

**Aus dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. B. Bültmann**

**Prognostisch bedeutsame histomorphometrische
Parameter in sentinel node Metastasen
beim malignen Melanom**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Daniela Carmen Trick
aus
Schramberg**

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Bültmann
2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Garbe

Ich bin nicht der „Macher“, ich bin Geschöpf.
Was immer mir gelingt – es ist nicht mein Verdienst –
es ist Geschenk.

Hanna-Renate Laurien

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	Seite	1
1.1	Die SN-Biopsie.....	Seite	2
1.2	Untersuchung des SN.....	Seite	4
1.3	TNM-Klassifikation des malignen Melanoms.....	Seite	5
1.4	Fragestellung.....	Seite	6
2	Material und Methoden	Seite	7
2.1	Patientengut und Gruppeneinteilung.....	Seite	7
2.2	Darstellung des Lymphabflusses und Gewinnung des SN.....	Seite	8
2.3	Verarbeitung der SN.....	Seite	9
2.4	Immunhistochemische Färbungen.....	Seite	9
2.5	Histomorphometrische Parameter.....	Seite	10
2.6	Tyrosinase-Reverse Transcriptase-PCR.....	Seite	11
2.7	Statistische Verfahren.....	Seite	13
3	Ergebnisse	Seite	14
3.1	Patientendaten.....	Seite	14
3.2	Angaben über den SN und die NSN.....	Seite	16
3.3	Vergleich der Verläufe von Gruppe 1 mit denen der Vergleichsgruppen.....	Seite	27
3.4	Einfluß der Metastasengröße im SN auf das rezidivfreie Überleben.....	Seite	28
3.5	Einfluß der Metastasenanzahl im SN auf das rezidivfreie Überleben.....	Seite	30
3.6	Einfluß des paranodalen Tumorwachstums auf das rezidivfreie Überleben.....	Seite	31

3.7 Einfluß der Anzahl positiver SN auf das rezidivfreie Überleben.....	Seite	34
3.8 Einfluß des NSN-Befalls auf den Verlauf.....	Seite	37
3.9 Einfluß der gesamten Anzahl positiver Lymphknoten (SN+NSN) auf das rezidivfreie Überleben.....	Seite	38
3.10 Einfluß der Metastasengröße im SN auf die Anzahl positiver NSN.....	Seite	40
3.11 Einfluß der Metastasenanzahl im SN auf die Anzahl positiver NSN.....	Seite	42
3.12 Einfluß des paranodalen Tumorwachstums auf die Anzahl positiver NSN.....	Seite	43
3.13 Einfluß der Anzahl positiver SN auf die Anzahl positiver NSN.....	Seite	44
3.14 Einfluß der Tumordicke auf den SN-Befall und den Verlauf.....	Seite	44
3.15 Einfluß der Tumordicke und des SN-Status auf die Anzahl positiver NSN.....	Seite	48
4 Diskussion.....	Seite	50
4.1 Vergleich des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit vom SN-Status.....	Seite	50
4.2 Metastasengröße.....	Seite	51
4.3 Metastasenanzahl.....	Seite	54
4.4 Paranodales Tumorwachstum.....	Seite	55
4.5 Anzahl befallener Lymphknoten.....	Seite	55
4.6 Bedeutung der morphologischen Parameter für den NSN-Befall.....	Seite	57
4.7 Der Einfluß der Tumordicke.....	Seite	58
4.8 Schlußfolgerung.....	Seite	59

5	Zusammenfassung	Seite 60
6	Tabellenteil	Seite 62
	Tabelle 20: TNM-Klassifikation des AJCC von 1992.....	Seite 62
	Tabelle 21: Vorschlag des AJCC (2000) für eine aktualisierte TNM-Klassifikation.....	Seite 64
	Tabelle 22: Patientenangaben – Gruppe 1-3.....	Seite 65
	Tabelle 23: Patientenangaben – Gruppe 1.....	Seite 67
	Tabelle 24: Patientenangaben – Gruppe 2.....	Seite 69
	Tabelle 25: Patientenangaben – Gruppe 3.....	Seite 71
	Tabelle 26: Methode zur Anfärbung von Melanomzellen mit S100- und HMB 45-Antikörpern.....	Seite 73
	Tabelle 27: Tyrosinase-Reverse Transcriptase-PCR: RNA-Messung mit Spektrometer.....	Seite 74
	Tabelle 28: Tyrosinase-Reverse Transcriptase-PCR: Herstellung der cDNA.....	Seite 74
	Tabelle 29: Tyrosinase-Reverse Transcriptase-PCR: PCR-Reaktionsansätze.....	Seite 75
	Tabelle 30: Tyrosinase-Reverse Transcriptase-PCR: PCR: 35 Zyklen – Ablauf eines Zyklus.....	Seite 75
7	Bildmaterial	Seite 76
	Abbildung 1: Kapsuläre Naevuszellen (HE x 200).....	Seite 76
	Abbildung 2: Kapsuläre Naevuszellen (S100 x 200).....	Seite 76
	Abbildung 3: Melanomzellnest ($\leq 0,5$ mm) im SN (S100 x 300).....	Seite 77
	Abbildung 4: Vier Metastasen $> 0,5$ mm im SN (S100 x 50).....	Seite 77
8	Literaturverzeichnis	Seite 78

Verwendete Abkürzungen

A	Alter
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	akrolentiginöses Melanom
Angew.	Angewandt
Anz	Anzahl
ax	axillär
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleotidsäure
CL	Clark-Level
D	größter Durchmesser der größten Metastase
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleotidsäure
ELND	elektive lymph node dissection
engl.	englisch
etc.	et cetera; und so weiter
FM	Fernmetastasen
G	Geschlecht
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin-Eosin
IH	Immunhistochemie; immunhistochemische Färbungen
IMS	Intermediärsinus
ing	inguinal
Transitm	Transitmetastasen
ITC	isolierte Tumorzellen
k.A.	keine Angabe
li	links
LK	Lymphknoten
LK-FM	Lymphknoten-Fernmetastasen
LKH	Lymphknotenhälfte

LMM	Lentigo-maligna Melanom
Lok	Lokalisation
m	männlich
M.	Metastase(n)
MBq	Megabecquerel
Met	Metastase(n)
Meth.	Methode(n)
min.	Minuten
ml	Milliliter
MM	malignes Melanom
mm	Millimeter
Mon.	Monat(e)
N	Lymphknoten (engl. node)
n	Anzahl
neg.	negativ
NMM	noduläres malignes Melanom
Nr	Nummer
NSN	non sentinel nodes
n.u.	nicht untersucht
O. majus	Omentum majus
OS	Oberschenkel
PCR	polymerase chain reaktion
PN	paranodales Tumorwachstum
PT	Primärtumor
re	rechts
reg. LK-M.	regionäre Lymphknotenmetastasen
retroauric	retroaurikulär
Rez.	Rezidiv
RNA	Ribonucleotidsäure
RS	Randsinus
RT	Reverse Transcriptase
Rts	Routineschnitte

Satellitenm.	Satellitenmetastasen
sec	Sekunden
SN	sentinel node
SS	Schnellschnitt
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
Str.	Stroma
T	Zeit
Tab	Tabelle
Tc	Technetium
TD	Tumordicke
TLND	therapeutic lymph node dissection
TNM	Tumor-Lymphknoten (engl. nodes)-Metastasen
Tyr-RT-PCR	Tyrosinase-reverse transcriptase-polymerase chain reaktion
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
Ulz	Ulzeration
US	Unterschenkel
UV	Ultraviolett
V	Vorhersagewert
v.a.	vor allem
visc. FM	viszerale Fernmetastasen
w	weiblich
Weichteilm.	Weichteilmastasen

1. Einleitung

Das maligne Melanom (MM) der Haut ist eine bösartige Neubildung, ausgehend von Melanozyten, die entwicklungsgeschichtlich der Neuralleiste entstammen. Man unterscheidet 4 verschiedene klinisch-histologische Tumortypen, das noduläre maligne Melanom (NMM), das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das akrolentiginöse (ALM) und das Lentigo-maligna Melanom (LMM). Von den kutanen malignen Melanomen wird die Gruppe der nicht klassifizierbaren Melanome abgegrenzt, zu der Aderhautmelanome, Schleimhautmelanome, Melanome der Hirnhäute und occulte Melanome gehören.

Der Metastasierungsweg des MM ist in 2/3 der Fälle zunächst lymphogen und nur in 1/3 der Fälle primär hämatogen (Garbe und Schaumburg-Lever, 1997). Wie bei den meisten anderen soliden Tumoren ist deshalb der Lymphknotenstatus ein wichtiges Staging-Kriterium. Je nachdem, ob Lymphknoten (LK) befallen sind oder nicht, kommt beim malignen Melanom der Haut unterschiedlichen Prognoseparametern die entscheidende Rolle zu. Wichtige Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben im Primärtumorstadium sind die von Breslow (Breslow, 1970) beschriebene Tumordicke (Balch et al., 1981, Büttner et al., 1995), das Vorliegen einer Ulzeration des Primärtumors (Buzaid et al., 1997) und der sogenannte Clark-Level, der die Eindringtiefe bezüglich der verschiedenen Hautschichten beschreibt (Clark et al., 1969). Sobald jedoch Lymphknotenmetastasen vorliegen, wird der Lymphknotenstatus zum entscheidenden Prognoseparameter sowohl für das rezidivfreie Überleben als auch für das Gesamtüberleben und die zuvor genannten Risikoindikatoren verlieren an prognostischer Bedeutung (Gershenwald et al., 1999). Um den Lymphknotenstatus bestimmen zu können wurde deshalb beim malignen Melanom der Haut über viele Jahre hinweg die drainierende Lymphknotenregion im Rahmen einer elektiven Lymphknotendisektion (engl.: elective lymph node dissection, ELND) komplett ausgeräumt. Außerdem hoffte man damit die Tumorzelllast zu reduzieren und durch Elimination potentieller Streuherde von Melanomzellen in klinisch unauffälligen Lymphknotenstationen die Prognose zu verbessern.

Man stellte jedoch fest, daß histologisch nur bei einem geringen Teil der Patienten tatsächlich eine Lymphknotenbeteiligung vorlag (ca.18%; Hohenberger et al., 1996). Die restlichen Patienten erlitten den Eingriff, ohne davon zu profitieren.

Da die ELND nicht selten zu erheblichen Komplikationen wie Lymphödem und Wundinfektion führt (Karakousis et al., 1991), wurde die Frage nach dem Vorgehen im Bezug auf die Lymphknotenstation, die das Tumorgebiet drainiert, zum Gegenstand beständiger kontroverser Diskussionen. Die Befürworter argumentierten, daß eine sofortige komplette Lymphknotendisektion auch klinisch unauffälliger Lymphknotenstationen (ELND), zumindest für bestimmte Patientenuntergruppen, einen Prognosevorteil erbringe (Drepper et al., 1993 a). Andere empfahlen, erst klinisch auffällige Lymphknotengebiete auszuräumen, da die ELND keinen sicheren Überlebensvorteil aufzeige (Veronesi et al., 1977). Ein Konsens konnte in dieser Frage nicht erzielt werden, da verschiedene Studien zu widersprüchlichen Ergebnissen führten (Ross, 1996).

1.1 Die sentinel node-Biopsie

1992 eröffneten Morton et al. mit der Beschreibung der sentinel node-Biopsie völlig neue Perspektiven für das Vorgehen bezüglich der drainierenden LK-Stationen (Morton et al., 1992).

Da sich in der Haut der Lymphabfluß der meisten Körperregionen gut vorhersagen und darstellen läßt, entwickelten Morton et al. eine Methode zur Darstellung des Lymphknotens, welcher als erster das Lymphabflußgebiet des Tumors drainiert. Dieser Wächterlymphknoten oder sentinel node (SN) wird durch intrakutane Umspritzung des Primärtumors, bzw., wenn dieser bereits exzidiert ist, der Exzisionsnarbe desselben mit 0,5-1ml Patent Blau oder Isosulfan Blau identifiziert. Intraoperativ wird die Haut über der Lymphknotenregion, welche aufgrund einer präoperativen Lymphabflußszintigraphie als Drainagegebiet lokalisiert worden war, eröffnet. Die Präparation erfolgt in Richtung des Primärtumors, bis das afferente, nun blau gefärbte Lymphgefäß sichtbar wird, welches die Lymphe aus der Region des Primärtumors zu diesem Lymphknotengebiet transportiert.

In ihrer ersten Studie konnten Morton et al. in 82% einen oder mehrere blau angefärbte sentinel nodes (SN) identifizieren und extirpieren. Im Anschluß daran wurde der Primärtumor exzidiert und initial zunächst stets eine komplette Lymphknotendisektion (engl. lymph node dissection, LND) des regionären Lymphabflußgebietes „en bloc“ durchgeführt. Nur in 2 Nicht-sentinel nodes (engl.: non sentinel nodes, NSN) aus 154 Lymphknotengebieten mit histologisch und immunhistologisch negativem SN fanden sich Melanometastasen (ca. 1%).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde davon ausgegangen, daß der SN tatsächlich das gesamte LK-Gebiet „repräsentiert“ und praktisch nicht übersprungen wird.

Teilweise war diese Methode jedoch aufgrund verschiedener technischer Schwierigkeiten mit einer relativ hohen Versagerquote bei der SN-Identifikation behaftet (Büchels et al., 1997). Deshalb wurde diese Technik durch den zusätzlichen Einsatz von radioaktiv markierten Kolloiden ergänzt und verfeinert.

Um den Lymphabfluß aus dem Tumorgebiet und die Lymphknotenregion, in welche das Melanom drainiert, darzustellen, wurde eine präoperative Lymphabflußszintigraphie empfohlen (Norman et al., 1990). Dazu werden Nanokolloide, die mit ^{99m}Tc markiert sind, um den Primärherd bzw. dessen Excisionsnarbe herum intracutan injiziert. Erfolgt die SN-Biopsie nicht später als 24 Stunden nach dieser Injektion (Krag et al., 1995), so kann der SN intraoperativ mit einer handgeführten Gammakamera aufgesucht werden. Wird zusätzlich Patent Blau oder Isosulfan Blau verwendet, dann ist der SN auch optisch zu erkennen (van der Veen et al., 1994).

In einer neueren Studie von Morton et al. gelang die Identifizierung des SN mit der Patent Blau Methode allein in 95,2% der Fälle, hingegen mit der kombinierten Methode aus Patent Blau und radioaktiv markierten Kolloiden in 99,1% (Morton et al., 1999).

1.2 Untersuchung des SN

Da sich im Falle einer metastatischen Lymphknotenbeteiligung das durchschnittliche 5-Jahres-Überleben deutlich verschlechtert (72,8% bei histologisch negativen LK versus 39,0% bei histologisch positiven LK; Drepper et al., 1993b), ist die sorgfältige Untersuchung des SN unerlässlich. Die diagnostischen Möglichkeiten sind dank immunhistologischer und molekularbiologischer Verfahren stark verfeinert worden. Über das Vorgehen bei der SN Untersuchung besteht jedoch noch kein genereller Konsens.

Es zeigte sich, daß mit der klassischen Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) allein eine Lymphknotenbeteiligung nicht selten übersehen wird (Messina et al., 1999; Baisden et al., 2000), insbesondere weil isolierte Tumorzellen und Mikrometastasen mit dieser Methode nur sehr schwer oder gar nicht erkannt werden können. Eine wichtige Rolle spielen deshalb die immunhistologischen Verfahren (IH) mit Antikörpern gegen das S100 Protein und gegen HMB 45.

Bei der HMB 45-Färbung werden Antikörper gegen das prämelanosomale Protein verwendet. Da dieses in Melanomzellen fehlen kann, ist die Sensitivität eingeschränkt, jedoch die Spezifität sehr hoch (Byers und Bhawan, 1998).

Das S100 Protein ist ein saures Protein unklarer Funktion, welches in den Gliazellen des ZNS, den Schwann'schen Zellen des peripheren Nervensystems, den dendritischen Zellen der Lymphknoten, den Satellitenzellen von Ganglien, in Melanozyten, Langerhanszellen und in manchen Knorpelzellen nachweisbar ist. Seine Spezifität ist somit geringer (Cochran et al., 1984), hingegen seine Sensitivität höher als die der HMB 45-Färbung (Messina et al., 1999).

Ein noch sensitiveres molekularbiologisches Nachweisverfahren für Zellen, die Tyrosinase exprimieren, ist die Tyrosinase-Reverse Transcriptase-PCR (Wang et al., 1994). Bezüglich des Vorgehens bei histologisch/immunhistologisch negativen aber in der PCR positiven SN wurde jedoch bisher noch kein allgemeingültiger Konsens erzielt. Wenn man voraussetzt, daß der SN mit diesen Methoden sehr sorgfältig und genau untersucht wird, so lassen sich auf diese Weise diejenigen Patienten herausfiltern, deren SN histologisch manifeste Metastasen enthalten oder bei denen aufgrund eines positiven PCR-Ergebnisses der Verdacht auf eine lymphogene Metastasierung des malignen Melanoms vorliegt.

Diese Patienten könnten somit am ehesten von einer ELND profitieren. Patienten mit negativem SN, bei denen man dann davon ausgehen kann, daß ihr regionäres Lymphknotengebiet noch nicht metastatisch befallen ist, umgehen so eine für sie unnötige Operation (Essner, 1997).

An der Universitätsklinik Tübingen wird beim MM der Haut jeder SN routinemäßig mittels HE sowie immunhistologisch (S100 und HMB 45) untersucht. Weist ein SN in der Histologie Melanommetastasen auf, so erfolgt anschließend eine therapeutische Lymphknotendisektion (engl.: therapeutic lymph node dissection, TLND) der drainierenden Lymphknotenregion. Wenn der SN in der Histologie negativ ist, so hat dies keine chirurgischen Konsequenzen.

1.3 TNM-Klassifikation des malignen Melanoms

Der Lymphknotenstatus als wichtiger prognostischer Parameter wurde, wie bei allen anderen soliden Tumoren auch, beim malignen Melanom der Haut (MM) in die TNM-Klassifikation mit aufgenommen. Jedoch wird hier das „N-Stadium“ nicht, wie bei den meisten Malignomen, von der Anzahl positiver Lymphknoten abhängig gemacht, vielmehr wird es beim MM über die Metastasengröße definiert.

Bereits in der Fassung von 1983 legte das American Joint Committee on Cancer (AJCC) den Grenzwert der Metastasengröße auf 5cm fest (N1: Metastase \leq 5cm; N2: Metastase $>$ 5cm). 1988 wurde dieser Wert in der neueren Fassung unter Zusammenarbeit des AJCC mit dem UICC (= Union Internationale Contre le Cancer) auf 3cm nach unten korrigiert, obwohl keine wissenschaftlichen Arbeiten bekannt sind, die diese Grenzwerte rechtfertigen (Buzaid et al., 1998). Auch in der vorläufig neuesten Klassifikation des AJCC von 1992 (Tabelle 20, Seite 62) blieb der Grenzwert der Metastasengröße auf 3cm festgelegt (N1: Metastase \leq 3cm; N2: Metastase $>$ 3cm).

Im März 2000 wurde vom American Joint Committee on Cancer (Balch et al., 2000) eine neue TNM-Klassifikation vorgeschlagen (Tabelle 21, Seite 64).

Zusätzlich zu einigen anderen Änderungen wurde empfohlen, die Metastasengröße durch die Anzahl befallener Lymphknoten zu ersetzen (N1: 1LK befallen; N2: 2-3 LK befallen; N3: 4 oder mehr LK befallen).

1.4 Fragestellung

Gerade weil dem Auftreten von LK-Metastasen eine große prognostische Bedeutung zukommt, sollte in dieser Studie untersucht werden, ob sich Parameter für histologisch nachgewiesene Metastasen im SN bestimmen lassen, welche eine exaktere prognostische Einschätzung bezüglich des rezidivfreien Überlebens erlauben. Diese Parameter sollten auch nach routinemäßiger Aufarbeitung des SN (HE, S100, HMB 45) und durch jeden Histopathologen mit einfachen Mitteln zu bestimmen sein.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsschrift wurden deshalb die folgenden Fragestellungen untersucht:

- 1.) Lassen sich bei Patienten mit histologisch/immunhistologisch nachgewiesenen Melanometastasen im SN aufgrund der Metastasengröße (als größter Durchmesser in mm) Untergruppen mit unterschiedlicher Prognose bezüglich des rezidivfreien Überlebens definieren?
- 2.) Haben andere morphologische Parameter wie die Anzahl der Metastasen im SN und das paranodale Tumorwachstum eine prognostische Bedeutung für das rezidivfreie Überleben?
- 3.) Ist die Anzahl befallener Lymphknoten bedeutsam für das rezidivfreie Überleben?
- 4.) Haben die in Frage 1 und 2 genannten Parameter bzw. die Anzahl positiver SN einen Einfluß auf den Befall von NSN?
- 5.) Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Tumordicke und der Metastasengröße im SN bzw. der Anzahl befallener NSN?

2. Material und Methoden

2.1 Patientengut und Gruppeneinteilung

In einer retrospektiven Studie wurden 159 sentinel nodes (SN) von 99 Patienten mit klinisch unauffälligen Lymphabflußgebieten untersucht.

Im Zeitraum von August 1996 bis November 1999 wurden im Melanomregister der Tübinger Universitäts-Hautklinik 33 Patienten, deren SN in der Histologie und/oder Immunhistologie Melanommetastasen zeigten, identifiziert (Gruppe 1), von denen die benötigten Schnittpräparate zur Auswertung (siehe 1.4) zur Verfügung standen. Als Vergleichskollektive wurden jeweils Patientengruppen der gleichen Größe mit histopathologisch negativen, Tyrosinase-Reverse Transcriptase-PCR (Tyr-RT-PCR) positiven (Gruppe 2) sowie histologisch und Tyr-RT-PCR negativen SN (Gruppe 3) so ausgewählt, daß sich die Nachbeobachtungszeiträume entsprachen.

Gruppe 1 bildete die Zielgruppe, an welcher der prognostische Wert der unter 1.4 beschriebenen histomorphologischen Parameter untersucht wurde. Zweiunddreißig dieser Patienten erhielten in der Folge eine therapeutische Lymphknotendisektion (engl.: therapeutic lymph node dissection, TLND) der Lymphknotenregion, aus welcher der histologisch positive SN stammte. Ein Patient verweigerte diesen Eingriff.

Bei den Patienten aus Gruppe 2 und 3 wurde nur in der Anfangszeit der SN-Methode zusätzlich eine elektive Lymphknotendisektion (ELND) durchgeführt. Dies war bei 10 Patienten der Fall (6 aus Gruppe 2, 4 aus Gruppe 3).

Das rezidivfreie Überleben wurde definiert als der Zeitraum von der SN-Biopsie bis zum ersten Tumorrezidiv in Monaten, bzw., wenn die Patienten rezidivfrei blieben, bis zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung. Für die Prognose wurde das rezidivfreie Überleben gewertet, da die Nachbeobachtungszeit zu kurz war, um das Gesamtüberleben beurteilen zu können. Als Melanomrezidiv wurden Lokalrezidive, Satellitenmetastasen, Transitmetastasen, regionäre Lymphknotenmetastasen, Lymphknoten-Fernmetastasen, Haut-Fernmetastasen, Weichteilmetastasen und viscerale Fernmetastasen gewertet.

2.2 Darstellung des Lymphabflusses und Gewinnung des sentinel node

Um den Lymphabfluß aus dem Tumorgebiet und die Lymphknotenregion, in welche das Melanom drainiert, darzustellen, wurde präoperativ eine Lymphabflußszintigraphie durchgeführt, indem 100MBq eines mit ^{99m}Tc -markierten Nanokolloids (Tc-Nanocoll, Nycomed Amersham GmbH und CoKG, Braunschweig) in 4 bis 8 gleichen Teilen um den Primärtumor, bzw. wenn dieser bereits entfernt worden war, um die Excisionsnarbe herum intracutan injiziert wurden (bei SN-Biopsie innerhalb der nächsten 24 Stunden: 50MBq).

Anschließend wurde unter Abdeckung der Injektionsstellen mit einer Bleiplatte eine dynamische Sequenzszintigraphie mittels eines Parallel-Lochkollimators (Diacam, Siemens, Erlangen) durchgeführt. Die erste lokalisierbare Anreicherung der radioaktiven Nanokolloide wurde als SN gewertet und in 2 Ebenen auf der Haut markiert. Erfolgte die SN-Biopsie nicht später als 24 Stunden nach der Lymphabflußszintigraphie, so reichte bereits eine Dosis von 50MBq aus, ohne daß eine erneute präoperative Umspritzung mit radioaktiv markierten Kolloiden erforderlich war. Direkt vor dem Eingriff wurden 1-2ml Patentblau (Byk Gulden, Konstanz) intradermal injiziert. Die Lokalisierung des SN geschah intraoperativ mittels einer handgeführten Gamma-Sonde (C-Trak, CareWise, Morgan Hill, CA, USA). Als SN wurden jene Lymphknoten entfernt, welche die höchste in vivo Radioaktivität im Vergleich zum umliegenden Gewebe aufwiesen. Ein weiteres Erkennungszeichen war die Blaufärbung. Von Januar 1996 bis Februar 1997 wurde der SN nur mittels radioaktiv markierten Kolloiden ermittelt.

Hatte die Lymphabflußszintigraphie mehrere drainierende Lymphknotenregionen identifiziert, so wurden aus jedem dieser Lymphknotenbezirke ein oder mehrere SN gewonnen.

War ein SN histologisch positiv, so wurde bei diesen Patienten das gesamte Lymphknotengebiet, aus dem dieser SN stammte, ausgeräumt (TLND). Achtzehn der Patienten aus Gruppe 1 erhielten zusätzlich zur SN-Biopsie gleichzeitig eine komplette Ausräumung der Lymphknotenregion, um die SN Methode zu überprüfen.

2.3 Bearbeitung der SN

Zunächst wurden die SN entlang der Längsachse halbiert, wobei eine Hälfte in 5%igem Formalin fixiert wurde. Von dieser Hälfte wurden dann, jeweils nach Einbettung in Paraffin, drei Schnitte mit ca.4µm Dicke angefertigt, wovon einer eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung, die beiden anderen jeweils eine immunhistochemische Färbung mittels Antikörpern gegen S100 Protein bzw. HMB 45, erhielten. Die andere Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C aufbewahrt bis zur RNA Isolation für die Tyrosinase- Reverse Transcriptase-PCR (Tyr-RT-PCR).

2.4 Immunhistochemische Färbung (IH)

Die IH-Färbung nach der ABC-Methode (Hsu et al., 1981) stellt humane zelluläre Antigene durch entsprechende tierische Antikörper immunhistochemisch dar.

Zunächst wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Vor dem Aufbringen der Primärantikörper mußte die endogene Peroxidaseaktivität mittels Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung aufgehoben und möglicherweise vorhandene unspezifische Bindungsstellen für den Sekundärantikörper mit verdünntem Pferdeserum blockiert werden. Nun erfolgte das Auftragen der primären Antikörper gegen S100 bzw. HMB 45. Der anschließend aufgebrauchte, gegen die primären Antikörper gerichtete Sekundärantikörper, ist an seinem Fc-Anteil biotinyliert.

Dieses Biotinyliende reagierte im nächsten Schritt mit dem Avidin-Biotin-Complex (ABC-Komplex), welcher Peroxidase gebunden hat, die wiederum 3,3 Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) in verdünnter Wasserstoffperoxidlösung zu einem braun-roten Farbkomplex umsetzt, welcher lichtmikroskopisch nachgewiesen wird. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Schnitte mehrfach mit Tris Puffer gespült. Um eine bessere zelluläre Zuordnung des Farbkomplexes zu ermöglichen, erfolgte schließlich eine Kernfärbung mit Harris-Hämatoxylin als Gegenfärbung, bevor die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt eingedeckt wurden (genaues Vorgehen in Einzelschritten siehe Tabelle 26, Seite 73).

2.5 Histomorphometrische Parameter

An den IH-Schnitten der histologisch in HE und/oder Immunhistologie (IH: HMB 45 und S100) positiven SN aus Gruppe 1, in denen die Melanommetastase am besten sichtbar war, wurde jeweils die größte Ausdehnung der größten Metastase mittels Meßokular (Carl Zeiss, Jena, 5+ 100/100mm) gemessen. Das im Meßokular sichtbare Gitterraster wurde entsprechend dem größten Durchmesser der Metastase ausgerichtet. Die Anzahl der in einer Reihe liegenden Gitterkästchen, welche den größten Durchmesser der Metastase enthielten, konnten für die Größenbestimmung einfach abgezählt werden. Das Ergebnis wurde auf zuvor für jedes Vergrößerungsobjektiv erstellte Eichkurven übertragen, an denen man nun die Metastasengröße in Millimetern ablesen konnte.

Enthielten mehrere SN eines Patienten Metastasen, so wurde diejenige zur Auswertung herangezogen, welche die größte Ausdehnung zeigte.

Des Weiteren wurde sowohl die Lokalisation der Metastase(n) im Lymphknoten (SN) als auch die Anzahl der Metastasen, das Vorliegen paranodalen Tumorwachstums und die Anzahl der befallenen SN erfaßt.

Die mittels ELND gewonnenen non sentinel nodes (NSN) wurden anschließend histologisch mittels HE untersucht. Auch hier wurde die Anzahl der befallenen NSN, paranodales Tumorwachstum, die Größe und Anzahl der Metastasen sowie deren Lokalisation dokumentiert. Die Auswertung der NSN-Metastasen erfolgte dem Vorgehen bei den SN entsprechend.

2.6 Tyrosinase-Reverse Transcriptase-PCR

Zunächst mußte aus der bei -80°C asservierten Lymphknotenhälfte (LKH) die RNA isoliert werden. Dazu wurde die bereits grob zerkleinerte LKH in RNA-Clean (Firma AGS, Heidelberg) gegeben (2ml RNA-Clean/100mg Gewebe) und mechanisch homogenisiert (Biovortexer 1083, Biospec Products, Bartlesville, USA), bis die RNA-Clean-Lösung (= Phenol- Guanidium- Thiocyanat) gesättigt war. Nun wurde nochmals RNA-Clean dazupipettiert und nach der Zugabe von Chloroform erneut gevortext.

Nach einer kurzen Inkubation (15min) auf Eis, wurde das Gemisch bei 12000 Umdrehungen/min für 15min zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus, Osterode) und die wässrige Phase, welche die RNA enthält, in Eppendorfhütchen abpipettiert, wo sie mit gleicher Menge Isopropanol gemischt und erneut gerührt wurde. Anschließend an eine weitere Inkubationsphase auf Eis (15min) und nochmaliger Zentrifugation (12000 Umdrehungen/min, 15min) wurde der flüssige Überstand abpipettiert. Den verbleibenden Rest bildete das weißliche RNA-Pellet, welches in 1ml 70%igem Ethanol gereinigt und nach erneuter Zentrifugation (10000 Umdrehungen/min, 10min) auf dem Thermoblock (37°C) von Ethanolresten befreit wurde. Anschließend wurde die gewonnene RNA in TE-Puffer resuspendiert.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mittels Spektrometer (Genesys 5, Spectronic, USA) bei 260nm gegen einen Leerwert von TE-Puffer (Tabelle 27, Seite 74).

Zur Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurden 3000ng RNA in DEPC-Wasser mit einem Gemisch (Mix I, Tabelle 28, Seite 74) aus Puffer, Hexamer Primern, Trinukleotiden als den Bausteinen, aus denen die cDNA aufgebaut werden sollte, und DTT (Stabilisator) in Eppendorfgefäße gegeben. Nach der Denaturierung der RNA bei 70°C und 3minütiger Inkubation auf Eis wurde als Enzym die Reverse Transcriptase zugegeben und die Lösung bei 42°C für eine Stunde im Thermoblock inkubiert.

Während dieser Zeit synthetisierte die Reverse Transcriptase (RT) die cDNA als zur RNA komplementären DNA-Strang. Bei 70°C wurde die Reaktion gestoppt und das Gemisch zentrifugiert, um die cDNA abzutrennen.

Für die DNA-Amplifikation in der PCR wurde ein Gemisch (Mix II, Tabelle 29, Seite 75) aus Desoxyribonucleotiden, Taq-Puffer, Primer und Taq DNA Polymerase hergestellt und mit HPLC-Wasser auf 45,0µl aufgefüllt. Nach Zugabe der komplementären DNA wurden im Multicycler PTC 200 (Biozym, Oldendorf) 35 PCR-Zyklen (bis Mai 1999 waren es 30 Zyklen) durchlaufen.

Jeder Zyklus bestand aus 3 Teilen (Tabelle 30, Seite 75): Nach einem Hotstart bei 85°C wurden anschließend die cDNA-Stränge bei 94°C (60sec) denaturiert. Die Anlagerung (Annealing) der Primer erfolgte bei 55°C für Tyrosinase bzw. 56°C für GAPDH (jeweils 65sec), die DNA Polymerisation mittels Taq DNA Polymerase bei 72°C (65sec).

An diese ersten 35 Zyklen wurde eine nested PCR mit einer verringerten Konzentration der amplifizierten DNA (Mix III, Tabelle 29, Seite 75) und weiteren 35 Zyklen angeschlossen. Der Reaktionsansatz für diese „verschachtelte“ PCR war der gleiche wie Mix II, aber mit 2,0µl des Reaktionsproduktes aus der ersten PCR und nested Oligonucleotidprimern. Außerdem wurde hier der Mix mit HPLC-Wasser auf 48,0µl aufgefüllt.

Die strukturelle Intaktheit der cDNA wurde mittels GAPDH-PCR (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-PCR) nachgewiesen.

Mittels Gelelektrophorese (2%iges Agarosegel) bei 100-120Volt (400mA) für 1,5 Stunden und 20-30minütiger Inkubation in Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) wurde das PCR Produkt als typische fluoreszierende Bande unter UV Licht (Wellenlänge 312nm) sichtbar gemacht und fotografiert.

2.7 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm JMP V 4.0 der asknet AG, Karlsruhe. Für die Basisauswertung kamen Verfahren der deskriptiven Statistik zum Einsatz (unter anderem Median, Range, absolute und relative Häufigkeit). Für die Kontingenzanalyse wurde Fisher's Exact Test in der 4-Feldertafel angewandt. Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven, mit denen auch das rezidivfreie Überleben dargestellt wird, wurden mittels Log-Rank Test ausgewertet. Die hierbei errechneten p-Werte wurden als statistisch auffällig gewertet, wenn sie unter 0,05 lagen.

Die Berechnung des Konfidenzintervalls (CI) für die Grundwahrscheinlichkeit einer Binominalverteilung erfolgte nach Anleitung von Werner (Werner, 1984). Das CI definiert den Bereich, in dem der „wahre Wert“ der relativen Häufigkeit mit 95%iger Wahrscheinlichkeit liegt.

Die Balkendiagramme wurden mit Excel aus dem Office Paket von Windows 2000 erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Patientendaten

Untersucht wurden 159 SN von 99 Patienten, deren Krankheitsverlauf über mindestens 4 und maximal 45 Monate verfolgt wurde. Die mediane Nachbeobachtungszeit lag bei 20 Monaten.

Für den schnellen Überblick sind die folgenden Patientendaten in Tabelle 22, Seite 65 zusammengestellt.

Von den 99 Patienten waren 48 männlichen und 51 weiblichen Geschlechts. Das Alter lag zwischen 19 und 82 Jahren, im Median bei 52 Jahren. Der Primärtumor manifestierte sich bei 60 Patienten an den Extremitäten, bei 34 Patienten am Rumpf und bei 5 Patienten am Kopf. Häufigster Tumortyp war das superfiziell spreitende Melanom (SSM), welches bei 48 Patienten diagnostiziert wurde, gefolgt vom nodulären malignen Melanom (NMM) bei 38 Patienten, dem akrolentiginösen Melanom (ALM) bei 9 Patienten und dem Lentigo-maligna Melanom (LMM) bei 2 Patienten. Die Melanome zweier Patienten ließen sich nicht nach diesem Schema klassifizieren und wurden unter „sonstige“ zusammengefaßt. Die Tumordicken (TD) nach Breslow erstreckten sich von 0,25mm bis 15,0mm bei einem Median von 2,0mm. Zwei Patienten zeigten eine Tumordicke <0,76mm, bei 29 Patienten wurde eine Tumordicke zwischen 0,76 und 1,5mm, 50 mal eine TD von 1,51 bis 4,0mm und in 17 Fällen eine TD >4,0mm gemessen. Bei einem Patienten lag keine Angabe zur TD vor. Bezogen auf die Eindringtiefe der Melanomzellen fand sich bei unserem Patientenkollektiv ein Patient mit Clark-Level (CL) II. In 16 Fällen trat CL III auf. 63 mal lag CL IV und 8 mal CL V vor. Bei 11 Patienten fehlte die Angabe des CL. Die Melanome von 41 der 99 Patienten wiesen eine Ulzeration auf. In 4 Fällen waren keine Angaben zur Ulzeration des Primärtumors (PT) gemacht worden. Die Primärtumore der restlichen 54 Patienten zeigten keine Ulzeration.

Diese 99 Patienten gliedern sich gemäß dem SN-Status in drei Gruppen.

Der Gruppe 1 wurden 33 Patienten zugeordnet, welche in mindestens einem SN eine histologisch (in HE und/oder IH) sichtbare und meßbare Metastase bzw. ein Melanomzellnest mit isolierten Tumorzellen (ITC) aufwiesen und auf die sich deshalb der größte Teil der Auswertung bezieht. Als ITC wurden einzelne oder in kleinen Gruppen (Nester) in den Rand- und Intermediärsinus locker beieinanderliegende Melanomzellen gewertet, die kein invasives Wachstum zeigten.

In der Folge erhielten 32 dieser Patienten eine vollständige Ausräumung des entsprechenden Lymphknotengebietes, aus welchem der histologisch positive SN stammte (ELND). Ein Patient verweigerte diesen Eingriff.

Als Vergleichsgruppen diente Gruppe 2 mit 33 Patienten, deren SN in der Histologie negativ waren, bei denen jedoch in mindestens einem SN Tyrosinase exprimierende Zellen mittels Tyrosinase-Reverse Transcriptase-PCR (Tyr-RT-PCR) nachweisbar waren und Gruppe 3 mit weiteren 33 Patienten deren SN sowohl in der Histologie, als auch mittels Tyr-RT-PCR negativ waren.

Bei den Patienten aus Gruppe 2 und 3 wurde nur in der Anfangszeit der SN-Methode eine ELND durchgeführt. Dies war bei 6 Patienten aus Gruppe 2 und bei 4 Patienten aus Gruppe 3 der Fall.

Die Patientenangaben der einzelnen Gruppen sind in den Tabellen 23-25 (Seite 67-71) unter der Angabe mit/ohne Rezidiv dargestellt.

3.2 Angaben über den SN und die NSN

In den 33 Patienten der Gruppe 1 wurden insgesamt 53 SN entfernt und untersucht. Pro Patient wurden zwischen 1 und 3 SN entfernt. Bei 18 Patienten war 1 SN, bei 13 Patienten 2 und bei 3 Patienten 3 SN extirpiert worden. So ergab sich im Median eine Extirpationsrate von einem SN pro Patient. Dreiundvierzig dieser 53 SN waren in der Histologie positiv. Pro Patient waren 1-3 SN positiv. Vierundzwanzig der 33 Patienten wiesen einen, 8 Patienten zwei und 1 Patient drei positive SN auf. Im Median lag pro Patient ein befallener SN vor.

Die histologische Untersuchung schloß zusätzlich zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) routinemäßig die immunhistochemischen Färbungen (IH) mit Antikörpern gegen das S100 Protein und gegen HMB 45 mit ein.

Von den 43 histologisch positiven SN der 33 Patienten wurden 29 SN (67,4%) aus 22 Patienten bereits in der HE-Färbung diagnostiziert. Die Melanommetastasen in den restlichen 14 SN (32,6%) von 14 Patienten konnten nur mittels Immunhistochemie identifiziert werden. Alle 43 SN waren in der IH positiv. Acht SN zeigten in der IH nur mittels S100, ein SN nur mittels HMB 45 eine positive Reaktion.

An den Schnitten der befallenen SN wurde jeweils die größte Ausdehnung der größten Metastase als Durchmesser (D) in Millimetern (mm) gemessen. Enthielten mehrere SN eines Patienten Metastasen, so wurde nur die Metastase mit der größten Ausdehnung gewertet. Die Metastasengrößen reichten von 0,1mm bis 23,0mm. Der Median lag bei 3,6mm. Bei zwei Patienten wurden isolierte Tumorzellen (ITC) gefunden. Auch hier wurde die größte Ausdehnung dieser Melanomzellnester vermessen. Es ergaben sich Werte von 0,1 bzw. 0,4mm.

Von den 33 Patienten, deren SN Metastasen aufwiesen, zeigten 12 Patienten eine unifokale Metastasierung. Diese Patienten zeigten eine einzelne isolierte Metastase in den befallenen SN (n = 10) oder ITC (n = 2). Lagen in den positiven SN hingegen mehrere Metastasen vor (n = 16), oder waren SN sub-/total destruiert (n = 5), so wurde dies als multifokale Metastasierung (n = 21) gewertet. Während die ITC sich im Randsinus der SN befanden, zeigten die meisten Metastasen eine vom RS bzw. von den Intermediärsinus ausgehende Infiltration in Richtung des Lymphknoten zentrums. Paranodales, kapselüberschreitendes Wachstum trat bei 7 (21,2%) der 33 Patienten auf.

Die gesamte Anzahl mittels ELND gewonnener NSN aus 32 Patienten der Gruppe 1 betrug 331. Ein Patient hatte diesen Eingriff verweigert. Die pro Patient gewonnene NSN-Anzahl schwankte zwischen 2 und 29 und lag im Median bei 8.

Bei der histologischen Untersuchung dieser NSN mittels HE fanden sich 27 positive NSN bei 8 Patienten. Drei Patienten zeigten jeweils einen, 2 Patienten zwei und jeweils ein Patient 4, 6 bzw. 10 positive NSN.

Waren NSN befallen, so enthielten diese in aller Regel große Metastasen. Viele NSN waren subtotal oder total destruiert. Die Metastasengrößen reichten von 2,7-19mm bei einem Median von 8,0mm. Das Ausmessen der Metastasen in den NSN erfolgte in der gleichen Weise wie bei den SN. Bei 5 Patienten hatten hier die Melanomzellen die Lymphknotenkapsel überschritten.

Von den 33 Patienten der Gruppe 1 (Tabellen 1-3, Seite 19-24) entwickelten 16 (48,5%) im Beobachtungszeitraum ein Tumorrezidiv. 14 Rezidive (87,5 %) ereigneten sich bereits in den ersten 12 Monaten, die zwei weiteren nach 13 bzw. 24 Monaten. Sieben der Patienten sind im Beobachtungszeitraum am Melanom verstorben.

Insgesamt 55 SN wurden bei den 33 Patienten der Gruppe 2 extirpiert. Die Anzahl pro Patient lag zwischen 1 und 5 SN. Im Median war dies ein SN. Bei 20 Patienten war ein SN, bei 8 Patienten waren 2, bei 3 Patienten 3 und bei 2 Patienten 5 SN entfernt worden. Alle 55 SN waren in der Histologie (HE + IH) negativ, jedoch lag bei jedem Patienten mindestens ein in der Tyrosinase-Reverse Transcriptase-PCR positiver SN vor. Insgesamt waren 41 der 55 untersuchten SN in der PCR positiv. Pro Patient waren dies zwischen einem und drei SN. Bei 27 Patienten lag ein in der PCR positiver SN vor. Vier Patienten zeigten 2, 2 Patienten 3 molekularbiologisch positive SN. Im Median wiesen die Patienten einen positiven SN auf. Nur in der Anfangszeit der SN- Methode erhielten Patienten mit histologisch negativem SN eine ELND, um die Sicherheit dieser Methode zu überprüfen. Dies war bei 6 Patienten dieser Gruppe der Fall, bei denen insgesamt 48 NSN entfernt wurden. Pro Patient wurden zwischen 5 und 11 NSN entfernt. Im Median waren dies 8 NSN pro Patient. Drei Patienten wiesen jeweils einen in der PCR positiven NSN auf, in der Histologie waren jedoch alle NSN negativ. Von den 33 Patienten der Gruppe 2 erlitten 4 (12%) ein Melanomrezidiv (Tabelle 4, Seite 25). Verstorben ist im Beobachtungszeitraum keiner dieser Patienten.

In der Gruppe 3 wurden bei den 33 Patienten 51 SN extirpiert und untersucht. Pro Patient waren dies zwischen einem und drei SN bei einem Median von einem SN. Aus 20 Patienten war ein SN, aus 8 Patienten 2 und aus 5 Patienten 3 SN gewonnen worden. Alle 51 SN zeigten weder in der Histologie noch in der PCR einen Hinweis auf Melanomzellen.

Auch in dieser Gruppe wurde in der Anfangsphase der SN-Methode eine ELND durchgeführt. Dies war bei 4 der 33 Patienten der Fall. Dabei wurden 22 NSN gewonnen, die ebenfalls in Histologie und PCR negativ waren. Drei Patienten (9%) dieser Gruppe entwickelten im Verlauf ein Tumorrezidiv (Tabelle 5, Seite 26), keiner dieser Patienten verstarb in der Nachbeobachtungsphase.

In den folgenden Tabellen werden zunächst nähere Informationen zu Primärtumor, SN, NSN und Verlauf all jener Patienten (aus Gruppe 1) gegeben, die kein Melanomrezidiv entwickelten (Tabelle 1 und 2). Daran schließt sich eine Tabelle an, die Auskunft gibt über die Patienten aus Gruppe 1, welche im Beobachtungszeitraum ein Tumorrezidiv erlitten (Tabelle 3). In den Tabellen 4 und 5 sind die Patienten aus den Gruppen 2 und 3 aufgelistet, bei denen ein Tumorrezidiv auftrat.

Tabelle 1: Patienten aus Gruppe 1 mit Metastasengrößen $\leq 0,5$ mm bzw. ITC ohne Rezidiv

Nr	G	A	Lok PT	MM-Typ	TD	Ulz	Lok SN	Anz SN+	Lok Met	Anz Met	D	Anz NSN+
1	m	50	re Oberarm	SSM	2,7	nein	re ax	1	RS + Stroma	unifokal	0,1	0
2	w	58	li Fuß	ALM	2,4	ja	li ing	1	RS + Stroma	unifokal	0,1	0
3	w	64	li Bein (US)	SSM	2,5	ja	li ing	1	RS	ITC	0,1	0
4	m	50	Thorax li	SSM	1,3	ja	li ax	1	RS + Stroma	unifokal	0,1	0
5	w	21	re Arm	NMM	4,0	ja	re ax	1	RS + Stroma	unifokal	0,2	0
6	m	67	Rima ani	NMM	2,0	nein	li ing	1	RS + Stroma	unifokal	0,2	0
7	m	55	li Bein (US)	Sonstige	2,3	nein	li ing	1	RS + Stroma	unifokal	0,3	0
8	m	57	li Schulter	SSM	1,3	nein	li ax	1	RS	ITC	0,4	1
9	w	61	re Bein (US)	NMM	2,6	ja	re ing	1	RS + Stroma	multifokal	0,5	0

Nr = Nummer; **G** = Geschlecht; w = weiblich; m = männlich; **A** = Alter in Jahren; **Lok PT** = Lokalisation des Primärtumors; li = links; re = rechts; US = Unterschenkel; **MM-Typ** = histologischer Tumortyp; **TD** = Tumordicke in mm; **Ulz** = Ulzeration; **Lok SN** = Lokalisation des SN; ing = inguinal; ax = axillär; **Anz SN +** = Anzahl positiver SN; **Lok Met** = Lokalisation der Metastasen im SN; RS = Randsinus; **Anz Met** = Befall des SN: unifokal/multifokal; ITC = isolierte Tumorzellen; **D** = Durchmesser der größten Metastase im SN in mm; **Anz NSN+** = Anzahl befallener NSN

Tabelle 2: Patienten aus Gruppe 1 mit Metastasengrößen >0,5mm ohne Rezidiv

Nr	G	A	Lok PT	MM-Typ	TD	Ulz	Lok SN	Anz SN+	Lok Met	Anz Met	D	Anz NSN+
10	m	65	re Oberarm	NMM	15,0	ja	re ax	1	RS + Stroma	unifokal	2,0	0
11	m	36	li Unterarm	NMM	k.A.	k.A.	li ax	1	RS + Stroma	multifokal	2,7	0
12	m	46	li Bein (OS)	NMM	2,2	nein	li ing	1	RS + Stroma	multifokal	3,0	0
13	w	46	li Fuß	NMM	4,1	ja	li ing	1	IMS + Stroma	multifokal	3,3	0
14	w	22	Rücken	NMM	10,0	ja	re ax	1	RS + Stroma	multifokal	6,0	0
15	w	35	re Bein (OS)	NMM	3,6	nein	re ing	2	RS + Stroma	multifokal	8,0	0
16	m	37	re Oberarm	NMM	7,0	nein	re ax	2	RS + Stroma	multifokal	7,0	0
17	w	38	Rücken	NMM	5,6	nein	re ax	1	RS + Stroma	subtotal	9,0	2

Nr = Nummer; **G** = Geschlecht; w = weiblich; m = männlich; **A** = Alter in Jahren; **Lok PT** = Lokalisation des Primärtumors; li = links; re = rechts; OS = Oberschenkel; **MM-Typ** = histologischer Tumortyp; **TD** = Tumordicke in mm; **Ulz** = Ulzeration; k.A. = keine Angabe; **Lok SN** = Lokalisation des SN; ing = inguinal; ax = axillär; **Anz SN +** = Anzahl positiver SN; **Lok Met** = Lokalisation der Metastasen im SN; RS = Randsinus; IMS = Intermediärsinus **Anz Met** = Befall des SN: unifokal/multifokal/subtotal; **D** = Durchmesser der größten Metastase im SN in mm; **Anz NSN+** = Anzahl befallener NSN

Tabelle 3 : Patienten aus Gruppe 1 mit Metastasengrößen >0,5mm mit Rezidiv

Nr	G	A	Lok PT	MM-Typ	TD	Ulz	Lok SN	Anz SN+	Lok Met	Anz Met	D	Anz NSN+	T bis 1. Rezidiv	Lok 1. Rezidiv
18	m	76	li Fuß	ALM	4,5	k.A.	li ing	1	RS + Str.	multifok	0,6	0	24	Transitm.
19	m	22	re Schulter	NMM	5,3	ja	re ax	2	RS + Str.	multifok	0,8	0	6	reg. LK-M.
20	w	52	re Fuß	NMM	3,2	ja	re ing	1	RS + Str.	multifok	1,2	0	6	Transitm.
21	w	41	li Stirn	LMM	2,5	nein	li retroauric	2	RS + Str.	multifok	3,6	10	5	Transitm.
22	w	66	re Fuß	Sonstige	2,5	ja	re ing	1	RS + Str.	multifok	3,8	4	2	visc. FM (Leber)
23	m	71	li Fuß	NMM	9,0	ja	li ing	1	RS + Str.	unifok	3,9	0	5	Lokalrezidiv
24	m	76	re Fuß	NMM	9,0	ja	re ing	2	RS + Str.	multifok	4,1	0	1	Transitm.

Nr = Nummer; **G** = Geschlecht; w = weiblich; m = männlich; **A** = Alter in Jahren; **Lok PT** = Lokalisation des Primärtumors; li = links; re = rechts; **MM-Typ** = histologischer Tumortyp; **TD** = Tumordicke in mm; **Ulz** = Ulzeration; k.A. = keine Angabe; **Lok SN** = Lokalisation des SN; ing = inguinal; ax = axillär; retroauric = retroaurikulär; **Anz SN +** = Anzahl positiver SN; **Lok Met** = Lokalisation der Metastasen im SN; RS = Randsinus; Str.= Stroma; **Anz Met** = Befall des SN: unifok = unifokal; multifok = multifokal; **D** = Durchmesser der größten Metastase im SN in mm; **Anz NSN+** = Anzahl befallener NSN; **T bis 1. Rezidiv** = Zeit von SN-OP bis zum ersten Rezidiv in Monaten; **Lok 1. Rezidiv** = Lokalisation des ersten Tumorrezidivs; Transitm. = Transitmetastase; reg. LK-M. = regionäre Lymphknotenmetastasen; visc. FM = viscerale Fernmetastasen

Fortsetzung Tabelle 3: Patienten aus Gruppe 1 mit Metastasengrößen >0,5mm mit Rezidiv

Nr	G	A	Lok PT	MM-Typ	TD	Ulz	Lok SN	Anz SN+	Lok Met	Anz Met	D	Anz NSN+	T bis 1. Rezidiv	Lok 1. Rezidiv
28	w	66	re Rücken	SSM	5,0	nein	re ax	1	RS + Str.	unifok	7,0	1	5	Transitm.+ Satellitenm.
29	m	52	re Fuß	ALM	4,2	ja	re ing	2	RS + Str.	multifok	9,0	0	2	Satellitenm.
30	m	63	li Brust	NMM	6,0	ja	re ax	3	RS + Str.	subtotal	12,0	0	13	Transitm. + Satellitenm.
31	m	54	li Fuß	ALM	2,0	ja	li ax	2	RS + Str.	subtotal	14,0	0	12	reg. LK-M.+ visc. FM (Lunge + Leber)

Nr = Nummer; **G** = Geschlecht; w = weiblich; m = männlich; **A** = Alter in Jahren; **Lok PT** = Lokalisation des Primärtumors; li = links; re = rechts; **MM-Typ** = histologischer Tumortyp; **TD** = Tumordicke in mm; **Ulz** = Ulzeration; **Lok SN** = Lokalisation des SN; ing = inguinal; ax = axillär; **Anz SN +** = Anzahl positiver SN; **Lok Met** = Lokalisation der Metastasen im SN; RS = Randsinus; Str.= Stroma; **Anz Met** = Befall des SN: unifok = unifokal; multifok = multifokal; subtotal; **D** = Durchmesser der größten Metastase im SN in mm; **Anz NSN+** = Anzahl befallener NSN; **T bis 1. Rezidiv** = Zeit von SN-OP bis zum ersten Rezidiv in Monaten; **Lok 1. Rezidiv** = Lokalisation des ersten Tumorrezidivs; Transitm. = Transitmetastase; Satellitenm. = Satellitenmetastase; reg. LK-M. = regionäre Lymphknotenmetastasen; visc. FM = viscerale Fernmetastasen

Fortsetzung Tabelle 3: Patienten aus Gruppe 1 mit Metastasengrößen >0,5mm mit Rezidiv

Nr	G	A	Lok PT	MM-Typ	TD	Ulz	Lok SN	Anz SN+	Lok Met	Anz Met	D	Anz NSN+	T bis 1. Rezidiv	Lok 1. Rezidiv
32	w	34	re Gesäß	NMM	15,0	k.A.	re ing	1	RS + Str.	subtotal	16,0	2	3	Lokalrezidiv + visc. FM (Leber + Milz)
33	w	49	re Bauch	NMM	3,4	ja	re ax	2	RS + Str.	total	23,0	0	5	reg. LK-M.+ subcutane M. (re Oberarm)

Nr = Nummer; **G** = Geschlecht; w = weiblich; **A** = Alter in Jahren; **Lok PT** = Lokalisation des Primärtumors; re = rechts; **MM-Typ** = histologischer Tumortyp; **TD** = Tumordicke in mm; **Ulz** = Ulzeration; k.A. = keine Angabe; **Lok SN** = Lokalisation des SN; ing = inguinal; ax = axillär; **Anz SN +** = Anzahl positiver SN; **Lok Met** = Lokalisation der Metastasen im SN; RS = Randsinus; Str.= Stroma; **Anz Met** = Befall des SN: sub-/total; **D** = Durchmesser der größten Metastase im SN in mm; **Anz NSN+** = Anzahl befallener NSN; **T bis 1. Rezidiv** = Zeit von SN-OP bis zum ersten Rezidiv in Monaten; **Lok 1. Rezidiv** = Lokalisation des ersten Tumorrezidivs; visc. FM = viscerale Fernmetastasen; reg. LK-M. = regionäre Lymphknotenmetastasen; M. = Metastase

Tabelle 4: Patienten aus Gruppe 2 mit Rezidiv

	Nr	G	A	Lok PT	MM-Typ	TD	Ulz	Lok SN	Anz SN+	SN	Anz NSN+	T bis 1. Rezidiv	Lokalisation 1. Rezidiv
Gruppe 2	34	w	60	re Knie	NMM	3,0	ja	re ing	1	PCR +	1PCR+	4	Transitmetastasen
	35	w	33	re Flanke	SSM	2,0	ja	re ax	3	PCR +	n.u.	14	Haut-FM (re Brust + re Schulter)
	36	w	50	li Wade	NNM	3,5	ja	li ing	1	PCR +	n.u.	3	reg. LK-M.
	37	w	46	re Oberschenkel	SSM	2,2	nein	re ing	1	PCR +	n.u.	9	reg. LK-M.

Gruppe 2: SN nur in der PCR positiv (PCR+). Nur in der Anfangszeit der SN-Methode wurde in dieser Gruppe eine ELND durchgeführt, deshalb lagen nicht bei allen Patienten NSN zur Untersuchung vor (nicht untersucht = n.u.). Bei Patient 34 war von 11 NSN einer in der PCR positiv.

Nr = Nummer; **G** = Geschlecht; w = weiblich; **A** = Alter in Jahren; **Lok PT** = Lokalisation des Primärtumors; re = rechts; li = links; **MM-Typ** = histologischer Tumortyp; **TD** = Tumordicke in mm; **Ulz** = Ulzeration; **Lok SN** = Lokalisation des SN; ing = inguinal; ax = axillär; **Anz SN +** = Anzahl positiver SN; **SN** = Status des SN; **Anz NSN+** = Anzahl befallener NSN; **T bis 1. Rezidiv** = Zeit von SN-OP bis zum ersten Rezidiv in Monaten; **Lok 1. Rezidiv** = Lokalisation des ersten Tumorrezidivs; Haut-FM = Haut-Fernmetastasen; reg. LK-M. = regionäre Lymphknotenmetastasen

Tabelle 5: Patienten aus Gruppe 3 mit Rezidiv

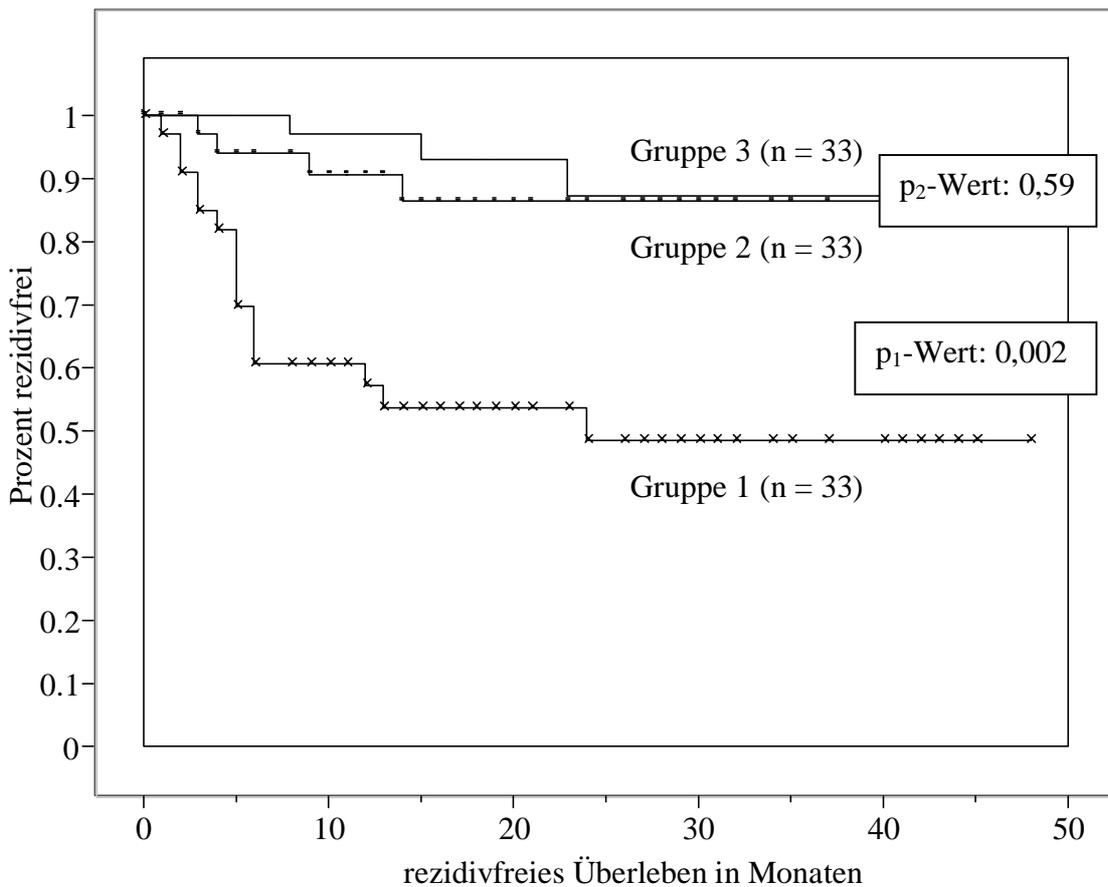
	Nr	G	A	Lok PT	MM-Typ	TD	Ulz	Lok SN	Anz SN+	SN	Anz NSN+	T bis 1. Rezidiv	Lokalisation 1. Rezidiv
Gruppe 3	38	m	27	re Wade	SSM	1,6	nein	re ing	0	SN neg.	n.u.	23	Transitmetastasen
	39	m	49	li Fuß	ALM	1,3	nein	li ing	0	SN neg.	n.u.	15	Lokalrezidiv
	40	w	67	re Oberarm	NMM	2,9	ja	re ax	0	SN neg.	n.u.	8	Satellitenmetastasen

Gruppe 3: SN in Histologie und PCR negativ (SN neg). Auch in dieser Gruppe wurde nur in der Anfangszeit der SN-Methode eine ELND durchgeführt, deshalb lagen nicht bei allen Patienten NSN zur Untersuchung vor (nicht untersucht = n.u.). Bei keinem der Patienten mit Rezidiv waren NSN extirpiert und untersucht worden.

Nr = Nummer; **G** = Geschlecht; w = weiblich; m = männlich; **A** = Alter in Jahren; **Lok PT** = Lokalisation des Primärtumors; re = rechts; li = links; **MM-Typ** = histologischer Tumortyp; **TD** = Tumordicke in mm; **Ulz** = Ulzeration; **Lok SN** = Lokalisation des SN; ing = inguinal; ax = axillär; **Anz SN +** = Anzahl positiver SN; **SN** = Status des SN; **Anz NSN+** = Anzahl befallener NSN; **T bis 1. Rezidiv** = Zeit von SN-OP bis zum ersten Rezidiv in Monaten; **Lok 1. Rezidiv** = Lokalisation des ersten Tumorrezidivs

3.3 Vergleich der Verläufe von Gruppe 1 mit denen der Vergleichsgruppen
 Vergleicht man zunächst das rezidivfreie Überleben der Patienten in deren SN sich histologisch faßbare Metastasen bzw. bei zwei Patienten isolierte Tumorzellen (ITC) fanden (Gruppe 1) mit dem rezidivfreien Überleben der Patienten, deren SN nur in der PCR positiv (Gruppe 2) bzw. histologisch und in der PCR negativ waren (Gruppe 3), so ergeben sich die in Diagramm 1 dargestellten Kaplan-Meier-Kurven.

Diagramm 1



P_1 gibt den Unterschied zwischen Gruppe 1 und 2, p_2 die Differenz zwischen Gruppe 2 und 3 wieder.

Während sich in Gruppe 1 von 33 Patienten bei 16 (48,5%) ein Melanomrezidiv entwickelte, erlitten nur 4 von den 33 Patienten (12%) der Gruppe 2 und 3 von den 33 Patienten (9%) der Gruppe 3 ein Tumorrezidiv.

Gruppe 1 zeigt in Diagramm 1 den schlechtesten Verlauf. Die Patienten der Gruppen 2 und 3, weisen deutlich bessere und in unserem Patientenkollektiv sehr ähnliche Verläufe auf (p-Wert: 0,59), was das rezidivfreie Überleben anbetrifft.

3.4 Einfluß der Metastasengröße im SN auf das rezidivfreie Überleben

Im folgenden sollen nun verschiedene morphologische Parameter der histologisch/immunhistologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen auf ihre prognostische Bedeutung für das rezidivfreie Überleben hin untersucht werden.

Bei den zwei Patienten mit isolierten Tumorzellen (ITC) wurde jeweils die größte Ausdehnung der Melanomzellnester gemessen (0,1 bzw. 0,4 mm).

Von den 33 Patienten der Gruppe 1 entwickelten 16 (48,5%) im Beobachtungszeitraum ein Melanomrezidiv. Alle diese Patienten hatten eine Metastasengröße >0,5mm. Bei Metastasengrößen >10mm kam es in allen Fällen zu einem Tumorrezidiv.

Von den 17 rezidivfreien Patienten war bei 8 Patienten (Tabelle 2, Seite 20) die Metastasengröße >0,5mm (2,0-9,0mm). Bei den restlichen 9 Patienten hingegen zeigte sich eine Metastasengröße ≤0,5mm bzw. ITC (Tabelle 1, Seite 19).

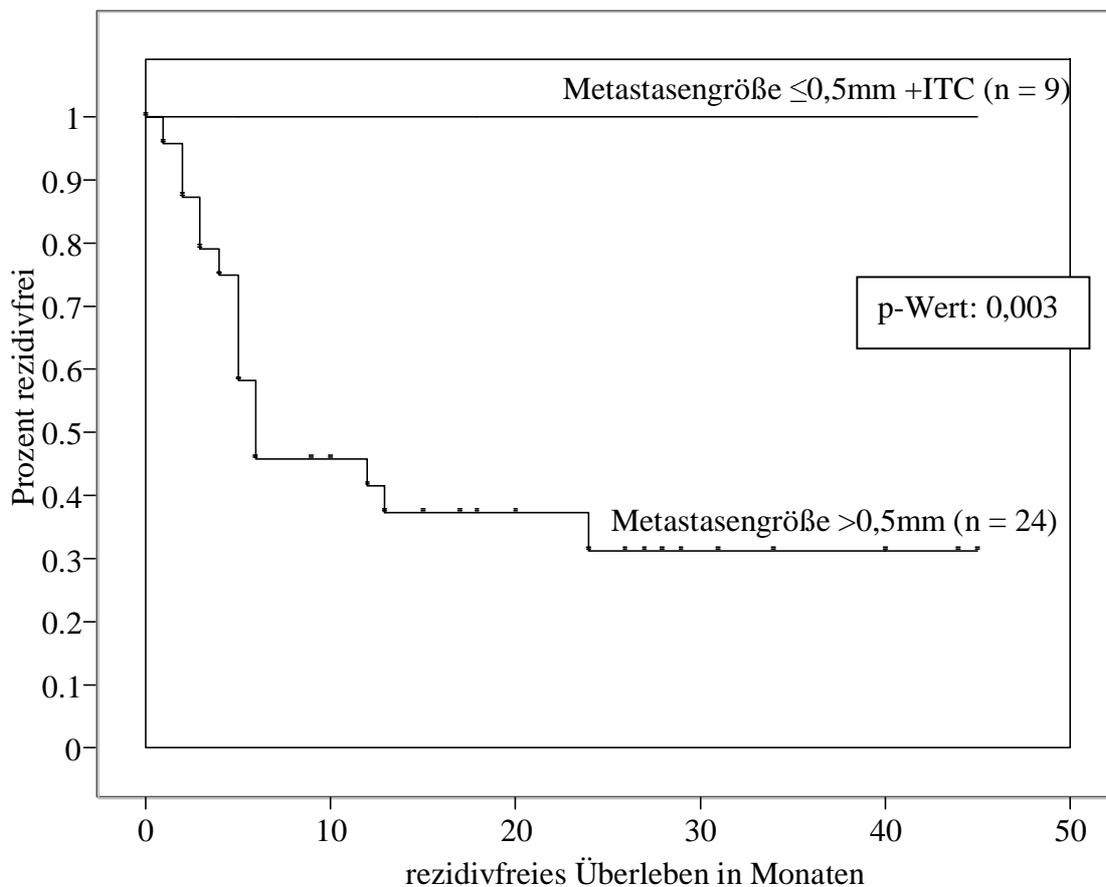
Tabelle 6: Gliederung der Patienten nach der Metastasengröße

Metastasengröße	n	n mit Rezidiv	n ohne Rezidiv
≤0,5mm (+ ITC)	9	0	9 (100%)
>0,5mm <10mm	20	12 (60%)	8 (40%)
>10mm	4	4 (100%)	0

Da kein Patient mit einer Metastasengröße im SN $\leq 0,5\text{mm}$ im Beobachtungszeitraum ein Tumorrezidiv zeigte, wurde dieser Wert als Grenzwert („cut- off- point“) für die nachfolgenden statistischen Berechnungen gewählt.

Gliedert man die Patienten der Gruppe 1 nach der Metastasengröße entsprechend diesem Grenzwert in zwei Metastasengrößengruppen, so ergibt sich für das rezidivfreie Überleben die folgende Kaplan-Meier-Kurve.

Diagramm 2



Die obere Kurve in Diagramm 2 zeigt die Verläufe der 9 Patienten mit Metastasengrößen im SN $\leq 0,5\text{mm}$ (inklusive der 2 Patienten mit ITC), von denen keiner ein Melanomrezidiv erlitt. Die untere Kurve stellt die Verläufe der 24 Patienten mit Metastasengrößen $>0,5\text{mm}$ dar. In 16 Fällen (66,7%) kam es hier zu einem Tumorrezidiv (Konfidenzintervall, CI: 45%- 84%).

3.5 Einfluß der Metastasenanzahl im SN auf das rezidivfreie Überleben

Bei der Anzahl der Metastasen wurde eine unifokale Metastasierung von einer multifokalen Metastasierung unterschieden. ITC wurden als unifokale Metastasen betrachtet.

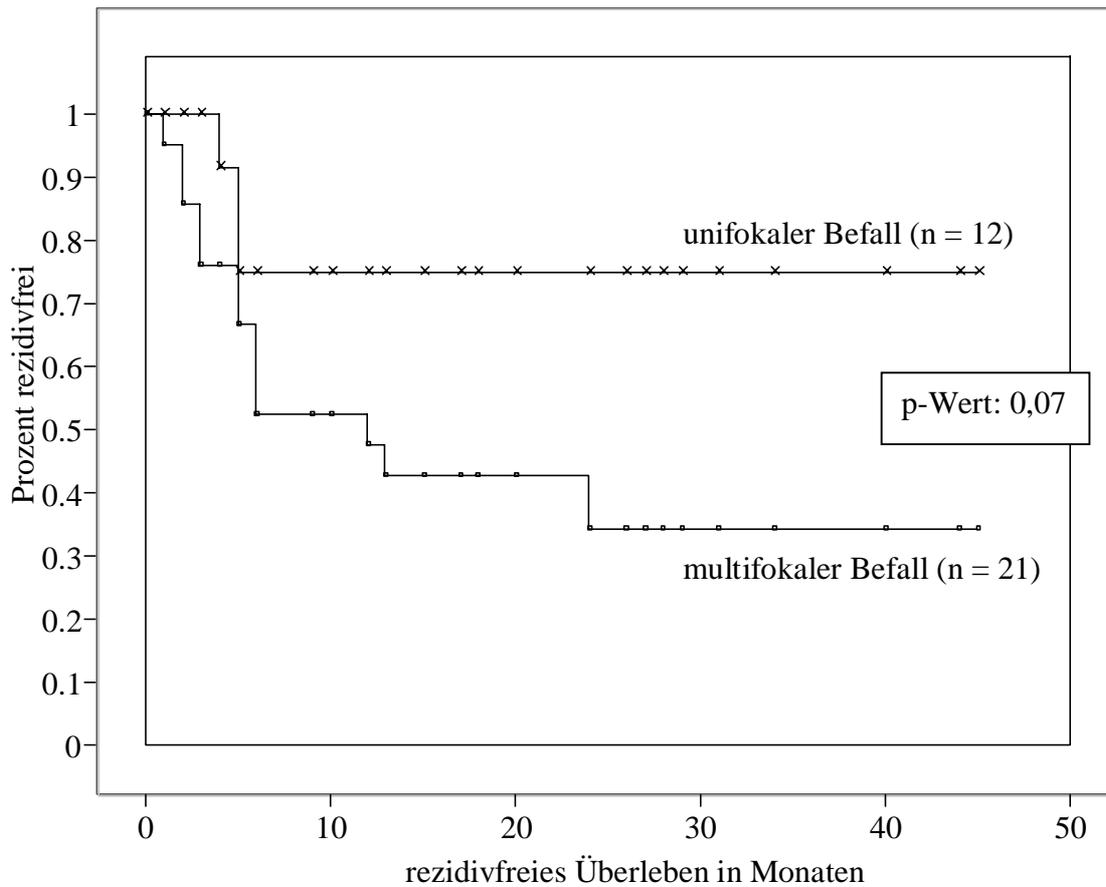
Einundzwanzig der 33 Patienten aus Gruppe 1 zeigten einen multifokalen SN-Befall. Von diesen erlitten 13 (61,9%) ein Melanomrezidiv. Von den 12 Patienten mit unifokaler Metastasierung entwickelten 3 (25,0%) ein Tumorrezidiv, welches in allen 3 Fällen zunächst lokal auftrat. Zweimal kam es zu Transitmetastasen, einmal zu einem Lokalrezidiv.

Tabelle 7: Gliederung der Patienten nach der Metastasenanzahl

Anzahl der Metastasen	n	n mit Rezidiv
unifokaler Befall	12	3 (25,0%)
multifokaler Befall	21	13 (61,9%)

Berechnet man die Kaplan-Meier-Kurven der Patientenverläufe mit unifokalem, bzw. multifokalem SN-Befall, so ergibt sich Diagramm 3.

Diagramm 3



Im Schaubild zeigen die Patienten bei denen eine multifokale SN-Beteiligung vorlag eine ungünstigere Entwicklung als die Patienten mit unifokalem SN-Befall.

3.6 Einfluß des paranodalen Tumorwachstums auf das rezidivfreie Überleben

Sieben der 33 Patienten aus Gruppe 1 wiesen kapselüberschreitendes, also paranodales Tumorwachstum auf. Von diesen erlitten 6 (85,7%) ein Melanomrezidiv.

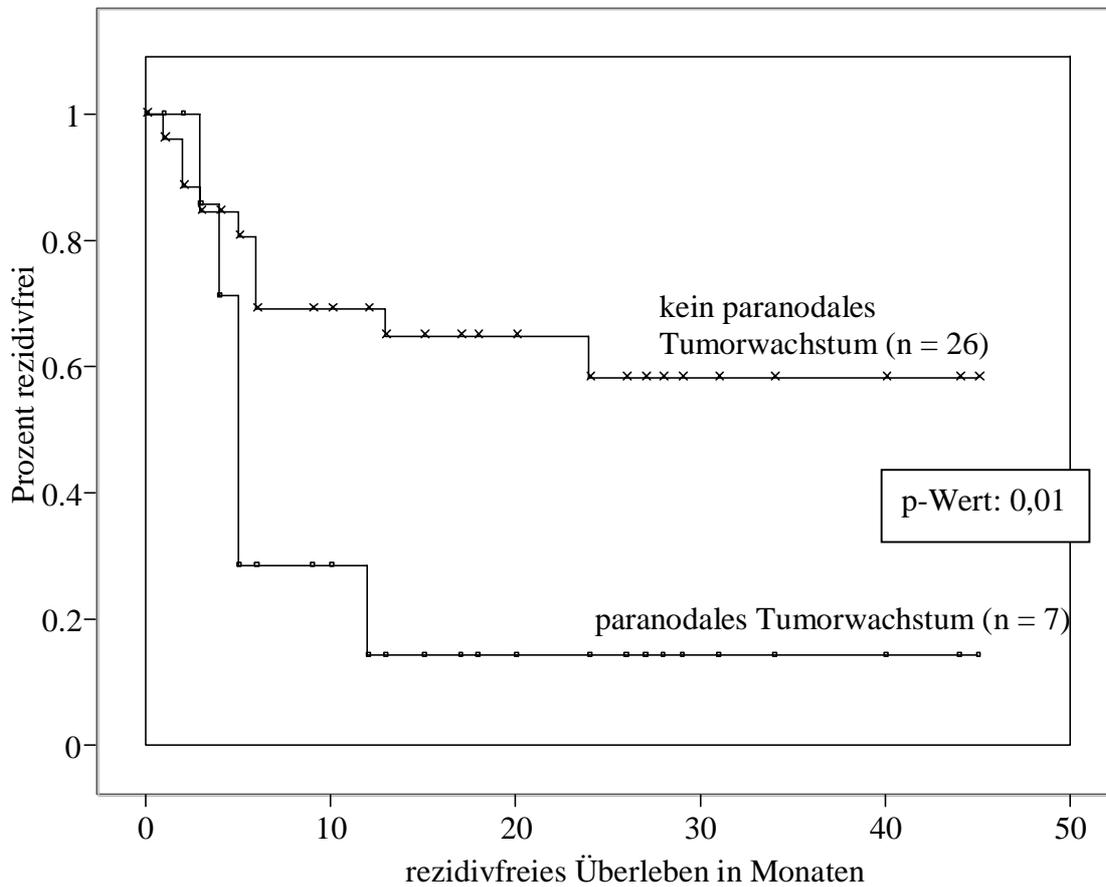
Die restlichen 26 Patienten zeigten keinen Kapseldurchbruch. In 10 dieser Fälle (38,5%) kam es zu einem Tumorrezidiv.

Tabelle 8: Gliederung der Patienten nach paranodalem/
nicht paranodalem Tumorwachstum

	n	n mit Rezidiv
kein paranodales Tumorwachstum	26	10 (38,5%)
paranodales Tumorwachstum	7	6 (85,7%)

Berechnet man die Kaplan-Meier-Kurven für die Patienten mit bzw. ohne paranodales Tumorwachstum, so ergibt sich das folgende Diagramm 4.

Diagramm 4



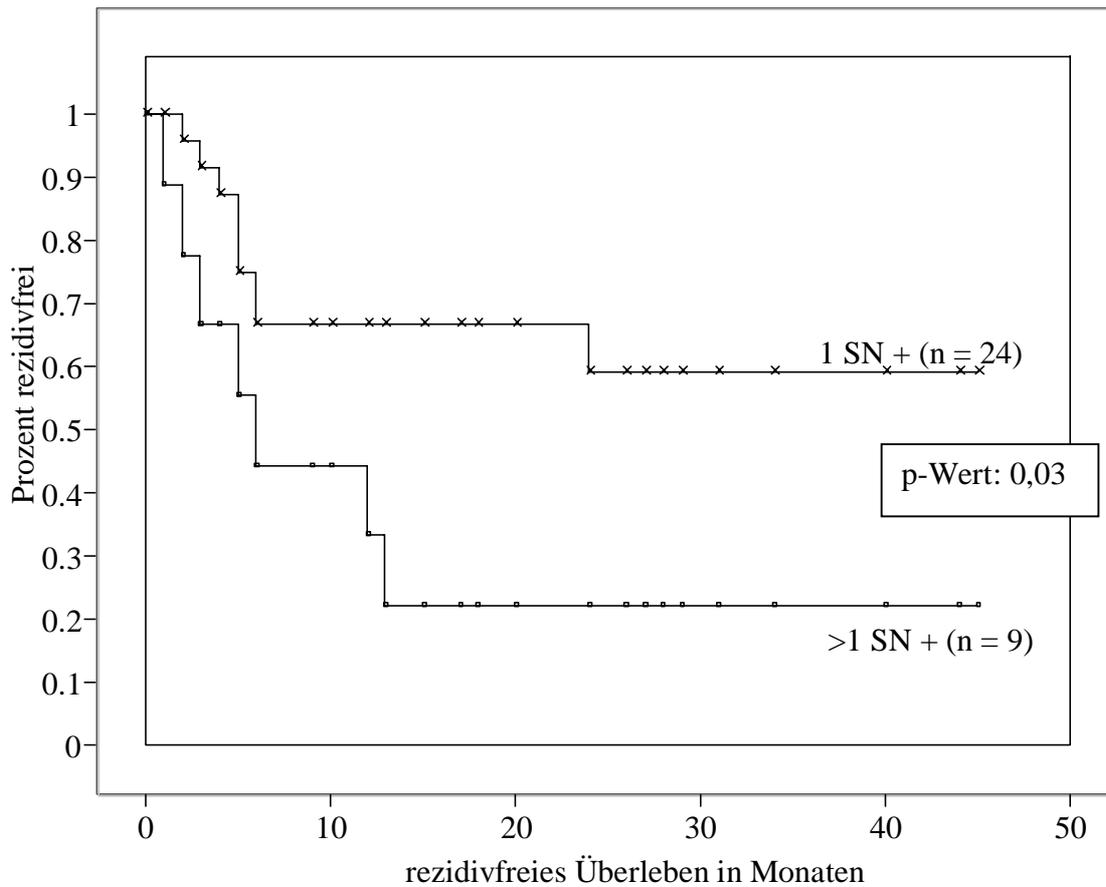
Unterteilte man dieses Kriterium zusätzlich nach der Metastasengröße, so zeigte sich, daß bei den 9 Patienten mit Metastasengrößen $\leq 0,5\text{mm}$ (bzw. ITC) kein Kapseldurchbruch auftrat. Diese Patienten blieben rezidivfrei. Von den 24 Patienten mit Metastasengrößen $>0,5\text{mm}$ wiesen 7 extranodales Tumorwachstum auf. In 6 Fällen kam es hier zu einem Melanomrezidiv. Bei den restlichen 17 Patienten überschritten die Melanomzellen die Lymphknotenkapsel nicht. Zehn dieser Patienten erlitten ein Tumorrezidiv.

Tabelle 9: Gliederung nach paranodal / nicht paranodal und Metastasengröße

	n	n mit Rezidiv
Metastasengröße $\leq 0,5\text{mm}$ (bzw. ITC) ohne paranodales Tumorwachstum	9	0
Metastasengröße $>0,5\text{mm}$ ohne paranodales Tumorwachstum	17	10 (58,8%)
Metastasengröße $>0,5\text{mm}$ mit paranodalem Tumorwachstum	7	6 (85,7%)

Prüft man das Kriterium paranodales Tumorwachstum im Zusammenhang mit der Metastasengröße (Diagramm 5), so nähert sich die Kurve der Patientenverläufe mit Metastasen $>0,5\text{mm}$ ohne Kapseldurchbruch der Kurve mit den Verläufen bei Metastasen $>0,5\text{mm}$ mit extranodalem Wachstum von Melanomzellen.

Diagramm 7



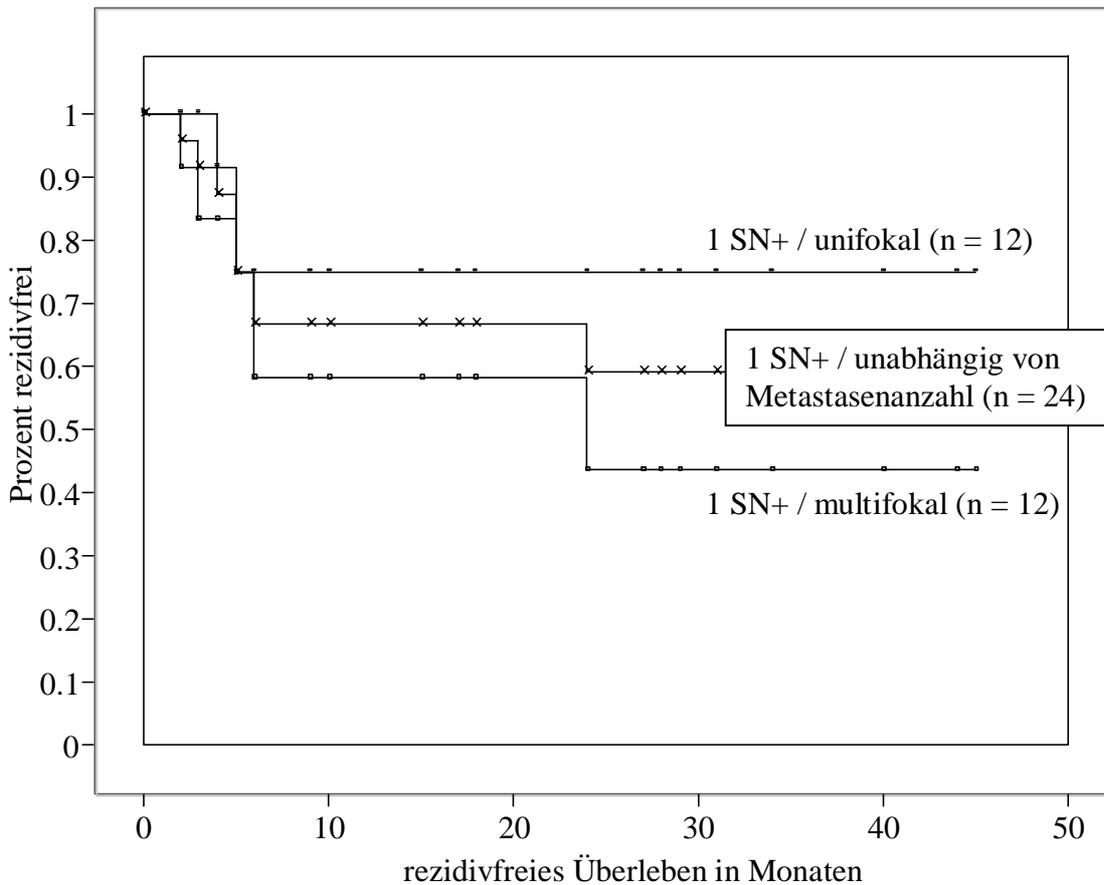
Bei allen Patienten mit Metastasengrößen $\leq 0,5\text{mm}$ bzw. ITC war jeweils nur ein SN befallen.

Unterteilt man die Patienten mit mehreren befallenen SN zusätzlich nach der Metastasenanzahl wie in 3.6, so stellt man fest, daß alle Patienten, bei denen mehrere SN (>1SN+) befallen waren, in diesen SN auch mehrere Metastasen, also eine multifokale Metastasierung aufwiesen. Betrachtet man jedoch die Patienten mit nur einem positiven SN (1SN+) und unterteilt diese nach unifokaler bzw. multifokaler Metastasierung, so ergibt sich Diagramm 8. In diesem Schaubild sind die Kurven des rezidivfreien Überlebens dieser Patienten in Abhängigkeit von der Metastasenanzahl und unabhängig davon dargestellt. Von den 24 Patienten, bei denen ein SN beteiligt war, zeigten 12 eine unifokale Metastasierung. Davon erlitten 3 ein Melanomrezidiv (25,0%). Die restlichen 12 Patienten wiesen eine multifokale Metastasierung auf. Sechs dieser Patienten erlebten ein Tumorrezidiv (50,0%).

Tabelle 11: Gliederung nach Anzahl positiver SN und Metastasenanzahl

	n	n mit Rezidiv
1SN+ / unifokal	12	3 (25,0%)
1SN+ / multifokal	12	6 (50,0%)

Diagramm 8



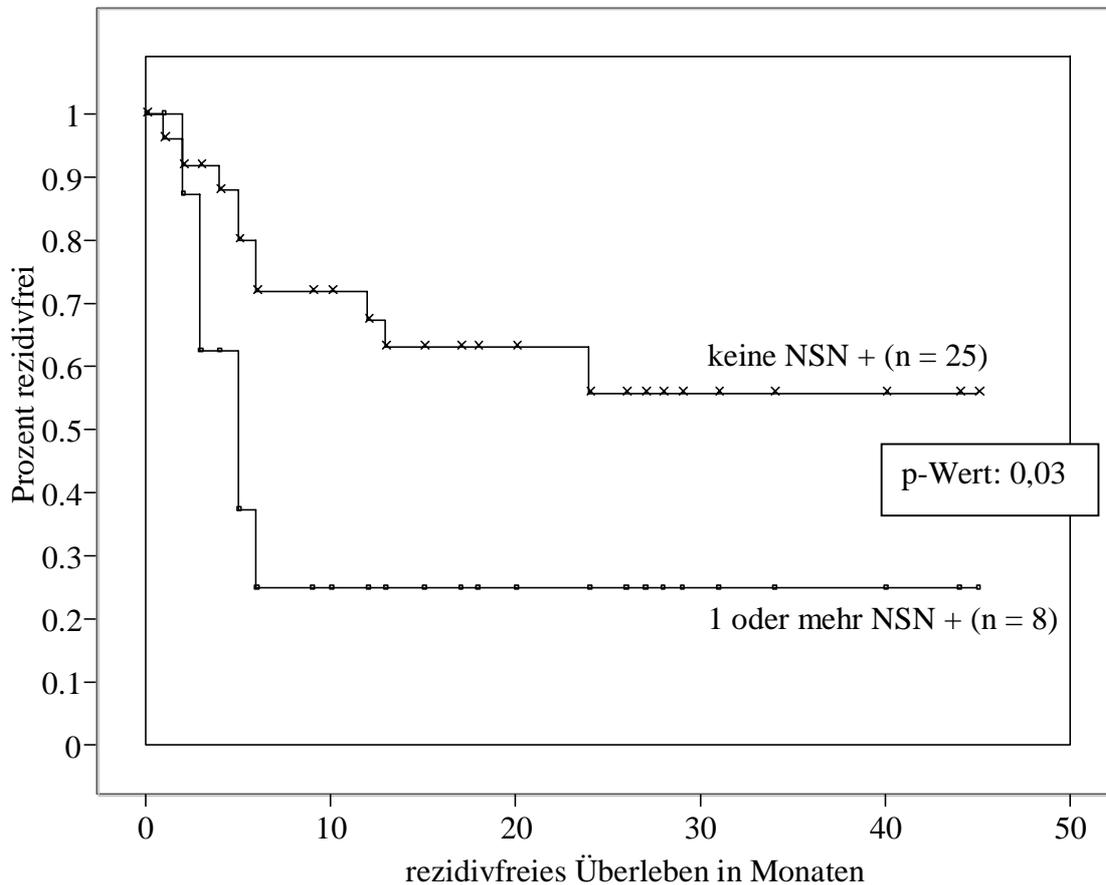
Der p-Wert zwischen der obersten und der untersten Kurve beträgt 0,25.

Die Kaplan-Meier-Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patienten mit einem befallenen SN und unifokaler Metastasierung unterscheiden sich somit nicht statistisch eindeutig von denen der Patienten mit einem positiven SN und multifokalem Befall.

3.8 Einfluß des NSN-Befalls auf den Verlauf

In Diagramm 9 sind die Kaplan-Meier-Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patienten aus Gruppe 1 (n = 33) in Abhängigkeit von der Beteiligung der NSN aufgetragen.

Diagramm 9



Bei 25 Patienten waren die NSN histologisch negativ (keine NSN+). In 10 dieser Fälle (40,0%) kam es zu einem Melanomrezidiv. Acht Patienten zeigten histologisch positive NSN (1 od. mehr NSN+). Von diesen erlitten 6 ein Tumorrezidiv (75,0%).

Tabelle 12: Gliederung nach dem NSN-Befall

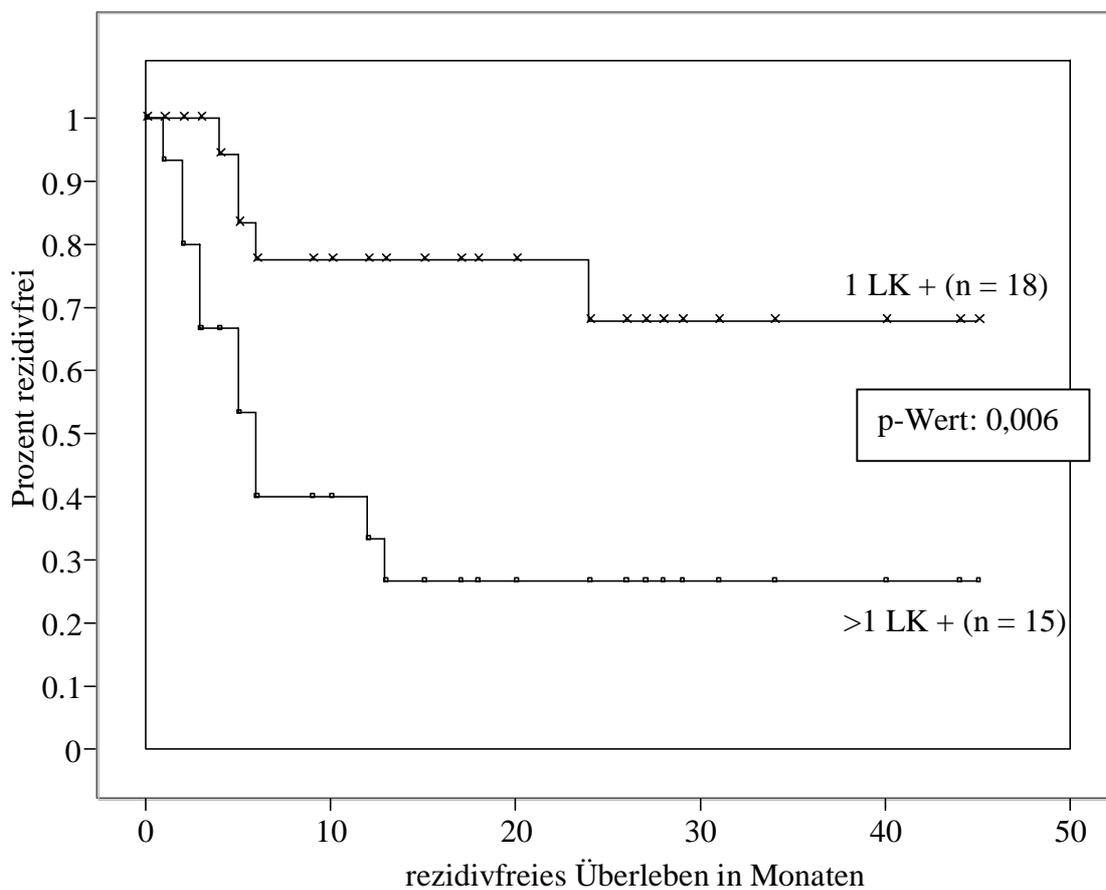
NSN-Befall	n	n mit Rezidiv
keine NSN +	25	10 (40,0%)
1 oder mehr NSN +	8	6 (75,0%)

3.9 Einfluß der gesamten Anzahl positiver Lymphknoten (SN+NSN) auf das rezidivfreie Überleben

Um die Bedeutung der Anzahl befallener Lymphknoten (LK) insgesamt zu prüfen, wurden die Patienten mit einem positiven LK (1LK+), der in unserem Patienten-kollektiv dem isolierten Befall eines SN entspricht, verglichen mit den Patienten, bei denen mehr als ein LK Metastasen aufwies (>1LK+).

Stellt man das rezidivfreie Überleben der 33 Patienten aus Gruppe 1 nach diesen Kriterien unterteilt als Kaplan-Meier-Kurven dar, so erhält man Diagramm 10.

Diagramm 10



Die obere Kurve (1 LK+) stellt den Verlauf der Patienten dar, bei welchen nur ein Lymphknoten positiv war. Von diesen 18 Patienten erlitten 5 (27,8%) ein Melanomrezidiv. Die untere Kurve (>1LK+) zeigt den Verlauf der 15 Patienten mit mehr als einem befallenen Lymphknoten von denen 11 (73,3%) ein Tumorrezidiv erlebten.

Tabelle 13: Gliederung nach der Anzahl positiver LK insgesamt

Anzahl positiver LK	n	n mit Rezidiv
1 LK +	18	5 (27,8%)
>1 LK +	15	11 (73,3%)

Unterteilte man die Verläufe der 18 Patienten mit einem positiven LK (1LK+) nach dem Kriterium der unifokalen bzw. multifokalen Metastasierung wie in 3.6, so zeigte sich, daß von diesen Patienten 10 eine unifokale Metastasierung aufwiesen, 8 jedoch eine multifokale.

Von den 10 Patienten mit einer isolierten Metastase (unifokal) im SN erlitten zwei (20%), von den 8 Patienten mit mehreren Metastasen (multifokal) im SN drei (37,5%) ein Melanomrezidiv.

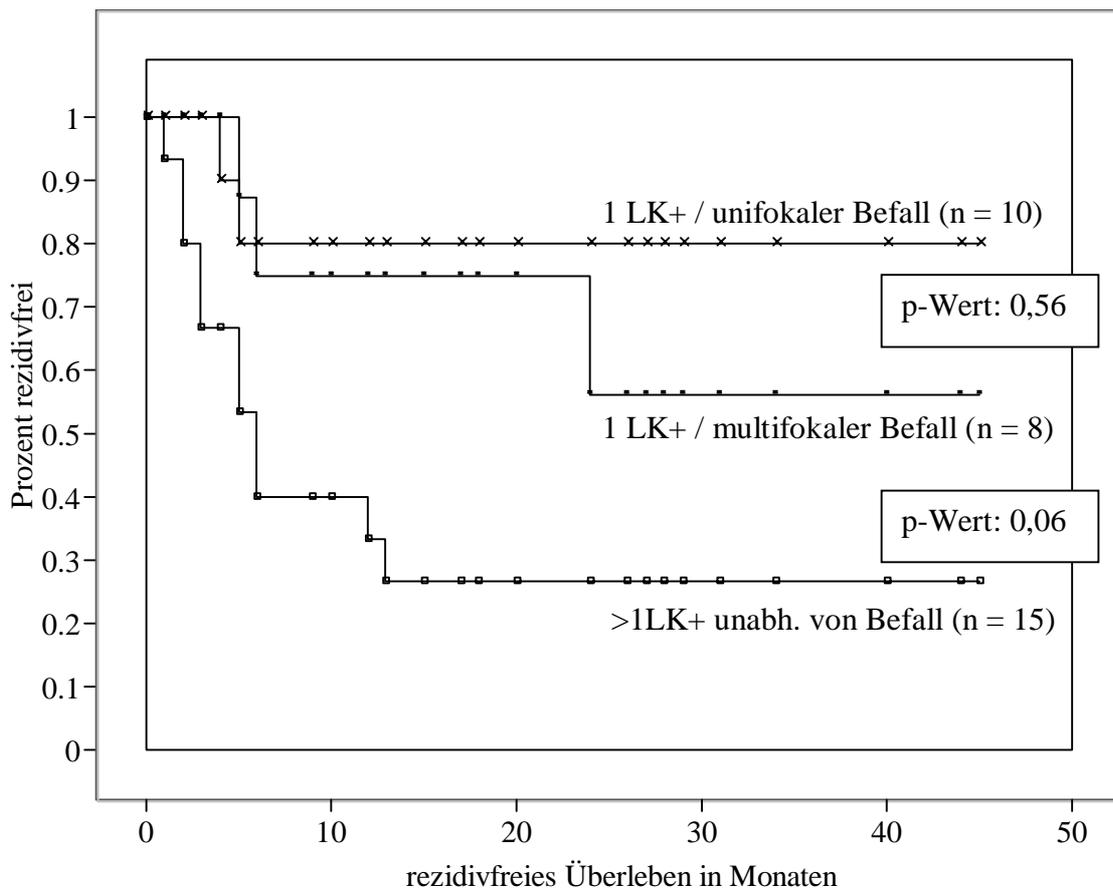
Tabelle 14: Gliederung nach Anzahl befallener LK und nach der Metastasenanzahl

	n	n mit Rezidiv
1 LK + / unifokaler SN- Befall	10	2 (20,0%)
1 LK + / multifokaler SN- Befall	8	3 (37,5%)

Stellt man die Patientenverläufe gruppiert nach diesen Parametern als Kaplan-Meier-Kurven dar, so ergibt sich Diagramm 11.

Die beiden oberen Kurven zeigen die Entwicklung der Patienten mit einem befallenen LK (1LK+) und uni- bzw. multifokaler Metastasierung. Die unterste Kurve stellt das rezidivfreie Überleben der Patienten mit mehr als einem positiven LK (>1LK+) unabhängig (unabh.) von der Metastasenanzahl dar.

Diagramm 11



3.10 Einfluß der Metastasengröße im SN auf die Anzahl positiver NSN

Als nächstes sollen die morphologischen Parameter wie die Metastasengröße, die Metastasenanzahl, paranodales Tumorwachstum und die Anzahl positiver SN auch im Hinblick auf die Beteiligung der NSN untersucht werden.

Zuerst soll die Relevanz der Metastasengröße im SN für den Befall weiterer Lymphknoten (NSN) geprüft werden.

Bei Metastasengrößen im SN $\leq 0,5$ mm bzw. ITC war von 9 Patienten nur bei einem ein NSN histologisch positiv (11,1% NSN+). Dieser Patient (Nr. 8 aus Tabelle 1, Seite 19) nimmt eine Sonderstellung ein, da er im SN nur ein Nest ITC aufwies mit einer Ausdehnung von 0,4mm. Hingegen fanden sich in einem seiner 17 NSN 2 Metastasen, von denen die größere 2,7mm maß.

Von den 24 Patienten mit einer Metastasengröße >0,5mm lagen bei 7 Patienten histologisch befallene NSN (NSN+) vor (29,2%), wobei 2 Patienten einen positiven NSN, 2 Patienten zwei und jeweils ein Patient 4, 6 bzw. 10 betroffene NSN aufwiesen. Von diesen 7 Patienten erlitten 6 im Verlauf ein Rezidiv (85,7%).

Siebzehn Patienten hatten keinen positiven NSN (NSN-). Aus dieser Gruppe ereignete sich bei 10 Patienten ein Tumorrezidiv (58,8%), 7 blieben tumorfrei.

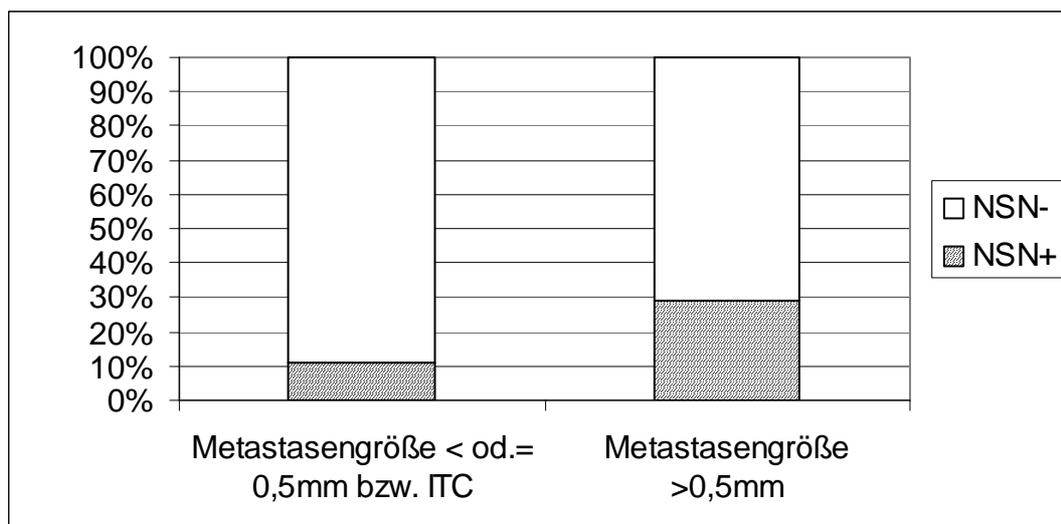
Tabelle 15: Gliederung nach Metastasengröße und NSN-Befall

Metastasengröße / NSN-Befall	n	n mit Rezidiv
≤0,5mm bzw. ITC / NSN -	8	0
≤0,5mm bzw. ITC / NSN +	1	0
>0,5mm / NSN -	17	10 (58,8%)
>0,5mm / NSN +	7	6 (85,7%)

Diagramm 12 veranschaulicht den NSN-Befall in Abhängigkeit von der Metastasengröße im SN. Die y-Achse stellt die Anzahl der Patienten in Prozent dar.

Die Patienten mit ITC im SN sind in der linken Säule mit enthalten.

Diagramm 12



In der 4 Feldertafel ergab sich nach dem Fisher's Exact Test ein p-Wert von 0,39.

3.11 Einfluß der Metastasenanzahl im SN auf die Anzahl positiver NSN

Die Metastasierung der SN wurde hier wieder, wie in 3.6, in unifokal und multifokal gegliedert.

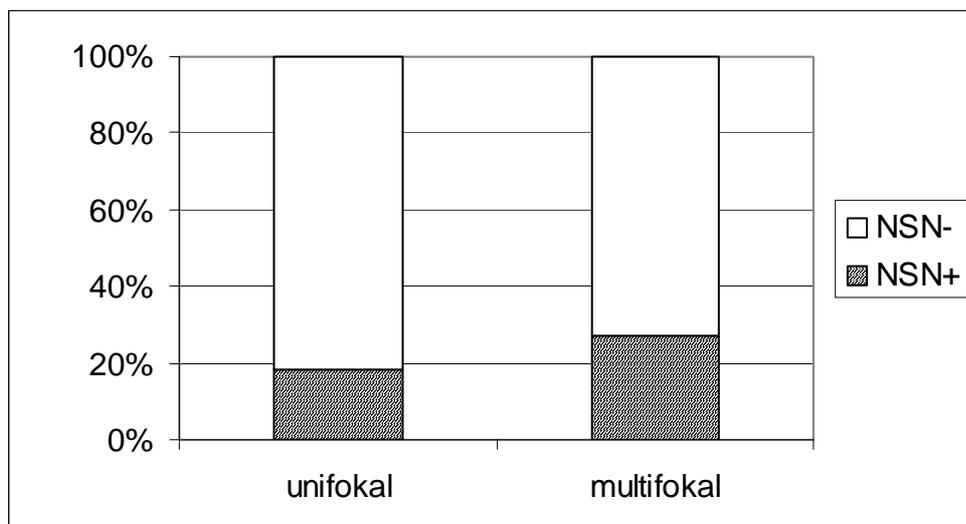
Von den 33 Patienten aus Gruppe 1 wiesen 12 eine unifokale Metastasierung auf. Bei zwei dieser Patienten fand sich jeweils ein positiver NSN.

Sechs der 21 Patienten mit multifokalen Metastasen zeigten eine Beteiligung der NSN. In einem Fall war ein, zwei mal waren 2, ein mal 4, ein mal 6 und ein mal 10 NSN betroffen.

Tabelle 16: Gliederung nach der Metastasenanzahl

Metastasenanzahl	n	n mit befallenen NSN
unifokale Metastasierung	12	2 (16,7%)
multifokale Metastasierung	21	6 (28,6%)

Diagramm 13



Mittels Fisher's Exact Test ergab sich in der 4 Feldertafel ein p-Wert von 0,68.

3.12 Einfluß des paranodalen Tumorwachstums auf die Anzahl positiver NSN

Von den 26 Patienten der Gruppe 1, deren SN-Metastase auf den Lymphknoten beschränkt war, zeigten 6 (23,1%) eine NSN-Beteiligung. Bei 3 Patienten war jeweils ein NSN, bei einem 4, bei einem weiteren 6 und bei einem anderen 10 NSN positiv.

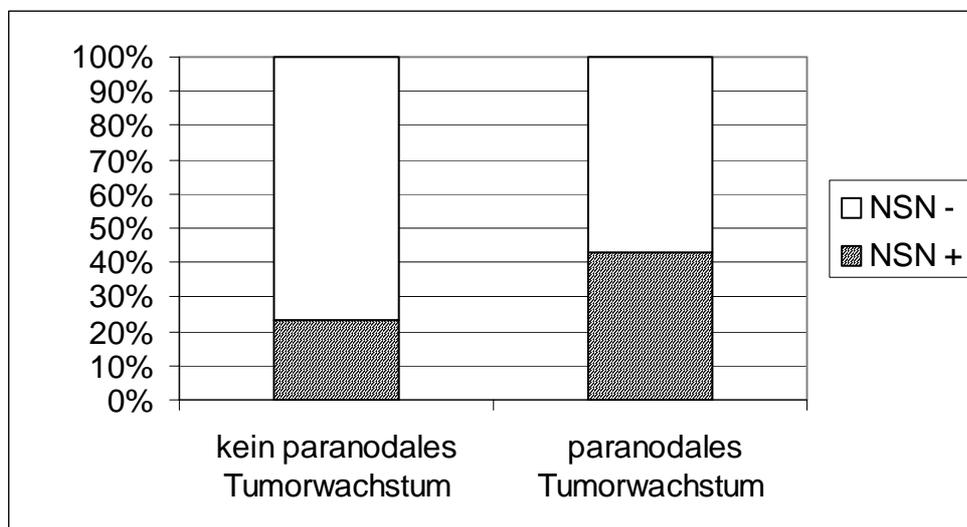
Drei (42,9%) der 7 Patienten mit paranodalem Tumorwachstum wiesen einen NSN- Befall auf. Zwei Mal lagen 2 und ein Mal 1 positiver NSN vor.

Tabelle 17: Kapseldurchbruch ja / nein

	n	n mit befallenen NSN
kein paranodales Tumorwachstum	26	6 (23,1%)
paranodales Tumorwachstum	7	3 (42,9%)

Im folgenden Schaubild (Diagramm 14) wird dieser Sachverhalt prozentual mittels Säulendiagramm dargestellt.

Diagramm 14



Der mit Hilfe von Fisher's Exact Test errechnete p-Wert beträgt 0,32.

3.13 Einfluß der Anzahl positiver SN auf die Anzahl positiver NSN

Im folgenden soll die Bedeutung der Anzahl positiver SN für die Anzahl befallener NSN untersucht werden. Um dies zu untersuchen, wurden die Patienten der Gruppe 1 gegliedert in Patienten mit einem positiven SN (1 SN +) und Patienten mit mehr als einem beteiligten SN (>1 SN +).

24 Patienten hatten jeweils einen befallenen SN. Von diesen zeigten 6 eine Beteiligung der NSN (25,0%). Bei drei Patienten war ein NSN, bei 2 Patienten waren 2 und bei einem Patienten 4 NSN befallen. Von den 9 Patienten mit mehr als einem positiven SN lagen bei zwei Patienten zusätzlich betroffene NSN vor (22,2%); ein Patient hatte 6, der andere Patient hatte 10 beteiligte NSN.

Tabelle 18: Gliederung nach Anzahl befallener SN

Anzahl positiver SN	n	n mit positiven NSN
1 SN +	24	6 (25,0%)
>1 SN +	9	2 (22,2%)

Der p-Wert beträgt hier 1,0.

3.14 Einfluß der Tumordicke auf den SN-Befall und den Verlauf

Um die Auswirkungen der Tumordicke auf die Metastasengröße im SN und auf das rezidivfreie Überleben zu untersuchen, wurden die Patienten in Tumordickegruppen entsprechend der TNM-Klassifikation des AJCC von 1992 unterteilt.

Von den 33 Patienten der Gruppe 1 gelangten hier nur 32 zur Auswertung, da bei einem Patienten keine Angaben zur Tumordicke vorlagen.

Tumordicken <0,76mm kamen in Gruppe 1 nicht vor. Zwei Patienten dieser Gruppe hatten eine Tumordicke von 0,76-1,5mm. Sie zeigten beide eine Metastasengröße im SN $\leq 0,5$ mm bzw. einer der Patienten ITC, und bei beiden kam es nicht zu einem Melanomrezidiv. Bei 15 Patienten der Gruppe 1 wurde eine Tumordicke zwischen 1,51mm und 4,0mm gemessen.

Von diesen 15 Patienten hatten 7 eine Metastasengröße $\leq 0,5\text{mm}$ bzw. einer ITC im SN und blieben rezidivfrei. Bei den anderen 8 Patienten fanden sich Metastasen $>0,5\text{mm}$ im SN. Von diesen entwickelte sich bei 6 Patienten (75%) im Beobachtungszeitraum ein Tumorrezidiv.

Der Tumordicke $>4,0\text{mm}$ waren 15 Patienten zuzuordnen. Alle diese Patienten hatten im SN eine Metastasengröße $>0,5\text{mm}$; bei 10 Patienten (66,7%) kam es im Verlauf zu einem Melanomrezidiv.

Tabelle 19: Gliederung nach Tumordicke und Metastasengröße

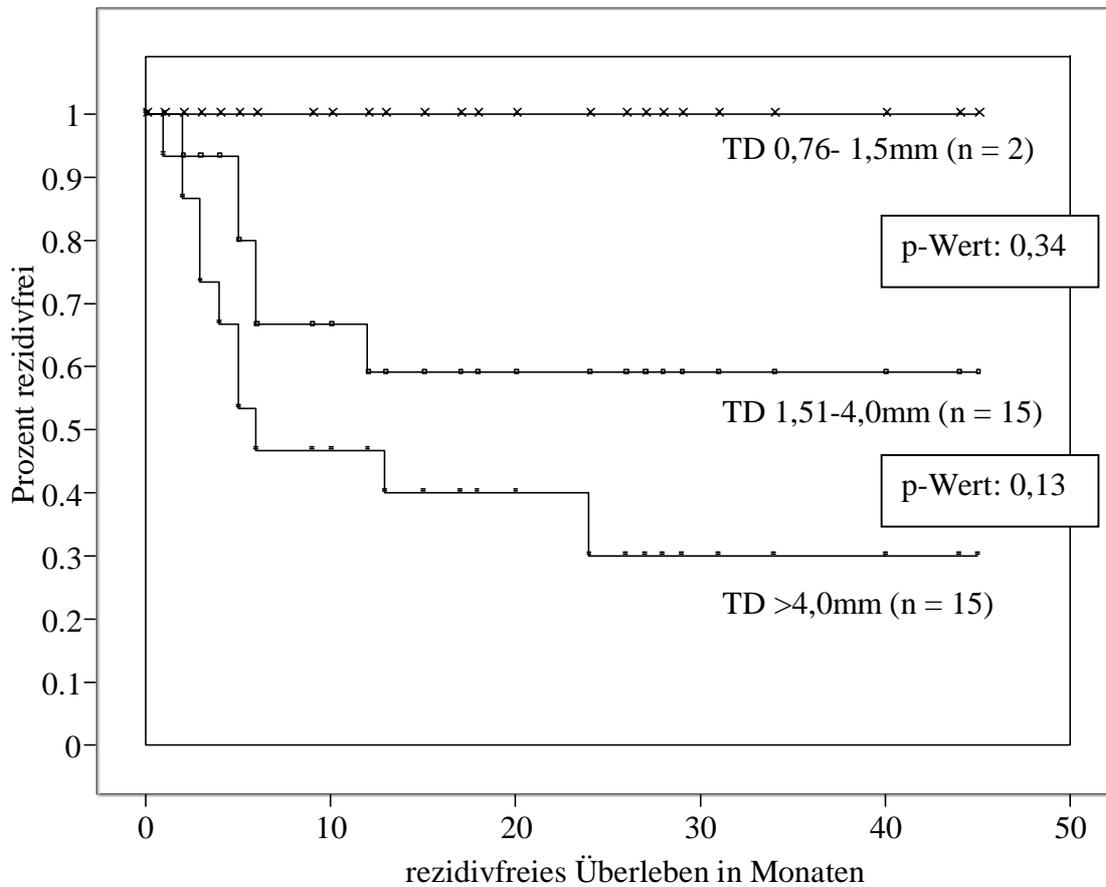
Tumordicke	n $\leq 0,5\text{mm}$	n mit Rezidiv		n $>0,5\text{mm}$	n mit Rezidiv
<0,76mm	0	0		0	0
0,76-1,5mm	2	0		0	0
1,51- 4,0mm	7	0		8	6 (75,0%)
>4,0mm	0	0		15	10 (66,7%)

Die Patienten mit Metastasengrößen $\leq 0,5\text{mm}$ bzw. ITC wiesen eine mediane Tumordicke von 2,4mm auf. Hingegen zeigten die Patienten mit Metastasengrößen $>0,5\text{mm}$ eine mediane Tumordicke von 4,5mm.

Von den zwei Patienten mit isolierten Tumorzellen im SN zeigte einer eine Tumordicke von 1,3mm und der andere eine Tumordicke von 2,5mm. Wie bereits erwähnt, lag bei beiden die größte Ausdehnung der Melanomzellnester $\leq 0,5\text{mm}$ und keiner von ihnen erlitt ein Melanomrezidiv.

Die Verläufe aller Patienten aus Gruppe 1 bis auf einen, bei dem keine Tumordicke angegeben war, sind in Diagramm 15 nach Tumordicken (TD) gegliedert als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

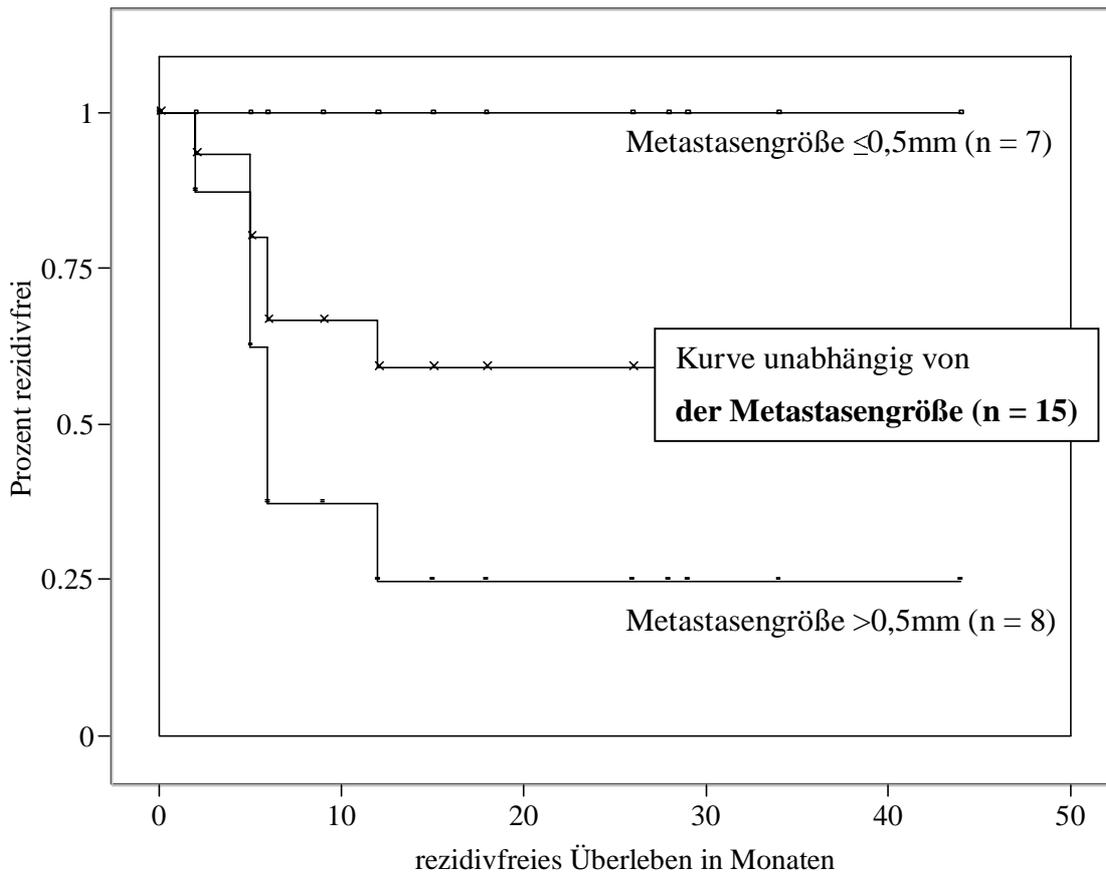
Diagramm 15



Stellt man das rezidivfreie Überleben der Patienten gruppiert nach der Tumordicke (Gruppierung entsprechend der TNM-Klassifikation) in Abhängigkeit von der Metastasengröße als Kaplan-Meier-Kurven dar, so unterscheiden sich die Verläufe der Patienten mit Tumordicken 1,51-4,0mm deutlich, je nachdem, ob die Metastasengröße im SN $\leq 0,5$ mm oder $> 0,5$ mm war (Diagramm 16).

Bei den anderen Tumordickegruppen ist dies nicht der Fall, da sie eine einheitliche SN-Beteiligung zeigen. So liegen bei den Patienten mit Tumordicken von 0,76-1,5mm nur Metastasengrößen $\leq 0,5$ mm, hingegen bei den Patienten mit Tumordicken $> 4,0$ mm nur Metastasengrößen $> 0,5$ mm vor. (Es bleibt somit für diese Tumordickegruppen bei den in Diagramm 15 gezeigten Verläufen.)

Diagramm 16: Tumordicken 1,51-4,0mm



Die oberste Kurve in Diagramm 16 zeigt das rezidivfreie Überleben der 7 Patienten mit Tumordicken von 1,51- 4,0 mm mit Metastasengrößen im SN $\leq 0,5$ mm bzw. eines Patienten mit ITC, die rezidivfrei blieben. In der untersten Kurve ist das rezidivfreie Überleben der 8 Patienten dieser Tumordicken gezeigt, deren SN Metastasen $>0,5$ mm enthielt und von denen 6 (75%) ein Melanomrezidiv erlebten.

Die mittlere Kurve gibt das rezidivfreie Überleben aller Patienten mit Tumordicken zwischen 1,51 und 4,0mm wieder, unabhängig von der Metastasengröße.

3.15 Einfluß der Tumordicke und des SN-Status auf die

Anzahl positiver NSN

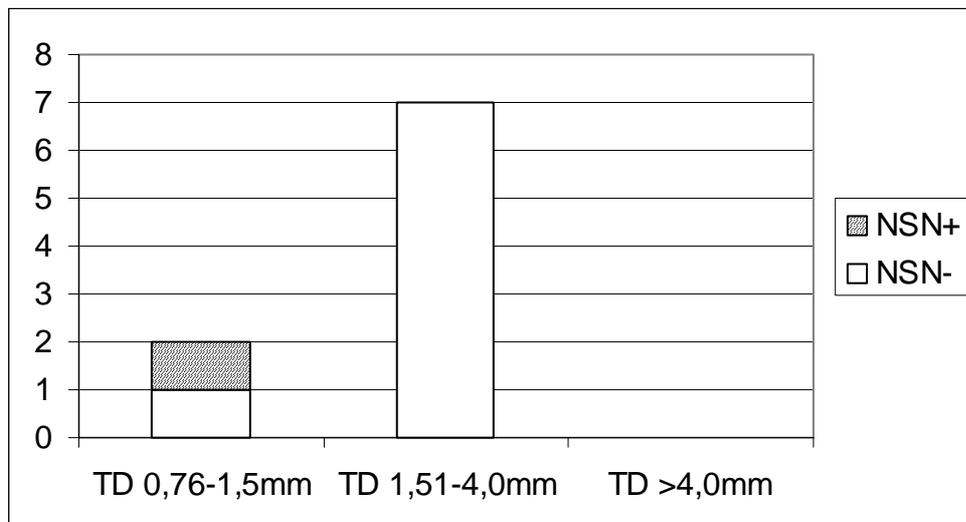
Untergliedert man die Patienten der Gruppe 1 nach der Tumordicke (entsprechend dem TNM-Schema) und nach der Metastasengröße $\leq 0,5\text{mm}$ bzw. $>0,5\text{mm}$, so kann man den NSN-Befall in Abhängigkeit von diesen Faktoren untersuchen.

In den folgenden Schaubildern (Diagramm 17 und 18) ist dieser Sachverhalt mittels Säulendiagrammen dargestellt. Auf der x-Achse sind die drei Tumordickegruppen, die in Gruppe 1 auftraten, als Säulen, deren Höhe die Patientenanzahl darstellt, aufgetragen.

Die erste Säule umfaßt Tumordicken zwischen 0,76 und 1,5mm, die zweite Säule Tumordicken von 1,51 bis 4,0mm und die dritte Säule Tumordicken $>4,0\text{mm}$.

Da es in Gruppe 1 keine Patienten mit Tumordicke $<0,76\text{mm}$ gab, sind in diesen Diagrammen keine vier Säulen sichtbar.

Diagramm 17: NSN-Befall in Abhängigkeit von der TD bei Metastasengröße $\leq 0,5\text{mm}$ im SN



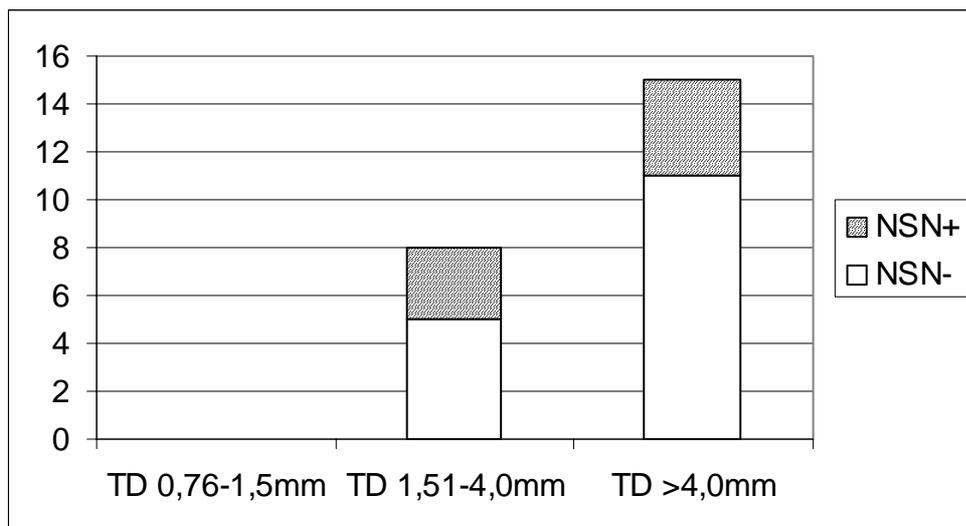
NSN+ = Patient hat einen oder mehrere positive NSN

NSN - = Patient hat keine befallenen NSN

Diagramm 17 veranschaulicht den NSN-Befall der Patienten mit einer Metastasengröße $\leq 0,5\text{mm}$, untergliedert in die aufgetretenen Tumordickegruppen.

Von den zwei Patienten mit einer Tumordicke zwischen 0,76 und 1,5mm war bei einem ein NSN befallen (NSN+). Hier handelt es sich wieder um den Patienten Nr. 8 aus Tabelle 1 (Seite 19) mit ITC im SN und einem befallenen NSN. Dieser NSN wies 2 Metastasen auf, von denen die größere 2,7mm maß. Die 7 Patienten mit einer Tumordicke von 1,51-4,0mm zeigten keinen NSN-Befall (NSN-).

Diagramm 18: NSN-Befall in Abhängigkeit von der TD bei Metastasengröße >0,5mm im SN



NSN+ = Patient hat einen oder mehrere positive NSN

NSN - = Patient hat keine befallenen NSN

Diagramm 18 zeigt den NSN-Befall der Patienten mit Metastasengrößen >0,5mm im SN nach Unterteilung in die Tumordickegruppen.

Fünf der insgesamt 8 Patienten mit einer Tumordicke zwischen 1,51 und 4,0mm wiesen keine NSN-Beteiligung auf (NSN-). Bei 3 Patienten waren weitere NSN befallen (37,5% NSN+).

Fünfzehn Patienten hatten eine Tumordicke >4,0mm. Elf dieser Patienten hatten keinen NSN-Befall (NSN-), bei 4 Patienten waren positive NSN gefunden worden (26,7% NSN+).

4. Diskussion

Die Prognose hängt bei Melanompatienten im Primärtumorstadium mit histologisch negativen Lymphknoten von den bekannten Prognosefaktoren wie Tumordicke, Ulzeration, Clark-Level ab. Sind jedoch bereits Lymphknotenmetastasen vorhanden, so ist das Ausmaß des Lymphknotenbefalls der entscheidende Prognoseparameter, und die zuvor aufgezählten Einflußgrößen verlieren an prognostischer Bedeutung (Gershenwald et al. 1999).

Wir haben untersucht, ob sich auf einfache Weise bei histologisch positiven SN das Ausmaß der Metastasierung (verschiedene morphologische Parameter) als Prognosefaktor für das rezidivfreie Überleben nutzen läßt.

In den folgenden Unterpunkten werden die Einzelheiten der Ergebnisse erläutert.

4.1 Vergleich des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit vom SN-Status

Die Nachweisverfahren für Melanomzellen in Lymphknoten und damit im SN wurden in den vergangenen Jahren immer weiter verfeinert. Mit molekularbiologischen Methoden wie der Tyr-RT-PCR lassen sich schon wenige Tyrosinase exprimierende Zellen nachweisen (Wang et al., 1994).

Wichtig ist, hierbei zwischen Melanomzellen und nodalen Naevuszellen (NZ), welche ebenfalls Tyrosinase exprimieren, zu unterscheiden. In der Histologie ist diese Differenzierung relativ einfach, da sich nodale Naevi typischerweise in der Lymphknotenkapsel befinden und sich in der Immunhistologie zwar mit S100, jedoch nicht oder nur sehr schwach mittels HMB 45 anfärben (Carson et al., 1996).

Die SN-Biopsie hat sich inzwischen etabliert, jedoch über die genauen Untersuchungsmethoden des SN und die daraus zu ziehenden Konsequenzen besteht noch kein Konsens. An der Universitätsklinik Tübingen wird jeder SN routinemäßig mit HE und immunhistologischen Färbungen (S100 und HMB 45) untersucht. Findet sich in einem SN histologisch eine Melanommetastase, so wird die entsprechende Lymphknotenregion anschließend radikal ausgeräumt. Ist der SN in der Histologie negativ, so zieht dies keine chirurgischen Konsequenzen nach sich.

Erwartungsgemäß zeigten die untersuchten Patienten aus Gruppe 1 mit histologisch positivem SN deutlich schlechtere Verläufe als die Patienten der Gruppe 2 mit nur molekularbiologisch positivem SN (p-Wert: 0,002). So erlitten in Gruppe 1 in den ersten 30 Monaten fast 50% der Patienten ein Melanomrezidiv (16 von 33), hingegen im gleichen Zeitraum in Gruppe 2 nur 12% (4 von 33). Im Gegensatz zu Daten der gleichen Arbeitsgruppe mit größerem Patientenkollektiv (Blaheta et al., 2000) nahmen in dieser Studie die Patienten der Gruppen 2 und 3 eine sehr ähnliche Entwicklung (p-Wert: 0,59). In Gruppe 3 erlebten 9% (3 von 33) der Patienten ein Tumorrezidiv. Dieser Unterschied ist am ehesten auf die relativ kleine Patientenzahl, im Verhältnis zu der Anzahl der im Beobachtungszeitraum entstandenen Rezidive, zurückzuführen.

4.2 Metastasengröße

Seitdem die SN-Biopsie weitgehende Akzeptanz gefunden hat und von vielen Zentren durchgeführt wird, werden immer kleinere Metastasen entdeckt. Deshalb ist eine Neuauflage der TNM-Klassifikation anzustreben, die den aktuellen Untersuchungsergebnissen angepaßt ist. Teilweise wurde dies in einem Vorschlag für ein neues Staging-System des AJCC (Balch et al., 2000) versucht. Beim Lymphknotenstatus (N) wurde hier die Metastasengröße durch die Anzahl befallener Lymphknoten ersetzt (Tabelle 21, Seite 64).

Nur wenige Studien haben sich bisher mit der prognostischen Bedeutung der Metastasengröße befasst. Drei davon sollen hier erwähnt werden.

Cochran et al. schlugen 1989 vor, die metastatisch befallenen Lymphknotenflächen als Prozentanteil an der gesamten Lymphknotenfläche aller untersuchten Lymphknoten anzugeben. Dies wurde mittels einer Formel aus dem jeweils größten Durchmesser der Lymphknoten und der Metastase(n) berechnet.

Die Prognose besonders im Bezug auf die tumorbedingte Letalität ließ sich mit dieser Methode präzisieren (Cochran et al., 1989). Allerdings war dieses Verfahren so aufwendig, daß es nicht zur routinemäßigen Anwendung kam.

1995 untersuchten Buzaid et al. die Bedeutung der Metastasengröße indirekt, indem sie die prognostische Aussagekraft des größten Lymphknotendurchmessers sowohl palpatorisch als auch pathologisch-anatomisch gemessen mit anderen Prognosefaktoren verglichen.

Keiner dieser beiden Parameter zeigte jedoch einen eindeutigen Einfluß auf das rezidivfreie Überleben oder auf das Gesamtüberleben (Buzaid et al., 1995).

Dies läßt jedoch keine Rückschlüsse auf die Bedeutung der Metastasengröße zu, da unklar ist, inwieweit die Metastasengröße die Lymphknotengröße beeinflusst.

Starz et al. berichteten 1999 über ein anderes Verfahren zum Staging der SN- Beteiligung. Sie zählten in Serienschnitten die Anzahl befallener Lymphknotenscheiben (n) und vermaßen die größte Eindringtiefe der Melanomzellen zum LK- Zentrum hin, ausgehend vom inneren Rand der Lymphknotenkapsel (d). Mit diesen beiden Faktoren formulierten sie verschiedene S-Stadien des SN-Befalls (S0-S3). Diese S-Stadien korrelierten mit den T-Stadien des staging-Systems und erwiesen sich als deutliche Risikoindikatoren für die Entwicklung von Fernmetastasen (Starz et al., 1999). Auch dieses Vorgehen fand bislang keinen Eingang in die Routineuntersuchung des SN.

Trotz unterschiedlichster Ansätze zu ihrer Erfassung und Untersuchung scheint sich herauszukristallisieren, daß die Metastasengröße Einfluß auf die Prognose nimmt. Um deshalb möglichst einfach und damit auch in der täglichen Diagnostik durchführbar die Metastasengröße bestimmen zu können, haben wir diese als größte Ausdehnung der größten Metastase im SN an den Routineschnitten (HE+IH) mittels Meßokular vermessen.

Es zeigte sich, daß alle Patienten mit sehr großen Metastasen von $>10\text{mm}$ ($n = 4$) ein Melanomrezidiv entwickelten. Hingegen blieben alle Patienten mit Metastasen $\leq 0,5\text{mm}$ ($n = 9$) rezidivfrei. Hierzu gehörten auch die 2 Patienten mit ITC. Von den Patienten, die Metastasengrößen $>0,5\text{mm}$, aber $<10\text{mm}$ aufwiesen ($n = 20$), erlitten 12 (60%) ein Tumorrezidiv, während 8 (40%) dieser Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraumes rezidivfrei blieben.

Da nur 4 Patienten eine Metastasengröße $>10\text{mm}$ zeigten, ist dieser prognostisch ungünstige Grenzwert nicht mit statistischer Signifikanz zu belegen. Es läßt sich jedoch eine deutliche Grenze zu einer positiven Prognose bei einer Metastasengröße $\leq 0,5\text{mm}$ ziehen.

Um, ausgehend von der Metastasengröße, das Risiko des Patienten für ein Melanomrezidiv zu klassifizieren, bedarf es also eines Grenzwertes, der deutlich unter dem des Staging-Systems des AJCC von 1992 liegt (Tabelle 20, Seite 62).

Auch beim Mammakarzinom wurde die Metastasengröße in den Lymphknoten als wichtiger Prognoseparameter für das rezidivfreie Überleben beschrieben. Interessanterweise wurde auch hier ein prognostisch entscheidender Grenzwert von $0,5\text{mm}$ identifiziert ($\leq 0,5\text{mm}$ versus $>0,5\text{mm}$; p-Wert: 0,003; McGuckin et al., 1996).

Die Vermessung der Metastasen in den Routineschnitten erwies sich vor allem bei multifokalem SN-Befall teilweise als schwierig, da in den zentralen Schnitten nicht eindeutig geklärt werden kann, ob es sich um verschiedene „Ausläufer“ einer einzigen großen Metastase oder tatsächlich um mehrere einzelne Metastasen handelt. Allerdings zeigte von den Patienten mit Metastasen $\leq 0,5\text{mm}$ nur einer eine multifokale SN-Beteiligung (Nr. 9 aus Tabelle 1, Seite 19). Die anderen Patienten mit multifokalem Befall wiesen Metastasen $>0,5\text{mm}$ auf (Tabelle 2-3, Seite 20-24). Ausgehend von den Schnitten, die in der Routinediagnostik angefertigt werden, ist verständlicherweise auch nicht mit letzter Sicherheit zu sagen, ob in der getroffenen Ebene die Metastase tatsächlich ihren größten Durchmesser zeigt. Um dies exakt beurteilen zu können, müßte man den gesamten Lymphknoten in Serienschnitten aufarbeiten. Da ein solches Vorgehen aber zu zeit- und auch zu kostenintensiv und mit unserem Vorhaben, einen einfach zu bestimmenden Prognoseparameter herauszuarbeiten, nicht kongruent wäre, wurde darauf verzichtet. Trotzdem zeigen unsere Ergebnisse deutliche Tendenzen auf, da es bei Patienten mit Metastasen $\leq 0,5\text{mm}$ im SN zu keiner Rezidiventwicklung kam.

Als weiteres morphologisches Kriterium sollte die prognostische Bedeutung von ITC im Vergleich zu Metastasen untersucht werden. Zwei der 33 Patienten aus Gruppe 1 präsentierten ITC. Bei beiden war die größte Ausdehnung der Melanomzellnester kleiner als 0,5mm. Sie blieben im Beobachtungszeitraum rezidivfrei. Aufgrund der geringen Fallzahl ist eine isolierte Auswertung nicht sinnvoll. Sie wurden deshalb der Metastasengröße $\leq 0,5\text{mm}$ zugerechnet.

4.3 Metastasenanzahl

Um auch der Metastasenanzahl Rechnung zu tragen - in 2/3 der Fälle lag mehr als eine Metastase vor - wurde auch dieser Parameter zur Auswertung gebracht. Hierbei zeigte sich bei unifokaler Metastasierung eine positivere Entwicklung als bei multifokaler Metastasierung oder sub-/totaler Destruktion. Das rezidivfreie Überleben der Patienten mit unifokalem SN-Befall lag nach 30 Monaten bei ca. 75%, bei den Patienten mit multifokaler Beteiligung jedoch nur bei knappen 40%.

Allerdings erlangte dieser Trend keine statistische Signifikanz (p-Wert: 0,07). Dies könnte sowohl an der geringen Patientenzahl liegen als auch an der bereits beschriebenen Schwierigkeit, bei mehreren Metastasen (multifokale Metastasierung) im SN nicht sicher ausschließen zu können, daß es sich dabei um einzeln getroffene Bereiche einer einzigen zusammenhängenden Metastase handelt. Interessanterweise zeigte von den Patienten mit Metastasen $\leq 0,5\text{mm}$ nur einer eine multifokale SN- Beteiligung (Nr. 9 aus Tabelle 1, Seite 19). Die anderen Patienten mit multifokalem SN-Befall wiesen Metastasen $> 0,5\text{mm}$ auf (Tabellen 2-3, Seite 20-24). Unter Umständen beeinflußt also die Metastasengröße die Anzahl der Metastasen.

4.4 paranodales Tumorwachstum

Es wurde bereits gezeigt, daß eine paranodale Ausbreitung der Melanomzellen zu einer deutlichen Verschlechterung der Prognose führt (Bevilacqua et al., 1990; Coit et al., 1991). In unserem Patientenkollektiv zeigten Patienten ohne kapselüberschreitendes Tumorwachstum ein rezidivfreies Überleben von knapp 60% nach 30 Monaten. Im Gegensatz dazu lag bei den Patienten mit perinodalen Melanomzellen das rezidivfreie Überleben nach 30 Monaten nur noch bei ca. 15% (p-Wert: 0,01). Somit entspricht das Ergebnis den in der Literatur beschriebenen Erfahrungen.

Betrachtet man diesen Sachverhalt unter Berücksichtigung der Metastasengröße, so findet man bei Metastasen $\leq 0,5\text{mm}$ bzw. ITC kein paranodales Tumorwachstum. Die Patienten mit Metastasen $>0,5\text{mm}$ lassen sich jedoch in solche mit und ohne Kapseldurchbruch unterteilen.

Hier wiesen die 7 Patienten mit perinodalen Tumorzellen eine Rezidivrate von 85,7% auf (6 von 7). Von den 17 Patienten ohne kapselüberschreitende Melanomzellen erlitten 10 (58,8%) ein Tumorrezidiv. Die Differenz dieser beiden Gruppen ist nicht statistisch bedeutsam (p-Wert: 0,23). Hingegen war der Unterschied zwischen den 9 Patienten mit Metastasen $\leq 0,5\text{mm}$ (bzw. ITC) und den 17 Patienten mit Metastasen $>0,5\text{mm}$ ohne paranodalem Tumorwachstum deutlich (p-Wert: 0,006).

Die Metastasengröße, orientiert an unserem Grenzwert, scheint somit eine größere Bedeutung für das rezidivfreie Überleben zu haben als das Vorliegen bzw. Fehlen von paranodalem Tumorwachstum.

4.5 Anzahl befallener Lymphknoten

Bereits vor bekannt werden der SN-Methode 1992 (Morton et al., 1992) galt die Anzahl der positiven LK als einer der entscheidenden Prognosefaktoren bei Patienten mit metastasiertem Melanom der Haut. Die Ergebnisse verschiedener Studien bestätigten dies immer wieder (Cohen et al., 1977; Bevilacqua et al., 1990; Coit et al., 1991; Drepper et al., 1993b; Buzaid et al., 1995). Um diesen Sachverhalt auch an unserem Patientenkollektiv zu untersuchen, wurde die prognostische Bedeutung der Anzahl befallener SN und der Einfluß der beteiligten NSN bestimmt.

Zusätzlich wurde der prognostische Wert der Gesamtanzahl positiver LK für das rezidivfreie Überleben geprüft.

Nach dieser Vorgehensweise zeigte die Anzahl der insgesamt befallenen Lymphknoten den deutlichsten Einfluß auf das rezidivfreie Überleben (p-Wert: 0,006).

Von den Patienten mit einem positiven LK waren nach 30 Monaten noch ca. 70% rezidivfrei. Zeigten die Patienten mehr als einen befallenen LK, so lag das rezidivfreie Überleben nach 30 Monaten nur noch bei ca. 25%. Auch die Anzahl positiver SN sowie die Anzahl positiver NSN erwiesen sich als wichtige Prognoseparameter mit p-Werten um 0,03.

Wenn man die Patienten mit einem befallenen SN zusätzlich nach der Metastasenanzahl (unifokal versus multifokal) unterteilte, so wichen die daraus resultierenden Kaplan-Meier-Kurven nur wenig von der ursprünglichen Kurve für das rezidivfreie Überleben der Patienten mit einem positiven SN unabhängig von der Metastasenanzahl ab. Die Anzahl der metastatischen SN scheint somit für die Prognose bedeutender als die Metastasenanzahl. Das gleiche gilt, wenn man die Patienten mit einem positiven LK nach der Metastasenanzahl gliedert.

In dem aktuellen Vorschlag des AJCC (Tabelle 21, Seite 64) zu einer überarbeiteten Stadieneinteilung beim malignen Melanom wurde konsequenterweise die Anzahl der befallenen Lymphknoten mit aufgenommen (Balch et al., 2000).

Bemerkenswert ist, daß bei Patienten mit Metastasen $\leq 0,5$ mm jeweils nur ein SN befallen war. Alle diese Patienten bis auf einen wiesen außerdem keine NSN-Beteiligung auf. Dies könnte bestätigen, daß bei kleinen Metastasen unterhalb des von uns gewählten Grenzwertes die Metastasierung des malignen Melanoms meist noch auf einen Lymphknoten beschränkt ist.

Ein Patient mit ITC (Nr. 8 in Tabelle 1, Seite 19) bildete hier allerdings eine Ausnahme. Bei der ELND einen Monat nach der SN-Biopsie wurde ein positiver NSN gefunden (von insgesamt 17 untersuchten NSN). In diesem LK fanden sich zwei Metastasen, von denen die größere 2,7mm in der größten Ausdehnung maß.

Entsprechend der für das maligne Melanom typischen systematisch fortschreitenden Metastasierung (Reintgen et al, 1994) könnte es sein, daß sich in dem SN eine weitere Metastase befand, die sich in dieser Schnittebene nicht darstellte, oder isoliert in der Hälfte des SN lag, welche molekularbiologisch untersucht wurde. Als weitere potentielle Ursachen kommt in Frage, daß es sich bei diesem NSN in Wahrheit um einen SN handeln könnte, insbesondere, da beschrieben wurde, daß es aufgrund metastatisch befallener Lymphknoten zu einem veränderten Lymphabfluß kommen kann (Thomas, 1956), was zu einer Umgehung des ursprünglichen SN geführt haben könnte. Desweiteren wäre es möglich, daß sich die Lymphdrainage nach der Melanom-OP geändert hat. Dennoch blieb auch dieser Patient rezidivfrei.

4.6 Bedeutung der morphologischen Parameter für der NSN-Befall

Da sich die Anzahl befallener NSN als Risikoindikator erwiesen hat, stellte sich die Frage, wie sich die untersuchten morphologischen Parameter (Metastasengröße, Metastasenanzahl, paranodales Tumorwachstum, Anzahl befallener SN) auf dieses Kriterium auswirkten.

Zwar schienen die Metastasengröße, die Metastasenanzahl und das paranodale Tumorwachstum einen schwachen Einfluß auf den NSN-Befall anzudeuten, die univariate Analyse ergab jedoch für keinen der getesteten Faktoren in unserem Patientenkollektiv einen statistisch bedeutsamen Zusammenhang (p-Werte jeweils $>0,1$).

4.7 Der Einfluß der Tumordicke

Die Tumordicke ist der entscheidende Prognoseparameter, ausgehend vom Primärtumor (Büttner et al., 1995). Entsprechend unterscheiden sich die Kaplan-Meier-Kurven für das rezidivfreie Überleben der Patienten aus Gruppe 1, auch wenn die p-Werte aufgrund der relativ kleinen Patientenzahl nicht statistisch bedeutsam sind.

Es ist außerdem bekannt, daß das Auftreten von Metastasen in den regionären Lymphknoten mit Ansteigen der Tumordicke zunehmend wahrscheinlicher wird (Hohenberger et al., 1996; Gershenwald et al., 1999). Unklar ist jedoch, ob und wie sich die Tumordicke (TD) auf die Metastasengröße auswirkt.

Die Patienten mit histologisch positivem SN (Gruppe 1; n = 32, da bei einem Patienten keine Angabe zur Tumordicke gemacht war) zeigten eine mediane Tumordicke von 3,8mm. In Gruppe 2 lag die mediane Tumordicke bei 2,0mm, in Gruppe 3 bei 1,4mm (Tabellen 23-25, Seite 67-71) .

In Abhängigkeit von der Metastasengröße ergab sich in Gruppe 1 für Patienten mit Metastasen $\leq 0,5$ mm bzw. ITC eine mediane TD von 2,4mm im Gegensatz zu den Patienten mit Metastasen $> 0,5$ mm, die im Median eine TD von 4,5mm zeigten.

Interessant ist, daß bei kleinen Tumordicken (0,76-1,5mm) nur Metastasen $\leq 0,5$ mm bzw. ITC auftraten, hingegen bei großen Tumordicken ($> 4,0$ mm) nur Metastasen $> 0,5$ mm. Im Bereich der mittleren Tumordicken lagen jedoch Metastasen \leq und $> 0,5$ mm vor. Von den 8 Patienten dieser TD mit Metastasen $> 0,5$ mm erlitten 6 (75%) ein Tumorrezidiv. Im Gegensatz dazu blieben die 7 Patienten mit Metastasen $\leq 0,5$ mm rezidivfrei. Hier erwies sich somit die Metastasengröße als entscheidender Prognoseparameter.

Beim Befall der NSN verhielt es sich ähnlich. Patienten mit Tumordicken 0,76-1,5mm lagen nur bei 2 Patienten der Gruppe 1 vor. Einer davon wies einen beteiligten NSN auf (Patient Nr.8 in Tabelle 1, Seite 19). Aufgrund der geringen Fallzahl dieser TD ist hier keine weitergehende Beurteilung möglich. Auffällig ist aber, daß von den Patienten mit mittleren TD (1,51-4,0mm) diejenigen mit Metastasen $\leq 0,5$ mm keine positiven NSN zeigten, wohingegen bei Patienten mit Metastasen $> 0,5$ mm der gleichen TD zu 38% befallene NSN vorlagen.

Diese Patienten zählten dann zu der Gruppe mit mehr als einem befallenen Lymphknoten, die typischerweise eine ungünstigere Prognose hatten. Eine TD >4,0mm zeigte sich bei 15 Patienten, deren Metastasen jeweils >0,5mm waren. In 27% dieser Fälle wurden positive NSN diagnostiziert. Auch für den NSN-Befall scheint somit im Bereich mittlerer Tumordicken die Metastasengröße eine wichtige Rolle zu spielen.

4.8 Schlußfolgerung

Die in der Einleitung gestellten Fragen können wie folgt beantwortet werden:

- 1.) Bei Patienten mit histologisch positivem SN war die Metastasengröße ($\leq 0,5\text{mm}$ versus $>0,5\text{mm}$) ein entscheidender prognostischer Faktor.
- 2.) Die Anzahl der Metastasen im SN (unifokal versus multifokal) hatte keinen Einfluß auf das rezidivfreie Überleben. Lag jedoch paranodales Tumorwachstum vor, verschlechterte sich die Prognose.
- 3.) Sowohl die Anzahl befallener SN (1 SN+ versus >1 SN+) als auch die Anzahl positiver NSN (kein NSN+ versus ≥ 1 NSN+) beeinflusst das rezidivfreie Überleben deutlich. Die größte Aussagekraft kam dabei der Anzahl insgesamt beteiligter Lymphknoten (1 LK+ versus >1 LK+) zu.
- 4.) Sämtliche untersuchte morphologische Parameter wie die Metastasengröße, die Metastasenanzahl, paranodales Tumorwachstum und die Anzahl positiver SN zeigten keinen statistisch signifikanten Einfluß auf die Anzahl befallener NSN.
- 5.) Es zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Tumordicke des Primärtumors und der Metastasengröße im SN. Des weiteren wurden Tendenzen sichtbar, daß die Tumordicke auch den NSN-Befall beeinflusst.

5. Zusammenfassung

Beim malignen Melanom der Haut verschlechtert sich die Prognose mit Auftreten von Lymphknotenmetastasen, unabhängig von bekannten Risikofaktoren.

Zur Vermeidung möglicherweise unnötiger elektiver Lymphknotendissektionen (ELND) und der daraus unter Umständen resultierenden Komplikationen wurde bei klinisch unauffälligem Lymphabflußgebiet die sentinel node (SN)-Biopsie als therapeutische Entscheidungshilfe eingeführt und hat sich in der Zwischenzeit als Standardmethode etabliert.

Nur im Falle histologisch nachgewiesener Melanommetastasen im SN wird routinemäßig eine therapeutische Lymphknotendissektion (TLND) durchgeführt. Die Bedeutung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesener submikroskopischer SN-Metastasen ist zur Zeit noch Gegenstand der Diskussion, stellt aber bisher nicht die Indikation für eine TLND dar.

Ziel dieser Studie war es, mit einfachen Mitteln, die jedem Pathologen an seinem Arbeitsplatz zu Verfügung stehen, morphologische Parameter zu identifizieren, welche auch bei histologisch positiven SN weitergehende prognostische Aussagen im Bezug auf das rezidivfreie Überleben sowie auf die Anzahl befallener non sentinel nodes (NSN) zulassen.

Dazu wurden aus dem Zeitraum von August 1996 bis November 1999 dreiunddreißig Patienten mit histologisch positiven SN des Melanomregisters der Universitäts-Hautklinik Tübingen, von denen die entsprechenden histologischen Schnittpräparate verfügbar waren, in die Studie eingeschlossen. Als Vergleichskollektiv wurden zwei weitere jeweils gleich große Gruppen von Patienten mit histologisch negativen, PCR positiven sowie histologisch und PCR negativen SN so ausgewählt, daß die Beobachtungszeiträume mit denen der ersten Gruppe übereinstimmten.

In der Patientengruppe mit histologisch positiven SN wurden als histomorphometrischen Parameter die Metastasengröße, die Anzahl der Metastasen, das Vorliegen paranodalen Tumorwachstums und die Anzahl befallener SN bestimmt und auf ihre prognostische Bedeutung hin untersucht. Die gleichen Parameter wurden bei den mittels TLND gewonnen NSN erfaßt.

Der Vergleich der drei in dieser Studie untersuchten Patientengruppen ergab für die Patienten mit histologisch positiven SN entsprechend der Literatur einen deutlich schlechteren Verlauf bezüglich des rezidivfreien Überlebens. Jedoch konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, daß Patienten mit SN Metastasen $\leq 0,5\text{mm}$ ($n = 9$) im Vergleich zu Patienten mit größeren Metastasen ($n = 24$) eine signifikant bessere Prognose aufwiesen. Während 16 von den 24 Patienten (67%) mit SN Metastasen $>0,5\text{mm}$ ein Melanomrezidiv entwickelten, trat bei den 9 Patienten mit Metastasen $\leq 0,5\text{mm}$ im Beobachtungszeitraum kein Rezidiv auf (p-Wert: 0,003).

Neben der Metastasengröße zeigte sich auch die Anzahl der befallenen Lymphknoten (LK) als signifikanter Prognoseparameter für das rezidivfreie Überleben. Sowohl die Anzahl positiver SN als auch die Anzahl positiver NSN erwiesen sich hier als statistisch signifikant. Die diesbezüglich größte Aussagekraft kam jedoch der Anzahl insgesamt befallener LK zu. Fünf der 18 Patienten (28%) mit einem positiven LK erlitten ein Tumorrezidiv. Im Gegensatz dazu entwickelten 11 der 15 Patienten (73%) mit mehr als einem befallenen LK in ein Rezidiv (p-Wert: 0,006).

Die übrigen untersuchten histomorphometrischen Parameter (Metastasenanzahl, paranodales Tumorwachstum) zeigten keinen eindeutigen Einfluß auf das rezidivfreie Überleben. Ebenso ließen sich aus den untersuchten histomorphologischen Parametern in unserem Patientenkollektiv keine Rückschlüsse auf die Anzahl befallener NSN gezogen werden.

Zusammenfassend konnten in dieser Studie für Patienten mit histologisch positiver SN-Biopsie die Metastasengröße im SN ($\leq 0,5\text{mm}$ versus $>0,5\text{mm}$) und die Anzahl positiver regionärer LK (1LK+ versus $>1\text{LK+}$) als signifikante prognostische Parameter für das rezidivfreie Überleben identifiziert werden. Letzterem wurde bereits in dem kürzlich vorgestellten Vorschlag des American Joint Committee on Cancer (AJCC) für ein aktualisiertes TNM-Schema Rechnung getragen. Ob bei sehr kleinen Metastasen in Zukunft auf eine TLND verzichtet werden kann, sollte an größeren Patientenkollektiven untersucht werden.

6. Tabellenteil

Tabelle 20: TNM-Klassifikation des AJCC von 1992

Primärtumor: pT

pTx: Primärtumor kann nicht beurteilt werden

pT0: occulter Primärtumor

pTis: in situ-Melanom u./od. Clarklevel I (Tumorzellen rein intra-epidermal)

pT1: Tumordicke $\leq 0,75$ mm u./od. Clarklevel II (Tumorzellen im stratum papillare)

pT2: Tumordicke 0,76-1,5mm u./od. Clarklevel III (Tumorzellen erreichen das stratum reticulare)

pT3: Tumordicke 1,51- 4,0mm u./od. Clarklevel IV (Tumorzellen dringen in das stratum reticulare ein)

pT3a: Tumordicke $>1,5$ mm aber ≤ 3 mm

pT3b: Tumordicke >3 mm aber ≤ 4 mm

pT4: Tumordicke $>4,0$ mm u./od. Clarklevel V (Tumorzellen erreichen das subcutane Fettgewebe)

u./od. Satellitenmetastase(n) im Abstand ≤ 2 cm vom Primärtumor

pT4a: Tumordicke $>4,0$ mm u./od. Clarklevel V

pT4b: Satellitenmetastase(n) im Abstand ≤ 2 cm vom Primärtumor

Wenn zwischen Tumordicke und Clarklevel eine Diskrepanz besteht, so wird jeweils der schlechtere von diesen Parametern gewertet.

Regionäre Lymphknotenmetastasen: N

NX: regionäre LK können nicht beurteilt werden

N0: keine regionären LK-Metastasen

N1: Metastasen ≤ 3 cm (größte Ausdehnung) in den regionären Lymphknoten (LK)

N2: Metastasen > 3 cm (größte Ausdehnung) in den regionären Lymphknoten
u./od. Transitmetastasen

N2a: Metastasen > 3 cm (größte Ausdehnung) in den regionären LK

N2b: Transitmetastasen

N2c: Metastasen > 3 cm (größte Ausdehnung) in den regionären
Lymphknoten und Transitmetastasen

Fernmetastasierung: M

MX: Fernmetastasen können nicht beurteilt werden

M0: keine Fernmetastasen

M1: Fernmetastasen

M1a: Metastasen in Haut, Subcutis oder Lymphknoten jenseits der regionären
Lymphknotenregion

M2b: Viszerale Metastasen

Tabelle 21: Vorschlag des AJCC (2000) für eine aktualisierte TNM-Klassifikation

T- Klassifikation:

T1	< oder = 1mm Tumordicke (TD)	a: ohne Ulzeration (Ulz)
T1		b: mit Ulz oder Clark-Level IV od. V
T2	1,01- 2,0mm TD	a: ohne Ulzeration
T2		b: mit Ulzeration
T3	2,01- 4,0mm TD	a: ohne Ulzeration
T3		b: mit Ulzeration
T4	> 4,0mm TD	a: ohne Ulzeration
T4		b: mit Ulzeration

N- Klassifikation:

N1	1 Lymphknoten (LK) positiv	a: Mikrometastasierung (histologisch)
N1		b: Makrometastasierung (klinisch)
N2	2-3 LK positiv	a: Mikrometastasierung
N2		b: Makrometastasierung
N2		c: Transitmetastasen/ Satellitenmetast. ohne LK-Metastasen
N3	4 oder mehr LK positiv; verbackene LK oder Kombinationen von Transitmetastasen/Satellitenmetastasen oder ulzeriertes Melanom und LK-Befall	

M- Klassifikation:

M1	Hautfernetastasen, subcutane FM, LK-FM	normale LDH
M2	Lungenmetastasen	normale LDH
M3	alle anderen visceralen Metastasen	normale LDH
	oder alle anderen Fernmetastasen	erhöhte LDH

LK = Lymphknoten; FM = Fernmetastasen

Tabelle 22: Patientenangaben

GRUPPE 1-3	alle Patienten	ohne Rezidiv	mit Rezidiv
Patientenanzahl	99	76	23
Geschlecht			
Männlich (m)	48	37	11
Weiblich (w)	51	39	12
Alter bei Melanom-OP in Jahren			
Median	52	50	52
Spanne	19-82	19-82	22-76
Lokalisation des Primärtumors			
Extremitäten	60	45	15
Rumpf	34	27	7
Kopf	5	4	1
Histologischer Tumortyp			
NMM	38	27	11
SSM	48	42	6
ALM	9	5	4
LMM	2	1	1
Sonstige	2	1	1
Breslow Tumordicke in mm			
Median	2,0	1,9	3,4
Spanne	0,25-15,0	0,25-15,0	1,3-15,0
Tumordicken			
<0,76mm	2	2	0
0,76-1,5mm	29	28	1
1,51-4,0mm	50	38	12
>4,0mm	17	7	10
keine Angabe	1	1	0

Forts. Tabelle 22 **alle Patienten** **ohne Rezidiv** **mit Rezidiv**

Clark-Level

II	1	1	0
III	16	13	3
IV	63	53	10
V	8	4	4
keine Angabe	11	5	6

Ulzeration

Ulzeration vorhanden	41	26	15
keine Ulzeration	54	46	8
keine Angabe	4	4	0

Tabelle 23: Patientenangaben

GRUPPE 1	alle Patienten	ohne Rezidiv	mit Rezidiv
Patientenanzahl	33	17	16
Geschlecht			
Männlich (m)	18	9	9
Weiblich (w)	15	8	7
Alter bei Melanom-OP in Jahren			
Median	52	50	59
Spanne	21-76	21-67	22-76
Lokalisation des Primärtumors			
Extremitäten	21	12	9
Rumpf	11	5	6
Kopf	1	0	1
Histologischer Tumortyp			
NMM	19	11	8
SSM	7	4	3
ALM	4	1	3
LMM	1	0	1
Sonstige	2	1	1
Breslow Tumordicke in mm			
Median	3,8	2,7	4,5
Spanne	1,3-15,0	1,3-15,0	2,0-15,0
Tumordicken			
<0,76mm	0	0	0
0,76-1,5mm	2	2	0
1,51-4,0mm	15	9	6
>4,0mm	15	5	10
keine Angabe	1	1	0

Forts. Tabelle 23 **alle Patienten** **ohne Rezidiv** **mit Rezidiv**

Clark-Level

II	0	0	0
III	2	1	1
IV	19	11	8
V	6	2	4
keine Angabe	6	3	3

Ulzeration

Ulzeration vorhanden	19	8	11
keine Ulzeration	13	8	5
keine Angabe	1	1	0

Tabelle 24: Patientenangaben

GRUPPE 2	alle Patienten	ohne Rezidiv	mit Rezidiv
Patientenanzahl	33	29	4
Geschlecht			
Männlich (m)	16	16	0
Weiblich (w)	17	13	4
Alter bei Melanom-OP in Jahren			
Median	50	50	48
Spanne	19-77	19-77	33-60
Lokalisation des Primärtumors			
Extremitäten	18	15	3
Rumpf	13	12	1
Kopf	2	2	0
Histologischer Tumortyp			
NMM	11	9	2
SSM	20	18	2
ALM	2	2	0
LMM	0	0	0
Sonstige	0	0	0
Breslow Tumordicke in mm			
Median	2,0	1,9	2,6
Spanne	0,3-7,0	0,3-7,0	2,0-3,5
Tumordicken			
<0,76mm	1	1	0
0,76-1,5mm	11	11	0
1,51-4,0mm	19	15	4
>4,0mm	2	2	0

Forts. Tabelle 24 **alle Patienten** **ohne Rezidiv** **mit Rezidiv**

Clark-Level

II	1	1	0
III	6	5	1
IV	22	21	1
V	2	2	0
keine Angabe	2	0	2

Ulzeration

Ulzeration vorhanden	14	11	3
keine Ulzeration	18	17	1
keine Angabe	1	1	0

Tabelle 25: Patientenangaben

GRUPPE 3	alle Patienten	ohne Rezidiv	mit Rezidiv
Patientenanzahl	33	30	3
Geschlecht			
Männlich (m)	14	12	2
Weiblich (w)	19	18	1
Alter bei Melanom-OP in Jahren			
Median	52	54	49
Spanne	27-82	27-82	27-67
Lokalisation des Primärtumors			
Extremitäten	21	18	3
Rumpf	10	10	0
Kopf	2	2	0
Histologischer Tumortyp			
NMM	8	7	1
SSM	21	20	1
ALM	3	2	1
LMM	1	1	0
Sonstige	0	0	0
Breslow Tumordicke in mm			
Median	1,4	1,4	1,6
Spanne	0,7-3,5	0,7-3,5	1,3-2,9
Tumordickegruppen			
<0,76mm	1	1	0
0,76-1,5mm	16	15	1
1,51-4,0mm	16	14	2
>4,0mm	0	0	0

Forts. Tabelle 25 **alle Patienten** **ohne Rezidiv** **mit Rezidiv**

Clark-Level

II	0	0	0
III	8	7	1
IV	22	21	1
V	0	0	0
keine Angabe	3	2	1

Ulzeration

Ulzeration vorhanden	8	7	1
keine Ulzeration	23	21	2
keine Angabe	2	2	0

Tabelle 26: Methode zur Anfärbung von Melanomzellen mit S100- und HMB 45-Antikörpern

<u>Verfahren in Einzelschritten / Verdünnung</u>	<u>Dauer</u>
Xylol; absteigende Alkoholreihe (100%, 96%,70%) 0,05 M Tris Puffer (pH 7,2) kaltes Wasser, Aqua dest.	10 min
0,1% H ₂ O ₂ in Methanol 0,05 M Tris Puffer (pH 7,2)	10 min
Pferdeserum 1 Tr : 5ml Tris Puffer verdünnt Vektor Laboratories, Inc, CA	
Primärantikörper gegen S100 1:5000 bzw. HMB 45 1:100 verdünnt Vektor Laboratories, Inc, CA	1 h
0,05 M Tris Puffer (pH 7,2)	
biotinylierter Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-Anti-Maus) 1 Tr : 2,5ml Tris Puffer Vektor Laboratories, Inc, CA	30 min
0,05 M Tris Puffer (pH 7,2)	
ABC-Komplex , je 1 Trpf Lösung A,B : 2,5ml Tris Puffer Vektor Laboratories, Inc, CA	30 min
0,05 M Tris Puffer (pH 7,2)	
0,1%ige 3,3-DAB-Lösung + 100µl H ₂ O ₂ Sigma GmbH, Deisenhofen	2 min
Aqua dest.	
Gegenfärbung mit Harris-Hämatoxylin Stoppen der Reaktion mit Leitungswasser, Alkohol + NH ₃ , Alkohol Aufsteigende Alkohol-Xylol-Reihe Eindeckung in Eukitt ® Kindler, Freiburg	45 sec

Tyrosinase-Reverse Transcriptase-PCR

Tabelle 27: RNA-Messung mit Spektrometer

Messung bei 260nm: Absorption = 1 entspricht einer RNA-Konzentration von
40µg/ml

Probe : 198µl TE-Puffer + 2µl RNA

Leerwert : 200µl TE-Puffer

Konzentrationsberechnung: gemessenes Ergebnis x 40 x Verdünnung in µg/ml

Tabelle 28: Herstellung der cDNA

Mix I: 8,0µl 5 x Erststrang-Puffer (Life Technologies, Eggenstein)

2,5µl dNTP Mix je 2mM (Pharmacia, Freiburg)

1,0µl DTT (Dithiothreitol) 0,1M (Pharmacia, Freiburg)

1,0µl Hexamere Primer 0,2µg (Pharmacia, Freiburg)

= 12,5µl Mix I

+ 27,0µl DEPC-Wasser + 3000ng RNA

= 40µl Reaktionsansatz

+ 0,5µl Reverse Transcriptase (Super-Script RNase H⁻ Reverse
Transcriptase, Life Technologies, Eggenstein)

Tabelle 29: PCR-Reaktionsansätze

1. Mix II:	5,0µl	10 x Taq Puffer	(Pharmacia, Freiburg)
	1,0µl	dNTP Mix je 20 mM	(Pharmacia, Freiburg)
	2,0µl	Primer je 20pmol	(Pharmacia, Freiburg)
	0,5µl	TAQ DNA-Polymerase 5U/µl	(Pharmacia, Freiburg)
	<u>36,5µl HPLC-Wasser</u>		
	45,0µl Mix II		
	+5,0µl cDNA	→	<u>PCR mit insgesamt 2 x 35 Zyklen</u>
			(GAPDH: 2x 25 Zyklen)
2. Mix III für die nested PCR:	Mix II mit 2,0µl des Reaktionsproduktes aus 1.		
	aber mit nested Oligonucleotidprimern und		
	39,5µl HPLC-Wasser => 48,0µl Mix III		

Tabelle 30: PCR: 35 Zyklen - Ablauf eines Zyklus:

Hotstart	85° C für 8 min
Auftrennung der cDNA-Stränge	94° C für 60 sec
Anealing: Primer docken an	-Tyrosinase: 55° C für 65 sec
	-GAPDH: 56° C für 65 sec
DNA-Amplifikation	72° C für 65 sec

wenn dieser Cyclus 35 mal durchlaufen ist, sistiert die Reaktion bei 4°C.

7. Bildmaterial

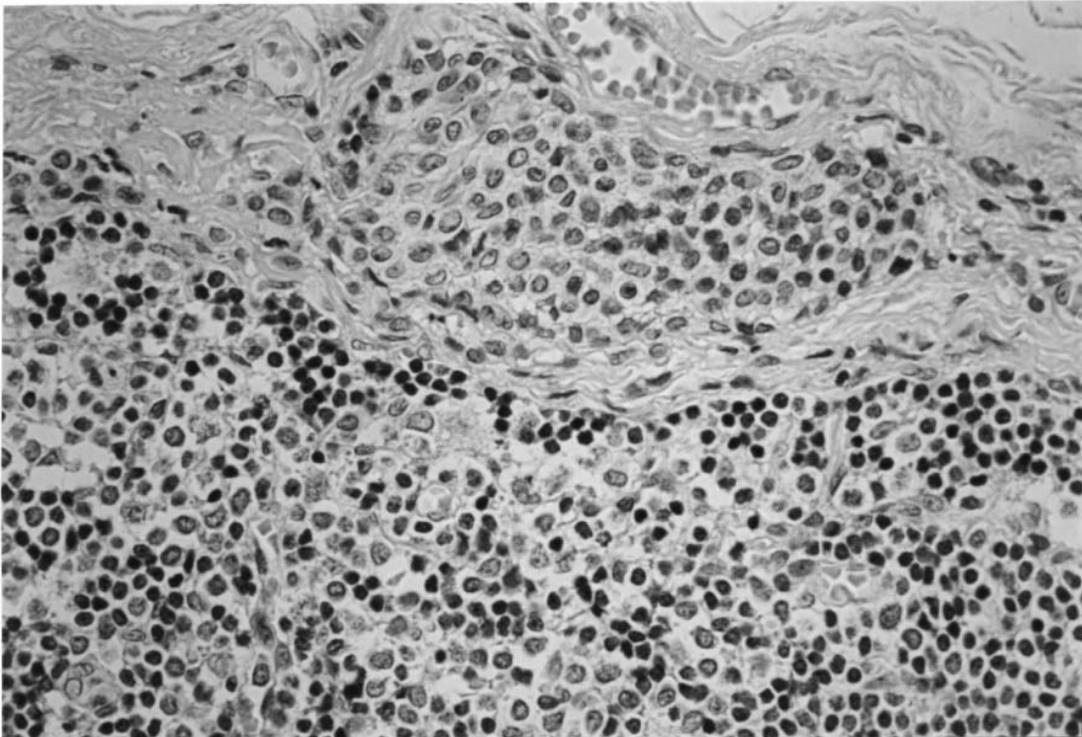


Abbildung 1: Kapsuläre Naevuszellen (HE x 200)

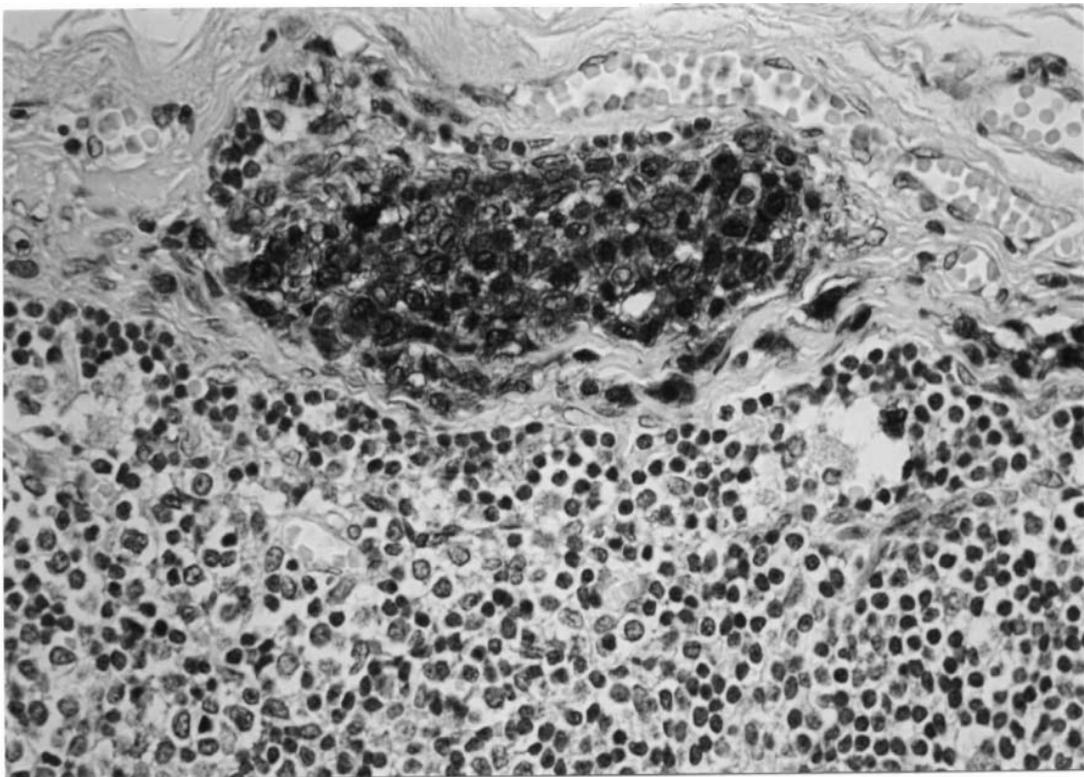


Abbildung 2: Kapsuläre Naevuszellen (S100 x 200)

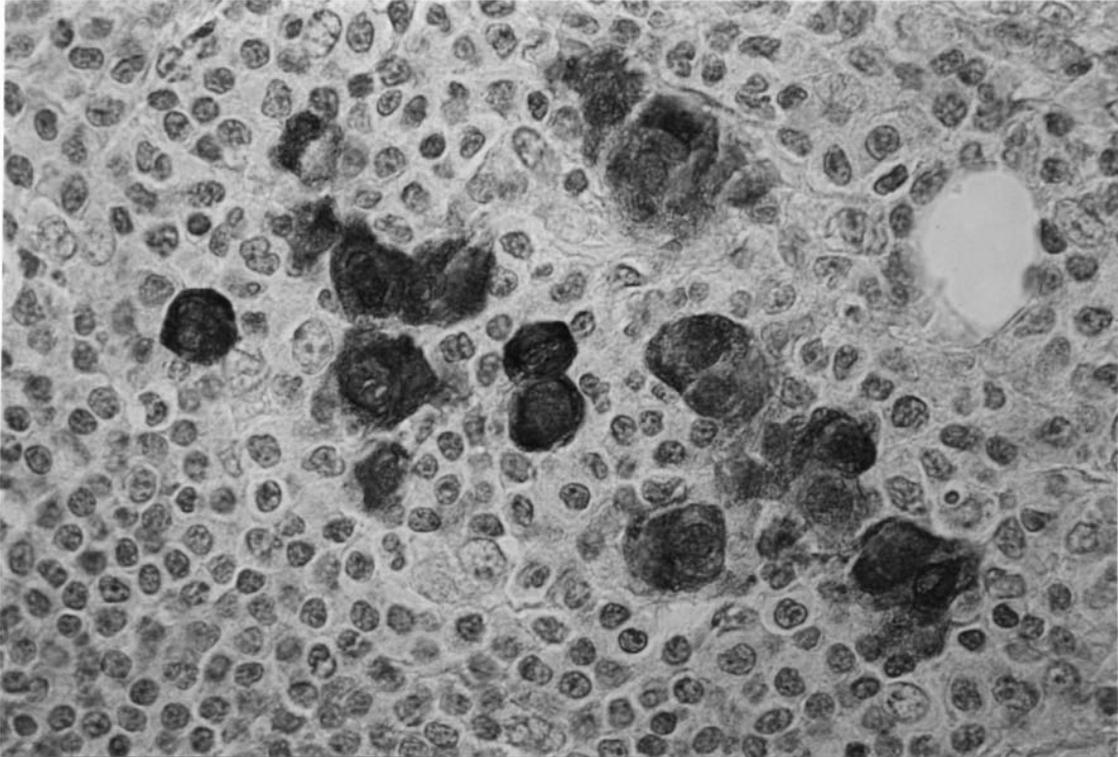


Abbildung 3: Melanomzellnest ($\leq 0,5\text{mm}$) im SN (S100 x 300)

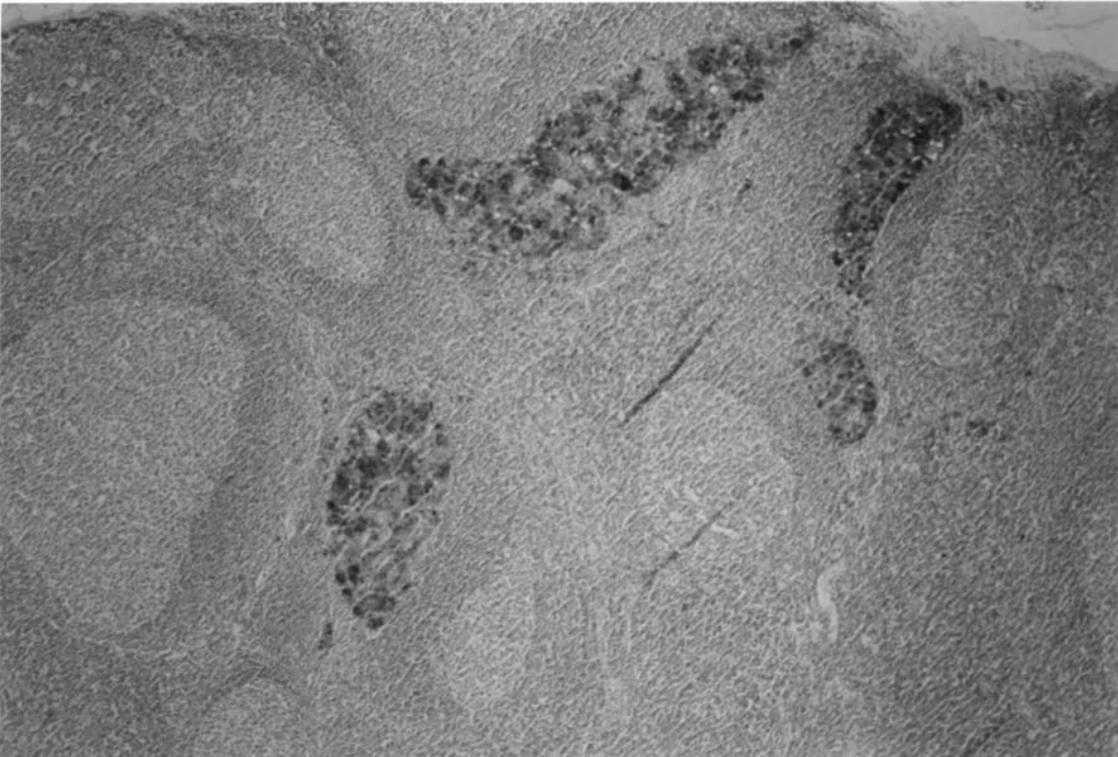


Abbildung 4: Vier Metastasen $> 0,5\text{mm}$ im SN (S100 x 50)

8. Literaturverzeichnis

- Baisden, B.L., Askin, F.B., Lange, J.R., Westra, W.H. (2000)
HMB-45 immunohistochemical staining of sentinel lymph nodes: a specific method for enhancing detection of micrometastases in patients with melanoma
Am J Surg Pathol, 24, 1140-1146
- Balch, C.M., Soong, S.-J., Murad, T.M., Ingalls, A.L., Maddox, W.A. (1981)
A multifactorial analysis of melanoma: III. Prognostic factors in melanoma patients with lymph node metastases (stage II)
Ann Surg, 193, 377-388
- Balch, C.M., Buzaid, A.C., Atkins, M.B., Cascinelli, N., Coit, D.G., Fleming, I.D., Houghton, A., Kirkwood, J.M., Mihm, M.F., Morton, D.L., Reintgen, D., Ross, M.I., Sober, A., Soong, S.-J., Thompson, J.A., Thompson, J.F., Gershenwald, J.E., McMasters, K.M. (2000)
A new american joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma
Cancer, 88, 1484-1491
- Bevilacqua, R.G., Coit, D.G., Rogatko, A., Younes, R.N., Brennan, M.F. (1990)
Axillary dissection in melanoma: Prognostic variables in node-positive patients
Ann Surg, 212, 125-131
- Blaheta, H.-J., Ellwanger, U., Schitteck, B., Sotlar, K., Maczey, E., Breuninger, H., Thelen, M.H., Bültmann, B., Rassner, G., Garbe, C. (2000)
Examination of regional lymph nodes by sentinel node biopsy and molecular analysis provides new staging facilities in primary cutaneous melanoma
J Invest Dermatol, 114, 637-642
- Breslow, A. (1970)
Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous malignant melanoma
Ann Surg, 172, 902-908
- Büchels, H.K., Vogt, H., Bachter, D. (1997)
Szintillationssondengesteuerte Sentinel-Lymphadenektomie beim malignen Melanom
Chirurg, 68, 45-50
- Büttner, P., Garbe, C., Bertz, J., Burg, G., d'Hoedt, B., Drepper, H., Guggenmoos-Holzmann, I., Lechner, W., Lippold, A., Orfanos, C.E., Peters, A., Rassner, G., Stadler, R., Stroebel, W. (1995)
Primary cutaneous melanoma: Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification
Cancer, 75, 2499-2506

Buzaid, A.C., Tinoco, L.A., Jendiroba, D., Tu, Z.N., Lee, J.J., Legha, S.S., Ross, M.I., Balch, C.M., Benjamin, R.S. (1995)

Prognostic value of size of lymph node metastasis in patients with cutaneous melanoma

J Clin Oncol, 13, 2361-2368

Buzaid, A.C., Ross, M.I., Balch, C.M., Soong, S.-J., McCarthy, W.H., Tinoco, L., Mansfield, P., Lee, J.E., Bedikian, A., Eton, O., Plager, C., Papadopoulos, N., Legha, S.S., Benjamin, R.S. (1997)

Critical analysis of the current American Joint Committee on cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system

J Clin Oncol, 15, 1039-1051

Buzaid, A.C., Ross, M.I., Soong, S.-J. (1998)

Classification and staging, 37-49

In: Balch, C.M., Houghton, A.N., Sober, A.J., Soong, S.-J.:

Cutaneous Melanoma

3. Auflage, Quality Medical Publishing, Inc., St. Louis, Missouri

Byers, H.R., Bhawan, J.(1998)

Pathologic parameters in the diagnosis and prognosis of primary cutaneous melanoma

Hematol Oncol Clin North Am, 12, 717-735

Carson, K.F., Wen, D.-R., Li, P.-X., Lana, A.M.-A., Bailly, C., Morton, D.L., Cochran, A.J. (1996)

Nodal nevi and cutaneous melanomas

Am J Surg Pathol, 20, 834-840

Clark, W.H.J., From, L., Bernardino, E.A., Mihm, M.C. (1969)

The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin

Cancer Res, 29, 705-727

Cochran, A.J., Wen, D.-R., Herschman, H.R. (1984)

Occult melanoma in lymph nodes detected by antiserum to S100 protein.

Int J Cancer, 34, 159-163

Cochran, A.J., Lana, A.M.A., Wen, D.- R. (1989)

Histomorphometry in the assessment of prognosis in stage II malignant melanoma

Am J Surg Pathol, 13, 600-604

Cohen, M.H., Ketcham, A.S., Felix, E.L., Li, S.- H., Tomaszewski, M.- M., Costa, J., Rabson, A.S., Simon, R.M., Rosenberg, S.A. (1977)

Prognostic factors in patients undergoing lymphadenectomy for malignant melanoma

Ann Surg, 186, 635-642

- Coit, D.G., Rogatko, A., Brennan, M.F. (1991)
 Prognostic factors in patients with melanoma metastatic to axillary or inguinal lymph nodes
Ann Surg, 214, 627-636
- Drepper, H., Köhler, C.O., Bastian, B., Breuninger, H., Bröcker, E.-B., Göhl, J., Groth, W., Hermanek, P., Hohenberger, W., Lippold, A., Kölmel, K., Landthaler, M., Peters, A., Tilgen, W. (1993 a)
 Benefit of elective lymph node dissection in subgroups of melanoma patients
Cancer, 72, 741-749
- Drepper, H., Bieß, B., Hofherr, B., Hundeiker, M., Lippold, A., Otto, F., Padberg, G., Peters, A., Wiebelt, H. (1993 b)
 The prognosis of patients with stage III melanoma: Prospective long-term study of 286 patients of the Fachklinik Hornheide
Cancer, 71, 1239-1246
- Essner, R. (1997)
 The role of lymphoscintigraphy and sentinel node mapping in assessing patient risk in melanoma
Semin Oncol, 24, 8-10
- Garbe, C., Schaumburg-Lever, G. (1997)
 Klinik und Histologie des malignen Melanoms, 247-270
 in: Garbe, C., Dummer, R., Kaufmann, R., Tilgen, W.: *Dermatologische Onkologie* 1. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Gershenwald, J.E., Thompson, W., Mansfield, P.F., Lee, J.E., Colome, M.I., Tseng, C.H., Lee, J.J., Balch, C.M., Reintgen, D.S., Ross, M.I. (1999)
 Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience:
 The prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients
J Clin Oncol, 17, 976-983
- Hohenberger, W., Göhl, J., Altendorf- Hofmann, A., Meyer, T. (1996)
 Lymphknotendisektion beim malignen Melanom
Chirurg, 67, 779-787
- Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H. (1981)
 Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures
J Histochem Cytochem, 29, 577-580
- Karakousis, C.P., Goumas, W., Rao, U., Driscoll, D.L. (1991)
 Axillary node dissection in malignant melanoma
Am J Surg, 162, 202-207

- Krag, D.N., Meijer, S.J., Weaver, D.L., Loggie, B.W., Harlow, S.P., Tanabe, K.K., Laughlin, E.H., Alex, J.C., (1995)
Minimal-access surgery for staging of malignant melanoma
Arch Surg, 130, 654-658
- McGuckin, M.A., Cummings, M.C., Walsh, M.D., Hohn, B.G., Bennett, I.C., Wright, R.G. (1996)
Occult axillary node metastases in breast cancer: Their detection and prognostic significance
Br J Cancer, 73, 88-95
- Messina, J.L., Glass, L.F., Cruse, C.W., Berman, C., Ku, N.K., Reintgen, D.S. (1999)
Pathologic examination of the sentinel lymph node in malignant melanoma
Am J Surg Pathol, 23, 686-690
- Morton, D.L., Wen, D.-R., Wong, J.H., Economou, J.S., Cagle, L.A., Storm, K., Foshag, L.J., Cochran, A.J. (1992)
Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma
Arch Surg, 127, 392- 399
- Morton, D.L., Thompson, J.F., Essner, R., Elashoff, R., Sern, S.L., Nieweg, O.E., Roses, D.F., Karakousis, C.P., Mozzillo, N., Reintgen, D., Wang, H.-J., Glass, E.C., Cochran, A.J. (1999)
Validation of the accuracy of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early-stage melanoma
Ann Surg, 230, 453- 465
- Norman, J., Cruse, W., Espinosa, C., Cox, C., Berman, C., Clark, R., Saba, H., Wells, K., Reintgen, D. (1990)
Redefinition of cutaneous lymphatic drainage with the use of lymphoscintigraphy for malignant melanoma
Am J Surg, 162, 432-437
- Reintgen, D., Cruse, C.W., Wells, K., Berman, C., Fenske, N., Glass, F., Schroer, K., Heller, R., Ross, M., Lyman, G., Cox, C., Rappaport, D., Seigler, H.F., Balch, C. (1994)
The orderly progression of melanoma nodal metastases
Ann Surg, 220, 759-767
- Ross, M.I. (1996)
Surgical management of stage I and II melanoma patients:
Approach to the regional lymph node basin
Semin Surg Oncol, 12, 394-401
- Starz, H., Bachter, D., Balda, B.-R., Gerstel, C., Büchels, H. (1999)
Qualitative und quantitative Auswertung der Sentinel-Lymphknoten bei malignem Melanom
Nuklearmedizin, 22, 253-260

Thomas, C.S. (1956)

Lymphatic dissemination of radiogold in the presence of lymph node metastasis
Surg Gynecol Obstet, 103, 51-56

Van der Veen, H., Hoekstra, O.S., Paul, M.A., Cuesta, M.A., Meijer, S. (1994)

Gamma probe-guided sentinel node biopsy to select patients with melanoma for lymphadenectomy

Br J Surg, 81, 1769-1770

Veronesi, U., Adamus, J., Bandiera, D.C., Brennhovd, I.O., Caceres, E., Cascinelli, N.,

Claudio, F., Ikonopisov, R.L., Javorskj, V.V., Kirov, S., Kulakowski, A., Lacour, J.,

Lejeune, F., Mechl, Z., Morabito, A., Rodé, I., Sergeev, S., van Slooten, E.,

Szczygiel, K., Trapeznikov, N.N., Wagner, R.I. (1977)

Inefficacy of immediate node dissection in stage I melanoma of the limbs

N Engl J Med, 297, 627-630

Wang, X., Heller, R., VanVoorhis, N., Cruse, C.W., Glass, F., Fenske, N., Berman, C.,

Leo-Messina, J., Rappaport, D., Wells, K., DeConti, R., Moscinski, L., Stankard, C.,

Puleo, C., Reintgen, D. (1994)

Detection of submicroscopic lymph node metastases with polymerase chain reaction in patients with malignant melanoma

Ann Surg, 220, 768-774

Werner, J. (1984)

Medizinische Statistik

Eine praktische Anleitung für Studierende, Ärzte und Biologen

Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. B. Bültmann danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und für sein Interesse an meiner Arbeit

Herrn Dr. med. K. Sotlar danke ich für die Betreuung der Arbeit und seine tatkräftige Unterstützung

Danken möchte ich auch Herrn Dr. med. H.-J. Blaheta für die Betreuung seitens der Hautklinik und für die Überlassung der benötigten Daten

Mein Dank gilt ebenso Fr. S. Röger für ihre Hilfsbereitschaft und Freundschaft

Fr. Ableiter und dem MTA-Team der Pathologie danke ich für ihre freundliche Mithilfe

Fr. Dr. B. Pietsch-Breitfeld danke ich für ihre ermutigende Hilfe bei der statistischen Auswertung

Fr. D. Guénon danke ich für ihre helfende Hand im Umgang mit der statistischen Software

Des weiteren danke ich Fr. Dr. med. M. Gleiniger, H. J. Budcke, meiner Schwester N.C. Trick, Fr. A. Schmirander, Fr. G. Braun, Fr. A. Strigel, Fr. P. Köthe und Fr. M. Rimner für ihre liebe Unterstützung.

Außerdem gilt mein Dank meiner Familie, die stets hinter mir stand

Lebenslauf

Name: Daniela Carmen Trick

Geburtsdatum: 20.02.1971

Geburtsort: Schramberg

Eltern: Jörg-Udo Trick geb. am 24.03.1948
Ingetraud Trick, geb. Kriener geb. am 09.08.1951

Schulische Bildung: 1977-1981 Grundschule Schramberg-Sulgen
1981-1990 Gymnasium Schramberg
1990 Abitur

Ausbildung: 1990-1993 zur Kinderkrankenschwester
am Olgahospital in Stuttgart

Anstellung: 1993-1996 als Kinderkrankenschwester in der Neuropädiatrie
der Universitätskinderklinik Freiburg

Studium: ab April'97 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-
Karls-Universität Tübingen
1999 ärztliche Vorprüfung
2000 erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2002 zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2003 dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung