

5 Patienten und Methoden

5.1 Patienten

5.1.1 Datenrecherche

Eine patientenbezogene Speicherung von Sentineloperationen mit den für diese Studie benötigten Informationen existierte am Klinikum Minden nicht. Deshalb wurde zu Beginn der Recherche aus der Abrechnungsabteilung eine Liste mit sämtlichen Patientennamen, bei denen eine entsprechende Operation vergütet wurde, angefordert. Eine zweite Patientenliste wurde aus der Abteilung Nuklearmedizin des hiesigen Hauses erbeten. Aus den Schnittmengen beider Listen wurden zunächst sämtliche Akten der in Frage kommenden Patientennamen durchgesehen. Dies führte einerseits zum Ausschluss von Patienten, die zwar eine szintigraphische Darstellung ihrer Lymphbahnen (z.B. bei Verdacht auf Lymphödem), aber kein MM hatten, andererseits auch solchen Patienten, bei denen die SLK-Entnahme nicht gelang oder bei denen die Einschlusskriterien nicht erfüllten waren.

5.1.2 Auswahlkriterien und Anzahl von Sentineloperationen

Aus dem Patientenkollektiv der Hautklinik Minden wurden von 1997-2002 insgesamt 225 Patienten mit einem MM (226 Tumore) ausgewählt. Diese erfüllten folgende Kriterien:

- Erfolgreiche histologisch gesicherte Entnahme mindestens eines SLK
- Td von ≥ 1 mm oder
- Bei Td < 1 mm mindestens ein Zusatzkriterium wie Ulzeration oder Regression
- Fehlende Fernmetastasen zum Operationszeitpunkt sowie keine klinisch und sonographisch auffälligen Lk

Zusätzlich zu den 225, wurde im genannten Zeitraum bei weiteren 23 Patienten ebenfalls eine SLK-Darstellung und -Operation durchgeführt. Davon war in 12 Fällen eine Entnahme des SLK nicht möglich, 6 Patienten waren bereits fernmetastasiert, in 4 Fällen konnte kein SLK szintigraphisch dargestellt werden und in einem Fall blieb der Primärtumor unbekannt. Somit waren hier die Kriterien zur Berücksichtigung nicht erfüllt.

Die Sentineloperation beim MM wurde an der Hautklinik Minden im Frühjahr 1997 zum erstenmal durchgeführt. Dieser Zeitpunkt ist gleichzeitig Startpunkt der vorliegenden Untersuchung. Die Abb. 2 gibt nur die Anzahl der für diese Studie ausgewählten Operationen wieder.

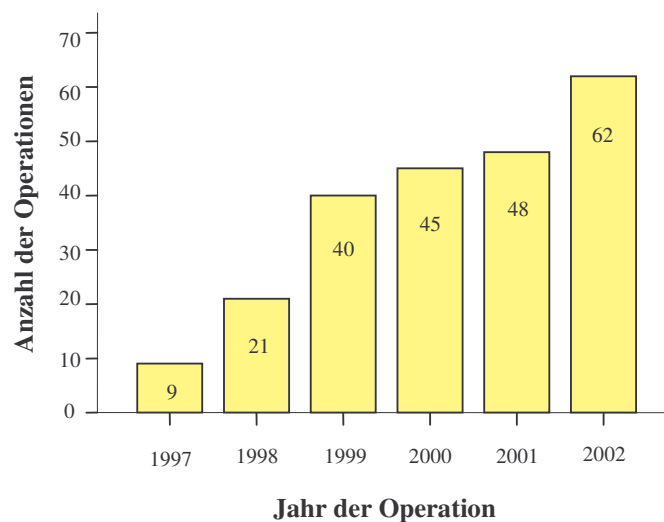


Abb. 2: Anzahl untersuchter Operationen pro Jahr

5.2 Methoden

Die adäquate operative Versorgung eines Melanompatienten mit der Indikation einer SLK-Biopsie basierte sowohl auf der Exzision des Primärtumors als auch der Extirpation des/der WLK. Die Primärtumore wurden sowohl ambulant exzidiert oder biopsiert als auch in der Klinik entfernt.

In der Regel wurde die SLK-Biopsie zuerst durchgeführt. Ausnahmen bildeten Tumore mit relativer Nähe zum SLK und eine hierdurch erschwerte Lokalisation der Lk mit der Gammasonde aufgrund der Strahlung der Injektionsdepots um den Tumor herum. Anschließend erfolgte die Primärtumorexzision mit einem Tumorabstand je nach Region und Td von 1,0 bis 3,0 Zentimetern. Die Wunde wurde entweder mit einer Primärnaht oder durch plastische Rekonstruktion geschlossen. In Ausnahmefällen, vor allem bei den anfänglichen Sentineloperationen mit Sicherheitsabständen bis 3,0 cm, ausgedehnten Tumoren oder ungünstiger Lokalisation, wurden auch sekundäre Wundverschlüsse mittels Spalt- oder Vollhaut nach entsprechender Wundkonditionierung durchgeführt.

5.2.1 Darstellung des Lymphabflusses und Entfernung von Sentinellymphknoten

In der Abteilung für Nuklearmedizin des Klinikums Minden erfolgte die Darstellung des Lymphabflusses der Patienten. Dazu wurde am Vormittag eine Lymphabstromszintigraphie durchgeführt, bei der ein Nuklearmediziner 1,0 ml einer radioaktiv markierten Lösung Technetium (Nanocoll[®]) 40 MBq (bzw. 80 MBq am Vortag) intradermal in mindestens 4 Depots im Abstand von 0,5 cm um den Tumor bzw. das Narbenareal herum injizierte. Es folgte über 10 bis 30 Minuten an der Injektionsstelle eine Sequenzszintigraphie bis zur Darstellung der drainierenden Lymphbahn. Die Aktivitätsdepots wurden dabei mit Bleiplatten abgedeckt, um eine Beeinflussung der Aufnahmen zu reduzieren. Anschließend folgte eine statische Szintigraphie für 1 bis 2 Stunden mit dem Ziel, den ersten drainierenden Lk zu identifizieren. Die Lokalisation des dargestellten Lk wurde abschließend auf der Haut in 2 Ebenen markiert. Zusätzlich erfolgte eine telefonische oder schriftliche Mitteilung an den Operateur über die Patientenlagerung bei der Markierung des Lk auf der Haut.

Nach der Narkoseeinleitung und entsprechender Lagerung wurde als zusätzliche Markierungshilfe intradermal ein Volumen von 0,5 bis 1,0 ml Patentblau[®] in die Umgebung des Primärtumors bzw. der Tumornarbe injiziert. In manchen Fällen war nach etwa 20 Minuten aufgrund des schnellen Abstroms eine Nachinjektion notwendig. Bedingt durch den schnellen Abtransport von Patentblau[®], wurde zunächst die Entnahme des bzw. der ersten drainierenden Lk durchgeführt. Hierzu wurde der WLK mit Hilfe der Gammasonde unter sterilen Bedingungen geortet. An der Stelle des maximalen Zerfalls erfolgte eine Hautinzision und die Präparation des subkutanen Fettgewebes bis zur Darstellung der eingefärbten Lymphknotenbahn. Unter erneutem Einsatz der Gammasonde wurde anschließend der WLK selektiert. Danach folgte die Präparation sowie Ligatur nach proximal und distal bzw. die Koagulation der afferenten und efferenten Lymphbahnen. Nach der Extirpation der Lk wurde zum Abschluss nochmals die Region mittels Gammasonde kontrolliert, um einen eventuell übersehenen weiteren SLK zu detektieren. Wenn sich bei dieser Kontrolle ein weiterer impulsgebender Lk fand oder ein zusätzlicher Lk mit einer maximalen Farbintensität von Patentblau[®] darstellte, wurde dieser ebenfalls entfernt und histologisch sowie immunhistologisch aufgearbeitet. Im Falle des Nachweises von MiM in den entnommenen Lk war in dem entsprechenden Gebiet eine LAD indiziert. Je nach betroffener Lokalisation kam es dabei zu einer Entfernung der zervikalen, axillären oder inguinalen Lk der jeweiligen Körperseite.

Verarbeitung der Sentinellymphknoten und immunhistochemische Färbungen

Die entnommenen Lk wurden zunächst in einer vierprozentigen Formalinlösung fixiert. Im weiteren Verlauf erfolgte die Präparation aus dem Fettgewebe mit nachfolgender Aufarbeitung und Lammellierung in approximativ 1,0-2,0 mm breite Schnitte. Bei Anfertigung der Schnitte wurde auf einen parallelen Verlauf zur Längsachse des Lk geachtet. Danach wurde eine vollständige Einbettung in Paraffin durchgeführt. Von jeder Ebene wurden 3 Paraffinschnitte angefertigt, ein Schnitt für die HE-Färbung, die anderen für die immunhistologische Aufarbeitung mit S-100 und HMB-45. Optional kam zusätzlich Melan-A zum Einsatz.

5.2.2 Histomorphologische Parameter positiver Sentinellymphknoten

Alle Lk mit MiM sowie alle Lk, in deren Region im Beobachtungszeitraum Lymphknotenmetastasen auftraten, wurden erneut mikroskopiert. Die Lk mit MiM wurden auf 12 Kriterien hin untersucht, wobei eine Aufteilung in 6 quantitative und 6 qualitative Merkmale möglich ist (Tab. 8). Einige Präparate waren bei der Untersuchung bereits verblasst. In diesen Fällen wurde für die entsprechenden Schnittstufen Nachschnitte mit den erforderlichen Färbungen angefertigt.

Tab. 8: Kriterien der histomorphologischen Untersuchung, angelehnt an Scolyer et al. [39]

Quantitative Kriterien	Qualitative Kriterien
Anzahl positiver SLK (n)	Subcapsuläres Depot
Anzahl Depots (n)	Intraparenchymales Depot
d (mm)	Zerstörung der nodalen Architektur
Depot-Durchmesser (mm)	Tumorzellen zerstreut im LK
Areal des größten Foki (mm ²)	Involvierung perinodaler LK
Depotfläche (prozentual vom LK)	Extrakapsuläre Streuung

Ein Depot wurde definiert als eine Ansammlung mehrerer Tumorzellen mit relativer Abgrenzung zu anderen Zellhaufen. Einzelzellen wurden im Falle von vorhandenen Depots nicht als eigenständig gezählt, sondern nur registriert in Lk ohne Depots.

Wenn möglich wurden die quantitativen Größen in der HE-Färbung beurteilt. Alternativ wurde die Protein-S-100-Färbung gebraucht. Die d wurde dabei vom Rand der inneren Kapsel bis zur maximalen Infiltration des Lk gemessen. Zur Bestimmung des Depotdurchmessers wurde das größte Depot ausgewählt, wobei als Grundlage für die Berechnung des Areals näherungsweise

das Produkt aus Länge und Breite verwendet wurde. Die Depotfläche wurde prozentual in 10er Schritten zwischen 2 Untersuchern abgestimmt. Bei den qualitativen Kriterien wurde die Ausbreitung der Tumorzellen im Lk beurteilt. Hier war auch eine Nennung mehrerer Kriterien möglich.

Um die Vorgehensweise der Untersuchung zu verdeutlichen, werden im folgenden exemplarisch einige histologische Abbildungen mikrometastasierter Lk dargestellt.

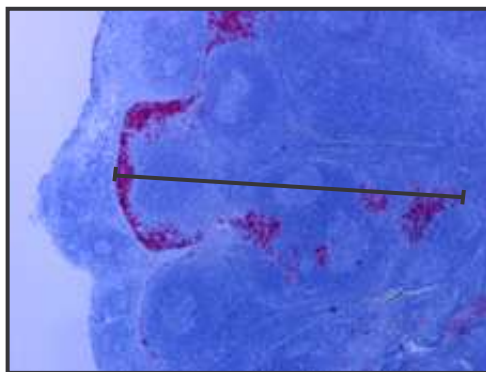


Abb. 3: 12,5-fache Vergrößerung

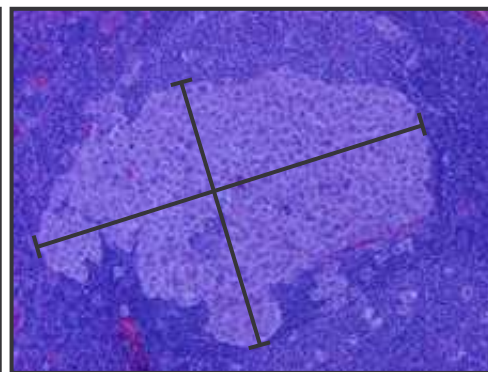


Abb. 4: 40-fache Vergrößerung

Abb. 3: Messung der d, Färbung mit HMB-45

Abb. 4: Ausmessung der größten Depotfläche, HE-Färbung

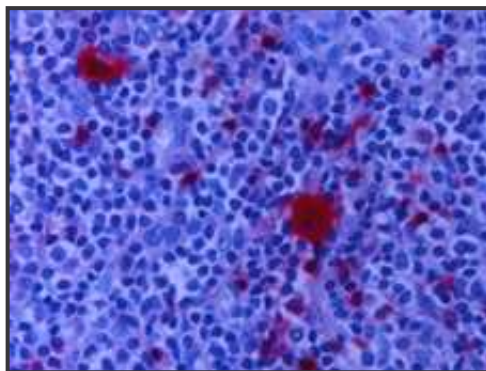


Abb. 5: 400-fache Vergrößerung

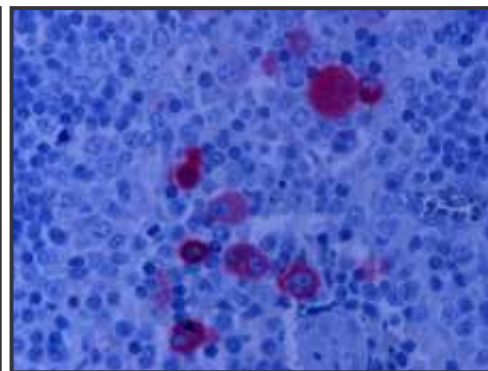


Abb. 6: 400-fache Vergrößerung

Abb. 5 und 6: zerstreute Tumorzellen im Lk, Färbungen mit HMB-45-Antikörpern

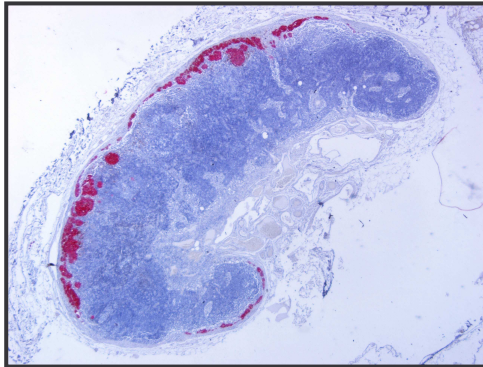


Abb. 7: 12,5-fache Vergrößerung

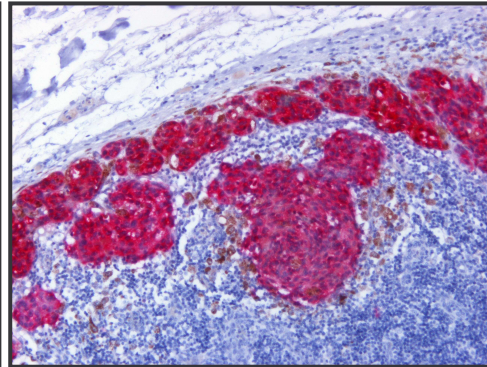


Abb. 8: 40-fache Vergrößerung

Abb. 7 und 8: subkapsuläre MiMg, Färbungen mit HMB-45-Antikörpern

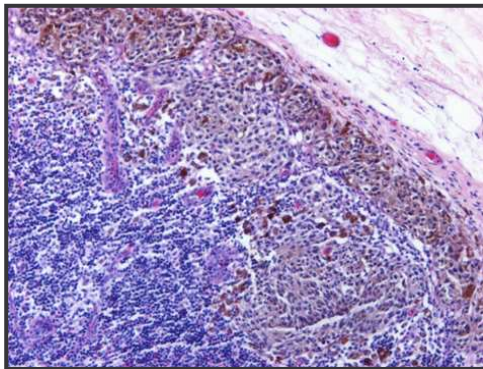


Abb. 9: 40-fache Vergrößerung

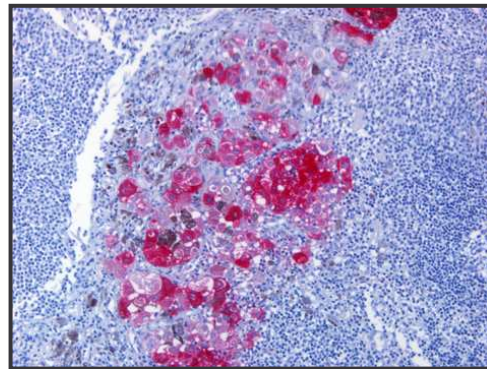


Abb. 10: 40-fache Vergrößerung

Abb. 9: subkapsuläre MiMg, HE-Färbung

Abb. 10: intraparenchymale MiMg, Färbung mit Melan A

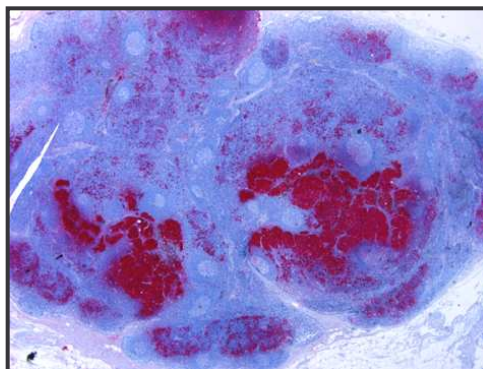


Abb. 11: 12,5fache Vergrößerung

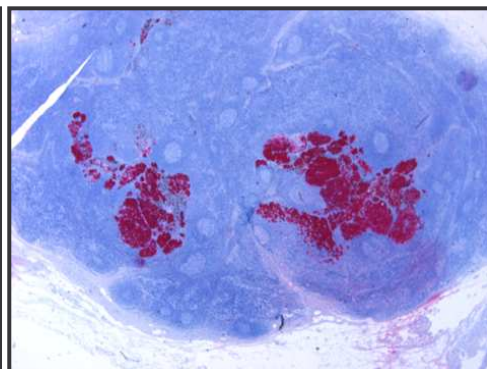


Abb. 12: 12,5fache Vergrößerung

Abb. 11 und 12: intraparenchymale Tumordepots, Zerstreung von Tumorzellen im LK, Zerstörung der nodalen Architektur, Färbung mit Protein S-100 (Abb. 11) und Melan A (Abb. 12)

5.2.3 Datenauswertung

Folgende Patientendaten wurden bei dieser Studie als relevant angesehen und bewertet:

- Basismerkmale (Alter, Geschlecht und BMI)
- Daten der Primärtumorexzision und SLK-Operation
- Tumorlokalisation
- Präklinische Selbstbeobachtung des Tumors
- Exzisionsweise und -art
- Td nach Breslow, Clark-Level, Sonographische Td
- Histologischer Typ, histologische Tumoreigenschaften
- Lymphabfluss, SLK-Lokalisation, SLK-Anzahl
- Histologisches Ergebnis, LAD, Ergebnis der LAD
- Histomorphologische Kriterien
- TNM-Klassifikation
- Auftreten und Zeitpunkt des Rezidivs oder letzte Beobachtung
- Metastasentyp und -art

Als zeitlicher Endpunkt wurden das Auftreten eines Rezidivs, der Tod des Patienten sowie die letzte ärztliche Untersuchung gewertet - ganz gleich ob diese durch den Hausarzt oder einen Dermatologen erfolgte. Die Staginguntersuchungen wurden in den ersten 2 Jahren alle 3-6 Monate und in den weiteren Jahren einmal jährlich durchgeführt. Neben der klinischen Untersuchung wurde insbesondere bei suspektem Palpationsbefund, in der Hautklinik Minden auch routinemäßig, eine Sonographie der Lk durchgeführt. Zusätzlich wurden bei Hochrisikopatienten mit Td $\geq 1,0$ mm CT von Hals, Thorax, Abdomen und Becken in jährlichen Abständen angefertigt.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS 13.0 für Microsoft Windows der Firma SPSS GmbH Software, München.

Als Kennwerte für stetige Variablen wurden Mittelwert, Median und Standardabweichung berechnet. Für diskrete Variablen wurde die Anzahl der Werte in jeder Kategorie und deren Anteil an der Gesamtanzahl (in Prozent) ermittelt.

Folgende Verfahren kamen für die prüfstatistische Auswertung der Daten zur Anwendung:

- Chi-Quadrat-Test: Hiermit wurden Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung diskreter Variablen in unverbundenen Stichproben untersucht.
- T-Test: Vergleich der Mittelwerte zweier Fallgruppen bei unabhängigen Stichproben.
- Fisher-Exact-Test: Vergleich der Unabhängigkeit von Zeilen und Spalten in einer 2 x 2-Kontingenztafel.
- Logistische Regression: Methode, um den Einfluss erklärender Variablen (z.B. Td) zur Zielvariable (z.B. SLK-Ergebnis, siehe Kap. 3.2.) zu untersuchen.
- Rezidivanalyse nach Kaplan-Meier und Log-Rank-Test: Verfahren, um einzelne Einflüsse auf das rezidivfreie Überleben zu überprüfen. Da nicht alle Patienten über einen konstant gleichen Zeitraum beobachtet werden konnten, gab es einige zensierte Fälle (solche, für die die Ereignisse Tod und Rezidiv nicht aufgezeichnet wurden).
- Cox-Regression: Ermittlung des gleichzeitigen Effektes mehrerer Einflussgrößen auf eine Zielvariable (hier: rezidivfreie Zeit).

Nähere Beschreibungen der eingesetzten Testverfahren sind der einschlägigen Fachliteratur zu entnehmen [40-43].