to magnetic nanoparticles for MPI*. Biomed Tech (Berl), 2013. **58**(6): p. 509-15.
62. Lindemann, A., et al., *Biological impact of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic particle imaging of head and neck cancer cells*. Int J Nanomedicine, 2014. **9**: p. 5025-40.
63. Eberbeck, D., et al., *How the size distribution of magnetic nanoparticles determines their magnetic particle imaging performance*. Applied Physics Letters, 2011. **98**.
64. Ferguson, R.M., et al., *Optimizing magnetite nanoparticles for mass sensitivity in magnetic particle imaging*. Med Phys, 2011. **38**(3): p. 1619-26.
65. Lüdtke-Buzug, K., *Von der Synthese zur Anwendung: Magnetische Nanopartikel*. Chemie in unserer Zeit, 2012(46): p. 32-39.
66. Shiozawa, M., et al., *Sentinel lymph node biopsy in patients with breast cancer using superparamagnetic iron oxide and a magnetometer*. Breast cancer, 2013. **20**: p. 223-229.
67. BayerSheringPharma, *Resovist (Fachinformation)*. Rote Liste Service GmbH, 2007: p. 1-3.
68. Cody, H.S., 3rd, *Sentinel lymph node mapping in breast cancer*. Breast Cancer, 1999. **6**(1): p. 13-22.
69. Godal, A., et al., *Determination of aluminium in liver from reindeer, moose and sheep by electrothermal atomic absorption spectrometry*. Sci Total Environ, 1995. **168**(3): p. 249-54.
70. Radunovic, A., M.W. Bradbury, and H.T. Delves, *Determination of aluminium in different tissues of the rat by atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization*. Analyst, 1993. **118**(5): p. 533-6.
71. Welz, B., *Atomabsorptionsspektrometrie*. 3 ed. 1983, Verlag Chemie. 196-197, 303-304.
72. Zada, A., et al., *Meta-analysis of sentinel lymph node biopsy in breast cancer using the magnetic technique*. Br J Surg, 2016. **103**(11): p. 1409-19.

73. Sekino, M., et al., *Handheld magnetic probe with permanent magnet and Hall sensor for identifying sentinel lymph nodes in breast cancer patients*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 1195.
74. Johnson, L., S. Pinder, and M. Douek, *Deposition of superparamagnetic iron-oxide nanoparticles in axillary sentinel lymph nodes following subcutaneous injection*. Histopathology, 2013. **62**(481 - 486).
75. Hojo, T., et al., *Evaluation of sentinel node biopsy by combined fluorescent and dye method and lymph flow for breast cancer*. Breast, 2010. **19**(3): p. 210-3.
76. van de Loosdrecht, M.M., et al., *A novel characterization technique for superparamagnetic iron oxide nanoparticles: The superparamagnetic quantifier, compared with magnetic particle spectroscopy*. Rev Sci Instrum, 2019. **90**(2): p. 024101.
77. Sydow, L., et al., *Evaluation of migration of SPIONs with MPS and AAS within a healthy mouse model for sentinel lymph node imaging in breast cancer (Abstract/Poster)*, in *9th International Workshop on Magnetic Particle Imaging (IMPI 2019)*, Y. Wadghiri, et al., Editors. 2019, Infinite Science Publishing: New York University, NYU Langone Health, New York, USA. p. 145-146.
78. Lubell, M.S. and A.S. Venturino, *Vibrating Sample Magnetometer*. Rev Sci Instrum, 1960. **31**: p. 207-8.
79. Graeser, M., et al., *Analog receive signal processing for magnetic particle imaging*. Med Phys, 2013. **40**(4): p. 042303.
80. Rety, F., et al., *MR lymphography using iron oxide nanoparticles in rats: pharmacokinetics in the lymphatic system after intravenous injection*. Journal of magnetic resonance imaging, 2000. **12**: p. 734 - 739.
81. Schad, H., *Das Lymphgefäßsystem - Funktion und Störung*. Lymph Forsch, 1998. **2**: p. 69-80.
82. Taupitz, M., S. Wagner, and B. Hamm, *[Contrast media for magnetic resonance tomographic lymph node diagnosis (MR lymphography)]*. Radiologe, 1996. **36**(2): p. 134-40.
83. Ellner, S.J., et al., *Dose-dependent biodistribution of [(99m)Tc]DTPA-mannosyl-dextran for breast cancer sentinel lymph node mapping*. Nucl Med Biol, 2003. **30**(8): p. 805-10.
84. Miner, T.J., et al., *Guidelines for the safe use of radioactive materials during localization and resection of the sentinel lymph node*. Ann Surg Oncol, 1999. **6**(1): p. 75-82.
85. Taupitz, M., et al., *Interstitial MR lymphography with iron oxide particles: results in tumor-free and VX2 tumor-bearing rabbits*. AJR Am J Roentgeno, 1993. **161**(1): p. 193-200.
86. Motomura, K., et al., *SPIO-enhanced magnetic resonance imaging for the detection of metastases in sentinel nodes localized by computed tomography lymphography in patients with breast cancer*. Ann Surg Oncol, 2011. **18**(12): p. 3422-9.
87. Harisinghani, M.G., et al., *Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(25): p. 2491-9.
88. Krag, D.N., *Minimal access surgery for staging regional lymph nodes: the sentinel-node concept*. Curr Probl Surg, 1998. **35**(11): p. 951-1016.
89. Jain, R., P. Dandekar, and V. Patravale, *Diagnostic nanocarriers for sentinel lymph node imaging*. Journal of Controlled Release, 2009. **138**: p. 90 - 102.

90. Finas, D., et al., *Detection and distribution of superparamagnetic nanoparticles in lymphatic tissue in a breast cancer model for magnetic particle imaging*, 2016.
91. Pouw, J.J., et al., *Comparison of three magnetic nanoparticle tracers for sentinel lymph node biopsy in an in vivo porcine model*. Int J Nanomedicine, 2015. **10**: p. 1235-43.
92. Rubio, I.T., et al., *The superparamagnetic iron oxide is equivalent to the Tc99 radiotracer method for identifying the sentinel lymph node in breast cancer*. Eur J Surg Oncol, 2015. **41**(1): p. 46-51.
93. Anninga, B., et al., *Magnetic sentinel lymph node biopsy and localization properties of a magnetic tracer in an in vivo porcine model*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **141**(1): p. 33-42.
94. Karakatsanis, A., et al., *Simplifying Logistics and Avoiding the Unnecessary in Patients With Breast Cancer Undergoing Sentinel Node Biopsy. A Prospective Feasibility Trial of the Preoperative Injection of Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles*. Scand J Surg, 2018. **107**(2): p. 130-137.
95. Motomura, K., et al., *Correlation between the area of high-signal intensity on SPIO-enhanced MR imaging and the pathologic size of sentinel node metastases in breast cancer patients with positive sentinel nodes*. BMC Med Imaging, 2013. **13**: p. 32.
96. Ahmed, M., et al., *Optimising magnetic sentinel lymph node biopsy in an in vivo porcine model*. Nanomedicine, 2015. **11**(4): p. 993-1002.
97. Pinero-Madrona, A., et al., *Superparamagnetic iron oxide as a tracer for sentinel node biopsy in breast cancer: A comparative non-inferiority study*. Eur J Surg Oncol, 2015. **41**(8): p. 991-7.
98. Ghilli, M., et al., *The superparamagnetic iron oxide tracer: a valid alternative in sentinel node biopsy for breast cancer treatment*. Eur J Cancer Care (Engl), 2015.
99. Poller, W.C., et al., *Magnetic Particle Spectroscopy Reveals Dynamic Changes in the Magnetic Behavior of Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles During Cellular Uptake and Enables Determination of Cell-Labeling Efficacy*. J Biomed Nanotechnol, 2016. **12**(2): p. 337-46.
100. Teeman, E., et al., *Intracellular dynamics of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic particle imaging*. Nanoscale, 2019. **11**(16): p. 7771-7780.
101. Lova, N., et al., *Magnetic Particle Spectroscopy for the Quantification of Magnetic Nanoparticles in Living Cells*. Biomed Tech (Berl), 2013.
102. Finas, D., et al., *Detection and distribution of superparamagnetic nanoparticles in lymphatic tissue in a breast cancer model for magnetic particle imaging*. Biomed Tech (Berl), 2012. **57**(SI-1 Track-M).
103. Arami, H., et al., *Size-dependent ferrohydrodynamic relaxometry of magnetic particle imaging tracers in different environments*. Med Phys, 2013. **40**(7): p. 071904.
104. Starmans, L.W., et al., *Iron oxide nanoparticle-micelles (ION-micelles) for sensitive (molecular) magnetic particle imaging and magnetic resonance imaging*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e57335.
105. Finas, D., et al., *SPIO processing in macrophages for MPI - The breast cancer MPI-SNLB-concept*. Current Directions in Biomedical Engineering, 2015. **1**(1-2): p. 558-564.

10 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
^{99m} Tc	Technetium-99m
AAS	Atomabsorptionsspektrometer/Atomabsorptionsspektrometrie
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.
AUC	area under the curve, Fläche unter der Kurve
bzw.	beziehungsweise
CT	Computertomogramm, Computertomografie
DCIS	ductales Carcinoma in situ
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur, EU
FDA	Food and Drug Administration, USA
Fe	Ferrum, Eisen
ff.	fortfolgende Seiten
FFP	field-free point, feldfreier Punkt
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.
h	hour, Stunde/Stunden
ICG	Indocyaningrün
i.v.	intravenös, in die Vene
kaudal	Richtung Schwanz
K. H.	Katja Heinrich
K. L.-B.	Kerstin Lüdtkke-Buzug
kranial	Richtung Kopf
L	links
Max.	Maximum
Min.	Minimum
mod. n.	modifiziert nach
MPI	Magnetic Particle Imaging
MPS	Magnetpartikelspektrometer, Magnetpartikelspektrometrie
MR	Magnetresonanz
MRT	Magnetresonanztomografie
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
OP	Operation, Operationssaal
P	p-Wert, Signifikanzwert
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PG	PBS Gruppe = SPION-freie Gruppe
Q ₁ / Q ₃	1. Quartil bzw. 3. Quartil
QD	Quantum Dots
R	rechts
Region	Entnahmeregion (Abbildung 3, Seite 23)
RG	Resovist [®] Gruppe
RES	Retikuloendotheliales System
resp.	respektive
ROC Kurve	receiver-operating-characteristic, Grenzwertoptimierungskurve

Abkürzung	Bedeutung
s.c.	subcutan, unter die Haut
SD	standard deviation, Standardabweichung
SEM	Standardfehler des MW
SLN	sentinel lymph node, Sentinellymphknoten
SLNB	sentinel lymph node biopsy, Sentinellymphonodektomie
SNR	signal-noise-ratio, Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SOP	standard operation procedure
SPaQ	Superparamagnetic Quantifier
SPION	superparamagnetic iron oxide nanoparticle, superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel
T	Tesla, Maßeinheit für magnetische Flussdichte
USPION	ultra-small SPION
VarK	Variationskoeffizient
VSM	Vibrating Sample Magnetometry
VSOP	very small superparamagnetic iron oxide particles

11 Anhang

11.1 Zulassung Tierversuchsantrag

Ministerium für Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume
des Landes Schleswig-Holstein

Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 7151 | 24171 Kiel

Frau
Dr. Britta Ruhland
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Ihr Antrag vom: 23.04.2009
Mein Zeichen: V 312-72241.122-10 (35-3/09)

Herr Butchereit

Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:

Herrn Dr. R. Noël
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

4. Juni 2009

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrte Frau Dr. Ruhland,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 18. Dezember 2007 (BGBl. I S. 3001), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Magnetic-Particle-Imaging (MPI) zur Darstellung des Sentinellymphknotens (SNL)
in der Axilla der Maus unter Verwendung von Resovist[®] als Tracer – Vorversuche
zur Sentinellymphknotenbiopsie (SNLB) beim Mammakarzinom durch MPI

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 110 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Mai 2011 befristet.
Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.

3. Leiterin des Versuchsvorhabens:
Frau Dr. Britta Ruhland
4. Ihr Stellvertreter:
Herr PD Dr. Dominique Finas
5. Wechselt die Leiterin des Versuchsvorhabens oder ihr Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
6. Verantwortlicher Tierarzt nach § 9 Abs. 2 Nr. 8 Tierschutzgesetz:
Herr Dr. R. Noël
7. Weitere Nebenbestimmungen:
Die Genehmigung beschränkt sich zunächst auf die Versuche 1 bis 3. Danach ist ein Zwischenbericht vorzulegen.

Die Bestimmungen der §§ 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVOB. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 9 Abs. 1 Tierschutzgesetz genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Irmer

Abbildung 18: Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren vom 04.06.2009 durch das Ministerium für Landschaft, Umwelt und ländliche Räume in Schleswig-Holstein.

12 Danksagung

Ich danke zunächst meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. habil. Dominique Finas für die Überlassung des Themas der hier vorgelegten Arbeit und die stets hervorragende Betreuung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Arbeit. Trotz seiner Stellung in leitenden Positionen zunächst als Leitender Oberarzt der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, der Medizinische Universität zu Lübeck, seit dem 01.03.2012 als Direktor der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Evangelischen Klinikums Bethel in Bielefeld (Lehrkrankenhaus der Universität Münster), seit dem 01.01.2018 als Chefarzt der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe am Klinikum Magdeburg (Lehrkrankenhaus der Universität Magdeburg), seit dem 01.01.2019 als stellvertretender Klinikdirektor der Universitätsklinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg und seit 01.08.2020 als Leitender Arzt der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Gemeinschaftskrankenhauses Havelhöhe in Berlin (Lehrkrankenhaus der Charité) war er stets bereit alle Fragen zu beantworten und Hilfestellung zu leisten wenn es um konzeptionelle, inhaltliche und organisatorische Fragen und solche der Ausarbeitung ging.

Mein Dank geht auch an Herrn Professor Dr. med. Klaus Diedrich, der bis 2012 Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, der Medizinische Universität zu Lübeck war. Durch Ihn war es möglich auf die in seiner Klinik vorliegenden Daten zurückzugreifen und die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zu erheben.

Ich danke Prof. Dr. med. A. Rody als neuem Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, der Medizinische Universität zu Lübeck für die Möglichkeit diese Dissertation an seiner Klinik durchzuführen.

Zudem möchte ich Frau Katja Heinrich danken, welche mir in ihrer Stellung als im Labor tätige MTA immer tatkräftig zur Seite gestanden hat und ohne deren Expertise in der Durchführung von Versuchen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein weiterer Dank geht an Dr. rer. nat. Kerstin Lüdtke-Buzug vom Institut für Medizintechnik an der Universität zu Lübeck, die die Versuche mit dem MPS erst

möglich machte und mir bei Fragen zu Durchführung und Verständnis stets eine große Hilfe war, sowie an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Buzug als Leiter des Instituts für Medizintechnik an der Universität zu Lübeck.

Ebenfalls zu erwähnen ist Frau Doris Mutschall, Mitarbeiterin der Biochemie der Universität zu Lübeck, welche mich den Umgang mit dem Atomabsorptionsspektrometer lehrte und auch hier immer mit Hilfe aufwarten konnte.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern, Prof. Dr. med. Michael Sydow sowie Dr. med. Friederike Sydow, sowie meinen beiden besten Freunden, Frau Dr. rer. nat. Sarah Falke sowie Herrn Dr. Ing. Peter Fischer, und natürlich meinem wunderbaren Ehemann Stefan Sydow danken. Sie alle standen mir stets bei Fragen, für Korrekturlesungen, Verbesserungen sowie mit tröstenden Worten im Falle akuter Schreib- und Denkblockaden zur Seite. Ohne dieses Netzwerk und die Hilfe vieler weiterer Freunde und Verwandter hätte ich diese Arbeit nicht zustande bringen können.

Vielen Dank an alle die mich neben den genannten bei dieser Arbeit unterstützt haben.

13 Lebenslauf

Universitäre Ausbildung

- 10/2007 – 03/2009 Bilinguales Jurastudium (deutsches und französisches Recht), Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf in Kooperation mit der Université de Cergy-Pontoise in Cergy und Pontoise, Frankreich
- 04/2009 – 03/2011 Medizinstudium bis zum Physikum, Justus-Liebig-Universität Gießen
- 04/2011 – heute Fortführung des Medizinstudiums, Universität zu Lübeck
- 08/2013 – 12/2013 Auslandssemester, Universitetet i Bergen, Norwegen
- 10/2014 Schriftliches Examen (M2)
- 02/2015 – 06/2015 Auslandstertial im Rahmen des praktischen Jahres, Klinik für Innere Medizin, Haukeland Universitets-Sjukehus, Bergen, Norwegen
- 09/2015 – 12/2015 Wahltertial im Rahmen des praktischen Jahres, Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)
- 01/2016 – 04/2016 Tertial im Rahmen des praktischen Jahres, Klinik für Chirurgie, Klinikum Itzehoe

Beruflicher Werdegang

- 09/2016 – heute Assistenzärztin in Weiterbildung, Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, St-Elisabeth-Hospital, Bochum
- 09/2017 – 04/2018: Weiterbildung durch Rotation, Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin, St-Elisabeth-Hospital, Bochum

Promotion

- 06/2011 – heute: Bestimmung superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel im murinen Modell zur MPI-Darstellung axillärer Sentinellymphknoten beim Mammakarzinom: Experimenteller Vergleich von Atomabsorptionsspektrometer und Magnetpartikelspektrometer.
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. habil. Dominique Finas, Leitender Arzt der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Gemeinschaftskrankenhaus Havelhöhe gGmbH, Berlin

14 Forschungsförderung / Preise

Das Projekt und die Zusammenarbeit zwischen der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe (UFK) des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck und dem Institut für Medizintechnik (IMT) der Universität zu Lübeck erhielten folgende Förderungen:

Fakultätsmittel der Universität zu Lübeck im Rahmen des Schwerpunktprogramms (SPP) Biomedizintechnik: "Bildgebung bei Krankheitsprozessen im Arbeitsfeld Biomedizintechnik", Teilprojekt "MPI geführte Sentinellymphknoten-Biopsie beim Mammakarzinom" (Projektleiter: Priv.-Doz. Dr. med. habil. Dominique Finas).

Projektförderung durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF): "MPI geführte Sentinellymphknoten-Biopsie beim Mammakarzinom" (BMBF Grant number 01EZ0912) (Teilprojektleiter: Priv.-Doz. Dr. med. habil. Dominique Finas).

Verleihung des BMBF Innovationspreises: „MPI-basiertes Wächterlymphknotenszenario“ (BMBF FKZ: 01EZ0912).

Posterpreis auf der 33. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie: Baumann K, Sydow L, Heinrich K, Rody A, Lüdtke-Buzug K, Buzug T, Finas D: Sentinellymphknoten-Detektion durch Realtime-3D-Navigation unter Verwendung superparamagnetischer Nanopartikel und Magnetic Particle Imaging.

15 Eigene Publikationen

- Baumann K, Sydow L, Heinrich K, Lüdtkke-Buzug K, Buzug T, Finas D: **Eine neue Technik der Sentinellymphknoten-Detektion mittels superparamagnetische Nanopartikel und Magnetic Particle Imaging am Beispiel des Mammakarzinoms. (Abstract/Poster)**. In: *32 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie 2012: 05.-07.07.2012 2012; Stuttgart, Germany*.
- Baumann K, Sydow L, Heinrich K, Lüdtkke-Buzug K, Buzug T, Finas D: **Superparamagnetische Nanopartikel und Magnetic Particle Imaging – eine neue Technik der Sentinellymphknoten-Detektion am Beispiel des Mammakarzinoms. (Abstract/Poster)**. In: *59 Kongress der DGGG 2012 (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe): 09.-13.10.2012 2012; München, Germany*.
- Baumann K, Sydow L, Heinrich K, Lüdtkke-Buzug K, Buzug T, Finas D: **Eine neue Technik der Sentinellymphknoten-Detektion beim Mammakarzinom mittels superparamagnetische Nanopartikel und MPI**. *Senologie* 2012, 9:A11. DOI 10.1055/s-0032-1313377.
- Finas D, Baumann K, Heinrich K, Ruhland B, Sydow L, Gräfe K, Lüdtkke-Buzug K, Buzug T: **Distribution of superparamagnetic nanoparticles in lymphatic tissue for sentinel lymph node detection in breast cancer by magnetic particle imaging**. In: *Magnetic Particle Imaging A Novel SPIO Nanoparticle Imaging Technique*. Edited by Buzug TM, Borgert J, vol. 140 (SPPHY), 1st edn. Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer-Verlag; 2012: 187-191. DOI 10.1007/978-3-642-24133-8.
- Finas D, Baumann K, Heinrich K, Ruhland B, Sydow L, Gräfe K, Lüdtkke-Buzug K, Buzug T: **Distribution of superparamagnetic nanoparticles in lymphatic tissue for sentinel lymph node detection in breast cancer by magnetic particle imaging. (Abstract/Oral)**. In: *International Workshop on Magnetic Particle Imaging: 2012; Luebeck*.
- Finas D, Baumann K, Sydow L, Heinrich K, Grafe K, Buzug T, Ludtke-Buzug K: **Detection and distribution of superparamagnetic nanoparticles in lymphatic tissue in a breast cancer model for magnetic particle imaging**. *Biomed Tech (Berl)* 2012, 57(Si-1):81-83. DOI 10.1515/bmt-2012-4158.
- Finas D, Baumann K, Sydow L, Heinrich K, Gräfe K, Buzug T, Lüdtkke-Buzug K: **Detection and distribution of superparamagnetic nanoparticles in lymphatic tissue in a breast cancer model for magnetic particle imaging. (Abstract/Oral)**. In: *BMT 2012, 46th DGBMT Annual Conference: 16.-19.09.2012 2012; Jena, Germany*.
- Baumann K, Sydow L, Heinrich K, Rody A, Lüdtkke-Buzug K, Buzug T, Finas D: **Sentinellymphknoten-Detektion durch Realtime-3D-Navigation unter Verwendung superparamagnetischer Nanopartikel und Magnetic Particle Imaging (Abstract/Poster 8/Poster Prize)**. *Senologie* 2013, 10:A3. ISSN 1611-647X (Electronic).
- Baumann K, Sydow L, Heinrich K, Rody A, Lüdtkke-Buzug K, Buzug T, Finas D: **Sentinellymphknoten-Detektion durch Realtime-3D-Navigation unter Verwendung superparamagnetischer Nanopartikel und Magnetic Particle Imaging**. In: *Poster Prize of the Society of Senology*. München, Germany: German Society of Senology; 2013.

- Finas D, Baumann K, Sydow L, Heinrich K, Gräfe K, Rody A, Buzug T, Lüdtke-Buzug K: **Lymphatic tissue and superparamagnetic nanoparticles - magnetic particle imaging for detection and distribution in a breast cancer model (Abstract/Oral L5)**. In: *BMT 2013, 3-Ländertagung D-A-CH: 19.-21.09.2013; Graz, Austria*: Edited by DGBMT, ÖGBMT, SGBT. 2013: 303. DOI 10.1515/bmt-2013-4262.
- Finas D, Baumann K, Sydow L, Heinrich K, Grafe K, Rody A, Ludtke-Buzug K, Buzug T: **Lymphatic Tissue and Superparamagnetic Nanoparticles - Magnetic Particle Imaging for Detection and Distribution in a Breast Cancer Model**. *Biomed Tech (Berl)* 2013, **58**. DOI 10.1515/bmt-2013-4262.
- Finas D, Baumann K, Sydow L, Heinrich K, Grafe K, Rody A, Ludtke-Buzug K, Buzug T: **Superparamagnetic Nanoparticles in Lymphatic Tissue - Detection and Distribution in a Breast Cancer Model for Magnetic Particle Imaging**. In: *International Workshop on MPI IWMPi 3013; Berkeley, CA, USA*. 2013. DOI 10.1109/IWMPi.2013.6528390.
- Finas D, Baumann K, Sydow L, Heinrich K, Rody A, Gräfe K, Lüdtke-Buzug K, Buzug T: **SPIO detection and Distribution in biological tissue - a murine MPI-SNLB breast cancer model (Abstract/Poster P55)**. In: *4th International Workshop on MPI IWMPi 2014: 27.-29.03.2014; Berlin, Germany*: Edited by Buzug T, Borgert J. 2014: 166.
- Finas D, Baumann K, Sydow L, Heinrich K, Rody A, Gräfe K, Buzug T, Lüdtke-Buzug K: **SPIO detection and distribution in biological tissue - a murine MPI-SLNB breast cancer model**. *IEEE TMAG* 2015, **51**(2). DOI 10.1109/TMAG.2014.2358272.
- Finas D, Baumann K, Sydow L, Heinrich K, Gräfe K, Buzug T, Lüdtke-Buzug K: **Detection and distribution of superparamagnetic nanoparticles in lymphatic tissue in a breast cancer model for magnetic particle imaging**. *nano online* 2016. DOI 10.1515/nano.0007.00011.
- Finas D, Baumann K, Sydow L, Heinrich K, Gräfe K, Lüdtke-Buzug K, Buzug T: **Lymphatic Tissue and Superparamagnetic Nanoparticles - Magnetic Particle Imaging for Detection and Distribution in a Breast Cancer Model**. *nano online* 2016. DOI 10.1515/nano.0007.00029.
- Sydow L, Lüdtke-Buzug K, Rody A, Buzug T, Finas D: **Evaluation of migration timespan of SPION with MPS and AAS within a healthy mouse model for sentinel lymph node detection in breast cancer. (Abstract/Poster)** In: *International Workshop on MPI IWMPi 2019; New York, USA*. 2019.

16 Selbständigkeitserklärung

Ich, Christina Lotta Sydow, versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen, einschließlich Quellen aus dem Internet als solche kenntlich gemacht habe.

Ich versichere, dass ich weder gleichzeitig noch vorher andernorts einen Zulassungsantrag gestellt habe noch die Dissertation eingereicht habe.

Dortmund , 23.09.2020