

Aus der Klinik für Augenheilkunde  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Tumorzellen-Zirkulation in der Blutbahn vor und nach  
operativen Behandlungen von Patienten mit  
Aderhautmelanom. Einflussfaktoren und Metastaserate**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Georgios St. Charitoudis

aus Alexandroupolis, Griechenland

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. med. N. Bechrakis  
                          2. Prof. Dr. med. U. Keilholz  
                          3. Prof. Dr. med. J. Roider

**Datum der Promotion: 18.11.2011**

Für meine Familie,  
für die Familie Bechrakis (Manolis und Nikolaos),  
für Herrn Professor M. Foerster,  
für die Freunde in Griechenland die immer noch auf meine Rückkehr warten,  
für die Freunde hier in Deutschland,  
und für den langen Weg, der mich hierher geführt hat.

1. Anatomie [1].....	7
2. Pathologie [2].....	8
3. Karkinogenese .....	9
4. Epidemiologie des Melanoms.....	10
4.1. Irismelanom .....	10
4.2. Ziliarkörpermelanom und Aderhautmelanom.....	11
4.3. Verlauf des Melanoms.....	12
5. Klassifikationen [28].....	13
5.1. Histologische Klassifikation.....	13
5.1.1. Callender-Klassifikation.....	13
5.1.2. W.H.O.- Klassifikation (Vorsitz Zimmermann, 1979) [30].....	14
5.2. TNM–Klassifikation.....	15
5.2.1. TNM-Klassifikation bei der Diagnose.....	15
5.2.2. PTNM-Klassifikation nach Eukleation.....	15
6. Biologisches Verhalten.....	17
6.1. Zimmermanns Theorie [31].....	17
6.2. Einschätzung der Wachstumsrate.....	18
6.3. Biologisches Verhalten.....	18
7. Therapiemöglichkeiten [28, 50].....	19
7.1. Entwicklung der Methoden.....	19
7.2. Eukleation.....	20
7.3. Bulbuserhaltende Methoden.....	20
7.3.1. Brachytherapie.....	20
7.3.2. Photokoagulation und Transpupilläre Thermotherapie (TTT).....	21
7.3.4. Resektion .....	24
7.3.4.1. Endoresektion [62].....	24
7.3.4.2. Transsklerale lokale Tumor-Resektion (TTR).....	25
8.1. Klinische Faktoren.....	26
8.1.1. Tumorlokalisation [69], Größe, Struktur.....	26
8.1.2. Extrasklerales Wachstum .....	27
8.1.3. Behandlungsmethoden.....	27
8.2. Zytomorphologische Faktoren (Histopathologie).....	27
8.2.1. Zelltyp .....	28

8.2.2. Mitotische Aktivität .....	29
8.2.3. Architektur der Mikrozirkulation (vascular patterns).....	29
8.2.4. Tumor-Lymphozyteninfiltration.....	29
8.3. Genetik.....	30
8.3.1. Zytogenetik.....	30
8.3.2. Molekulargenetik.....	30
9. Patienten und Methoden.....	31
9.1. Ziel der Studie.....	31
9.2. Patienten.....	31
9.2.1. Patientenpopulation.....	31
9.2.2. Erfasste Patientendaten.....	32
9.2.3. Statistische Methoden.....	33
9.3.1. Lagerung der Blutproben .....	33
.....	33
9.3.2. Nachweis von RNA-Markern mittels Polymerasekettenreaktion.....	33
9.3.2.1. RNA-Extraktion .....	34
9.3.2.2. cDNA-Synthese.....	34
9.3.2.3. Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (Real-Time PCR).....	35
9.3.3. Quantifizierung mittels Standards.....	37
9.3.4. Haushaltsgene.....	38
10. Ergebnisse .....	39
10.1 Ausgangsdaten aller Patienten.....	39
10.2. Nachkontrolle.....	42
10.3. PCR Ergebnisse.....	42
10.3.1 Tyrosinase-Gen.....	42
10.3.2. MelanA/Mart1-Gen.....	44
10.3.3. Kombinierte Bestimmung des PCR-Ergebnisses.....	46
10.4. Gen-Verteilung und Patienten-Subpopulationen.....	47
10.5. Schwankung der Gen-Menge .....	49
10.6. Einfluss der operativen Methoden auf die Genmenge.....	51
10.6.1 Einfluss der 1. Operation.....	51
10.6.2. Einfluss der 2. Operation.....	55
10.7. Aderhautmelanometastasen .....	58

10.7.1. Metastasen und Patientengruppen.....	59
10.7.2. Metastasen und PCR-Ergebnis.....	66
10.7.3. Metastasen und Schwankung des PCR-Ergebnisses.....	74
10.8. Lokales Aderhautmelanom-Rezidiv .....	81
11. Diskussion .....	85
11.1. Ausgangsdaten und PCR-Ergebnis.....	85
11.2. Metastasen bei Patienten mit Aderhautmelanom.....	87
11.2.1. Geschlecht.....	87
11.2.2. Prominenz, Basis.....	88
11.2.3. Histologie.....	88
11.2.4. Andere Einflussfaktoren.....	89
11.2.5. Genetische Parameter .....	89
11.3. Einflussfaktoren im Hinblick auf das Auftreten eines Rezidivs.....	91
11.4. Operativer Eingriff und iatrogene Tumorzellen-Dissemination.....	91
11.4.1. Erste Operation.....	91
11.4.2. Zweite Operation.....	93
12. Zusammenfassung .....	96
13. Literature.....	97
Erklärung .....	105

1981 haben Zimmermann und McLean nach der Beobachtung des Verlaufs bei 2105 Patienten mit Aderhautmelanom, die mit Enukleation behandelt worden waren, eine Zunahme der Mortalitätsrate im postoperativen Zeitraum dokumentiert. Verschiedene Theorien wurden vorgeschlagen, und eine davon war die eventuelle Disemmination der melanotischen Zellen in der Blutbahn. Diese Dissertation wurde zur Analyse dieser Theorie geplant und durchgeführt.

## **1. Anatomie [1]**

Das Auge wird aus dem kugeligen Augapfel (Bulbus oculi) und dem Sehnerv (N. opticus) gebildet. Als seine Anhangsgebilde werden die Augenmuskeln, die Faszien der Augenhöhle (Orbita), die Augenlider, die Bindehaut (Conjunktiva) und der Tränenapparat bezeichnet. Mit ihnen zusammen bildet es das Sehorgan, das in Fettgewebe eingebettet in der Augenhöhle (Orbita) liegt.

Die Wand des Bulbus Oculi ist dreischichtig:

1. Die äußere Schicht, besteht aus der Hornhaut (Cornea) und der Lederhaut (Sklera). Die Hornhaut ist durchsichtig mit glatter Oberfläche, enthält normalerweise keine Gefäße und ist fünfschichtig aufgebaut, mit einer Dicke von 530-710µm. Die Sklera bildet das Stützgerüst des Auges, ihre Dicke variiert von 0,3-1,35mm. Nach vorne geht sie in die Hornhaut über, nach hinten bildet sie die Lamina Cribrosa, ein siebartiges Areal für den Durchtritt des Sehnervs.
2. Die mittlere Augapfelschicht besteht aus der Regenbogenhaut (Iris), dem Ziliarkörper (Strahlenkörper) und der Aderhaut (Chorioidea). Die Regenbogenhaut bildet mit ihren Geweben die Blende des Auges und in ihrer Mitte liegt die Pupille, die sich mittels des M.sphincter und des M.dilatator verengt und erweitert. Der Ziliarkörper besteht aus einem faltigen vorderen Teil, die Pars Plicata und einem flachen hinteren Teil, die Pars Plana, die in die Aderhaut und Netzhaut übergeht. Der Ziliarkörper produziert das Kammerwasser, mit den Zonulafasern

stabilisiert er die Linse und mit dem Ziliarmuskel reguliert er die Akkomodation. Die Aderhaut wird vorwiegend aus Gefäßen gebildet, daneben enthält sie Bindegewebe mit Melanozyten, Mastozyten, Makrophagen und Inoblasten.

3. Die innere Schicht nennt sich Netzhaut (Retina) und ist der lichtempfindende, bildaufnehmende Teil des Auges. Die Nervenfasern der Ganglienzellen der Netzhaut vereinigen sich am Sehnervkopf zum Sehnerv (N.optikus), der das Auge durch Aussparungen in der Aderhaut und in der Sklera verlässt.

Das Augapfelinnere lässt sich in drei Räume unterteilen:

1. Die vordere Augenkammer ist mit Kammerwasser ausgefüllt und weist als vordere Begrenzung die Hornhaut, als hintere die Regenbogenhaut und die zentrale Linsenvorderfläche auf. Ihre seitliche Begrenzung wird von dem Kammerwinkel mit dem Trabekelwerk gebildet.

2. Die hintere Augenkammer liegt zwischen der Rückfläche der Regenbogenhaut, der von der Iris bedeckten Linsenvorderfläche, der Vorderfläche der Zonulafasern und der Außenseite des Ziliarkörpers. Die hintere Augenkammer enthält ebenfalls Kammerwasser, das durch die Pupille in die vordere Augenkammer gelangt.

3. Der Glaskörperraum umfasst etwa zwei Drittel des Augapfelinnenraums und wird vom Glaskörper ausgefüllt.

Die äußere Fläche des Augapfels ist in Kontakt mit sechs Augenmuskeln, von denen vier als gerade Augenmuskeln bezeichnet werden (M. rectus superior, inferior, lateralis, medialis) und zwei als schräge (M.obliquus superior, inferior).

Die Nervenfasern des Sehnervs verlassen das Auge durch die Lamina Cribrosa, durchlaufen die Augenhöhle und erreichen über den knöchernen Sehnervenkanal das Gehirn.

## **2. Pathologie [2]**

Die Melanozyten stammen von den Melanoblasten des embryonalen Neuralcrests, und deren Emigration zu den Zielorganen fängt während der 2. Woche der Gestation an [3]. Die meisten Zellen dringen in das Epithel der Haut ein und ein großer Anteil in das mesodermische Gewebe der Aderhaut. Melanozyten sind nicht nur auf der Haut und dem Auge erkennbar, sondern auch in Organen die nicht von der Sonnenstrahlung betroffen sind, wie Leptomeninges, mukosale

Flächen der Genitalien, der Sinuses und Palaten [4]. Trotz der gemeinsamen Herkunft gibt es bei den verschiedenen Melanomtypen große Unterschiede im Metastasierungspotential und im Therapieanspruch [5].

Die Melanozyten fertigen aus der Aminosäure Tyrosine eine dichte Pigmentierung mit dem Namen Melanin an. Es gibt zwei Sorten von Melanin: das rotgelbe Pheomelanin und das braunschwarze Eumelanin [6]. Die choroidalen Melanozyten produzieren Melanin bis in die frühe Kindheit und wechseln in einen ruhenden Zustand über, obwohl sich bei verschiedenen Experimenten eine ständige Produktion während des gesamten Lebens ergab [7]. Die choroidalen Melanozyten sind im Bereich des Irisstromas, der Aderhaut und des Ziliarkörpers relativ immobil, und ihr Zytoplasma ist reich an Melanosomen. Im Gegensatz dazu setzen die Melanozyten der Haut die gleiche Pigmentierung frei und produzieren nach ultravioletter Lichtexposition neues Melanin im Rahmen der Schutzmaßnahmen gegen das ultraviolette Licht und die eventuellen oxidativen Freiradikalen [8].

### **3. Karkinogenese**

Die Transformation der normalen menschlichen Zellen in maligne Zellen ist ein mehrschrittiges Verfahren, das von multiplen genetischen Änderungen abhängt. Sechs wichtige Schritte beschreiben die Entwicklung eines Tumors: die Selbstgenügsamkeit bei der Wachstumsfaktorenproduktion, die Resistenz gegen wachstumshemmende Signale, die Ausflucht aus dem programmierten Zelltod (Apoptosis), das grenzenlose Duplikationspotenzial, die Angiogenese und die Infiltration von gesunden Geweben sowie die Metastasierung [9].

Störungen der Gene, die die Zellenproliferation kontrollieren, z.B. Aktivierung der normalen Proto-Oncogenen in Oncogenen (cellular gas pedal), Deaktivierung der suppressor Gene (cellular brakes) und Defekt der DNA-Reparatur Gene, sind für diese maligne Transformation verantwortlich.

Mehr als 50% der choroidalen Melanome sind vom Löschen des Chromosoms 3 betroffen und mit einer erhöhten Metastisierungsrate verbunden [10-14]. Häufig sind außerdem Änderungen

wie die Verdopplung des Chromosoms 8 oder das Löschen des Chromosoms 6, mit Unterschieden bei der Prognose [12] [10].

Für die Melanozyten gibt es eine Theorie, nach der der Expressionsweg der zwei wichtigsten Tumorsuppressorgene, p53 am Chromosom 17 und Rb am Chromosom 13, funktionell gehemmt ist [15]. Das p53 ist an der Entdeckung von DNA-Schäden und der Kontrolle der Apoptosis beteiligt und das Rb (Retinoblastoma) ist für die Zellreproduktion, die Differenzierung und die Seneszenz zuständig.

## 4. Epidemiologie des Melanoms

### 4.1. Irismelanom

Das Melanom ist mit einer Frequenz von 5% bis 8% unter den Iristumoren und einer Mortalität von 4% bis 5% innerhalb der ersten 5 Jahre [16] der häufigste Iristumor. Diese Tumoren haben keine Geschlechtsspezifität und das Durchschnittsalter beim Auftreten liegt bei 47 Jahren [17]. Die meisten Tumoren entwickeln sich aus den Melanomzellen der oberflächigen Schicht der Iris entweder de novo oder nach malignen Transformationen in den schon vorhandenen Nävi. Die klinische Manifestation kann variieren, z.B. als diskretes Maß, diffuse Veränderung, entrundete Pupille, Ektropium uveae, Heterochromie (Bild 4.1., Archiv Augenklinik, Charite), Pigmentausschat und sekundäres Glaukom, chronische Uveitis oder plötzliches Hyphäma. Die Tumorpigmentierung kann von kaum bis stark pigmentiert variieren. Histologisch überwiegen die spindelförmigen Zellen, deswegen haben diese Tumoren einen relativ gutartigen Verlauf. Die Metastasen sind mit epithelialen Zellen und diffusen Tumoren oft assoziiert [17].



Bild 4.1.: entrundete Pupille bei Iris-Melanom

## 4.2. Ziliarkörpermelanom und Aderhautmelanom

Besonders betroffen von diesen Melanomen sind weiße Patienten mit einem Durchschnittsalter von 55 Jahren, d.h. 15 Europäer auf 1 Afrikaner. Es gibt eine leichte Prävalenz der männlichen Patienten. Die Inzidenz liegt in Europa und Nordamerika bei ca. 5-7 pro Millionen pro Jahr. Für Leute, die ihr 20. Lebensjahr überschritten haben, ist die Inzidenz 7,5 pro Millionen pro Jahr und für Leute über 70 Jahre ist die Inzidenz 21 pro Million. Über einen Zeitraum von ca. 75 Jahre erscheint ein neuer Fall pro 2500 Personen [18]. Eine bilaterale primäre Läsion ist selten, mit einer Wahrscheinlichkeit bis 0,2% für die Beteiligung des zweiten Auges nach der Diagnose [18, 19]. Eine hereditäre familiäre Fortsetzung wird selten beschrieben [20]. Die Diagnose wird entweder bei einer Routineuntersuchung gestellt oder meistens nach Vorstellung beim Augenarzt wegen einer subjektiven Visusstörung. Klinisch zeigt sich manchmal außer der typischen Raumforderung eine exsudative Netzhautablösung, eine Pigmentepithelabhebung, eine Erweiterung der konjunktivalen Gefäße, extraokulares Wachstum (das oft falsch als Bindehautpigmentierung beschrieben wird), eine Glaskörperblutung, ein Neovaskularisationsglaukom oder eine okuläre Inflammation (Bild 4.2. und 4.3.). Es gibt verschiedene Theorien über die Genese der Melanome. Einer bestimmten Theorie zufolge stammen sie von den mesodermalen Komponenten der Aderhaut, einer anderen Theorie zufolge wird das Melanom mit dem retinalen Pigmentepithel oder mit Schwanzzellen der Ziliarnerven assoziiert [21]. In verschiedenen Fällen gibt es eine Verbindung mit schon existierenden Aderhautnävi [22], in diesem Fall sind die Zeichen einer Transformation eine Prominenz größer als 2mm, Kontakt mit dem Sehnerv, exsudative Netzhautablösung, orange Pigmentierung und subjektive Sehstörung. Natürlich kann ein Melanom immer de novo wachsen.

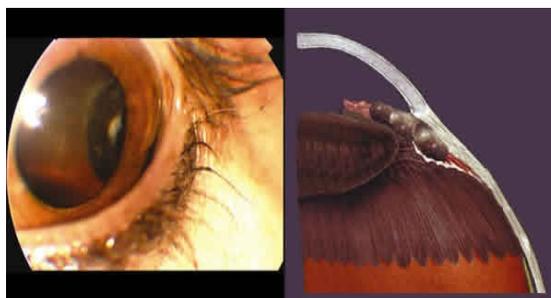


Bild 4.2.: klinische Darstellung eines Ziliarkörpers-Melanoms

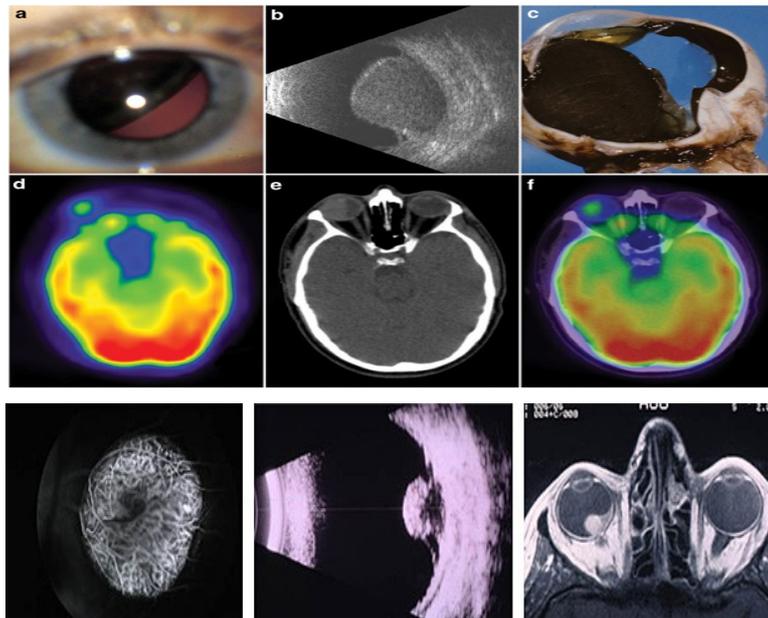


Bild 4.3.: Verschieden Bildgebungen des Aderhautmelanoms

#### 4.3. Verlauf des Melanoms

62%, 90%, 98% der Patienten mit Aderhautmelanom sind jeweils 5, 15 und 25 Jahre nach der Diagnose gestorben. Todesfälle ausschließlich aufgrund des Melanoms haben sich bei 31%, 45% und 49% jeweils nach 5, 15 und 25 Jahren ergeben [23]. Die COMS (Collaborative Ocular Melanoma Study) weist bei behandelten Aderhautmelanomen eine Metastasenrate von 25% in den ersten fünf Jahren und 34% in den ersten zehn Jahren [24, 25] auf. Bei der Erstdiagnose des Melanoms im Auge ist nur bei 1% der gesamten Patientenpopulation eine Feststellung von Filiae im Körper möglich [26], jedoch können eventuelle, bereits im Entstehen begriffene Mikrometastasen nicht ausgeschlossen werden. Bei der Metastasierung ist in 93% der Fälle zuerst die Leber betroffen. In 24% der Fälle die Lunge, in 16% die Knochen, in 11% die Haut und in 10% die Lymphknoten-Absiedlungen [27]. Die Prognose ist äußerst ungünstig mit einer Mortalitätsrate von 80% nach einem Jahr und 92% nach zwei Jahren und einer mittleren Überlebenszeit von 6 Monaten nach der Entdeckung der Metastasen [24].

## 5. Klassifikationen [28]

### 5.1. Histologische Klassifikation

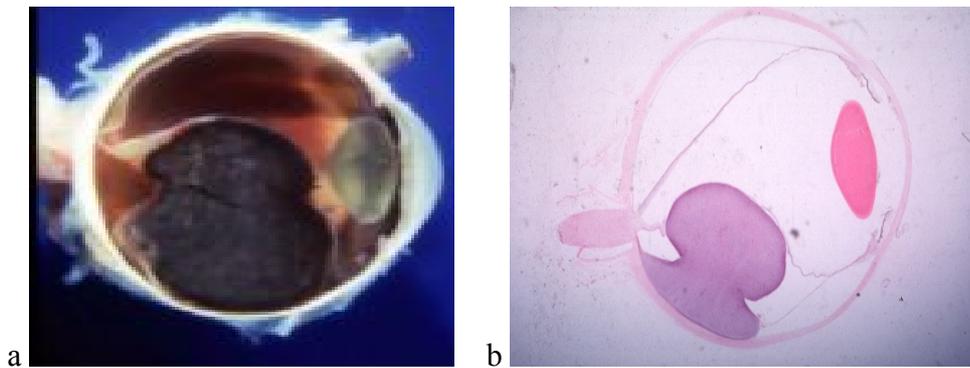


Bild 5.1.: a) Histologisches Präparat, b) gefärbte Schnitte (Archiv, Augenlinik Charite)

#### 5.1.1. Callender-Klassifikation

Die erste Klassifikation stammt aus dem Jahr 1931 von Callender [29], der nach den histologischen Eigenschaften der Malignen Melanome diese in die folgenden 6 Gruppen einteilte:

1. Spindelförmige Melanome Typ A
2. Spindelförmige Melanome Typ B
3. Faszikuläre Melanome
4. Epitheloidzellige Melanome
5. Gemischtzellige Melanome
6. Nekrotische Melanome

Auf dieser Einteilung basierte die Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Jahre 1979.

### 5.1.2. W.H.O.- Klassifikation (Vorsitz Zimmermann, 1979) [30]

Spindelzelltypen:

1. Spindelzelltyp A-Melanome bestehen zu mehr als 75% aus Zellen des Spindelzelltyps A, die übrigen Zellen aus Spindelzelltyp B. Die Spindel A-Zellen sind relativ lang gestreckte, schlanke Zellen mit kleinen Zellkernen, die im Regelfall keine Nukleoli besitzen.
2. Spindelzelltyp B-Melanome enthalten zu mehr als 25% Zellen des Spindelzelltyps B, sonst vorwiegend Spindelzelltyp A und kleine Anteile von Epitheloidzellen. Spindel B-Zellen sind ebenfalls längliche Zellen. Sie sind aber größer und plumper als Spindel A-Zellen, mit einer ovoiden Form, größeren Kernen und deutlichem Nukleolus. Epitheloidzellige maligne Melanome: Diese Tumoren bestehen zu mehr als 75% aus epitheloiden Zellen, ansonsten aus dem Spindelzelltyp A und/oder B. Epitheloidzellen sind die größten Zellen, die beim malignen Melanom vorkommen. Ihre Form variiert. Die Epitheloidzellkerne beinhalten einen bis mehrere große Nukleoli, die in ihrer Form stark variieren. Gemischtzellige maligne Melanome: Diese Tumoren enthalten sowohl Spindel- als auch Epitheloidzellen.
  1. Gemischtzellige maligne Melanome mit Spindelzelldominanz (jedoch unter 75%).
  2. Gemischtzellige maligne Melanome mit Spindelzell-Epitheloidzell-Gleichgewicht.
  3. Gemischtzellige maligne Melanome mit Epitheloidzelldominanz (jedoch unter 75%).

### 5.1.3. Modifizierte Callender-Klassifikation (McLean et al, 1983)

Durch die modifizierte Callender-Klassifikation wurde die bis zu diesem Zeitpunkt geltende Klassifikation in einigen Punkten geändert:

1. Reine Spindel A Tumoren wurden seitdem als Nävi bezeichnet.
2. Der faszikuläre Typ wurde nach seinen zytologischen Charakteristika klassifiziert.
3. Die spindelzelligen Tumoren wurden nicht mehr in den Unterklassen A und B klassifiziert, da diese beiden Untergruppen in ihrer Prognose keine signifikanten Unterschiede aufweisen.
4. Tumoren, welche auch nur wenige Epitheloidzellen beinhalten, wurden als gemischtzellige Melanome klassifiziert.

## 5.2. TNM-Klassifikation

Eine Arbeitsgruppe der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) hat aus der Erkenntnis, dass neben der zytologischen Klassifikation auch die Tumorgöße einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose hat, eine TNM-Klassifikation (Tab. 1) für das uveale Melanom erarbeitet.

### 5.2.1. TNM-Klassifikation bei der Diagnose

**T:** Mit T charakterisiert man den Primärtumor und unterteilt ihn je nach Größe in 6 Untergruppen. Die Basis des Tumors wird in Papillendurchmessern gemessen (1 P.D. = 1,5 mm) und seine Prominenz in Dioptrien (3 dptr. = 1 mm).

T0 kein Primärtumor

T1 größte Tumorbreite (Basis)  $\leq 10$  mm, Tumorprominenz  $\leq 3$  mm

T1a größte Tumorbreite (Basis)  $\leq 7$  mm, oder Tumorprominenz  $\leq 2$  mm

T1b  $7\text{mm} < \text{größte Tumorbreite (Basis)} \leq 10$  mm, oder  $2\text{mm} < \text{Tumorprominenz} \leq 3$  mm

T2  $10\text{mm} < \text{größte Tumorbreite (Basis)} \leq 15$  mm, oder  $3\text{mm} < \text{Tumorprominenz} \leq 5$  mm

T3 größte Tumorbreite (Basis)  $> 15$  mm, oder Tumorprominenz  $> 5$  mm

T4 Tumor mit extraokularer Ausbreitung

Tx die Ausdehnung des Primärtumors kann nicht ermittelt werden.

**N:** Mit N charakterisiert man den Befall der regionalen Lymphknoten.

N0 Kein Befall regionärer Lymphknoten

N1 Nachgewiesener Befall regionärer Lymphknoten

Nx Der Befall der regionären Lymphknoten kann nicht ermittelt werden.

**M:** Mit M charakterisiert man das Auftreten von Fernmetastasen.

M0 Keine Fernmetastasen

M1 Fernmetastasen nachgewiesen

Mx Das Auftreten von Fernmetastasen kann nicht ermittelt werden.

### 5.2.2. PTNM-Klassifikation nach Eukleation

**pT:** Charakterisierung des Primärtumors entsprechend der T-Einteilung

**G:** Histopathologische Einteilung entsprechend dem prädominanten Zelltyp

G1 Spindelzelliges Melanom

G2 Gemischtzelliges Melanom

G3 Epitheloidzelliges Melanom

Gx Histopathologische Einteilung kann nicht ermittelt werden.

**S:** Mit S charakterisiert man die Sklerainvasion

S0 keine Sklerainvasion

S1 intrasklerale Invasion nachgewiesen, einschließlich der perineuralen und perivaskulären Invasion der Sklerakanäle

S2 extrasklerale Tumorausbreitung nachgewiesen

Sx sklerale Invasion kann nicht ermittelt werden.

**V:** Mit V charakterisiert man die venöse Invasion

V0 Keine venöse Invasion nachweisbar

V1 Invasion von venösen Tumorgefäßen nachgewiesen

V2 Invasion von Vortexvenen nachgewiesen

Vx Die venöse Invasion kann nicht ermittelt werden.

**pN:** Charakterisierung des Befalls der regionalen Lymphknoten entsprechend der N-Einteilung

**pM:** Charakterisierung des Auftretens von Fernmetastasen entsprechend der M-Einteilung

Stadiengruppierung (Staging) des uvealen malignen Melanoms			
Stadium Ia	T1a	N0	M0
Stadium Ib	T1b	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
Stadium Iva	T4	N0	M0
Stadium Ivb	jedes T	N1	M0
	jedes T	jedes N	M1

Tab. 5.1.

## 6. Biologisches Verhalten

### 6.1. Zimmermanns Theorie [31]

Zimmerman, McLean et al. haben 1980 festgestellt, dass die Mortalitätsrate der Patienten mit Aderhautmelanom nach der Enukleation des Auges innerhalb des zweiten Jahres sehr schnell von einer kleinen Rate (1% pro Jahr) bis zu einer maximalen Rate von 8% pro Jahr ansteigt und sich dann allmählich bis zum siebten Jahr reduziert. Bezüglich des Überlebens der Patienten weist diese Feststellung auf einen eventuell schädlichen Einfluss der Enukleation und der Ereignisse im Anschluss an die Behandlung des Melanoms hin, z.B. auf eine iatrogene Dissemination von Melanomzellen und auf eine Schwächung des Immunsystems.

Zimmerman, McLean et al. [32, 33] haben 2105 Fälle retrospektiv analysiert. Die Durchführung der Enukleation wurde nicht in allen Fällen gleich nach dem Erscheinen der ersten Symptome beschlossen, sondern bei 1/3 der Patienten erst nach Komplikationen wie Glaukom und bei 1/3 im Fall eines Tumors mit einem Durchmesser von mehr als 15mm. Bei 1,9% der Patienten war das Melanom entweder ein zufälliger Befund nach einer Autopsie oder der Patient ist innerhalb eines Monats nach der Enukleation gestorben.

Mit der Zellen-Methode [34] könnte der Verlauf des Melanoms vorausgesehen werden. Das Durchschnittsalter der behandelten Patienten mit einem mittelgroßen Melanom war 5 Jahre geringer als das Durchschnittsalter der behandelten Patienten mit einem großen Melanom. Das bedeutet, dass die größeren Tumoren mit einer Verspätung von ca. 5 Jahren behandelt wurden und dass die mittelgroßen Melanome (<10mm Durchmesser) durchschnittlich einen Zeitraum von ca. 7 Jahren benötigen, um einen Durchmesser von ca. 15mm zu erreichen.

Nach der Enukleation mittelgroßer Melanome wurde die Mortalität innerhalb der ersten 5 Jahre wegen Metastasen mit ca. 25% berechnet. Diese Patienten hatten eine schlechtere Prognose innerhalb der ersten 7 Jahre nach der Behandlung, im Vergleich zur Prognose mit einer Mortalitätsrate von 1% jährlich vor der Behandlung. Würde diese Mortalität am natürlichen Verhalten des Melanoms gemessen und nicht an den Nebenwirkungen der Enukleation, dann läge auch die Mortalitätsrate der Patienten mit großen Tumoren in den letzten 5 Jahren vor der Behandlung bei mindestens 25%. Trotzdem lag die Mortalität der unbehandelten Patienten mit großen Tumoren laut dem National Cancer Institute (NSI) [35] und dem Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) [36] bei 6,8%.

## 6.2. Einschätzung der Wachstumsrate

Anhand des exponentiellen Wachstumspatterns wurde errechnet, dass eine Tumorzelle nach 30 Verdoppelungszeiten ein Volumen von maximal  $10\text{mm}^3$  bzw. 1 Billion Zellen erreichen kann [37]. Wenn Apoptose, Nekrose und Zellenproliferation in Betracht gezogen werden, dann entwickelt sich das Wachstum schätzungsweise nach dem Gompertzianpattern [38].

Die Verdoppelungszeit des primären Aderhautmelanoms liegt zwischen 154 und 511 Tagen. Das bedeutet, dass das Wachstum des Tumors ca. 10 Jahre vor der Diagnose der intraokularen Stelle anfängt [39-42]. Bezüglich der Lebermetastasen schwankt die Verdoppelungszeit theoretisch zwischen 30 und 350 Tagen, nach klinischer Erfahrung beträgt sie jedoch nur rund 63 Tage. Deswegen vermutet man, dass die Metastasierung 5 Jahre vor der klinischen Feststellung stattfindet, wenn der primäre Tumor noch klein ist, mit einem Durchmesser von ca. 3mm und einer Prominenz von 1,5mm [43]. Im Allgemeinen braucht es 2,2 Jahre nach der Diagnose des Aderhautmelanoms, bis eine Metastase klinisch erkennbar ist oder die Metastasierung stattfindet, wenn der Tumor  $7\text{mm}^3$  ist.

Dieses Wachstumspattern deutet an, dass die Enukleation oder eine andere Behandlungsart nicht direkt mit der Metastasierung zusammenhängt.

## 6.3. Biologisches Verhalten

Das Wachstum des primären Tumors zeichnet sich durch verschiedene Parameter aus: Selbst-Produktion von Wachstumsfaktoren, Kontrolle der Apoptose und der Proliferation, Unempfindlichkeit gegenüber den Anti-Wachstumsfaktoren, Neovaskularisation, Infiltration der Gewebe und Metastasierung [44, 45]. Die Tumorzellen erwerben diese Möglichkeiten durch eine Reihe von Genomänderungen [46]. Zusätzlich ist es wahrscheinlich, dass die Entwicklung des metastatischen Herdes einer beschränkten Kontrolle sowohl durch den primären Herd als auch durch das Immunsystem unterliegt.

Ein mögliches Szenario ist, dass der primäre Tumor mittels eines anti-angiogenic oder eines angiostatic Proteins das Wachstum von Mikrometastasen unterdrückt [47, 48]. Deswegen entwickeln sich die Filiaen nach der Behandlung des primären Herdes.

Die Effektivität des Immunsystems des Patienten ist ein zusätzlicher Faktor, der das Metastasenwachstum beeinflussen kann. Tumorzellen zirkulieren in der Blutbahn nach spontaner oder chirurgisch evozierter Entlastung. Neue Studien haben nachgewiesen, dass der Ausfall der HLA I Genexpression an den Tumorzellen das Überleben dieser Zellen verbessern kann, weil die T spezifischen Lymphzellen den Tumor nicht erkennen und töten können. Zum Anderen gibt es eine Ausnahme: die Expression der HLA Gene an den Melanomzellen schützt sie von den Natural Killer Cells in der Blutbahn [49]. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass die postoperativen Schwankungen bei der Aktivität des Immunsystems ein Zeitfenster seien, das die Zirkulation der Melanomzellen erleichtert.

## **7. Therapiemöglichkeiten [28, 50]**

### **7.1. Entwicklung der Methoden**

**16. Jahrhundert:** G. Bartisch, Enukleation des betroffenen Auges.

**1930:** Foster/Moore beschreiben die transsklerale Implantation von Radon-seeds direkt in ein ziliochoroidales Melanom (damals noch choroidales Sarkom genannt) mit Verkleinerung der ursprünglichen Tumorgröße auf ein Viertel [51].

**1952:** Meyer-Schwickerath: Xenon-Photokoagulation eines malignen Aderhautmelanoms.

**1960:** Stallard erprobt zum ersten Mal die episklerale Aufnähung von Co-60 Plaques [52]. Oft treten erst

nach einigen Jahren schwierige strahlungsbedingte Komplikationen auf.

Da sich jedoch oft erst nach einigen Jahren schwere strahlenbedingte Komplikationen ergaben [53, 54], wurde die Entwicklung neuer Bestrahlungsverfahren vorangetrieben.

**1966:** Lommatzsch: Anwendung von Ru-106/Rh-106 Applikatoren ( $\beta$ -Strahlenquelle), um Komplikationen zu verringern.

**1974:** Gragoudas: Beginn der Protonenbestrahlung am Zyklotron der Harvard-Universität in Boston (USA).

**1978:** Rotmann: Anwendung von I-125 Plaques.

**1983:** Char: Entwicklung der Bestrahlung von Aderhautmelanomen mit He<sup>2</sup>-Ionen.

**1987:** Rand: Stereotaktische Bestrahlung.

## **7.2. E nukleation**

Für lange Zeit war die E nukleation die Therapie der Wahl für maligne Aderhautmelanome. Es gibt viele dazwischen liegende Schritte, von den ersten groben Methoden der Augenentfernung mittels eines löffelförmigen Instrumentes, bis zu den heutigen beweglichen Glasprothesen infolge des Orbitasilikonimplantats und der zusammen genähten Muskeln. Die Lebensqualität und die Überlebensraten waren jedoch enttäuschend, und die Zimmerman-Studie in den 1970<sup>er</sup> Jahren zeigte – wie oben beschrieben - einen eventuell negativen Einfluss der E nukleation [31]. Daher ging man dazu über, die Entwicklung von Methoden zu fördern, welche bei gleicher oder sogar besserer Lebenserwartung für die Patienten unter möglichst weitgehendem Erhalt der Sehfähigkeit eine größtmögliche Zerstörung des Tumors erreichen sollten. Trotz der Abweichung der Methoden wurde festgestellt, dass die Lebenserwartung von Patienten mit gleichgroßen Melanomen unabhängig von der gewählten Methode innerhalb von 5 Jahren gleich lang ist, wie dies nachstehend analysiert wird.

Relative Indikationen zur E nukleation [55]:

- Tumordurchmesser  $\geq 17$ mm,
- Tumorprominenz  $> 6-7$ mm,
- Aderhaut-Ziliarkörpermelanom mit Ausbreitung in der Pars Plicata  $\geq 4$  Stunden,
- Sehnervinfiltration, Retinainfiltration,
- schlechter Allgemeinzustand des Patienten.

Bei ca. 10% der durch eine bulbuserhaltende Therapie behandelten Augen wird später eine sekundäre E nukleation nötig sein [55]. Der Grund kann ein lokales Rezidiv, eine Netzhautablösung oder ein Neovaskularisationsglaukom sein [56].

## **7.3. Bulbuserhaltende Methoden**

### **7.3.1. Brachytherapie**

Bei dieser Methode werden radioaktive Strahlenträger - so genannte Plaques - direkt über dem Tumor auf die Sklera genäht (Bild 7.1.), um so den Tumor möglichst selektiv bestrahlen zu können, da nur an deren Innenseite ein radioactives Isotop fixiert ist.

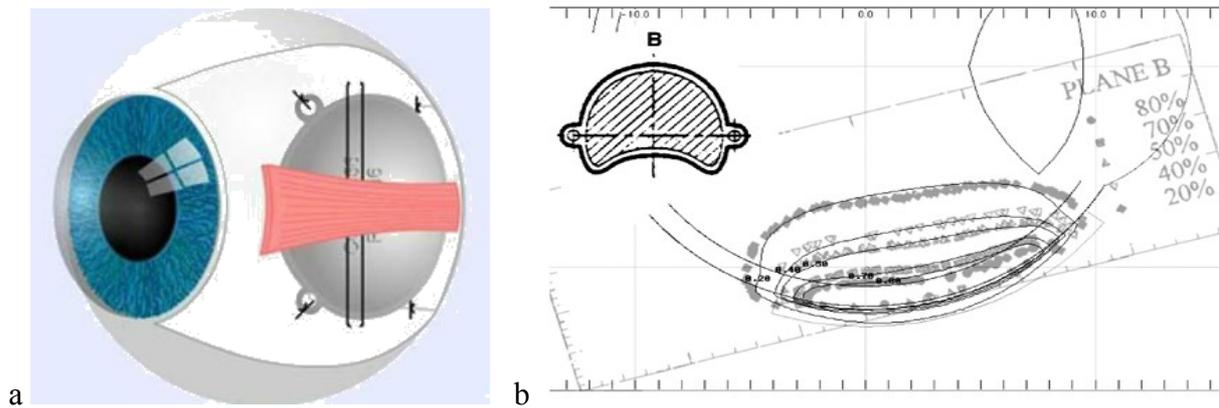


Bild 7.1.: a) Applikator stabilisiert durch Faden hinter dem Muskel, b) radioaktive Wirksamkeit

Die Plaque verbleibt - abhängig von der Größe des Tumors und der Dosisleistung des Isotops - ca. 1 bis 10 Tage am Auge des Patienten. Heute stehen für die Brachytherapie unterschiedliche Strahlenträger zur Verfügung. Die Strahlenträger, die in Europa am häufigsten eingesetzt werden, sind mit Ruthenium-106 beschichtet und emittieren eine  $\beta$ -Strahlung mit einer maximalen Energie von 3,53 MeV. Die 10% Isodose liegt in 6,8mm Entfernung von der Oberfläche des Strahlenträgers im Gewebe. Diese Applikatoren können aufgrund der Halbwertszeit des Rutheniums-106 von 366 Tagen ca. 2 Jahre benutzt werden [57]. Tumoren, die eine maximale Tumorprominenz von mehr als ca. 6,5 mm aufweisen, können in der Regel mit diesen Strahlenträgern nicht mehr zuverlässig behandelt werden. In diesen Fällen kann eine lokale Strahlentherapie mit Jod-125 ( $^{125}\text{I}$ ),  $\gamma$ -Strahlung und Strahlenträgern erfolgen. Hier liegt die 10% Isodose im Gewebe bei ca. 9mm über der Applikatorinnenfläche.

Indikationen zur Brachytherapie mittels Ru-106:

- kleine Aderhauttumoren,
- Tumorprominenz  $\leq 8$  mm und mehr als 2,5 mm von der Papille entfernt.

### 7.3.2. Photokoagulation und Transpupilläre Thermotherapie (TTT)

Bei der Photokoagulation werden mittels Xenonkoagulator oder Argon-Grün-Laser (488 nm) die Tumoren zunächst mit konfluierenden Herden von mindestens 500  $\mu\text{m}$  Durchmesser umstellt, um die Gefäßversorgung zu unterbinden [58]. Im Anschluss wird der Tumor mit Expositionszeiten von 1-1,5 s koaguliert. Im Gegensatz zur Photokoagulation wird bei TTT mit einem Diodenlaser im Infrarotbereich (810 nm) eine Hyperthermie des Tumorgewebes mit Temperaturen zwischen 45° und 60° C erzeugt. Der Tumor wird während der Therapiesitzung

mit Expositionsherden mit einem Durchmesser von zwischen 1,2mm und 3mm und einer Expositionszeit von mehr als 60 Sekunden konfluierend abgedeckt. Der Überwärmungseffekt führt zur Zerstörung der Tumorzellen durch die Zerstörung ihrer zellulären Membranen, ihrer Mitochondrien und intrazellulären Proteinen [59, 60]. Da nach dieser Therapieform nicht selten lokale Rezidive auftreten, wurde diese Behandlungsmethode durch neuere effizientere Methoden ersetzt. Meistens wird heute die transpupilläre Thermotherapie als Kombinationstherapie mit der Brachytherapie (sandwich therapy) oder der Protonentherapie angewandt, sowie als ergänzende Therapie bei flachen Aderhautmelanom-Rezidiven [61].

Indikationen sind daher:

- kleine Tumoren am hinteren Pol, insbesondere bei juxtafoveolärer Lage,
- mit einer maximalen Tumorprominenz von unter 3mm und ohne exsudative Begleitablato im Tumorareal.

### 7.3.3. Protonen-Bestrahlung

Eine konventionelle Teletherapie mit Photonen oder Elektronen ist aufgrund der erzielbaren Dosisverteilung in konventioneller Technik zur Therapie eines uvealen Melanoms nicht geeignet. Es ist mit dieser Methode nicht möglich, vom Tumorwachstum nicht betroffene Anteile des Auges aus dem Strahlenfeld ausreichend auszublenden. Die Anwendung geladener Teilchen erlaubt jedoch eine präzise Bestrahlung auch kleiner Volumina im Auge. Für eine klinische Anwendbarkeit in der Medizin ist ein Zyklotron (Kreisbeschleuniger) erforderlich. Die Gewebseindringtiefe der Protonenbestrahlung kann präzise gesteuert werden. Nach einem Aufbaueffekt im Gewebe werden die Protonen bis zu einer spezifischen Gewebstiefe zunehmend stärker vom Gewebe absorbiert. Protonen zeigen eine „inverse“ Dosisverteilung in der Tiefe des bestrahlten Gewebes, d.h. die Dosis steigt mit wachsender Eindringtiefe nichtlinear an und erreicht in einer von der Ausgangsenergie abhängigen Tiefe ein Maximum, den so genannten Bragg peak (Bild 7.2.), und anschließend kommt es zu einem steilen Dosisabfall. Die Lage des Bragg peaks kann durch die Energie der geladenen Teilchen genau festgelegt werden. Außerdem ist die seitliche Streuung von Protonenstrahlen wesentlich geringer als die von Gamma- oder Elektronenstrahlen. Häufige Nebenwirkungen der Protonentherapie sind radiogene Katarakt, Strahlenoptikopathie, Strahlenretinopathie, Sekundärglaukom und Komplikationen der vorderen Augenabschnitte wie Sicca-Symptomatik und Zilienverlust.

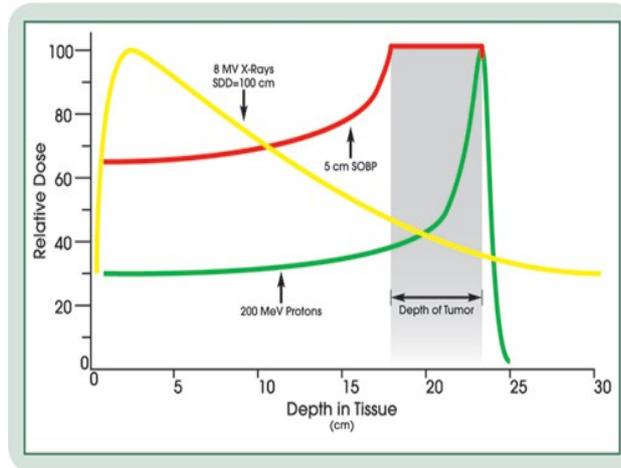


Bild 7.2.: Bragg peak für verschiedene radiative Strahlen

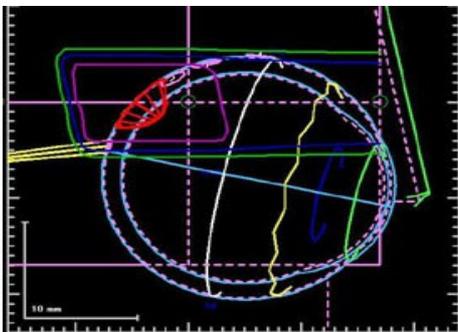


Bild 7.3.: Planung der Protonenbestrahlung

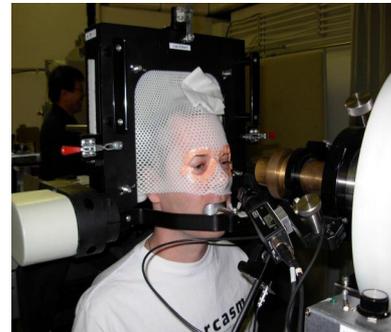


Bild 7.4.: Patient bei der Protonenbestrahlung

Insgesamt sind Protonen wegen ihrer genauen Steuerbarkeit sehr gut für Tumoren geeignet, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu strahlenempfindlichen Strukturen wie Makula oder Papille befinden (Bild 7.3., Bild 7.4., Archiv, Augenklinik Charite, Helmholtz Institut Berlin).

Für die Behandlung eines Aderhautmelanoms werden die Ränder des Tumors operativ durch röntgendichte Tantalumclips markiert, die episkleral aufgenäht werden. Der Bestrahlungsstrahl wird unter Röntgenkontrolle auf den Tumor ausgerichtet. Die eigentliche Bestrahlung erfolgt fraktioniert in 4 Sitzungen mit einer Zielvolumendosis von 60 GyE.

Indikationen zur Protonen-Teletherapie:

- Juxtapapilläre oder juxtafoveale Tumoren,
- Iris- oder Ziliarkörpermelanome,
- Prominenz < 6 mm, oder Prominenz > 7 mm in Kombination mit einer Resektion.

### 7.3.4. Resektion

Nach der Bestrahlung ist es in verschiedenen Fällen notwendig, eine Resektion des Tumors durchzuführen, um sekundäre Komplikationen wie Neovaskularisationsglaukom und Zunahme der exsudativen Netzhautablösung zu vermeiden. Es gibt zwei Methoden: die Entfernung ab interno (Endoresektion) und ab externo (transsklerale Tumorresektion).

#### 7.3.4.1. Endoresektion [62]

Für die Therapie juxtapapillärer Aderhautmelanome wurden neue Ansätze zur lokalen Tumorresektion ab interno entwickelt. Bei dieser Technik wird zunächst eine Vitrektomie durchgeführt, danach wird die Netzhaut vom darunter liegenden Tumor getrennt und so umgeklappt, dass der Tumor vom Auginnenraum her gut zugänglich wird (Bild 7.5.). Die Gefäßversorgung des Tumors wird mittels Diathermie unterbunden, und anschließend wird der Tumor entfernt. Dann wird die Netzhaut wieder mittels Laser fixiert und der Auginnenraum mit Silikon gefüllt (Bild 7.6., Archiv von Prof. Bechrakis, Charité).

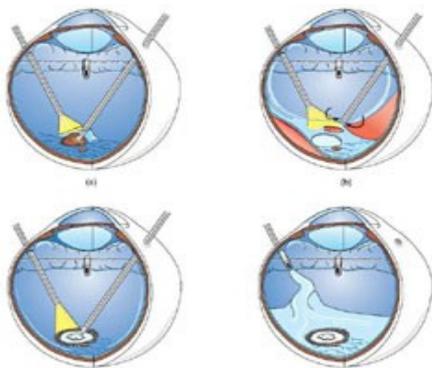


Bild 7.5.: Resektion über pars Plana



Bild 7.6.: Postoperativer Befund

Indikationen zur Endoresektion [63, 64]

- Tumorprominenz > 7mm
- Tumor mit Durchmesser  $\leq 10$ mm
- Tumorklage posterior des Äquators
- Tumor-Papillen-Abstand < 1 Papillendurchmesser (1,5mm)
- Juxtamakulär liegender Tumor (zentraler Visus gefährdet)

Als häufigste Nebenwirkungen könnte man die Glaskörper- und subretinale Blutung, das Sekundärglaukom und den Katarakt bezeichnen. Das Risiko eines lokalen Rezidives nach

Endoresektion liegt bei 5-10 % [63, 64]. In ca. 90% der behandelten Augen kann eine E nukleation vermieden werden.

#### 7.3.4.2. Transsklerale lokale Tumor-Resektion (TTR)

Bei den hauptsächlich anterior des Äquators wachsenden Aderhautmelanomen und Ziliarkörpermelanomen treten Symptome oft relativ spät auf. Diese Tumoren zeigen oft eine Tumorprominenz, die einer Therapie mit einem Ruthenium-Applikator nicht mehr zugänglich ist. Die lokale Strahlentherapie mit Jod-Applikatoren hat eine hohe Komplikationsrate und die Protonenbestrahlung allein ist wie bei jedem großen Tumor mit einer Reihe von Komplikationen verbunden. Ein alternativer operativer Ansatz wurde in diesen Fällen von Foulds und Damato publiziert [65]. Besonders gut zu behandeln mittels dieser Therapie sind anterior des Äquators sowie nasal gelegene, hochprominente Tumoren mit einem Durchmesser von 10 - 15mm. Die operative Technik entspricht im Wesentlichen der von Foulds entwickelten lamellierenden Sklerapräparation und anschließender Choroidektomie. Diese Methode wird in systematischer arterieller Hypotonie (auf 40 mmHg) und Vollnarkose durchgeführt. Aus diesem Grund muss der Patient strenge Kriterien der kardiovaskulären und zerebralen Belastbarkeit erfüllen. Durch die arterielle Hypotonie werden intraoperative Komplikationen wie intraokulare Blutungen reduziert.

Die Bindehaut wird eröffnet und die Tumorränder werden mittels Transillumination dargestellt. Ein Sklerafenster wird präpariert, um anschließend eine weitere tiefe Skleralamelle einzuschneiden. Der Tumor wird entfernt. Die Netzhaut bleibt intakt und wird nicht berührt. Die Entfernung des Tumors begünstigt eine Begleitablatio im Tumorbereich, da eine intravitreale Injektion von SF6 erforderlich ist. Am Ende der Operation wird das Sklerafenster wieder zugenäht.

Indikationen zur transskleralen Tumorresektion (TTR):

- Aderhautmelanom am Äquator oder anterior des Äquators
- Aderhaut-Ziliarkörpermelanom mit weniger als 4 Stunden Ausbreitung in der Pars Plicata
- Maximaler Durchmesser des Tumors bis 18mm
- Tumorprominenz  $\geq$  6mm

Kontraindikationen wie arterielle Durchblutungsstörungen, Gefäßstenosen, kardiale Vorerkrankungen, pulmonale Funktionsstörungen und neurologische Störungen sind zuvor auszuschließen.

## **8. Epidemiologie und Prognoseparameter [16, 66]**

Das Aderhautmelanom ist mit 6 neuen Patienten pro Million und Jahr der häufigste primäre intraokulare Tumor [67]. In der Literatur wird eine bestehende Mortalitätsrate innerhalb von 5 Jahren von 12,8% bis 36% beschrieben, meistens wegen einer Metastase in der Leber [27, 66, 68]. Die Prognose der Patienten mit Aderhautmelanom wird von klinischen, zytomorphologischen und zytogenetischen Faktoren beeinflusst.

### **8.1. Klinische Faktoren**

#### **8.1.1. Tumorlokalisation [69], Größe, Struktur**

Das Irismelanom ist mit einer Frequenz von 3% unter den betroffenen Patienten das seltenste und hat die günstigste Prognose. Die Mortalität innerhalb der ersten 10 Jahre liegt zwischen 5% und 6% [70, 71], was sich mit der Früherkennung und der kleinen Tumorgroße erklären ließe.

Eine Ausnahme ist das diffuse Irismelanom mit einer 5-Jahres-Mortalität von 24%.

15% der Melanome befinden sich im Ziliarkörper und die Mortalität in den ersten 5 Jahren liegt bei ca. 22% [72], steigt jedoch bis auf 53% [73] bei Tumoren, die dicker als 7mm sind. Diese Melanome werden in der Regel und im Vergleich zu den Melanomen der Aderhaut etwas später diagnostiziert, und zwar zu dem Zeitpunkt, zu dem ihre Prominenz größer ist. Trotzdem ist die Tumorgroße kein unabhängiger Prognosefaktor [74].

Die anderen 80% der Melanome sind im Bereich der Aderhaut lokalisiert und für deren epidemiologische Analyse sind sie in 3 verschiedene Kategorien je nach Dimensionen eingeteilt [75]. Kleine Melanome (Prominenz<3mm, Basis<10) sind mit einer 5-Jahres-Mortalität von 16% verbunden. Die mittelgroßen Melanome (Prom.: 3-8mm, Basis<15mm) gehen einher mit einer 5-Jahres-Mortalität von 32%, die großen (Prom.>8mm, Basis>15mm) von 53%.

Der Durchbruch durch die Bruch-Membran führt zur Entwicklung eines Mushroom-Shaped Tumors, allerdings ohne Folgen für die Prognose [25, 76]. Eine Ausbreitung des Melanoms ist mit einer schlechteren Prognose verbunden. Eine Studie, bei der 111 diffuse Melanome untersucht wurden, ergab eine 5-Jahres-Mortalität von 24% [25], eventuell wegen der Verspätung der Diagnose, der nicht scharf begrenzten Randfigur, der Beteiligung des Sehnervs, dem extraokularen Wachstum und der Dominanz von Epithelzellen.

Kategorie	Faktor	Mortalität	Wert	Reference
Lokalisation	Iris	10 Jahres M.	6%	Rones and Zimmerman, 1958
		10 Jahres M.	5%	Shields et al., 2000
	Ziliar-K.	5 Jahres M.	53%	Seddon et al., 1983
		5 Jahres M.	22%	Gunduz et al., 1999
Größe	Choroidal	5 Jahres M.	14%	Seddon et al., 1983
		klein	5 Jahres M.	16%
		5 Jahres M.	3%	Shields et al., 1995
		5 Jahres M.	1%	COMS, 1997
	medium	5 Jahres M.	32%	Diener-West et al., 1992
	groß	5 Jahres M.	53%	Diener-West et al., 1992
Konfiguration	diffuse	5 Jahres M.	24%	Shields et al., 1996
Therapie	Enucleation	8 Jahres M.	38%	Augsburger et al., 1989
	Brachytherapie	8 Jahres M.	24%	Augsburger et al., 1989
	Protonen-Radiatio	5 Jahres M.	19%	Seddon et al., 1990

Tab. 8.1.: klinische Parameter

### 8.1.2. Extrasklerales Wachstum

In ca. 8% der enukleierten Augen fand sich ein extraokulares Wachstum des Melanoms. Dieser Befund verdoppelt die Mortalitätsrate auf 75% in 10 Jahren [77].

### 8.1.3. Behandlungsmethoden

Die Behandlung des Aderhautmelanoms wird mit den oben beschriebenen Methoden durchgeführt (Enukleation, Ruthenium-Brachytherapie, Protonenbestrahlung, Kombination einer Bestrahlung mit einer operativen Entfernung des Tumors, Lasern). Trotz der Abweichung der Methoden voneinander ergab sich unabhängig von der Methode eine fast gleich hohe Lebenserwartung der Patienten von 5 Jahren bei Melanomen mit ähnlichen Dimensionen. Sowohl die Enukleation als auch die Brachytherapie mittels Applikator und die Protonen-Bestrahlung führen zu einer Lebenserwartung von ca. 74,9%-81% nach 5 Jahren, oder einer 5-Jahres-Mortalität von ca. 18,5% [39, 78-80].

## 8.2. Zytomorphologische Faktoren (Histopathologie)

Durch die histopathologischen Auswertungen von Melanomen und den Zustand nach Enukleationen wurden mehrere Faktoren, wie zum Beispiel Zelltyp, mitotische Aktivität,

Mikrozirkulation der Architektur, Lymphzelleninfiltration des Tumors und extraokulares Wachstum als Prognoseparameter anerkannt.

Kategorie	Faktor	Mortalität	Wert	Reference
Zelltyp	Spindelzellen	15 J.	20%	McLean et al., 1982
	Mischtyp	15 J.	60%	McLean et al., 1982
	Epitheliodzellen	15 J.	75%	Shammas and Blodi, 1977
mitotische Aktivität	niedrig	6 J.	15%	McLean et al., 1977
	medium	6 J.	43%	McLean et al., 1977
	hoch	6 J.	56%	McLean et al., 1977
Mikrozirkulation	ohne	10 J.	10%	Folberg et al., 1993
	mit	10 J.	50%	Folberg et al., 1993
TILs	niedrig	15 J.	30%	de la Cruz et al., 1990
	hoch	15 J.	62%	de la Cruz et al., 1990
extrasklerale Infiltration	ohne	10 J.	37%	Seddon et al., 1983
	mit	10 J.	75%	Seddon et al., 1983

Tab. 8.2.: Zytomorphologische Faktoren

### 8.2.1. Zelltyp

Im Jahr 1931 wurde von Callender [29] ein Klassifikationssystem auf der Basis des Zelltyps (Spindelzellen, Epitheliodzellen, Mischtyp) vorgeschlagen, das später von McLean [81] modifiziert wurde.

5% der Tumoren enthalten Spindel-A-Zellen und sind gutartige Läsionen. Melanome mit Spindel-B-Zellen sind bösartige Tumoren mit einer Frequenz von 39%, aber mit guten Prognosen. Daher liegt die Überlebensrate bei 75%, im Gegensatz zu epitheliodzelligen Melanomen, die mit 3% die seltensten sind und mit einer Überlebensrate von 28% eine schlechtere Prognose haben. Die gemischtzelligen Melanome mit einer Frequenz von 45% haben bei einer Überlebensrate von 41% eine mittelmäßige Prognose [82]. In den Irismelanomen werden zumeist Spindelzellen gefunden und daher haben diese Tumoren eine relativ bessere Prognose.

Die Ziliarkörper- und Aderhautmelanome sind bei etwas weniger als 50% der Fälle aus Spindelzellen aufgebaut, mit einer guten Prognose und einer Überlebensrate von 73%. Die anderen 50% und etwas mehr der Fälle sind keine reine Spindelzellentumoren, sondern epitheliodzellige, gemischtzellige und nekrotische Tumoren mit einer schlechten Prognose bei einer Überlebensrate von 35%. Fälle, in denen die Zellnekrose so weit fortgeschritten ist, dass der Zellentyp nicht erkennbar ist, erscheinen bei 7%, während die Überlebensrate 41% beträgt.

Da diese Klassifikation subjektiv ist [83], wurden Methoden mit morphometrischen Kriterien vorgeschlagen, wie die Bestimmung der nukleolaren Arealen, sowie die Standard Deviation of the Nucleolar Area (SDNA) [84], des nukleolaren Pleomorphismus und des durchschnittlichen Durchmessers der 10 größten Nukleoli (MLN).

### **8.2.2. Mitotische Aktivität**

Verschiedene Studien haben belegt, dass die mitotische Aktivität (Mitosennummer pro HPF) ein prognostischer Faktor zu sein scheint. Der Prozentsatz der Todesfälle nimmt mit der Steigerung der Mitosennummer pro HPF zu. Tumoren mit niedriger Aktivität (0-1 Mitosen pro HPF) haben eine gute Prognose, d.h. die Mortalität liegt innerhalb von 6 Jahren bei 15%. Bei Tumoren mit hoher Aktivität hingegen liegt die Mortalität innerhalb von 6 Jahren bei 56% [74].

### **8.2.3. Architektur der Mikrozirkulation (vascular patterns)**

Neue Studien zeigen, dass die Architektur der Mikrozirkulation ein signifikanter Prognosenfaktor der Metastasen im Vergleich zu Tumorgröße, Zelltyp und Tumorlokalisation ist. In AHMM-Paraffinpräparaten werden 9 verschiedene Typen von vascular patterns anerkannt: normale Gefäße, avaskuläre Zonen, gerade Gefäße, parallele Gefäße, parallele Gefäße mit Kreuzungen, Gefäßbögen, Gefäßbögen mit Aufzweigungen, Gefäßschlingen, Gefäßnetzwerke. Eine 10-Jahres-Überlebenserwartung betrifft zu 90% Patienten mit Tumoren ohne vascular patterns und zu 50% Patienten mit erkennbaren vascular patterns [85, 86].

### **8.2.4. Tumor-Lymphozyteninfiltration**

Rund 5-12% der AHMM beweisen die Infiltration des Tumors durch Lymphozyten (TILs). Es besteht der Verdacht einer Korrelation zwischen dieser Infiltration und der Expression der HLA-Faktoren der Tumorzellen. Die unter den folgenden Kriterien fallenden Tumoren wurden in 2 Gruppen eingeteilt. Die hoch infiltrierte Gruppe (TILs > 100 per 20HPFs) hat eine 15-Jahres-Überlebenserwartung von 36,7 % im Gegensatz zu der niedrig infiltrierte Gruppe, deren Überlebenserwartung einem Anteil von 69,6% entspricht [87, 88].

## **8.3. Genetik**

### **8.3.1. Zytogenetik**

Die Analyse des genetischen Materials der Aderhautmelanome ergab chromosomale Anomalien des 3., 6. und 8. Chromosoms [89, 90]. Die Anomalien des 3. und 8. Chromosoms erscheinen meistens bei Ziliarkörpermelanomen im Gegensatz zu Anomalien des 6. Chromosoms, die öfters bei Melanomen der Choroid zu erkennen sind [91-93]. Nach einer Studie über den Zustand von 54 Patienten nach der Enukleation des Auges wegen eines Aderhautmelanoms ergab sich, dass die Patienten mit Monosomie 3 und Verdopplung des Chromosoms 8q eine Überlebensrate von ca. 40% innerhalb von 3 Jahren haben, während Patienten ohne diese Anomalien bis zu einem Prozentsatz von 95% überleben [90]. In einer anderen Studie sind 30 von 50 Patienten mit Melanom von Monosomie 3 betroffen. 57% von ihnen (17 Patienten) entwickelten in den nächsten 3 Jahren eine Metastase. Die restlichen 24 Patienten (alle ohne Monosomie 3) entwickelten keine Metastase [92]. Das lässt sich eventuell durch die schlechte Prognose der Ziliarkörpermelanome, auf Grund der Anomalien, erklären [90, 92, 93].

### **8.3.2. Molekulargenetik**

Die Verdopplung des Chromosoms 8q ist mit dem Aderhautmelanom verbunden. Näher dazu ist - auf molekularer Ebene - das c-myc Gen an der Zellenproliferation beteiligt und ist auf dem Chromosom 8q lokalisiert. Eine eventuelle Verbindung dieser Art zwischen dem c-myc und dem Melanom ist nicht auszuschließen. Eine immunohistochemische Studie von 24 Melanomen hat die Expression des c-myc bei bis zu 85% der Melanome sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma nachgewiesen [16]. Zellenproliferation hängt von dem c-myc Gen ab, der Zellentyp jedoch nicht. Es gibt Nachweise einer inversen Korrelation des c-myc und der HLA Expression, mit einer Downregulation des HLA- Antikörpers von c-myc und einer fehlenden Immunreaktion gegen das Melanom.

## **9. Patienten und Methoden**

### **9.1. Ziel der Studie**

Verschiedene Parameter - klinische, histologische oder genetische - sind als Risikofaktoren der Metastasen- und der Überlebens-Wahrscheinlichkeit beschrieben worden. Die klinischen Faktoren (z.B. largest tumor diameter, Ziliarkörperinfiltration, extraokulares Wachstum) sind schon in der Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS) analysiert worden. Die Analyse der histologischen und genetischen Parameter ist jedoch praktisch eingeschränkt, weil der größte Anteil der Patienten konservativ mittels Bestrahlung, ohne chirurgische Manipulation der Tumorgewebe behandelt wird.

Im Rahmen der konservativen Behandlung ist es möglich, mit einer unkomplizierten Blutentnahme zirkulierende Melanomzellen in der Blutbahn mit Hilfe der Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaktion (RT-PCR) zu erkennen. Für die Erkennung haben wir als Marker zwei Gene gewählt, die Tyrosinase und das MelanA/Mart1. Transkripten der Gene konnten wir in der mRNA der Melanomzellen finden. Diese Theorie wurde bei Patienten mit Hautmelanom bestätigt, und aufgrund der gemeinsamen embryonalen Herkunft der Melanomzellen lässt sich diese Theorie auch bei Patienten mit Aderhautmelanom einsetzen, sogar mit klinischer Signifikanz für die Prognose [94, 95].

Ziel dieser Arbeit war die Entdeckung der eventuell zirkulierenden Melanomzellen in der Blutbahn bei Patienten mit Aderhautmelanom und die Analyse des Einflusses einer operativen Behandlung auf die Gesamtzahl dieser Zellen. Es soll auch die Frage geklärt werden, ob bestimmte Faktoren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und bestimmte operative Manipulationen eine Rolle für den postoperativen Verlauf der Erkrankung, für das lokale Rezidiv und die Metastasierung spielen könnten.

### **9.2. Patienten**

#### **9.2.1. Patientenpopulation**

Es wurden die Daten aller Patienten ausgewertet, die im Zeitraum zwischen dem 07.11.2006 und dem 03.11.2007 aufgrund eines neu entdeckten Aderhautmelanoms am Universitätsklinikum Charité Campus Benjamin Franklin in Berlin erstmalig behandelt wurden (n=202).

Von jedem Patienten wurde Blut entnommen und zwar wie folgt:

- a) vor der operativen Behandlung
- b) 30 Minuten nach den wichtigen operativen Manipulationen
- c) (falls zusätzliche Tumorresektion geplant) vor der 2. OP
- d) 30 Minuten nach den wichtigen operativen Manipulationen der 2. OP
- e) nach 6 Monaten und
- f) nach 12 Monaten

Die erste Blutentnahme wurde als Referenz verwendet, die zweite zur Bestimmung der Einwirkung der operativen Behandlung an der Gesamtzahl der Melanomzellen und die dritte, sowie die vierte zur Korrelation der prospektiven Zahl der Melanomzellen mit dem Metastasierungsrisiko.

Gleichzeit wurden die Patientendaten mittels klinischer Untersuchung und Auswertung der Patientenakten erhoben.

### 9.2.2. Erfasste Patientendaten

Bei allen Patienten wurde eine Reihe von Parametern erhoben:

Demographische Daten:	Name, Vorname, Geschlecht, Geburtsdatum
Chronologische Daten:	Diagnose, Operation, Kontrolle, Metastase
Klinische Daten:	betroffenes Auge, Lokalisation, Pigmentierung, Begleitablatio
Sonographische Daten:	Dimensionen des Melanoms (maximale Prominenz, maximale Basis, minimale Basis, Volumen, Reflektivität)
Histologische Befunde:	(falls Eukleation, Endoresektion, transklurale Resektion, Biopsie) Beteiligung oder nicht des Ziliarkörpers, der Iris, Durchbruch in der vorderen Kammer, Infiltration des Sehnervs, der Sklera, extraokulares Wachstum,
Operative Methode	Clip-OP, Brachytherapie, Eukleation, Endoresektion, transkl. Resektion,
Metastase	ja, nein,
Lokales Rezidiv	ja, nein.

### **9.2.3. Statistische Methoden**

Die deskriptive Statistik umfasst die absolute und relative Häufigkeit der kategorischen Varianten sowie die Angabe von Mittelwert, Standardabweichung, Median und Range (Minimum und Maximum) der stetigen Varianten.

Für konfirmatorische Analysen der kategorischen Varianten wurden der Chi-Quadrat- bzw. (sofern der Anteil an Zellen mit erwarteter Häufigkeit weniger als 5 oder mehr als 25% betrug) der exakte Fisher-Test verwendet. Da die stetige Variante in der Regel nicht normal verteilt war, wurden für zwei Gruppen Vergleiche hinsichtlich metrischer Daten verwendet: der U-Test von Mann-Whitney bzw. der Wilcoxon-Test bei Wertpaaren. Beim Vergleichen zwischen drei und mehreren Gruppen wurde dementsprechend der Kruskal Wallis- bzw. der Test von Friedman verwendet.

Alle statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt und das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt. Die Analysen verstehen sich exploratorisch, alle p-Werte werden ohne Bonferroni-Korrektur präsentiert.

Univariate Überlebenszeitanalysen bzgl. der Zielparameter Rezidiv und Metastasierung wurden deskriptiv mittels Kaplan Meier Kurven durchgeführt und konfirmatorisch durch Log-Rank-Test abgesichert. Im Falle mehrerer signifikanter Prognosefaktoren wurde die Identifizierung unabhängiger Einflussgrößen mittels altersadjustierter multipler Cox-Regression durchgeführt.

## **9.3. RT-PCR [90]**

### **9.3.1. Lagerung der Blutproben**

12ml (2x6ml) Blut wurden in 2 EDTA Röhren entnommen und innerhalb von 2 Stunden bearbeitet, was einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 3000rpm entspricht. Das Plasma wurde in Kryo-Röhren übertragen und bei -20°C gelagert. Die Restzellen wurden in 5ml Guanidium Thiocyanate Buffer (chemische Lösung) (GTC) aufgelöst (Aufschlammung) und bei -80°C gelagert.

### **9.3.2. Nachweis von RNA-Markern mittels Polymerasekettenreaktion**

Der Nachweis von RNA-Transkripten in intakten Zellen erforderte die Isolierung der RNA, die Umschreibung der mRNA in cDNA und den Nachweis der cDNA mittels RT-PCR.

### 9.3.2.1. RNA-Extraktion

Die RNA-Isolierung von den Blutzellen erforderte materialspezifische Aufbereitungsschritte. Die Zell-Lyse, die Isolierung der RNA und die Inaktivierung von RNasen erfolgte im Beisein von Acid Guanidinium Thiocyanat (GTC)/ Phenol Chloroform [91, 92] und Phase Lock Gel Heavy (Eppendorf, Hamburg, Germany) und wurde weiter mittels des High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) aufbereitet. Die RNA der Zellen ging weiter mit dem RNeasy Mini Kit und dem RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Germany). Die Qualität der gewonnenen RNA wurde mittels Gelelektrophorese übergeprüft, 5µl RNA-Lösung mit 5µl Bromphenolblau wurde versetzt und auf ein 1-prozentiges Agarose-Gel (hergestellt mit MESA 1x und 1µl Ethidiumbromid/20ml Gel) aufgetragen und mittels Spektralphotometrie gemessen, 2µl RNA-Lösung 1:10 wurde mit sterilem Wasser verdünnt und die RNA-Konzentration wurde bei 260nm und 280nm photometrisch bestimmt ( $A_{260}=1$  entspricht 40ng/µl RNA). Die verbliebene RNA-Lösung wurde sofort bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 9.3.2.2. cDNA-Synthese

Für die Reverse Transkription wurden 2µg von der isolierten RNA in 15µl RNase-freies Wasser verdünnt und für 5 Minuten bei  $65^{\circ}\text{C}$  inkubiert (löst RNA-Sekundärstrukturen) und 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Falls die photometrisch bestimmte RNA-Konzentration kleiner als im Standard-Fall war, wurde die RNA-Lösung unverdünnt verarbeitet.

Die weitere cDNA-Synthese erfolgte mit dem Omniscript Reverse Transcriptase Kit entsprechend den Angaben des Herstellers. Eine 7.5µl Lösung, aus 2 µl oligo-p(dT)15, primer (0.8 µg/µl), 2 µl Deoxynucleoside Triphosphate (5mM), 0.5µl RNase-Inhibitor (40 units/ µl), 1 µl Omniscript Reverse Transcriptase (4.5 units/ µl), und 2 µl Reverse Transcriptase Buffer (x10) wurde gemischt und zur isolierten RNA hinzugefügt. Jeder RNA-Probe wurde eine Minus- (-) RT-Kontrolle zugeordnet, wobei der entsprechende Reaktions-Mix anstatt der reversen Transkriptase, RNase-freies Wasser enthielt. Zusätzlich wurde zu jeder cDNA-Synthese ein Ansatz ohne RNA hergestellt, bei dem der Reaktions-Mix in 15µl RNase-freies Wasser gegeben wurde. Die gewonnene Lösung mit einem Volumen von 22,5µl wurde für 1 Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Schließlich wurde die Lösung vor der Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zur Deaktivierung der Omniscript Reverse Transcriptase 5 Minuten bei  $95^{\circ}\text{C}$  gewärmt. Alle Reverse Transkriptase Reagenzien, außer oligo p(dT)15 primers und RNAsin (Roche Diagnostics), wurden von Qiagen bezogen.

### 9.3.2.3. Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (Real-Time PCR)

Die quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion wurde mit dem LightCycler unter Verwendung des "LightCycler Faststart DNA Master Hybridization Probes" Kits durchgeführt.

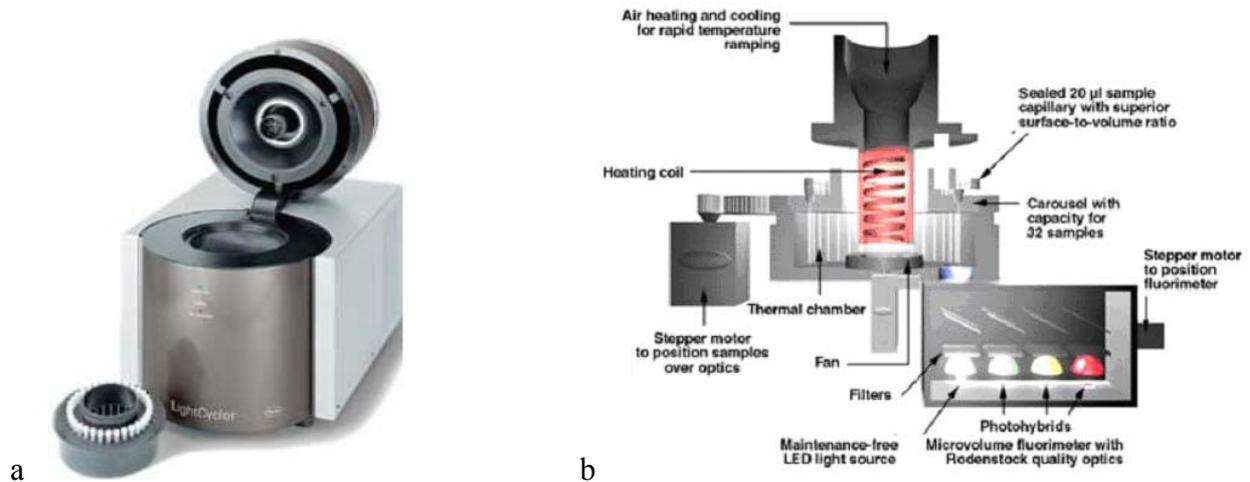


Bild 9.1.: a) LightCycler Hardware, Roche©, b) LightCycler, Funktionsprinzip

Das Prinzip der PCR, nämlich eine Aufeinanderfolge von 3-phasischen Zyklen (Denaturierung, Annealing, Elongation), die auf die exponentielle Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz einwirken, liegt auch dieser neuen Methode zugrunde. Die Besonderheit besteht allerdings darin, dass dem Reaktionsansatz selektiv an das Reaktionsprodukt bindende Sonden zugefügt werden, die die Quantifizierung des Produkts und die simultane Beobachtung des Reaktionsablaufs ermöglichen.

Die Sonden sind Oligonukleotide, die sich an benachbarten Stellen an das Amplifikat binden (max. 5 Nukleotide voneinander entfernt). Eines der Nukleotide trägt einen Donor Fluoreszenz-Farbstoff am 3'-Ende (Fluorescein) und das andere einen Akzeptor-Farbstoff am 5'-Ende (LC Red 640) und eine Phosphorylierung am 3'-Ende. Wenn beide Sonden an ein DNA-Molekül binden, wird Fluoreszenzlicht einer bestimmten Wellenlänge emittiert und durch den LightCycler detektiert.

Damit ist neben der Quantifizierung auch die Spezifität des Produktes gesichert. Die PCR-Reaktion findet in Glaskapillaren statt, die über die Luft erwärmt werden, was eine beträchtliche Verkürzung der einzelnen PCR-Zyklen im Vergleich zur konventionellen PCR gestattet.

Die notwendigen Konditionen für die Funktion des LightCycler (Roche Diagnostics) sind in der Tabelle 9.1. zusammengefasst. Jede cDNA (complementary DNA) wurde bis zu einem Volumen von 20 µl verdünnt. Diese Lösung heißt PCR-Mix (LightCycler Faststart DNA Master

Hybridization Probes; Roche Diagnostics). Je Lösung wurde eine Mischung aus 1µl des Vorwärts-Primers (10µM), 1µl des Rückwärts-Primers (10µM), jeweils 1µl der Sonden (4µM), 2µl der Enzym-Mischung und 12µl einer MgCl<sub>2</sub>-Lösung (Marker-spezifische Mg-Konzentration) in jede Kapillare pipettiert, und danach wurden 2µl der cDNA-, (-) RT-Lösung oder Wasser zugegeben.

Die Primers wurden von Metabion (Martinsried, Germany) gewährt und die Fluoprobe von TIB Molbiol (Berlin, Germany) und Metabion. 0.5 pmol Primer, 0.2 pmol Probe und noch MgCl<sub>2</sub> in einer Konzentration. Während des Prozederes und vor der Amplifikation (Vervielfältigung) der cDNA findet während 10 Minuten eine initiale Denaturation bei 95°C statt. Dann läuft ein Prozedere von 55 fortlaufenden Zyklen. Die entsprechenden Konditionen je Zyklus sind 10 Sekunden bei 95°C Denaturation, 12 Sekunden bei 72°C Amplifikation Annealing und 10 Sekunden bei 72°C Extension Elongation. In den letzten 2 Minuten erfolgte bei 72°C noch eine endgültige Verlängerung. Das Ausmaß des PCR-Produktes konnte mittels Gelelektrophorese geprüft werden. Jeder PCR-Lauf enthielt für jede cDNA-Probe sowohl Standards drei verschiedener Konzentrationen zum Quantifizieren, als auch eine minus (-) RT-Kontrolle und eine Wasser-Kontrolle (negative Kontrolle). Alle cDNA-Proben wurden doppelt analysiert, soweit das Material ausreichte. Alle porphobilinogen deaminase (PBGD), tyrosinae und MelanA/MART-1 Proben wurden in doppelter Ausführung analysiert und der Mittelwert wurde berechnet.

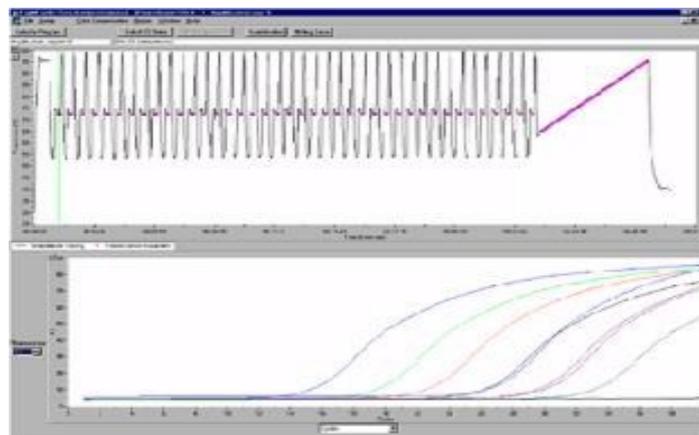


Bild 9.2.: „Crossing points“ einer cDNA Probe

Marker	Primer/hybridization probe sequence	Amplicon	Annealing Temperature	MgCl <sub>2</sub> Konzentration
<b>Porphobilinogen deaminase</b>		187 bp	65°C	4 mmol/L
Forward	5'-TGCAGGCTACCATCCATGTCCCTGC-3'			
Reverse	5'-AGCTGCCGTGCAACATCCAGGATGT-3'			
Probe	5'-CGTGGAATG TTACGAGCAGTGATGCCTACC-Fluo-3'			
Probe	5'-LCRed-640-TGTGGGTCATCCTCAGGGCCATCTTC-Pho-3'			
<b>Tyrosinase</b>		207	60°C	3 mmol/L
Forward	5'-GTCTTTATGCAATGGAACGC-3'			
Reverse	5'-GCTATCCCAGTAAGTGGACT-3'			
Probe	5'-GCGTAATCCTGGAAACCATGACAAA-Fluo-3'			
Probe	5'-LCRed-640-CACAACCCCAAGGCTCCCCTCTTC-Pho-3'			
<b>MelanA/Mart1</b>		300	65°C	4 mmol/L
Forward	5'-CACTCTTACACCACGGCTGA-3'			
Reverse	5'-AGGTGAATAAGGTGGTGGTGA-3'			
Probe	5'-GCTGTCCCGATGATCAAACCCTTC-Fluo-3'			
Probe	5'-LCRed-640-TGTGGGCATCTTCTTGTTAAGGCACA-Pho-3'			

Tab. 9.1.: Konditionen für die Funktion des LightCycler

Um das Kontaminationsrisiko zu vermindern, wurden die RNA-Isolation, die cDNA-Synthese, die PCR-Mix-Vorbereitung (Oncor Appligene, Heidelberg, Germany) und die RT-PCR in unterschiedlichen Labors durchgeführt. RNase-freies Wasser wurde für die cDNA-Synthese gebraucht. Im Verlauf aller Schritte der Prozedere wurden nicht nur Kontroll-negative Proben kontrolliert, sondern auch reverse transcriptase negative Proben für jede transcriptase positive Probe sowie Wasser-Proben pro PCR-Zyklus, laut Empfehlungen der EORTC.

### 9.3.3. Quantifizierung mittels Standards

Die Vervielfältigung von Sequenzen durch PCR folgt anfangs einer exponentiellen Kinetik, die im weiteren Verlauf in eine Sättigung aufgrund der begrenzten Substratmenge sowie die

Anreicherung von Endprodukten übergeht. Die Anzahl der Ausgangstranskripte im Reaktionsgefäß lässt sich anhand der PCR-Zyklen berechnen, bei denen die Kurve einen annähernd exponentiellen Charakter besitzt, d.h. am Anfangsteil der Kurven. Dieser sogenannte „Crossing point“ berechnet sich aus dem Maximum der zweiten Ableitung der aufsteigenden Kurve und wird vom der LightCycler-Software automatisch abgeschätzt. Der Kurvenverlauf bei fortgeschrittener Reaktion (Sättigung) ist vom Marker und den Sonden abhängig und für die Quantifizierung ohne Bedeutung. Für die Quantifizierung der Transkriptmenge einer cDNA-Probe wird eine Eichkurve verwendet, die die „Crossing points“ von Standard-Plasmid-Molekülen drei verschiedener Konzentrationen gegenüber dem Logarithmus der Konzentrationen darstellt. Im quantitativen Bereich der PCR ist diese Kurve eine Gerade. Nun kann mittels des gemessenen „Crossing points“ einer cDNA Probe deren Ausgangstranskriptmenge berechnet werden (Bild 9.2.). Die Quantifizierung von Transkripten einer cDNA-Probe durch eine Plasmid-Eichkurve ergibt allerdings nicht die absolute Anzahl von Ausgangstranskripten sondern eine relative Anzahl in Plasmidäquivalenten („number of standard molecules“ = NSM). Für die absolute Bestimmung müsste man einen Standard herstellen, der eine definierte Menge der gesuchten cDNA in der gleichen Umgebung wie in der Probe enthält. Sehr wahrscheinlich ist aber, dass die Ausgangstranskriptmenge proportional zu den Plasmidäquivalenten ist, so dass cDNA-Proben gleichen Hintergrundes untereinander verglichen werden können. Zur Abschätzung der PCR-Sensitivität ist es notwendig, die Anzahl der Standardmoleküle in einem Ansatz zu kennen. Das Molekulargewicht des Standards beträgt:

$$M = (660 * \text{Anzahl der bp})g/mol = (660 * \text{Anzahl der bp})g / (6,023 * 10^{23} \text{ Moleküle}).$$

Damit enthält 1pgb  $6,023 * 10^{11}$  Moleküle /  $(660 * \text{Anzahl der bp})$ .

Bei einer Standardkonzentration von 1pg/μl, einer Plasmidgröße von etwa 4kbp und einer Menge von 2μl befinden sich daher  $1,83 * 10^9 / \text{Anzahl der bp}$ , d.h. etwa 450000 Moleküle, im Ansatz.

#### 9.3.4. Haushaltsgene

Haushaltsgene (HKG) sind für einen Zelltyp relativ konstant und stabil exprimierte Gene, deren Quantifizierung eine interne Qualitätskontrolle der Aufarbeitung ermöglicht. Unter der Annahme, dass Variationen in der Menge der HKG-Transkripte eher durch die Aufarbeitung (RNA-Isolierung, cDNA-Synthese), als durch deren biologische Variabilität bestimmt sind, lassen sich Marker-Konzentrationen durch Normierung auf die Transkriptmenge des HKGs relativieren.

Wir haben PBGD gewählt, welches in gut quantifizierbarer Menge in Zellen vorhanden ist, nicht reguliert wird, sowie keine Pseudogene besitzt. Als zweites HKG wurde G6PD getestet, welches ähnliche Eigenschaften wie PBGD aufweist.

## 10. Ergebnisse

### 10.1 Ausgangsdaten aller Patienten

An der Studie nahmen 202 Patienten teil, die im Zeitraum zwischen dem 07.11.2006 und dem 03.11.2007 aufgrund eines neu entdeckten Aderhautmelanoms am Universitätsklinikum Charite Campus Benjamin Franklin in Berlin erstmalig behandelt worden sind. 55% (N=111) waren Frauen und 45% (N=91) waren Männer. Das mittlere Therapialter aller behandelten Patienten lag bei 61,29 ( $\pm 13,68$ ) Jahren (Abb.10.1a). Der jüngste Patient war 16 und der älteste 93 Jahren alt.

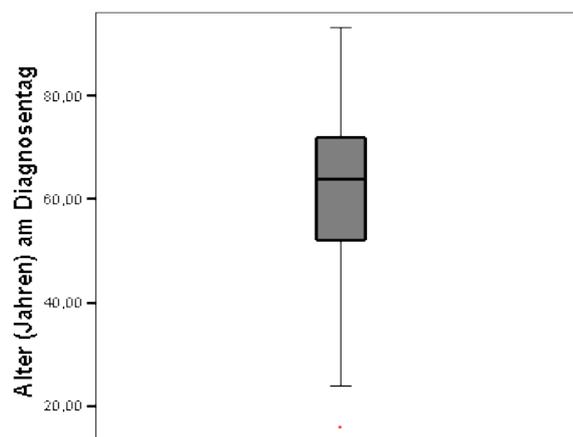


Abb. 10.1.: Graphische Darstellung der Altersverteilung

Die Tumorprominenz wies vor der Behandlung einen Mittelwert von 5,77 ( $\pm 3,37$ )mm auf. Die geringste Tumorprominenz maß 1,20mm und die höchste 15,31mm. Die maximale Tumorbasis

hatte einen Mittelwert von 11,72 ( $\pm 3.95$ ) mm (Abb.10.1b). Der niedrigste Wert maß 2.00mm und der größte 20,94mm. Der entsprechende Wert für die minimale Tumorbasis war 9,97 ( $\pm 3,78$ )mm, der niedrigste Wert 1,84mm und der größte Wert 20,45mm.

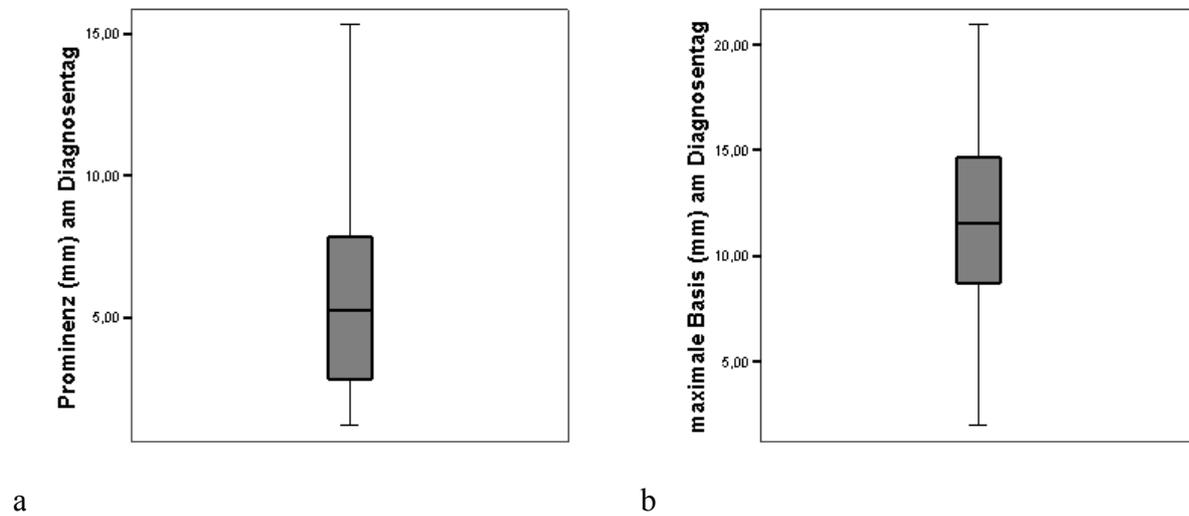


Abb. 10.2.: Graphische Darstellung a) der Prominenz- und b) der Basis-Verteilung

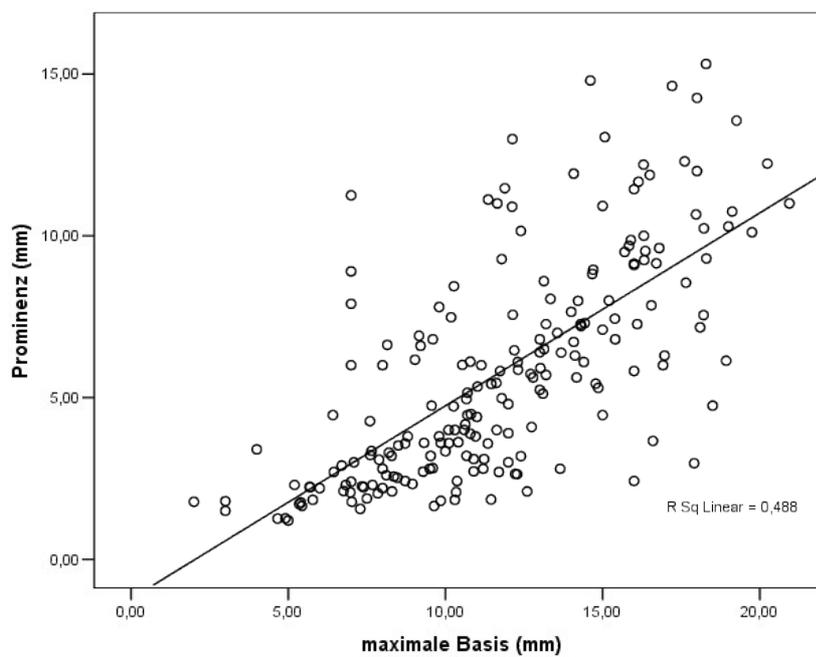


Abb. 10.3.: Korrelation der Tumorprominenz mit der maximaler Tumor Basis

Das maximale Tumolvolumen, gemessen bei 112 Patienten, hatte einen Mittelwert von 661,62 ( $\pm 601,52$ )mm<sup>3</sup> (Abb. 10.4.). Der niedrigste Wert maß 33,30 mm<sup>3</sup> und der größte 2271,60 mm<sup>3</sup>.

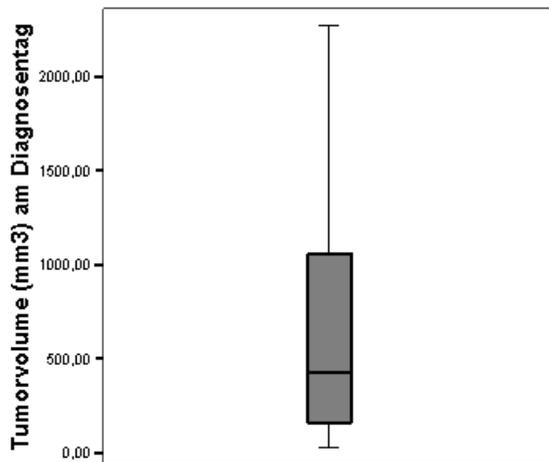


Abb. 10.4.: Verteilung der Volumen in mm<sup>3</sup>

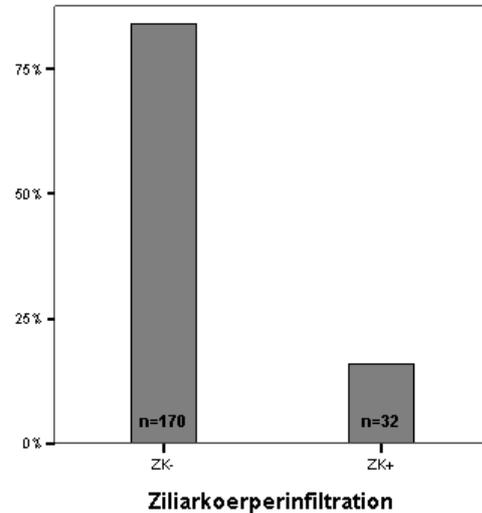


Abb. 10.5.: Ziliarkörperbeteiligung

Eine Infiltration des Ziliarkörpers wurde bei 32 (15,8%) Patienten dokumentiert (Abb. 10.5.), und eine zusätzliche Infiltration der Iris nur bei 7 (3,5%) Patienten. Bei 174 (86,1%) Patienten zeigte sich kein extraokulares Wachstum, bei den Restpatienten fand sich jedoch klinisch oder pathologisch eine Infiltration der Sklera (6,4%) oder des Sehnervs (7,4%). In 20 Fällen, bei denen ein biologisches Präparat vorlag, konnten wir auch die Tumoren in 4 verschiedene histologische Gruppen einordnen: 9 Patienten (45%) mit spindelzelligen Tumoren, 2 (10%) mit epitheloidzelligen Tumoren und die übrigen mit gemischten Tumoren, von denen 8 (40%) überwiegend spindelzellig und 1 (0,5%) überwiegend epitheloidzellig waren.

Von den 202 Patienten wurden 128 Patienten (66%) mit Protonen bestrahlt, und dafür wurden 4 Clips am Auge operativ aufgenäht. 48 Patienten (24,7%) wurden mit radioaktivem Applikator behandelt, und 18 Augen (6,4% der Patienten) wurden entfernt. Schließlich wurde bei 43 der bereits 128 mit Protonen bestrahlten Patienten eine zweite Operation (Endoresektion 19,5% oder transklurale Tumor Resektion 6,3%, ggf Enukleation 1,6%) zur Entfernung des Tumors durchgeführt (Abb. 10.6., Abb. 10.7.).

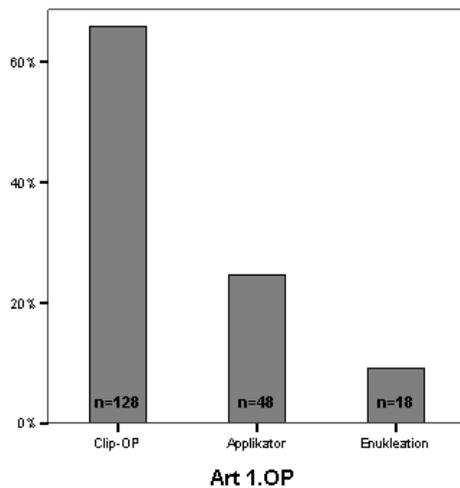


Abb. 10.6.

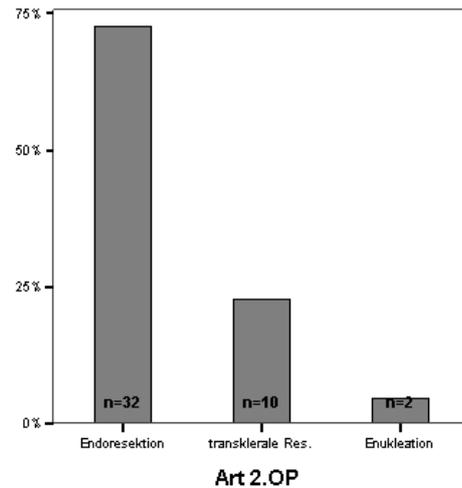


Abb. 10.7.

## 10.2. Nachkontrolle

Die erste Kontrolle des behandelten Tumors fand 7,2411 ( $\pm 3,44952$ ) Monate nach der Diagnose statt und wurde bei 175 Patienten durchgeführt. Die zweite Tumorkontrolle bzw. die letzte Blutentnahme fand bei 120 Patienten 16,2545 ( $\pm 4,10823$ ) Monate nach der Diagnose statt. Die mittlere postoperative Beobachtungszeit des gesamten Patientenkollektives betrug 25,9 ( $\pm 6,10$ ) Monate. Die längste Beobachtungszeit lag bei 35,51 Monaten.

## 10.3. PCR Ergebnisse

Die Quantifizierung der Gene in der Blutbahn geschah sowohl als stetige Variante, als auch als kategoriale Variante.

### 10.3.1 Tyrosinase-Gen

Ein Patient war positiv in Bezug auf das Tyrosinase-Gen, wenn überhaupt Tyrosinase durch die PCR produziert wurde, sonst war er negativ (Abb.10.8., Abb.10.9.).

Am Tag der Aufnahme: Die Tyrosinase konnte bei 184 Patienten bestimmt werden. Davon waren 182 (98,9%) negativ in Bezug auf das Tyrosinase-Gen und 2 (1,1%) positiv. Bei den positiven Patienten war der Mittelwert 0.000000051261 ( $\pm 0.0000006529152$ ) pg/ $\mu$ l.

30 Minuten nach den wichtigen operativen Manipulationen: Bearbeitete Befunde aus dieser Blutentnahme hatten wir von 180 Patienten. 176 (97,8%) waren negativ und 4 (2,2%) positiv, mit dem Mittelwert bei 0.000001076758 ( $\pm 0.0000142357042$ ) pg/ $\mu$ l.

Eine Tumorsektion erfolgte bei 43 Patienten, aber Blut wurde nur von 40 Patienten analysiert. Präoperativ waren 39 Patienten (97,5%) negativ und 1 Patient (2,5%) positiv. Der Durchschnittswert der positiven Patienten betrug 0.000000013650 ( $\pm 0.0000000863302$ ) pg/ $\mu$ l. Intraoperativ zeigte sich keine positive Blutprobe. Alle 40 Patienten waren negativ.

Am Tag der ersten Verlaufskontrolle: von den 159 gesammelten Blutproben waren 156 Patienten (98,1%) negativ und 3 Patienten (1,9%) positiv. Der Durchschnittswert der positiven Patienten lag bei 0.000000559975 ( $\pm 0.0000068451568$ ) pg/ $\mu$ l.

Am Tag der zweiten Verlaufskontrolle waren 113 (98,3%) Patienten negativ und 2 (1,7%) positiv. Der Durchschnittswert der positiven Patienten betrug 0.000000388609 ( $\pm 0.0000029488493$ ) pg/ $\mu$ l.

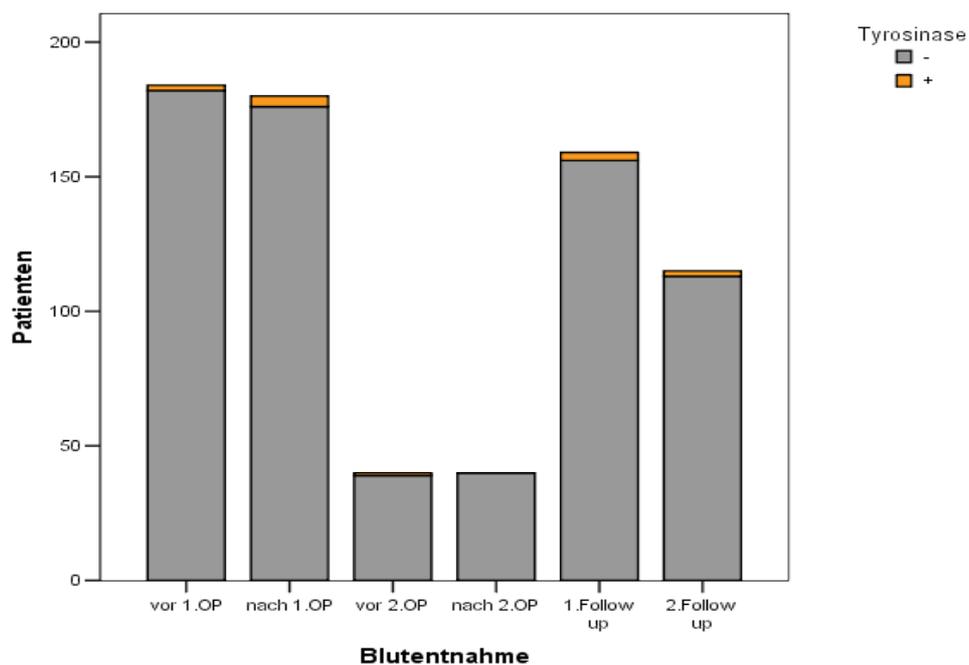


Abb. 10.8.: Patienten für Tyrosinase positiv

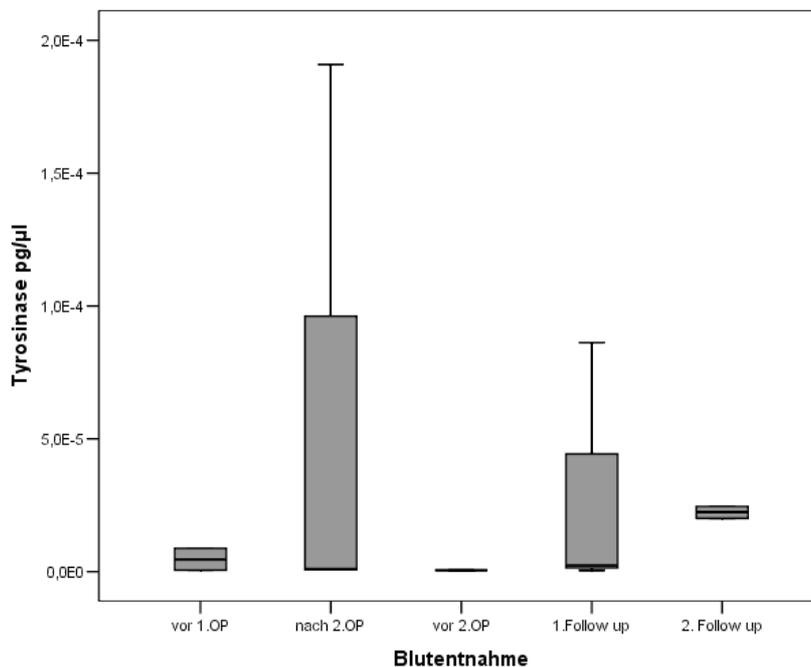


Abb. 10.9.: Verlauf der Tyrosinase-Ladung

### 10.3.2. MelanA/Mart1-Gen

Im Fall des MelanA/Mart1 Gens erwies sich ein Patient als positiv, wenn MelanA/Mart1 durch PBGD Ratio mehr als  $4,4 \times 10^{-5}$  war, bzw. doppelt so hoch wie bei gesunden Menschen ( $2,2 \times 10^{-5}$ ) [89], (Abb 10.10., Abb. 10.11.).

Am Tag der Aufnahme: Das MelanA/Mart1 konnte bei 184 bestimmt werden. Davon waren 164 (89,1%) negativ für das Gen und 20 (10,9%) positiv. Bei den positiven Patienten war der Mittelwert  $0,000038112834 (\pm 0,0002758720630)$  pg/µl.

30 Minuten nach den wichtigen operativen Manipulationen: Bearbeitete Befunde aus dieser Blutentnahme hatten wir von 180 Patienten. 155 Patienten (86,1%) waren negativ und 25 (13,9%) positiv, mit einem Mittelwert von  $0,000082926135 (\pm 0,0005383897758)$  pg/µl.

Wie bereits weiter oben aufgeführt, erfolgte eine Tumorresektion bei 43 Patienten, Blut wurde jedoch nur von 40 Patienten analysiert. Präoperativ waren 36 Patienten negativ (90,0%) und 4 positiv (10,0%). Der Durchschnittswert der positiven Patienten lag bei  $0,000047571423 (\pm 0,0001894687861)$  pg/µl. Intraoperativ erwies sich die Blutprobe bei 33 Patienten (82,5%) als negativ und bei 7 Patienten (17,5%) als positiv. Der Durchschnittswert der positiven Patienten lag bei  $0,000072956535 (\pm 0,0002835864329)$  pg/µl.

Am Tag der ersten Verlaufskontrolle: von den 159 gesammelten Blutproben waren 141 (88.7%) negativ und 18 (11.3%) positiv. Der Durchschnittswert der positiven Patienten lag bei 0.000060540426 ( $\pm 0.0004751718849$ ) pg/ $\mu$ l.

Am Tag der zweiten Verlaufskontrolle waren 100 (87,0%) Patienten negativ und 15 (13,0%) positiv. Der Durchschnittswert der positiven Patienten lag bei 0.000058235760 ( $\pm 0.0003127498488$ ) pg/ $\mu$ l.

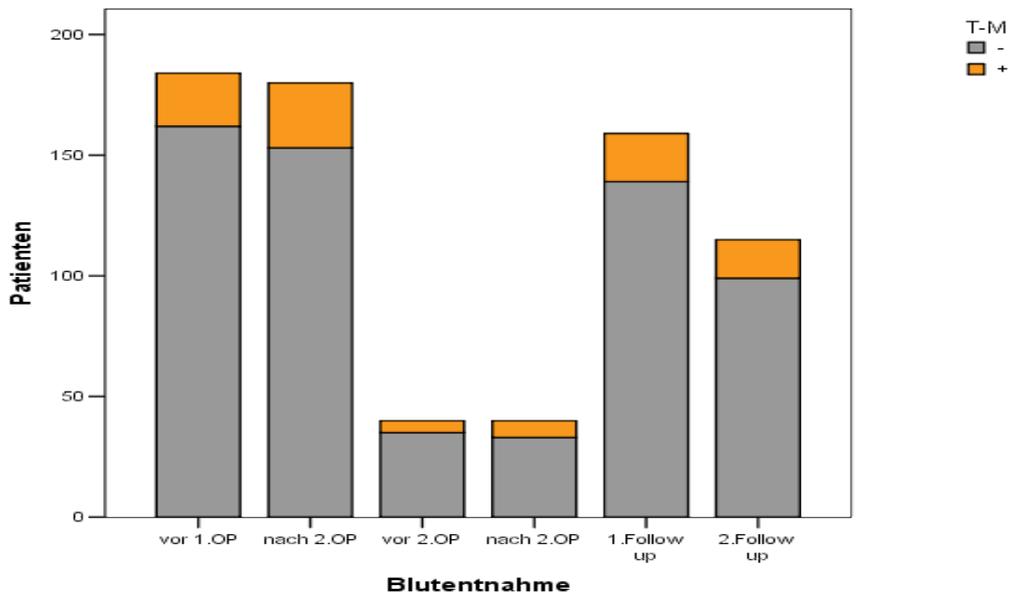


Abb. 10.10.: Patienten für MelanA/Mart1 positiv

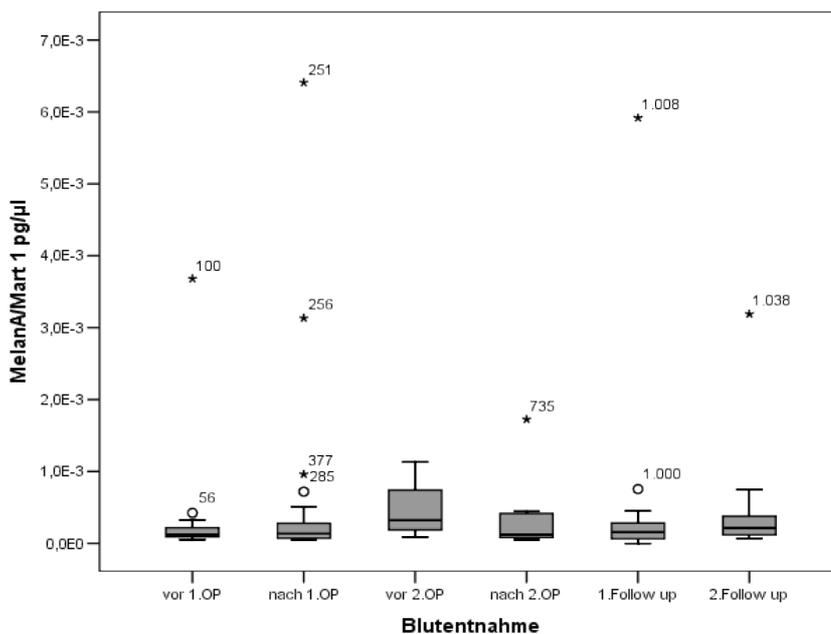


Abb. 10.11.: Verlauf der MelanA/Mart1-Ladung

### 10.3.3. Kombinierte Bestimmung des PCR-Ergebnisses

Weil nicht so viele positive Patienten für Tyrosinase oder MelanA/Mart1 gemessen worden waren, wurde ein neuer Parameter eingesetzt, der von uns „T-M“ genannt wurde. Ein Patient wird als positiv für den „T-M“ eingetragen, wenn er entweder für Tyrosinase oder/und für MelanA/Mart1 positiv ist, ansonsten wird er als negativ bezeichnet.

Am Tag der Aufnahme: Der „T-M“ konnte bei 184 bestimmt werden. Davon waren 162 (88,0%) negativ für das „T-M“ und 22 (12,0%) positiv.

30 Minuten nach den wichtigen operativen Manipulationen: Bearbeitete Befunde aus dieser Blutentnahme hatten wir von 180 Patienten. 153 (85,0%) waren negativ und 27 (15,0%) positiv.

Eine Tumorresektion erfolgte bei 43 Patienten, Blut wurde jedoch nur von 40 Patienten analysiert.

Präoperativ waren 35 negativ (87,5%) und 5 positiv (12,5%). Intraoperativ waren 33 (82,5%) negativ und 7 (17,5%) positiv.

Am Tag der ersten Verlaufskontrolle: Von den 159 gesammelten Blutproben waren 139 (87,4%) negativ und 20 (12,6%) positiv.

Am Tag der zweiten Verlaufskontrolle waren 99 (86,1%) Patienten negativ und 16 (13,9%) positiv.

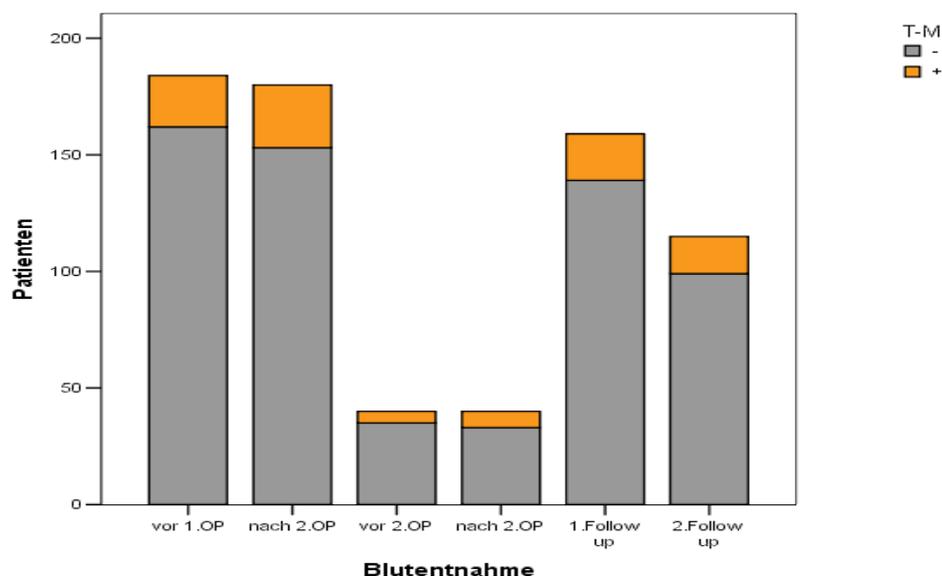


Abb. 10.12.: Patienten für T-M positiv

## 10.4. Gen-Verteilung und Patienten-Subpopulationen

Die Patienten wurden nach Alter, Geschlecht, Tumorprominenz, maximaler Tumorbasis, minimaler Tumorbasis, Histologie, Ziliarkörperinfiltration, Irisinfiltration und extraokularem Wachstum in die nachstehenden Kategorien eingeteilt (Tab. 10.1.).

<b>Alter Diagnose</b>	<b>202 Patienten</b>
Jungen (jünger als 62)	99 (49%)
ältere	103 (51%)
<b>Geschlecht</b>	
männlich	91 (45%)
weiblich	111 (55%)
<b>Prominez</b>	
1 (kleiner als 3.5)	67 (33.2%)
2 (zwischen 3.5 und 7)	71 (35.1%)
3 (größer als 7 )	46 (22.8%)
<b>Max Basis</b>	
1 (kleiner 8)	41 (20.3%)
2 (zwischen 8 und 14)	99 (49.0%)
3 (mehr als 14)	62 (30.7%)
<b>Min Basis</b>	
1 (kleiner 6.5)	34 (16.8%)
2 (zwischen 6.5 und 13)	126 (62.4%)
3 (mehr als 13)	42 (20.8%)
<b>Biopsie</b>	<b>*(N=20)</b>
Spindelzellen	9 (45.0%)
Epitheliodzellen	2 (10.0%)
gemischt. Spindel	8 (40.0%)
gemischt. Epithel.	1 (0.5%)
<b>Ziliarkörper</b>	
keine Infiltration	170 (84.2%)
Infiltration	32 (15.8%)
<b>Iris</b>	
keine Infiltration	195 (96.5%)
Infiltration	7 (3.5%)
<b>extraokulares Wachstum</b>	
keine	174 (86.1%)
Infiltration Sehnerv	15 (7.4%)
Infiltration Sklera	13 (6.4%)

Tab. 10.1.: Patientenkollektiv

Pro Subpopulation der entsprechenden Kategorien wurde die Gen-Konzentration am Tag der ersten Blutentnahme analysiert (Abb. 10.13., Abb. 10.14., Abb. 10.15., Abb. 10.16.).

Für das Tyrosinase-Gen wies die Analyse mittels Pearson  $\chi^2$  und Kruskal-Wallis - sowohl als binary als auch als stetige Variante - keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Subpopulationen nach.

Für das MelanA/Mart1-Gen wies die Analyse mittels Pearson  $\chi^2$  und Kruskal-Wallis - sowohl als binary als auch als stetige Variante - keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Subpopulationen nach.

Für den „T-M“ Parameter (binary) wies die Analyse mittels Pearson  $\chi^2$ , Fischer Exact Test und U Mann-Whitney Test keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Subpopulationen nach.

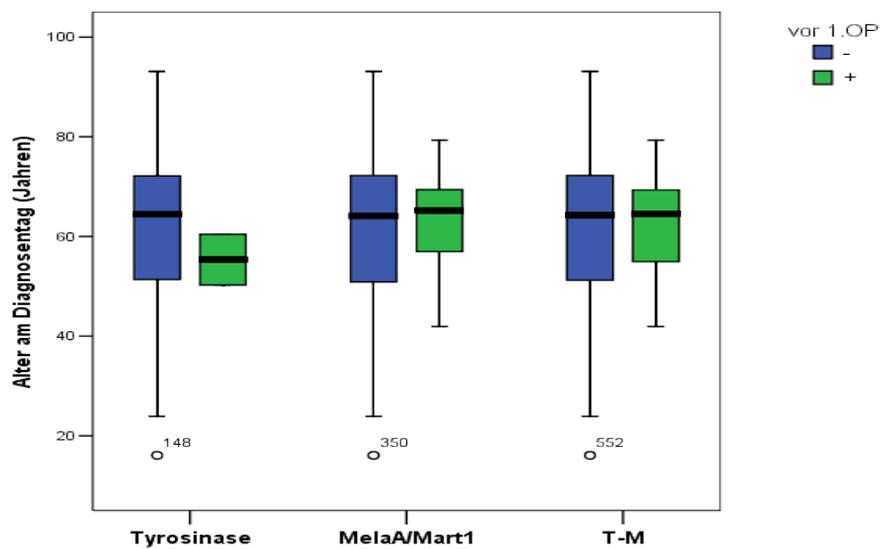


Abb. 10.13.: Alterverteilung nach RT-PCR Ergebnis

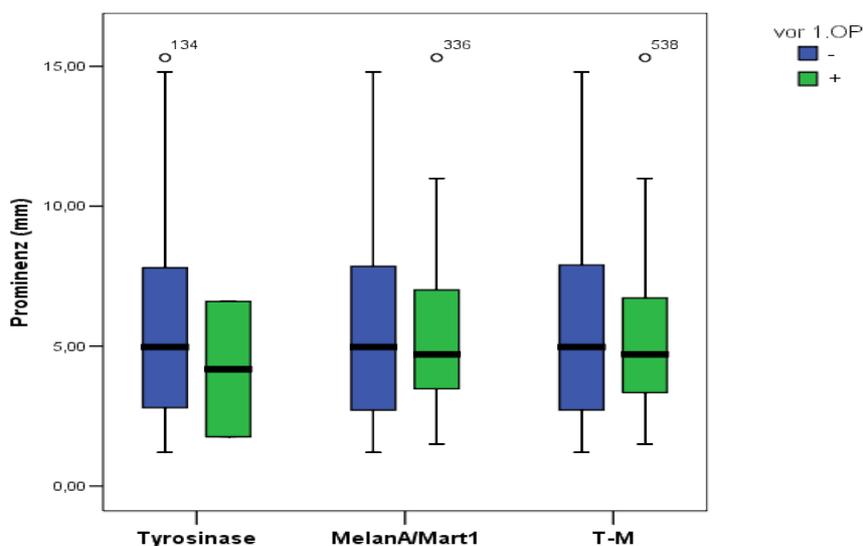


Abb. 10.14.: Prominenzverteilung nach RT-PCR Ergebnis

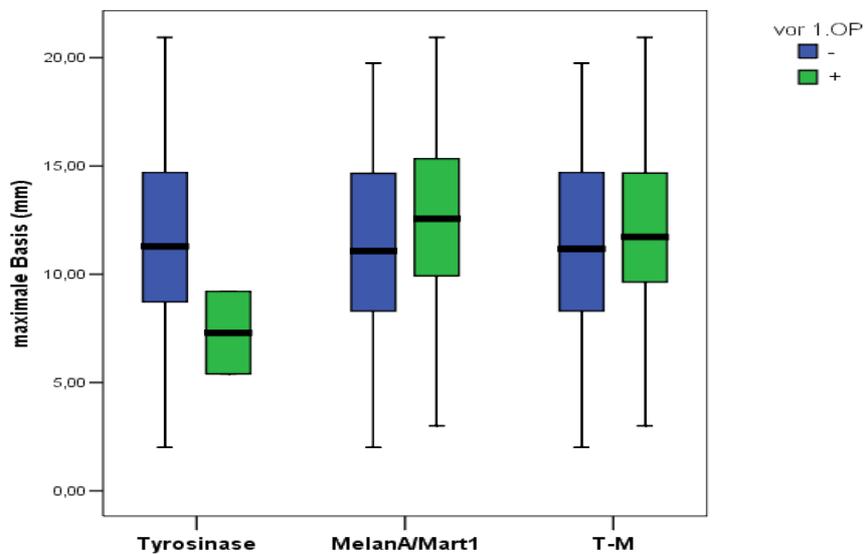


Abb. 10.15.: Basisverteilung nach RT-PCR Ergebnis

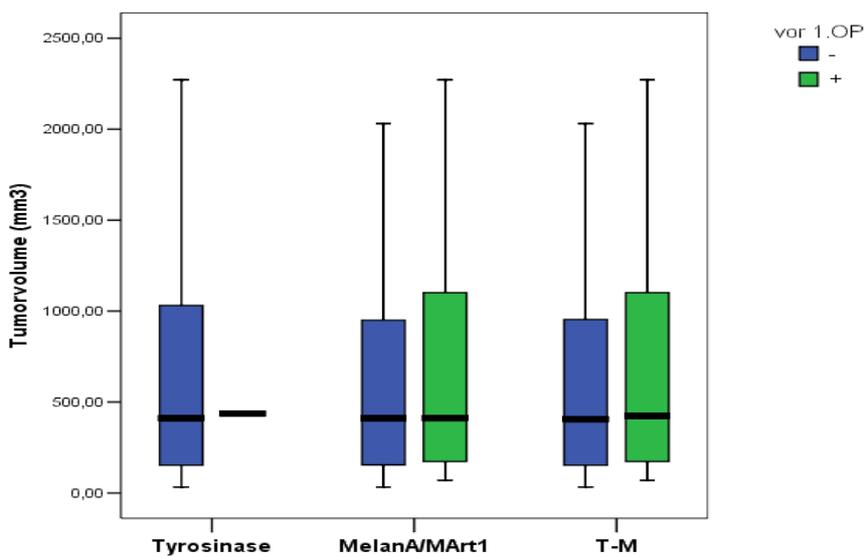


Abb. 10.16.: Volumenverteilung nach RT-PCR Ergebnis

### 10.5. Schwankung der Gen-Menge

Ein Ziel der Studie war unter anderem die Dokumentation der Änderung der zirkulierenden Tumorzellen in der Blutbahn. Dafür wurden die Patienten in 4 Kategorien pro Zeitraum eingeteilt. Zur ersten Kategorie (Kat. 1) gehörten Patienten, die vor und nach dem Ereignis negativ in Bezug auf Tyrosinase oder MelanA/Mart1 oder in Bezug auf das Kombi „T-M“ waren (- -). Die zweite Kategorie (Kat. 2) erfasste Patienten, die vor dem Ereignis negativ und danach positiv waren (- +). Die dritte Kategorie (Kat. 3) erfasste Patienten, die vor dem Ereignis positiv und danach negativ waren (+ -). In der vierten Kategorie (Kat. 4) nahmen Patienten teil, die

sowohl vor dem Ereignis als auch danach positiv waren (+ +). Ereignisse nannten wir die zwei operativen Verfahren und Zeitraum die Perioden zwischen 2 verschiedenen Blutentnahmen. Die Verteilung der Patienten ist in den nachstehenden Tabellen aufgezeichnet.

<b>Tyrosinase-Schwankung</b>	1.Kat. (--)	2.Kat. (-+)	3.Kat (+-)	4.Kat. (++)
vor 1.OP und nach 1.OP	167 (97,1%)	3 (1,7%)	2 (1,2%)	0 (0%)
vor 1.OP und am 1.Follow up	143 (97,9%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)	1 (0,6%)
vor 1.OP und am 2.Follow up	102 (97,1%)	2 (1,0%)	1 (0,5%)	0 (0%)
nach 1.OP und am 1.Follow up	139 (96,5%)	2 (1,4%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)
nach 1.OP und am 2.Follow up	101 (97,1%)	2 (1,9%)	1 (1,0)	0 (0%)
vor 2.OP und nach 2.OP	36 (97,3%)	0 (0%)	1 (2,7%)	0 (0%)
nach 2.OP und am 1.Follow up	33 (97,1%)	1 (2,9%)	0 (0%)	0 (0%)
nach 2.OP und am 2.Follow up	22 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
zwischen 1. und 2.Follow up	99 (96,1%)	2 (1,9%)	2 (1,9%)	0 (0%)

Tab. 10.2.

<b>MelanA/Mart1-Schwankung</b>	1.Kat. (--)	2.Kat. (-+)	3.Kat (+-)	4.Kat. (++)
vor 1.OP und nach 1.OP	135 (78,5%)	19 (11,0%)	15 (8,7%)	3 (1,7%)
vor 1.OP und am 1.Follow up	120 (82,2%)	11 (7,5%)	14 (9,6%)	1 (0,7%)
vor 1.OP und am 2.Follow up	80 (76,2%)	10 (9,5%)	14 (13,3%)	1 (1,0%)
nach 1.OP und am 1.Follow up	111 (77,1%)	12 (8,3%)	18 (12,5%)	3 (2,1%)
nach 1.OP und am 2.Follow up	79 (76,0%)	9 (8,7%)	14 (13,5%)	2 (1,9%)
vor 2.OP und nach 2.OP	28 (75,7%)	5 (13,5%)	2 (5,4%)	2 (5,4%)
nach 2.OP und am 1.Follow up	24 (70,6%)	4 (11,8%)	5 (14,7%)	1 (2,9%)
nach 2.OP und am 2.Follow up	17 (77,3%)	3 (13,6%)	2 (9,1%)	0 (0%)
zwischen 1. und 2.Follow up	79 (76,7%)	13 (12,6%)	9 (8,7%)	2 (1,9%)

Tab. 10.3.

<b>T-M Schwankung</b>	1.Kat. (--)	2.Kat. (-+)	3.Kat (+-)	4.Kat. (++)
vor 1.OP und nach 1.OP	131 (76,2%)	21 (12,2%)	17 (9,9%)	3 (1,7%)
vor 1.OP und am 1.Follow up	117 (80,1%)	13 (8,9%)	15 (10,3%)	1 (0,7%)
vor 1.OP und am 2.Follow up	78 (74,3%)	11 (10,5%)	15 (14,3%)	1 (1,0%)
nach 1.OP und am 1.Follow up	108 (75,0%)	15 (9,7%)	19 (13,2%)	3 (2,1%)
nach 1.OP und am 2.Follow up	79 (76,0%)	9 (8,7%)	13 (12,5%)	3 (2,9%)
vor 2.OP und nach 2.OP	27 (73,0%)	5 (13,5%)	3 (8,1%)	2 (5,4%)
nach 2.OP und am 1.Follow up	23 (67,6%)	5 (14,7%)	5 (14,7%)	1 (2,9%)
nach 2.OP und am 2.Follow up	17 (77,3%)	4 (13,6%)	2 (9,1%)	0 (0%)
zwischen 1. und 2.Follow up	76 (73,8%)	14 (13,6%)	11 (10,7%)	2 (1,9%)

Tab. 10.4.

## 10.6. Einfluss der operativen Methoden auf die Genmenge

Verschiedene Theorien verzeichneten eine eventuelle iatrogene Dissemination der Tumorzellen in der Blutbahn. Die Schwankungen der Genmenge zwischen den verschiedenen Zeitpunkten der entsprechenden Blutentnahmen wurden bereits in Absatz 10.5. aufgeführt. Im Zeitraum von der Aufnahme bis zur letzten Kontrolle wurden die 202 Patienten mindestens einmal operiert. Zusätzlich wurden 43 Patienten ca. 6 Wochen nach der ersten Operation erneut operiert.

Für einen Ausschluss oder eine Bestätigung einer iatrogenen Tumorzellen-Dissemination müssen die Schwankungen der Genmenge bzw. Tumorzellen-Anzahl bestimmt werden. In dieser Studie wurde analysiert, wie viele Patienten in Bezug auf die o.g. Gene negativ geblieben sind, wie viele positiviert geworden sind, wie viele negativiert worden sind und wie viele positiv geblieben sind. Diese Schwankung wurde für die Operation nicht nur als einheitliches Ereignis analysiert, sondern auch für jede operative Technik getrennt.

### 10.6.1 Einfluss der 1. Operation

Nachstehend die Zusammenfassung der Schwankung des Tyrosinase-Gens während der 1. Operation:

Tyrosinase vor und nach 1. OP	Clip	Applikator	Enukleation	p-Wert $\chi^2$
				(total) 0,845
Kat. 1 (- -)	112 (96.6%)	39 (97.5%)	16 (100%)	0,732
Kat. 2 (- +)	2 (1.7%)	1 (2.5%)	0 (0%)	0,812
Kat. 3 (+ -)	2 (1.7%)	0 (0%)	0 (0%)	0,614
Kat. 4 (+ +)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
p-value $\chi^2$	0.614	0.678	0.768	

Tab. 10.5.

Nach der Pearson  $\chi^2$  Analyse gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied bei einem  $\chi^2$  p-Wert= 0,845 zwischen den 3 operativen Verfahren und für alle 4 Kategorien. Nach erneuter  $\chi^2$  Analyse - pro Kategorie - gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied bei einem  $\chi^2$  p-Wert = i)0,732, ii)0,812, iii)0,614, iv)nicht möglich, pro entsprechende Kategorie zwischen den 3 operativen Techniken (Abb. 10.17.). Umgekehrt gab es auch keinen statistisch signifikanten

Unterschied bei einem  $\chi^2$  p- Wert = 0,614, 0,678, 0,768 pro entsprechende operative Methode zwischen den 4 Kategorien.

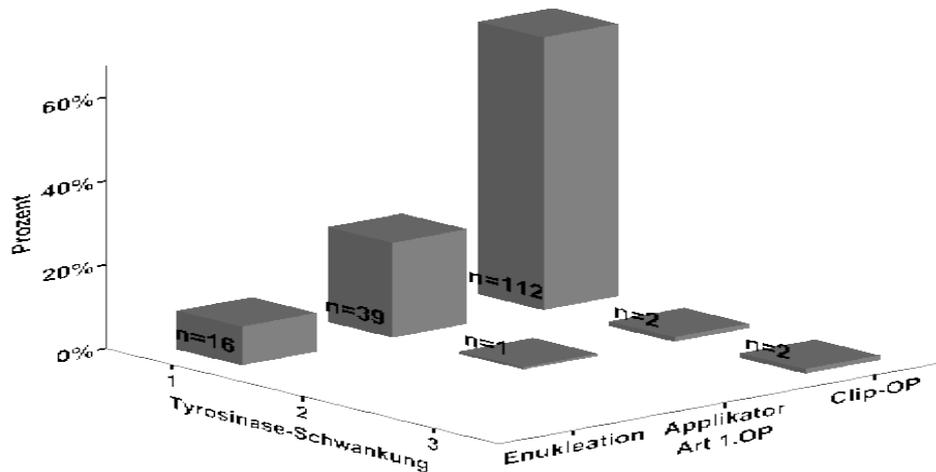


Abb. 10.17.: Patientenverteilung, pro Kategorie für Tyrosinase, pro Operationsart, p-Wert 0,845

Der Mittelwert des Tyrosinase-Gens lag vor der 1. Operation bei 0.000000051261 ( $\pm 0.0000006529152$ ) pg/ $\mu$ l und danach bei 0.000001076758 ( $\pm 0.0000142357032$ ) pg/ $\mu$ l. Die Wilcoxon Analyse und der Sign Test für nichtparametrische Werte wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den 2 Mittelwerten nach, Wilcoxon Test Asymp. Sig (2-tailed) 0,500, Sign Test Exact Sig. (2-tailed) 1,000.

Nachstehend die Zusammenfassung der Schwankung des MelanA/Mart1-Gens während der 1. Operation:

MelanA/Mart1 vor und nach 1. OP	Clip	Applikator	Enucleation	p-value $\chi^2$
				(total) 0,631
Kat. 1 (- -)	92 (79.3%)	32 (80.0%)	11 (68.8%)	0.607
Kat. 2 (- +)	13 (11.2%)	3 (7.5%)	3 (18.8%)	0.477
Kat. 3 (+ -)	8 (6.9%)	5 (12.5%)	2 (12.5%)	0.475
Kat. 4 (+ +)	3 (2.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0.479
p-value $\chi^2$	0.416	0.499	0.624	

Tab. 10.6.

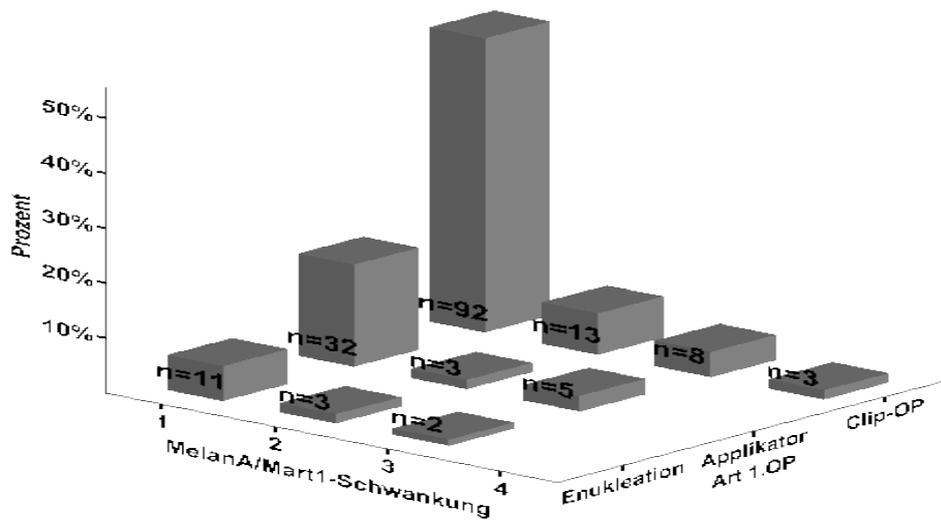


Abb. 10.18.: Patientenverteilung, pro Kategorie für MelanA/Mart1, pro Operation, p-Wert 0,631

Nach der Pearson  $\chi^2$  Analyse gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied bei einem  $\chi^2$  p-Wert = 0,631 zwischen den 3 operativen Verfahren und für alle 4 Kategorien. Nach erneuter  $\chi^2$  Analyse pro Kategorie - gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied bei einem  $\chi^2$  p-Wert = 0,607, 0,477, 0,475, 0,479 pro entsprechende Kategorie zwischen den 3 operativen Techniken (Abb.10.18.). Umgekehrt gab es auch keinen statistisch signifikanten Unterschied bei einem  $\chi^2$  p-Wert = 0,416, 0,499, 0,624 pro entsprechende operative Methode zwischen den 4 Kategorien.

Der Mittelwert des Mart/MELAN1-Gens lag vor der 1. Operation bei 0.000038112834 ( $\pm 0.0002758720630$ ) pg/ $\mu$ l und danach bei 0.000082926135 ( $\pm 0.0005383897758$ ) pg/ $\mu$ l. Die Wilcoxon Analyse und der Sign Test für nichtparametrische Werte wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den 2 Mittelwerten nach, Wilcoxon Test Asymp. Sig (2-tailed) 0,313, Sign Test Exact Sig. (2-tailed) 0,215.

Nachstehend die Zusammenfassung der Schwankung des kombinierten PCR-Ergebnisses während der 1. Operation:

„T-M“ vor und nach 1. OP	Clip	Applikator	Enukleation	p-value $\chi^2$
	(total) 0.737			
Kat. 1 (- -)	88 (75.9%)	32 (80.0%)	11 (68.8%)	0.665
Kat. 2 (- +)	15 (12.9%)	3 (7.5%)	3 (18.8%)	0.467
Kat. 3 (+ -)	10 (8.6%)	5 (12,5%)	2 (12.5%)	0.727
Kat. 4 (+ +)	3 (2.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0.479
p-value $\chi^2$	0.536	0.509	0.759	

Tab. 10.6.

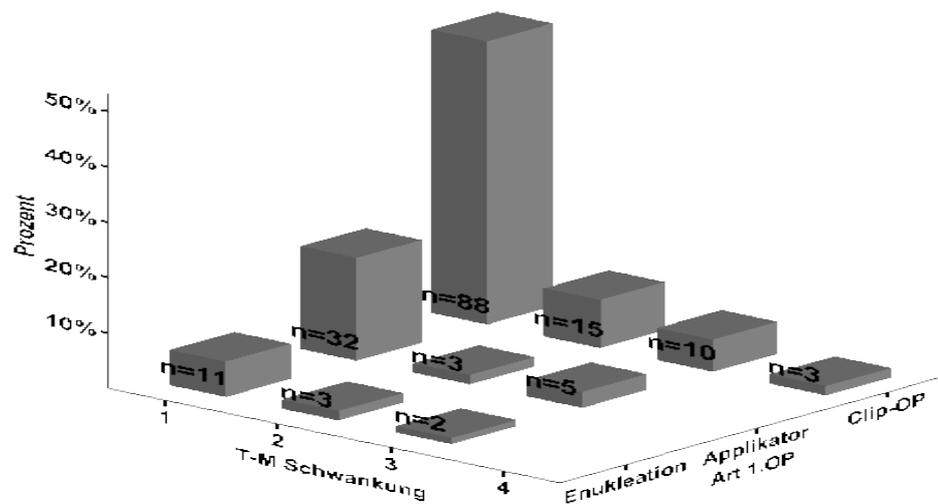


Abb. 10.19.: Patientenverteilung, pro Kategorie für T-M, pro 1. Operationsart, p-Wert 0,737

Nach der Pearson  $\chi^2$  Analyse gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied bei einem  $\chi^2$  p-Wert = 0,737 zwischen den 3 operativen Verfahren und für alle 4 Kategorien. Nach erneuter  $\chi^2$  Analyse - pro Kategorie - gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied bei einem  $\chi^2$  p-Wert = 0,665, 0,467, 0,727, 0,479 pro entsprechende Kategorie zwischen den 3 operativen Techniken (Abb. 10.19.). Umgekehrt gab es auch keinen statistisch signifikanten Unterschied bei einem  $\chi^2$  p-Wert = 0,536, 0,509, 0,759 pro entsprechende operative Methode zwischen den 4 Kategorien. Bei den 2 Patienten, bei denen eine sekundäre Enukleation durchgeführt wurde, fand keine Blutentnahme statt.

### 10.6.2. Einfluss der 2. Operation

Nachstehend die Zusammenfassung der Schwankung des Tyrosinase-Gens während der 2. Operation:

Tyrosinase vor und nach 2. OP	Endoresektion	transklereale Res.	p-value $\chi^2$	Fisher 2sided sig. p-value
				(total)0.537
Kat. 1 (- -)	26 (96.3%)	10 (100%)	0.537	1.000
Kat. 2 (- +)	0 (0%)	0 (0%)	///	///
Kat. 3 (+ -)	1 (3.7%)	0 (0%)	0.537	1.000
Kat. 4 (+ +)	0 (0%)	0 (0%)	///	///
p-value $\chi^2$	0.537	0.537		
Fisher 2sided sig. p-value	1.000	1.000		

Tab. 10.7.

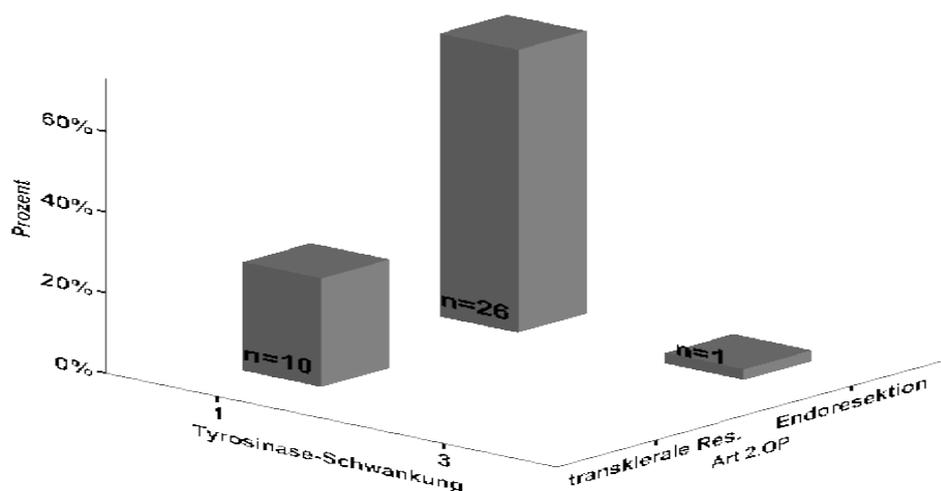


Abb. 10.20.: Patientenverteilung, pro Kategorie für Tyrosinase, pro Operationsart, p-Wert 0,537

Die obige Tabelle gehört zur Kategorie 2x2 und in diesem Fall wurde sowohl die Pearson  $\chi^2$  Analyse, als auch die Fischer two-sided Analyse durchgeführt. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied,  $\chi^2$  p- Wert 0,537, Fisher 2sided sig. p- Wert 1,000, zwischen den 2 Resektionsmethoden pro Kategorie und zwischen den 2 Kategorien pro operative Methode (Abb.10.20.). Der Mittelwert des Tyrosinase-Gens lag vor der 2. Operation bei 0.000000013650 ( $\pm 0.0000000863302$ ) pg/ $\mu$ l und danach bei 0.000000000 ( $\pm 0.000000000$ ) pg/ $\mu$ l. Die Wilcoxon

Analyse für nichtparametrische Werte hat einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den 2 Mittelwerten nachgewiesen, Wilcoxon Test Asymp. Sig (2-tailed) 0,317.

Nachstehend die Zusammenfassung der Schwankung des MelanA/Mart1-Gens während der 2. Operation:

MelanA/Mart1 vor und nach 2. OP	Endoresektion	transklere Res.	p-value $\chi^2$	Fisher 2sided sig. p-value
				(total) 0.321
Kat. 1 (- -)	19 (70.4%)	9 (90.0%)	0.216	0.393
Kat. 2 (- +)	5 (18.5%)	0 (0%)	0.143	0.295
Kat. 3 (+ -)	1 (3.7%)	1 (10%)	0.452	0.473
Kat. 4 (+ +)	2 (7.4%)	0 (0%)	0.376	1.000
p-value $\chi^2$	0.321	0.321		
Fisher 2sided sig. p-value				

Tab. 10.8.

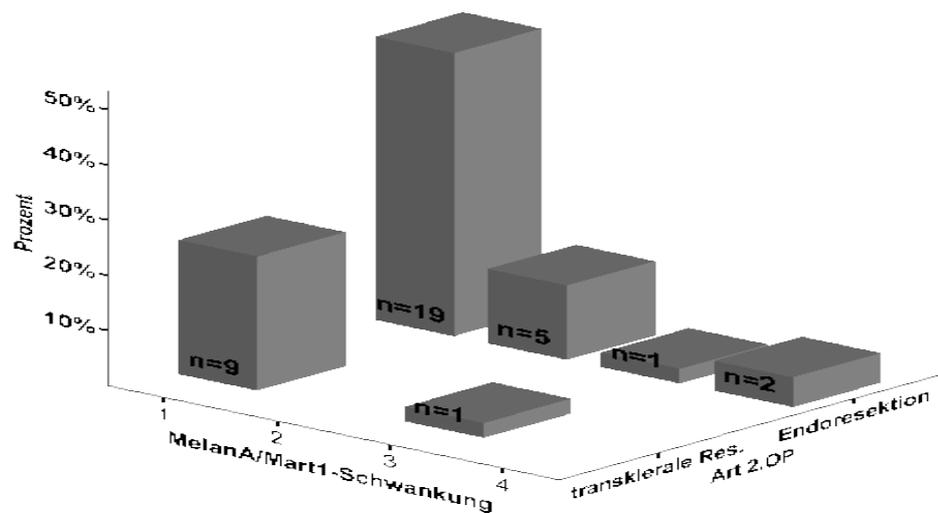


Abb. 10.21.: Patientenverteilung, pro Kategorie für MelanA/Mart1, pro Operation, p-Wert 0,321

Nach der Pearson  $\chi^2$  Analyse gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied bei einem  $\chi^2$  p-Wert = 0,321 zwischen den 2 operativen Verfahren und für alle 4 Kategorien (Abb. 10.21.). Nach erneuter  $\chi^2$  Analyse - pro Kategorie - gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied bei einem  $\chi^2$  p- Wert =0,216, 0,143, 0,452, 0,376 und Fisher 2sided sig. p- Wert 0,393, 0,295, 0,473, 1,000 pro entsprechende Kategorie zwischen den 2 operativen Techniken. Umgekehrt

gab es auch keinen statistisch signifikanten Unterschied bei einem  $\chi^2$  p- Wert = 0,321, 0,321 pro entsprechende operative Methode zwischen den 4 Kategorien.

Der Mittelwert des MelanA/Mart1-Gens lag bei 0.000047571423 ( $\pm 0.0001894687861$ ) pg/ $\mu$ l vor der 2. Operation und bei 0.000072956535 ( $\pm 0.0002835864329$ ) pg/ $\mu$ l. danach. Die Wilcoxon Analyse und der Sign Test für nichtparametrische Werte haben keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den 2 Mittelwerten nachgewiesen, Wilcoxon Test Asymp. Sig (2-tailed) 0,3497 Sign Test Exact Sig. (2-tailed) 0,774.

Nachstehend die Zusammenfassung der Schwankung des kombinierten PCR-Ergebnisses während der 2. Operation:

„T-M“ vor und nach 2. OP	Endoresektion	transklereale Res.	p-value $\chi^2$	Fisher 2sided sig. p-value
			(total)0.362	
Kat. 1 (- -)	18 (66.7%)	9 (90.0%)	0.156	0.229
Kat. 2 (- +)	5 (18.5%)	0 (0%)	0.143	0.295
Kat. 3 (+ -)	2 (7.4%)	1 (10.0%)	0.798	1.000
Kat. 4 (+ +)	2 (7.4%)	0 (0%)	0.376	1.000
p-value $\chi^2$	0.362	0.362		
Fisher 2sided sig. p-value				

Tab. 10.9.

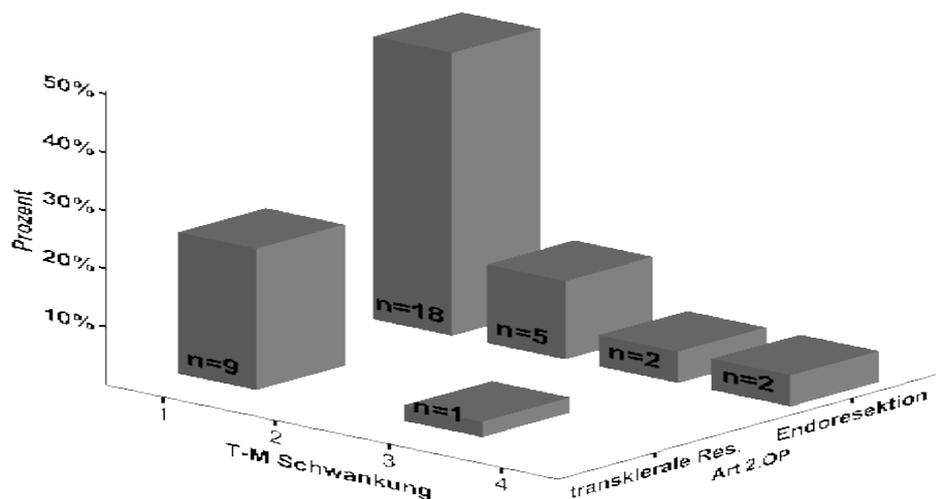


Abb. 10.22.: Patientenverteilung, pro Kategorie für T-M, pro Operationsart, p-Wert 0,362

Nach der Pearson  $\chi^2$  Analyse gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied bei einem  $\chi^2$  p- Wert = 0,362 zwischen den 2 operativen Verfahren und für alle 4 Kategorien (Abb. 10.22.).

Nach erneuter  $\chi^2$  Analyse - pro Kategorie - gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied bei einem  $\chi^2$  p- Wert = 0,156, 0,143, 0,798, 0,376 und Fischer 2sided sig. p- Wert 0,229, 0,295, 1,000, 1,000 pro entsprechende Kategorie zwischen den 2 operativen Techniken. Umgekehrt gab es auch keinen statistisch signifikanten Unterschied bei einem  $\chi^2$  p- Wert = 0,362 und 0,362 pro entsprechende operative Methode zwischen den 4 Kategorien.

### 10.7. Aderhautmelanometastasen

3 Jahre nach dem Beginn der Erarbeitung dieser Dissertation gab es dokumentierte Daten für 199 Patienten. 22 Patienten entwickelten in diesem Zeitraum eine Aderhautmelanometastase (Abb. 10.23). Der Zeitpunkt der Metastase war frühestens nach ca. 1 Woche (bei diesem Fall wurde die Metastase praktisch gleichzeitig mit dem primären Tumor entdeckt) und spätestens nach 30,38 Monaten, im Durchschnitt nach 14,83 ( $\pm 8,74$ ) Monaten. Bei der Überlebensanalyse betrug der Anteil der metastasefreien Patienten nach 30 Monaten (durchschnittliche Analysezeit 2,5 Jahre) 89,1%. Das bedeutet, dass sich bei 10,8% der Patienten im gleichen Zeitraum eine Metastase entwickelte.

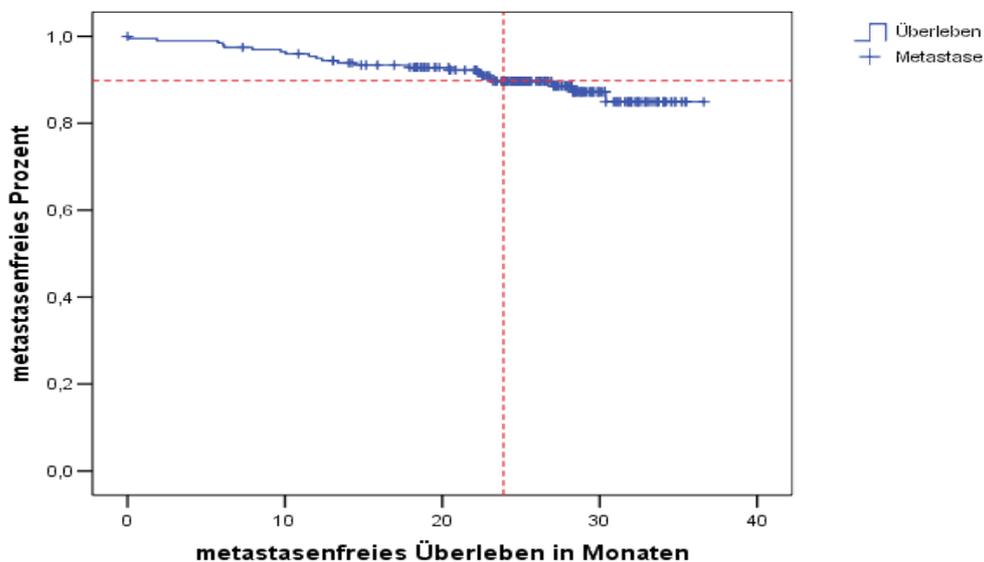


Abb. 10.23.: Metastasenwahrscheinlichkeit nach Kaplan Meier

### 10.7.1. Metastasen und Patientengruppen

Unterschiede zwischen Patientengruppen ohne und mit Metastase:

Die Patienten wurden in 2 Gruppen eingeteilt: die erste Gruppe mit 177 (88,9%) Patienten ohne zumindest eine bekannte Metastase in den ersten 30 Monaten und die zweite Gruppe mit 22 (11.1%) Patienten mit einer bestätigten Metastase in dem gleichen Zeitraum.

Mittels Log-Rank Analyse (Abbildung durch Kaplan-Meier Graph), Pearson  $\chi^2$  Analyse, Fischer Analyse und U-Mann-Whitney Analyse, wurden folgende Einflussfaktoren eingebracht: Diagnosealter, Geschlecht, Tumorprominenz, max. Tumorbasis, Ziliarkörperinfiltration, Art der ersten Operation, Art der zweiten Operation, positives oder negatives PCR für das Tyrosinase-Gen, das MelanA/Mart1-Gen, den kombinierten Parameter „T-M“ für jede Blutentnahme, Schwankung des PCR-Ergebnisses zwischen 2 Zeitpunkten.

<b>Log Rank</b>	<b>p-Wert</b>
Alter am Diagnosentag	0,644
Geschlecht	<b>0,031</b>
Prominenz	<b>0,036</b>
maximale Basis	<b>0,004</b>
Ziliarkörpersinfiltration	0,088
Art der 1.OP	0,375
Art der 2.OP	0,465

Tab 10.10.

Das Durchschnittsalter lag bei diagnostizierten Patienten ohne Metastase bei 61,6351 ( $\pm 13,71771$ ) Jahren und bei Patienten mit Metastase bei 59,4758 ( $\pm 13,47117$ ), U-Mann-Whitney p-Wert 0,414 (Abb. 10.24). Nach erneuter Analyse der Subpopulationen mit und ohne Metastase (1. Gruppe bis 62 Jahre alt und 2. Gruppe älter als 62) war der p-Wert für die  $\chi^2$  0,564, für die Fischer 2-signed 0,653 und für die Log-Rank 0,644, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose. (12/96, 10/101 in den 30 Monaten)

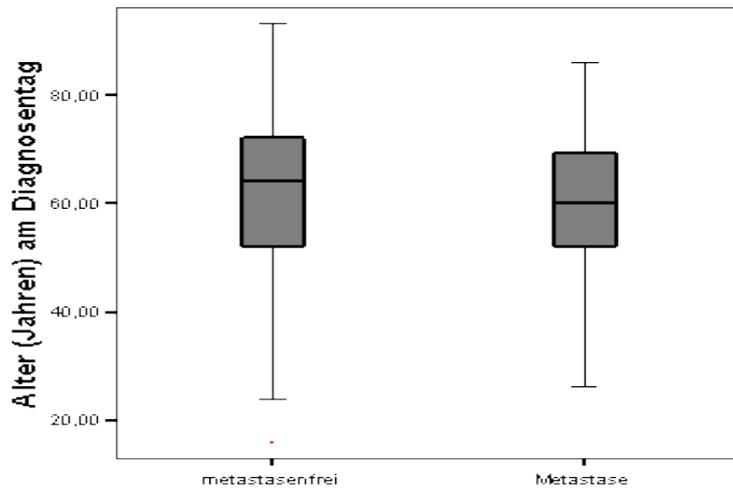


Abb. 10.24.: Altersverteilung der Patienten mit/ohne Metastase p-Wert 0,414

15 von 90 Männern und 7 von 109 Frauen hatten eine Metastase. Der p-Wert für die  $\chi^2$  Analyse war 0,022 (Abb. 10.25.), für die Fischer 2-signed 0,021 und für die Log-Rank Analyse war er 0,031 (Abb. 10.26), und damit gab es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose. (15/90, 7/109 in 30 Monaten)

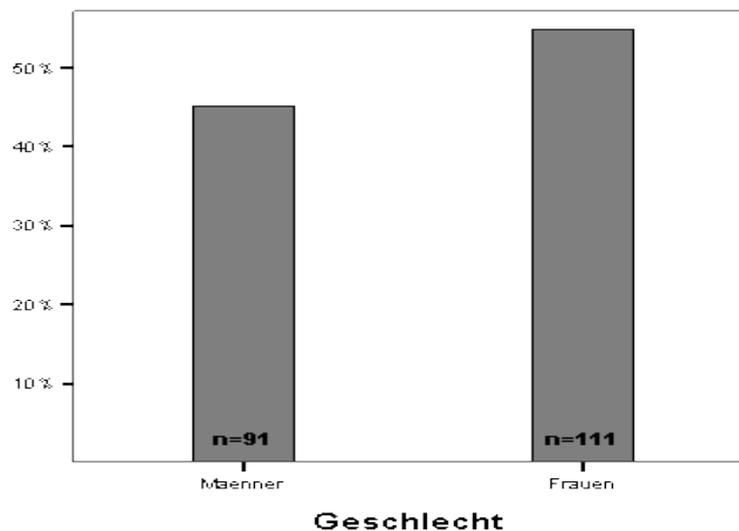


Abb. 10.25.: Geschlechtsverteilung der Patienten mit/ohne Metastase, p-Wert 0,022

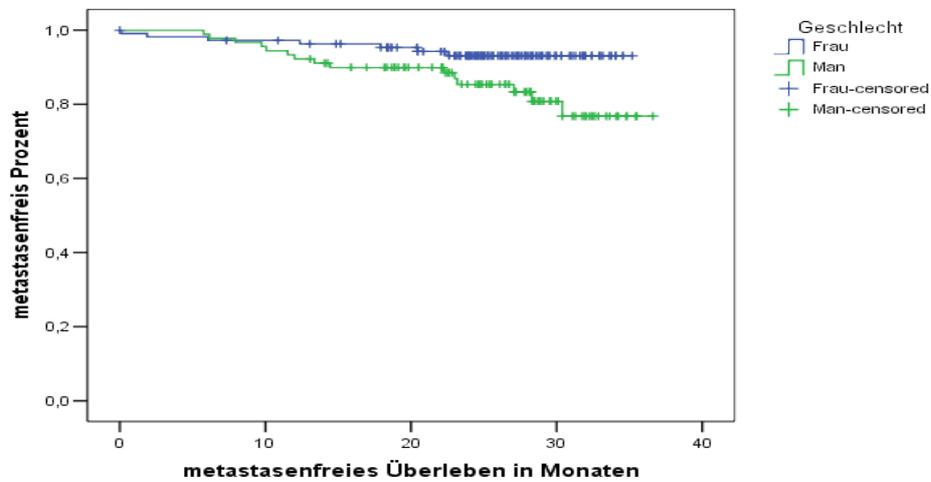


Abb. 10.26.: Metastasenwahrscheinlichkeit nach Geschlecht, **p-Wert 0,031**

Die durchschnittliche Prominenz des Tumors lag bei der Diagnose der Patientengruppe ohne Metastase bei 5,5659 ( $\pm 3,29343$ ) mm und bei Patienten mit Metastase bei 7,1114 ( $\pm 3,66991$ ) mm, (U-Mann-Whitney p-Wert 0,049) (Abb. 10.27.). Nach erneuter Analyse der Subpopulationen (Gruppe 1  $\leq 3,5$ mm,  $3,5$ mm < Gruppe 2  $\leq 7$ mm,  $7$ mm < Gruppe 3) war der p-Wert für die  $\chi^2$  Analyse 0,097, für die Fischer 2-signed Analyse der 1. Gruppe 0,150, der 2. Gruppe 0,816 und der 3. Gruppe 0,052. Der p-Wert der Log-Rank Analyse war für die entsprechenden Kategorien 0,036 (Abb.10.28.), und damit gab es einen statistisch signifikanten Unterschied. (4/67, 7/70, 11/62).

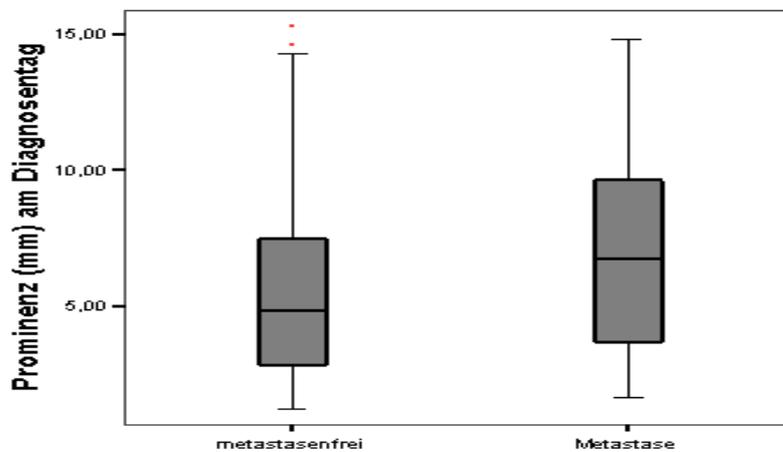


Abb.10.27.: Verteilung der Prominenz der Patienten mit/ohne Metastase, **p-Wert 0,049**

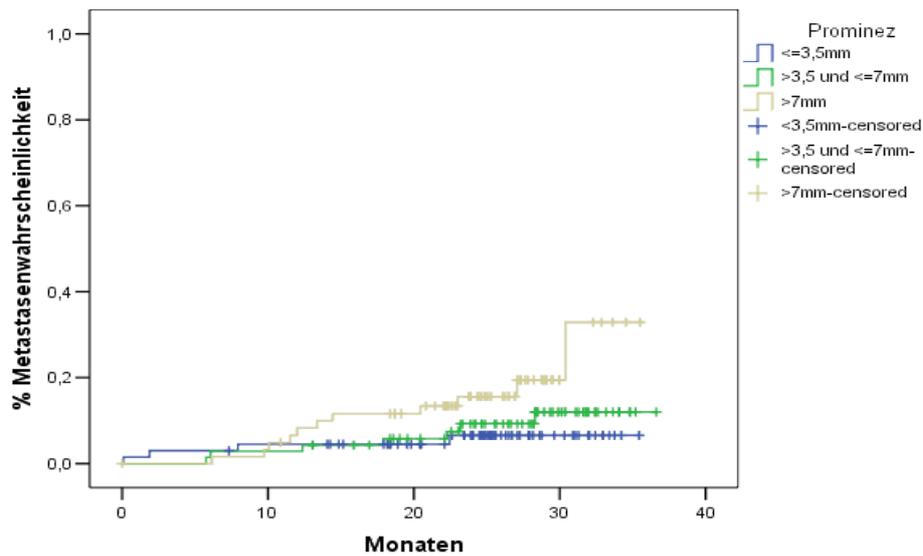


Abb. 10.28.: Metastasenwahrscheinlichkeit nach Prominez, **p-Wert 0,036**

Die mittlere maximale Basis des Tumors lag bei der Diagnose der Patienten ohne Metastase bei 11,3886 ( $\pm 3,84610$ ) mm und mit Metastase bei 14,0723 ( $\pm 4,05987$ ) mm, (U-Mann-Whitney p-Wert 0,002) (Abb. 10.29.). Nach erneuter Analyse der Subpopulationen (Gruppe 1  $\leq 8$ mm,  $8\text{mm} <$  Gruppe 2  $\leq 14$ mm,  $14\text{mm} <$  Gruppe 3) war der p-Wert für die  $\chi^2$  Analyse 0,002, für die Fischer 2-signed Analyse der 1. Gruppe war er 0,577, der 2. Gruppe 0,012, der 3. Gruppe 0,001 und der Log-Rank 0,004 (Abb. 10.30.), und damit gab es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose. (3/41 7,5%, 5/97 5,2%, 14/61 23%).

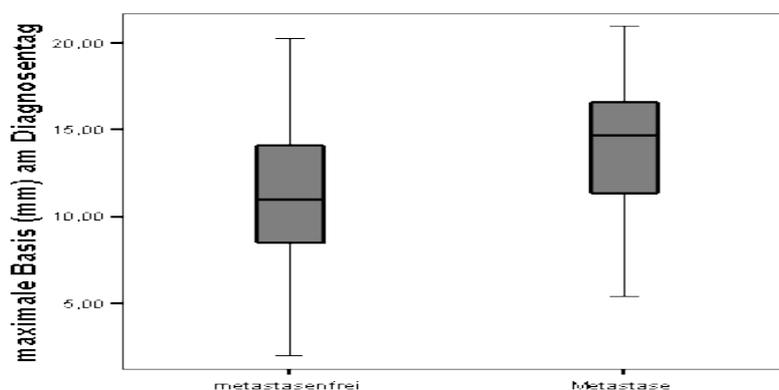


Abb. 10.29.: Verteilung der max. Basis der Patienten mit/ohne Metastase, **p-Wert 0,002**

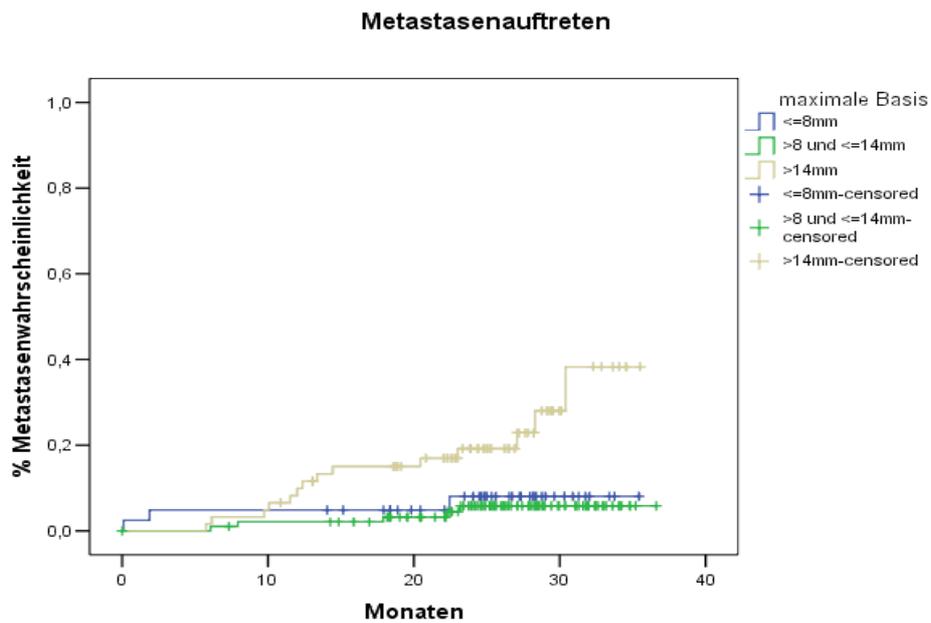


Abb. 10.30.: Metastasenwahrscheinlichkeit nach max. Basis, **p-Wert 0,004**

Das mittlere Tumolvolumen lag bei der Diagnose der Patienten ohne Metastase bei 622,5811 ( $\pm 578,69307$ ) mm<sup>3</sup> und mit Metastase bei 936,3500 ( $\pm 736,38398$ ) mm<sup>3</sup>, U-Mann-Whitney p-Wert 0,113 (Abb.10.31.), und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose.

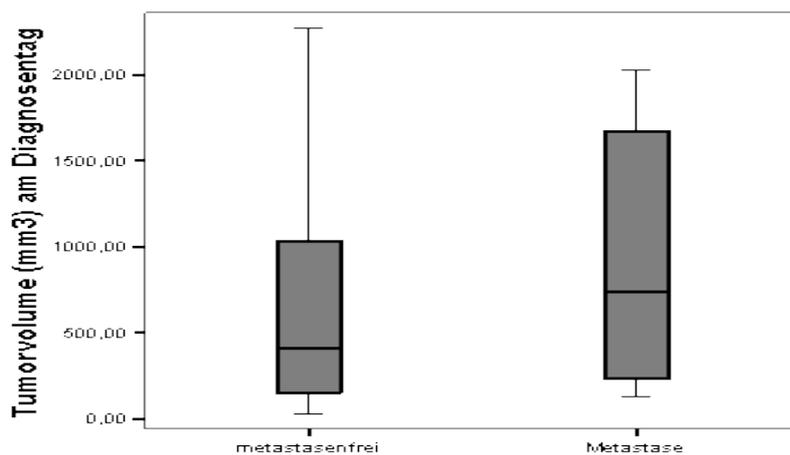


Abb. 10.31.: Verteilung der Tumolvolumen der Patienten mit/ohne Metastase, p-Wert 0,113

Der Ziliarkörper war bei 167 Patienten nicht infiltriert und bei 32 infiltriert. Eine Metastase wurde bei 16 Patienten ohne Ziliarkörperinfiltration und bei 6 Patienten mit Ziliarkörperinfiltration diagnostiziert. Der p-Wert für die  $\chi^2$  Analyse war 0,130, für die Fischer 2-signed 0,133 und für die Log-Rank Analyse war er 0,088 (Abb. 10.32.), und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose. (16/67 9,6%, 6/32 18,7%).

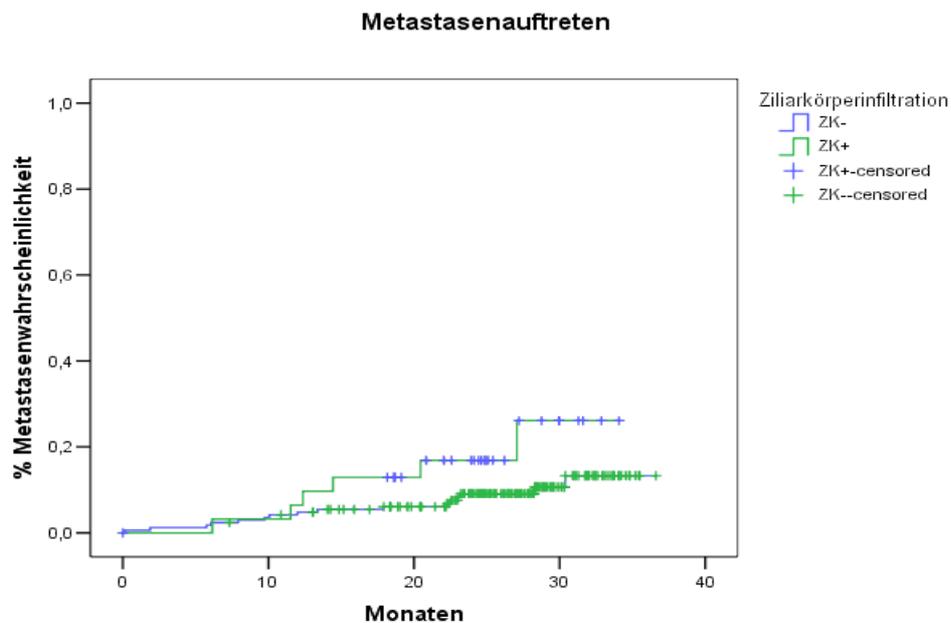


Abb. 10.32.: Metastasenwahrscheinlichkeit nach Ziliarkörperinfiltration, p-Wert 0,088

Die Art der ersten Operation spielte statisch keine signifikante Rolle in der Metastasierung. Der p-Wert für die  $\chi^2$  Analyse war 0,114, für die Fischer 2-signed und insbesondere für die Clip-OP war er 0,100, für die Applikator-OP 0,298, für die Enukleation 0,101 und für die Log-Rank Analyse 0,375 (Abb.10.33.). (14/128 10,9%, 3/47 6,4%, 4/17 23,5%).

Die Art der zweiten Operation spielte statisch auch keine signifikante Rolle bei der Metastasierung. Der p-Wert für die  $\chi^2$  Analyse war 0,736, für die Fischer 2-signed und insbesondere für die Endoresektion war er 0,755, für die transsklerale Tumorsektion 0,305, für die Enukleation 1,000 und für die Log-Rank 0,465 (Abb. 10.34.). (16/156 10,3%, 4/31 12,9%, 2/10 20%).

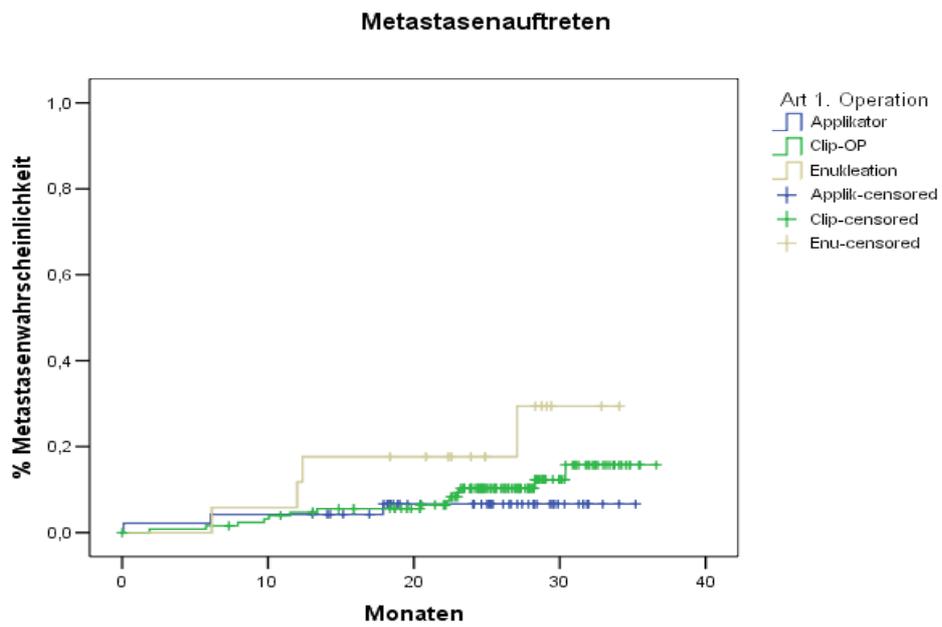


Abb. 10.33.: Metastasenwahrscheinlichkeit bezüglich der Art 1.Operation, p-Wert 0,375

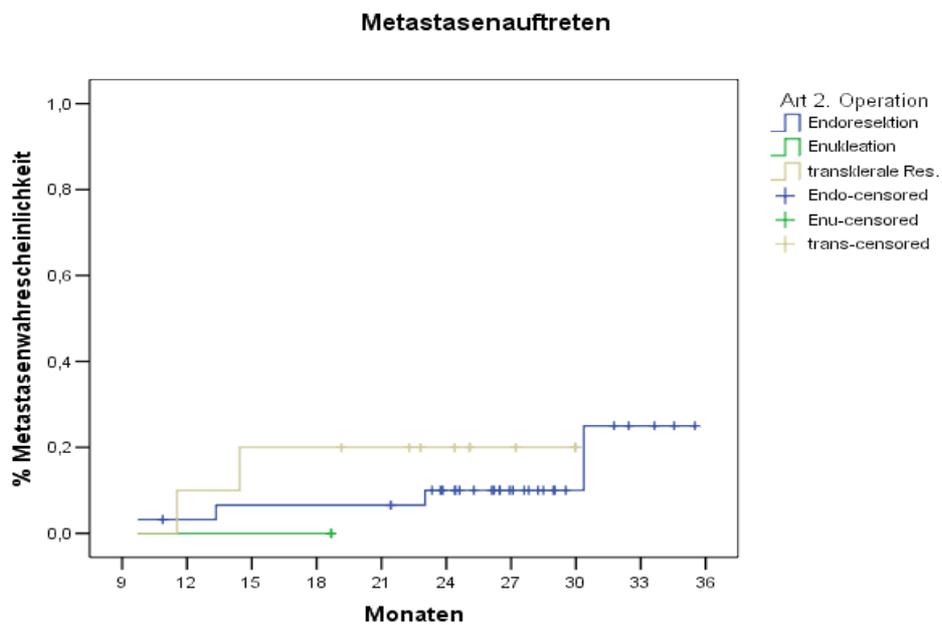


Abb. 10.34.: Metastasenwahrscheinlichkeit bezüglich der Art 2.Operation, p-Wert 0,465

### 10.7.2. Metastasen und PCR-Ergebnis

Das PCR-Ergebnis der Blutentnahme vor der ersten Operation:

Eine Metastase trat bei 18 von 180 negativen (10%) und bei 0 von 2 positiven Patienten (0%) für das Tyrosinase-Gen auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,678, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.35.).

Eine Metastase trat bei 14 von 162 negativen (8,6%) und bei 4 von 20 positiven Patienten (20%) für das MelanA/Mart1 auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,112, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.36.).

Eine Metastase trat bei 14 von 160 negativen (8,7%) und bei 4 von 22 positiven Patienten (18,2%) für den kombinierten Parameter „T-M“ auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,159, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.37.).

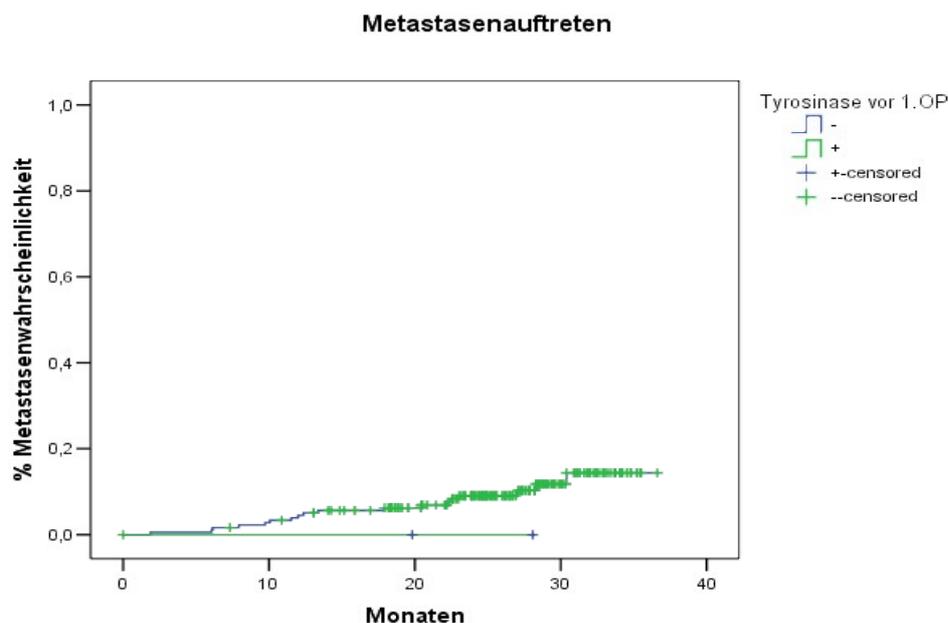


Abb. 10.35.: Metastasenwahrscheinlichkeit bezüglich des RT-PCR Ergebnisses für Tyrosinase, 1. Blutentnahme, p-Wert 0,678

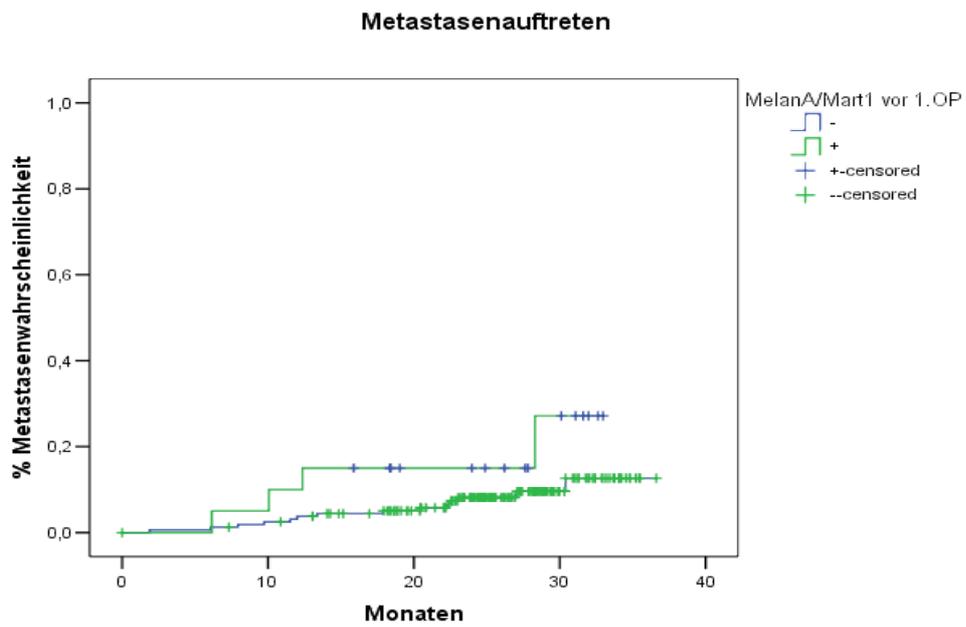


Abb. 10.36.: Metastasenwahrscheinlichkeit bezüglich des RT-PCR Ergebnisses für MelanA/Mart1, 1. Blutentnahme, p-Wert 0,112

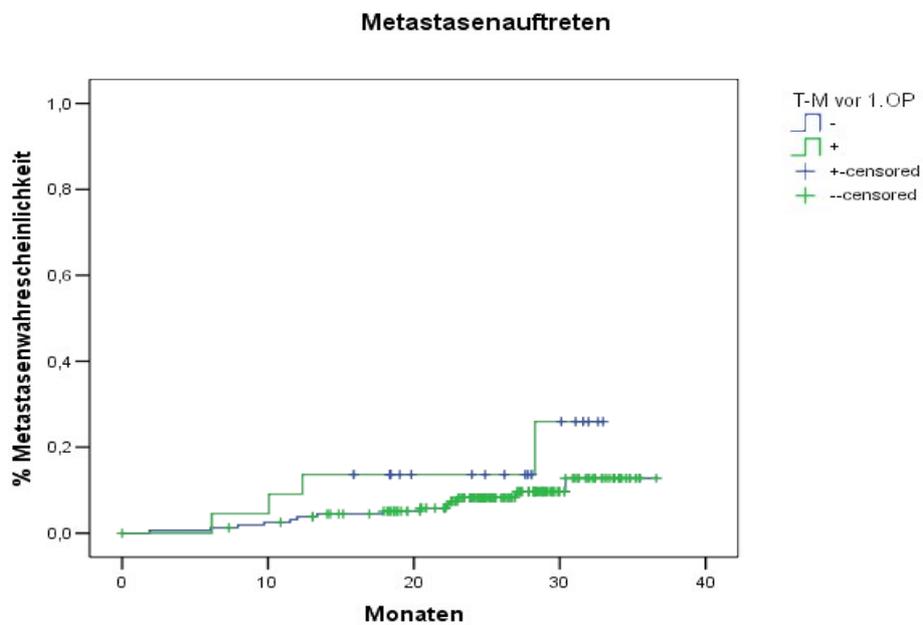


Abb. 10.37.: Metastasenwahrscheinlichkeit bezüglich des RT-PCR Ergebnisses für T-M, 1. Blutentnahme, p-Wert 0,159

Das PCR-Ergebnis der Blutentnahme nach der ersten Operation

Eine Metastase trat bei 18 von 174 negativen (10,3%) und bei 1 von 4 positiven (25%) Patienten für das Tyrosinase-Gen auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,306, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.38.).

Eine Metastase trat bei 12 von 153 negativen (7,8%) und bei 7 von 25 positiven (28%) Patienten für das MelanA/Mart1-Gen auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,007, und damit gab es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.39.).

Eine Metastase trat bei 12 von 151 negativen (7,9%) und bei 7 von 27 positiven (25,9%) Patienten für den kombinierten Parameter „T-M“ auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,012, und damit gab es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb.10.40).

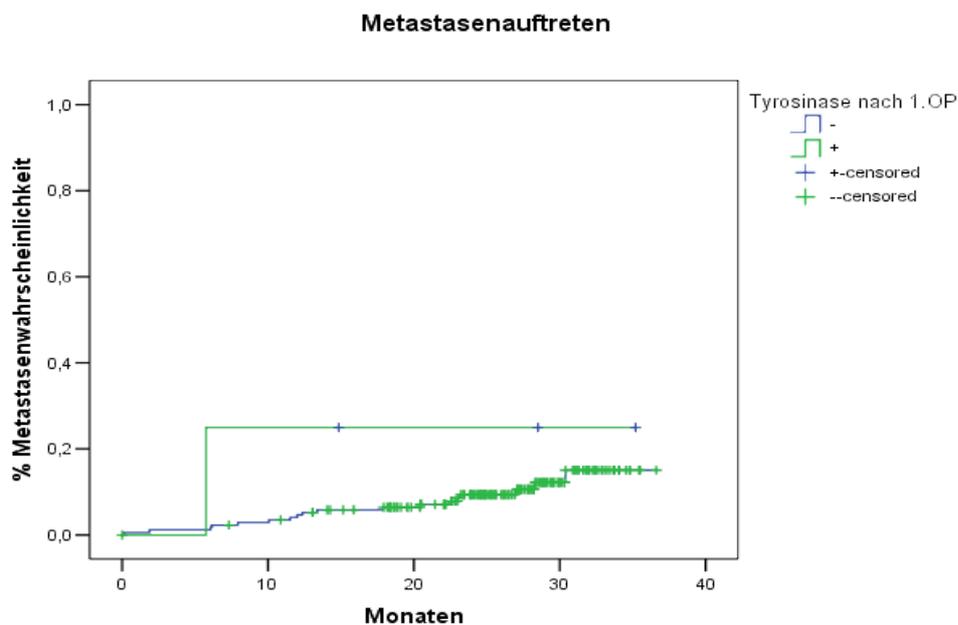


Abb. 10.38.: Metastasenwahrscheinlichkeit bezüglich des RT-PCR Ergebnisses für Tyrosinase, 2. Blutentnahme, p-Wert 0,306

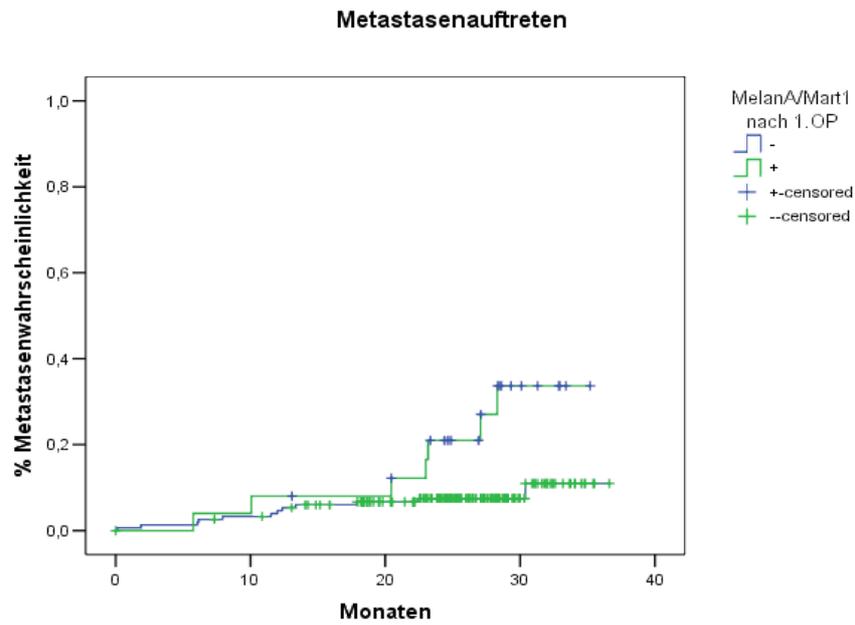


Abb. 10.39.: Metastasenwahrscheinlichkeit bezüglich des RT-PCR Ergebnisses für MelanA/Mart1, 2. Blutentnahme, **p-Wert 0,007**

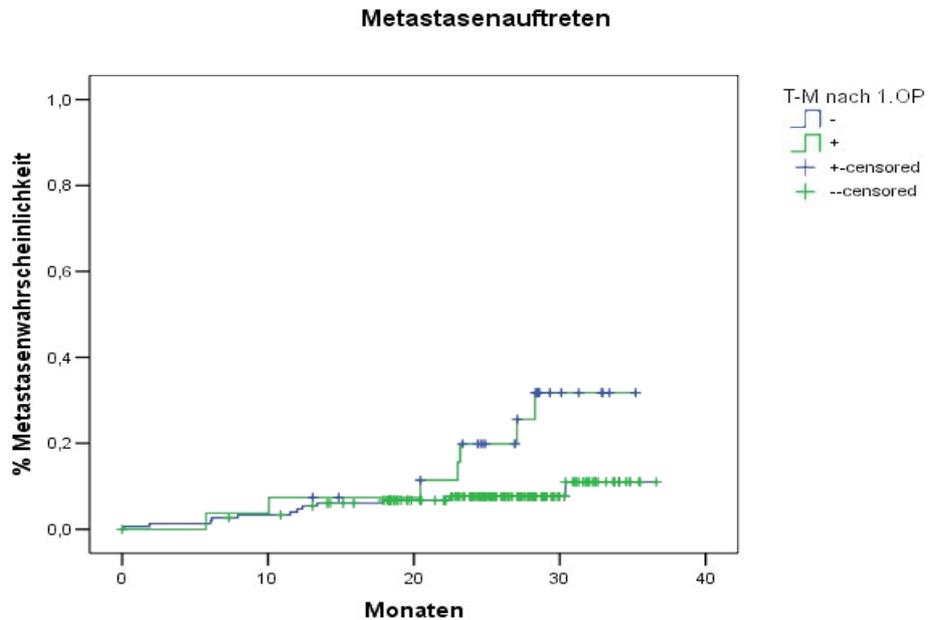


Abb. 10.40.: Metastasenwahrscheinlichkeit bezüglich des RT-PCR Ergebnisses für T-M, 2. Blutentnahme, **p-Wert 0,012**

Das PCR-Ergebnis der Blutentnahme vor der zweiten Operation:

Eine Metastase trat bei 6 von 38 negativen (15,8%) und bei 0 von 1 positiven (0%) Patienten für das Tyrosinase-Gen auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,702, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose.

Eine Metastase trat bei 5 von 36 negativen (13,9%) und bei 1 von 3 positiven (33,3%) für das MelanA/Mart1-Gen Patienten auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,275, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose.

Eine Metastase trat bei 5 von 35 negativen (14,3%) und bei 1 von 4 positiven (25%) Patienten für den kombinierten Parameter „T-M“ auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,466, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose.

Das PCR-Ergebnis der Blutentnahme nach der zweiten Operation:

Eine Metastase trat bei 6 von 39 negativen (15,4%) Patienten auf. Es gab keine positiven Patienten bei dieser Blutentnahme, und deswegen war eine Log-Rank Analyse nicht möglich.

Eine Metastase trat bei 6 von 33 negativen (18,2%) und bei 0 von 6 positiven (0%) Patienten für das MelanA/Mart1/MART1-Gen auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,256, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose.

Eine Metastase trat bei 6 von 33 negativen (18,2%) und bei 0 von 6 positiven (0%) Patienten für den kombinierten Parameter „T-M“ auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,256, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose.

Das PCR-Ergebnis der Blutentnahme beim ersten Follow up:

Eine Metastase trat bei 15 von 156 negativen (9,6%) und bei 1 von 3 positiven (33,3%) Patienten für das Tyrosinase-Gen auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,107, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb 10.41.).

Eine Metastase trat bei 12 von 141 negativen (8,5%) und bei 4 von 18 positiven (22,2%) Patienten für das MelanA/Mart1-Gen auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,050, und damit gab es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.42.).

Eine Metastase trat bei 12 von 139 negativen (8,6%) und bei 4 von 20 positiven (20%) Patienten für den kombinierten Parameter „T-M“ auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,91, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.43.).

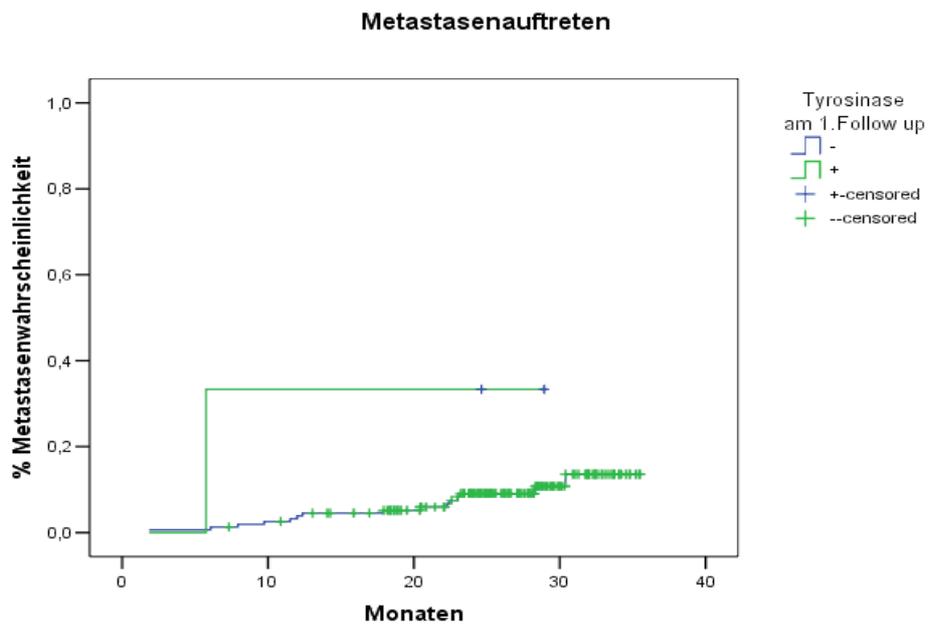


Abb. 10.41.: Metastasenwahrscheinlichkeit bezüglich des RT-PCR Ergebnisses für Tyrosinase, 5. Blutentnahme, p-Wert 0,107

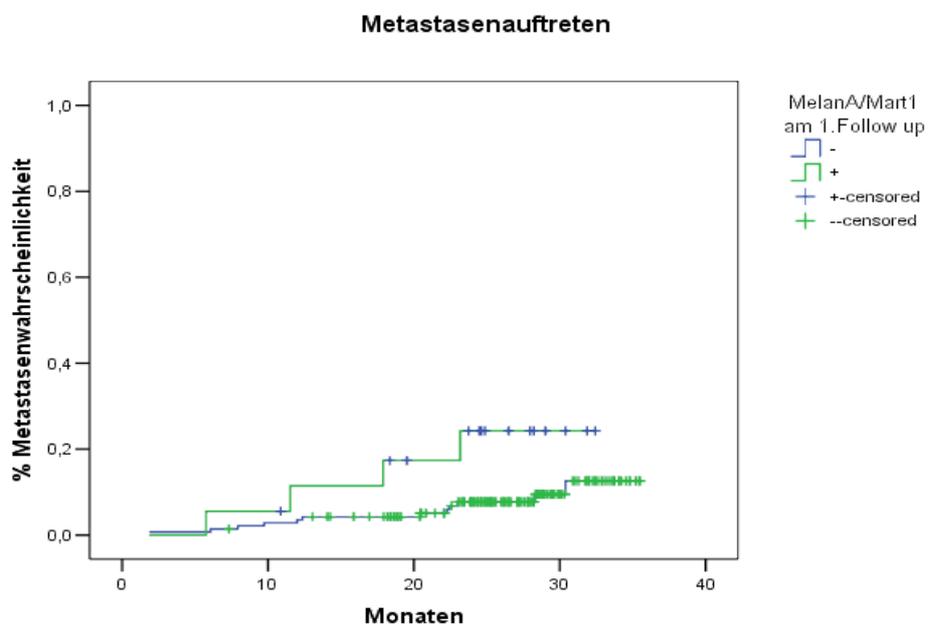


Abb. 10.42.: Metastasenwahrscheinlichkeit bezüglich des RT-PCR Ergebnisses für MelanA/Mart1, 5. Blutentnahme, **p-Wert 0,050**

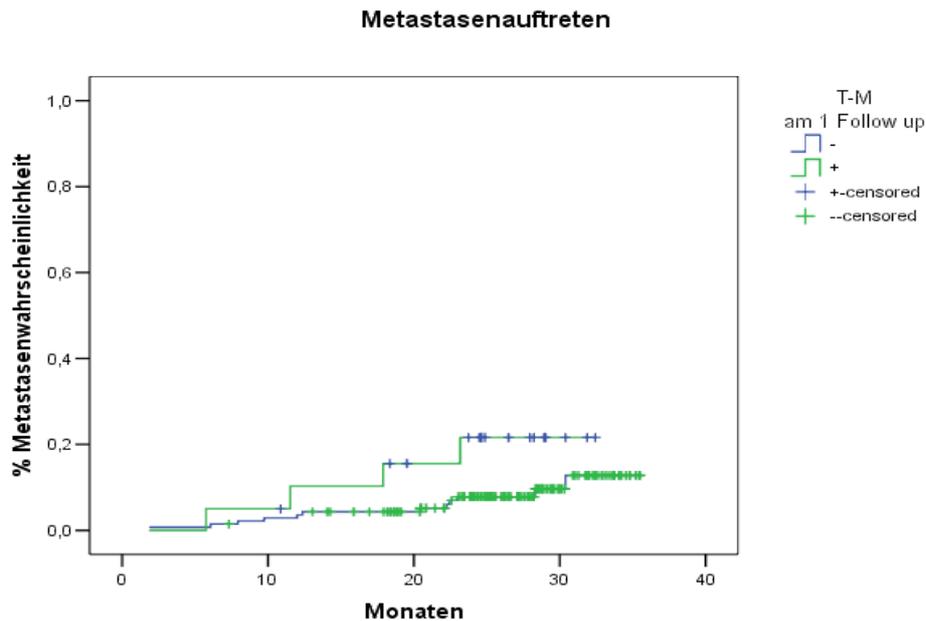


Abb. 10.43.: Metastasenwahrscheinlichkeit bezüglich des RT-PCR Ergebnisses für T-M, 5. Blutentnahme, p-Wert 0,91

Das PCR-Ergebnis der Blutentnahme beim zweiten Follow up:

Eine Metastase trat bei 9 von 113 negativen (8%) und bei 0 von 2 positiven (0%) Patienten für das Tyrosinase-Gen auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,655, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.44.).

Eine Metastase trat bei 6 von 100 negativen (6%) und bei 3 von 15 positiven (20%) Patienten für das MelanA/Mart1-Gen auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,109, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.45.).

Eine Metastase trat bei 6 von 99 negativen (6,1%) und bei 3 von 16 positiven (18,7%) Patienten für den kombinierten Parameter „T-M“ auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,142, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.46.).

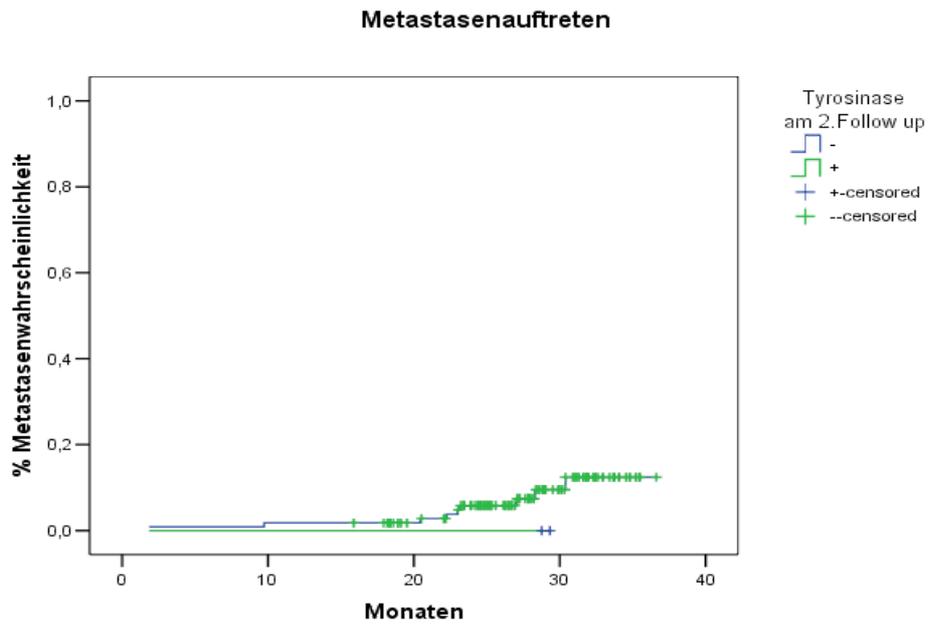


Abb. 10.44.: Metastasenwahrscheinlichkeit bezüglich des RT-PCR Ergebnisses für Tyrosinase, 6. Blutentnahme, p-Wert 0,655

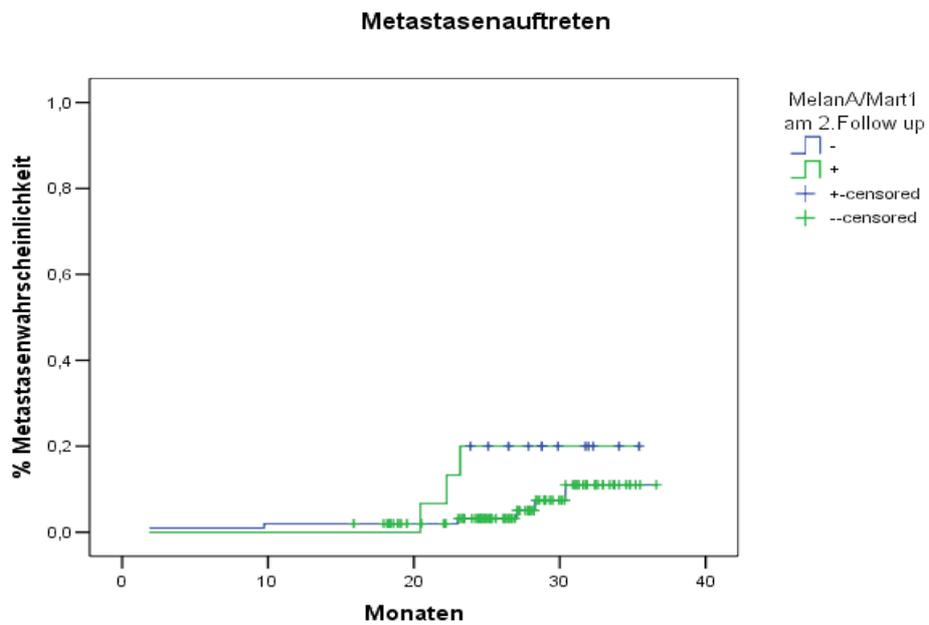


Abb. 10.45.: Metastasenwahrscheinlichkeit bezüglich des RT-PCR Ergebnisses für MelanA/Mart1, 6. Blutentnahme, p-Wert 0,109

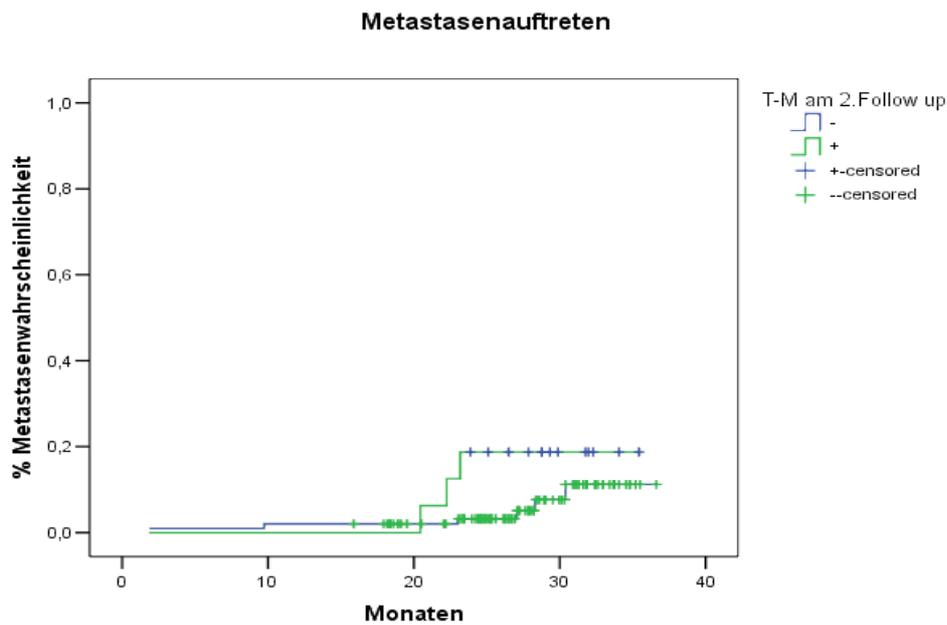


Abb. 10.46.: Metastasenwahrscheinlichkeit bezüglich des RT-PCR Ergebnisses für T-M, 6. Blutentnahme, p-Wert 0,142

Log-Rank für RT-PCR	Tyrosinase	MelanA/Mart1	T-M
	p-Wert		
vor 1.OP	0,678	0,112	0,159
nach 1.OP	0,306	<b>0,007</b>	<b>0,012</b>
vor 2.OP	0,702	0,275	0,466
nach 2.OP	----	0,256	0,256
am 1.Follow up	0,107	<b>0,05</b>	0,091
am 2.Follow up	0,656	0,109	0,142

Tab 10.11.

### 10.7.3. Metastasen und Schwankung des PCR-Ergebnisses

Die Schwankung des PCR-Ergebnisses der Blutentnahme vor und nach der ersten Operation:

Die erste Einteilung betrifft das Tyrosinase-Gen:

Eine Metastase trat bei 16 von 165 (9,7%) Patienten der ersten Kategorie (- -), bei 0 von 3 (0%) Patienten der zweiten Kategorie (- +), bei 0 von 2 (0%) Patienten der dritten Kategorie (+ -) und bei 0 von 0 Patienten der vierten Kategorie (+ +), für das Tyrosinase-Gen auf. Der p-Wert für die

Log-Rank Analyse war 0,507, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose.

Die zweite Einteilung betrifft das MelanA/Mart1-Gen:

Eine Metastase trat bei 9 von 133 (6,8%) Patienten der ersten Kategorie (- -), bei 3 von 19 (15,8%) Patienten der zweiten Kategorie (- +), bei 2 von 15 (13,3%) Patienten der dritten Kategorie (+ -) und bei 2 von 3 (66,7%) Patienten der vierten Kategorie (+ +) für das MelanA/Mart1-Gen auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,008, und damit gab es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.47.).

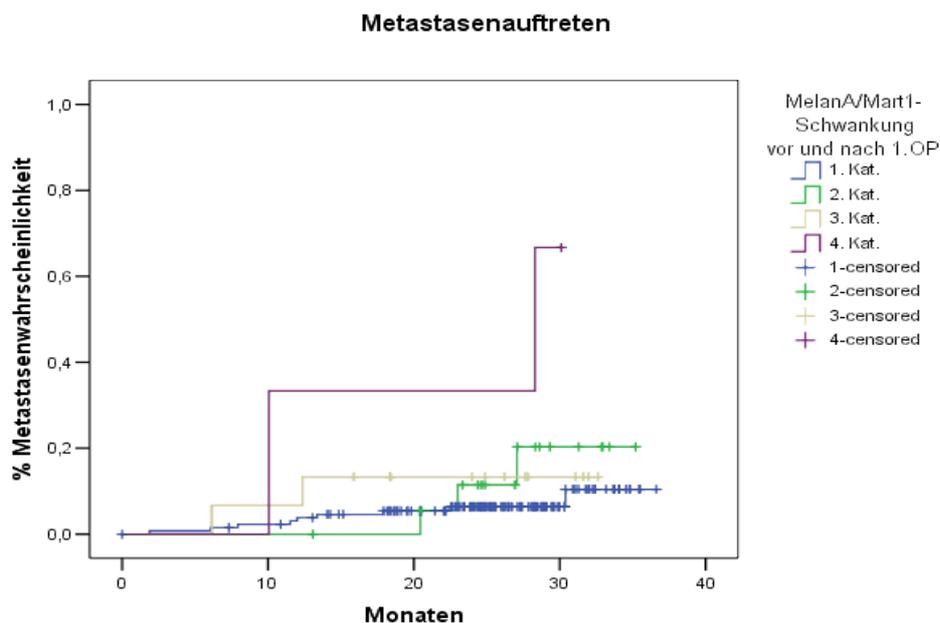


Abb. 10.47.: Kaplan Meier bezüglich der MelanA/Mart1 Schwankung zwischen 1 und 2. Blutentnahme, **p-Wert 0,008**

Die dritte Einteilung betrifft den kombinierten Parameter „T-M“:

Eine Metastase trat bei 9 von 129 (6,97%) Patienten der ersten Kategorie (- -), bei 3 von 21 (14,3%) Patienten der zweiten Kategorie (- +), bei 2 von 17 (11,8%) Patienten der dritten Kategorie (+ -) und bei 2 von 3 (66,7%) Patienten der vierten Kategorie (+ +) für den kombinierten Parameter „T-M“ Patienten auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,016, und damit gab es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.48.).

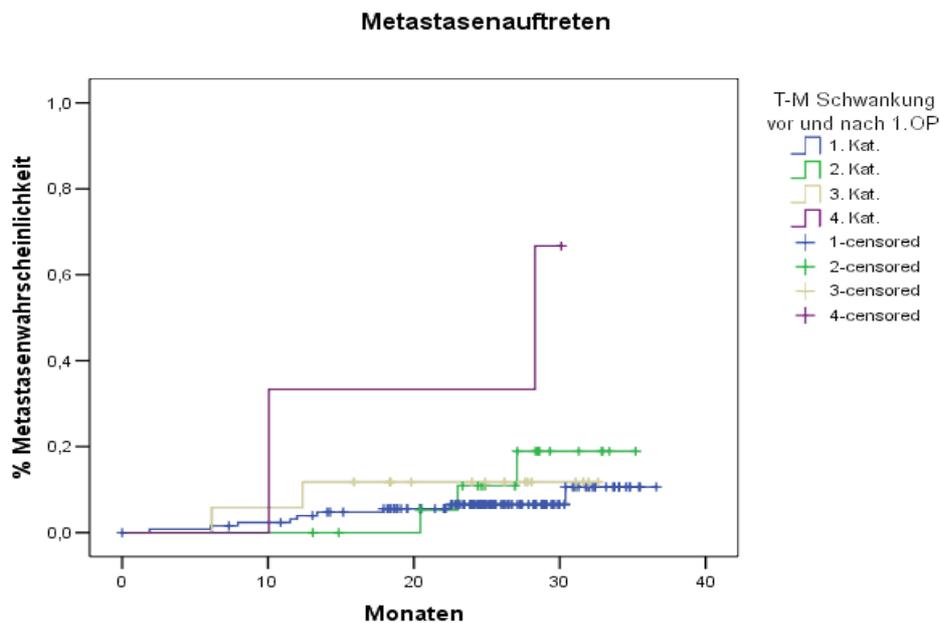


Abb. 10.48.: Kaplan Meier bezüglich der T-M Schwankung zwischen 1 und 2. Blutentnahme, **p-Wert 0,016**

Die Schwankung des PCR-Ergebnisses der Blutentnahme vor der ersten Operation und beim ersten Follow up Termin:

Die erste Einteilung betrifft das Tyrosinase-Gen:

Eine Metastase trat bei 14 von 143 (9,7%) Patienten der ersten Kategorie (- -), bei 0 von 2 (0%) Patienten der zweiten Kategorie (- +), bei 0 von 1 (0%) Patienten der dritten Kategorie (+ -) und bei 0 von 0 Patienten der vierten Kategorie (+ +) für das Tyrosinase-Gen Patienten auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,602, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose.

Die zweite Einteilung betrifft das MelanA/Mart1-Gen:

Eine Metastase trat bei 10 von 120 (8,3%) Patienten der ersten Kategorie (- -), bei 2 von 11 (18,2%) Patienten der zweiten Kategorie (- +), bei 2 von 14 (14,2%) Patienten der dritten Kategorie (+ -) und bei 0 von 1 (0%) Patienten der vierten Kategorie (+ +) für das MelanA/Mart1-Gen Patienten auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,318, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose.

Die dritte Einteilung betrifft den kombinierten Parameter „T-M“:

Eine Metastase trat bei 10 von 117 (8,5%) Patienten der ersten Kategorie (- -), bei 2 von 13 (15,4%) Patienten der zweiten Kategorie (- +), bei 2 von 15 (13,3%) Patienten der dritten Kategorie (+ -) und bei 0 von 1 (0%) Patienten der vierten Kategorie (+ +) für den kombinierten Parameter „T-M“ Patienten auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,421, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose.

Die Schwankung des PCR-Ergebnisses der Blutentnahme nach der ersten Operation und beim ersten Follow up Termin:

Die erste Einteilung betrifft das Tyrosinase-Gen:

Eine Metastase trat bei 13 von 139 (9,4%) Patienten der ersten Kategorie (- -), bei 0 von 2 (0%) Patienten der zweiten Kategorie (- +), bei 0 von 2 (0%) Patienten der dritten Kategorie (+ -) und bei 1 von 1 (100%) Patient der vierten Kategorie (+ +) für das Tyrosinase-Gen Patienten auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,055, und damit gab es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.49.).

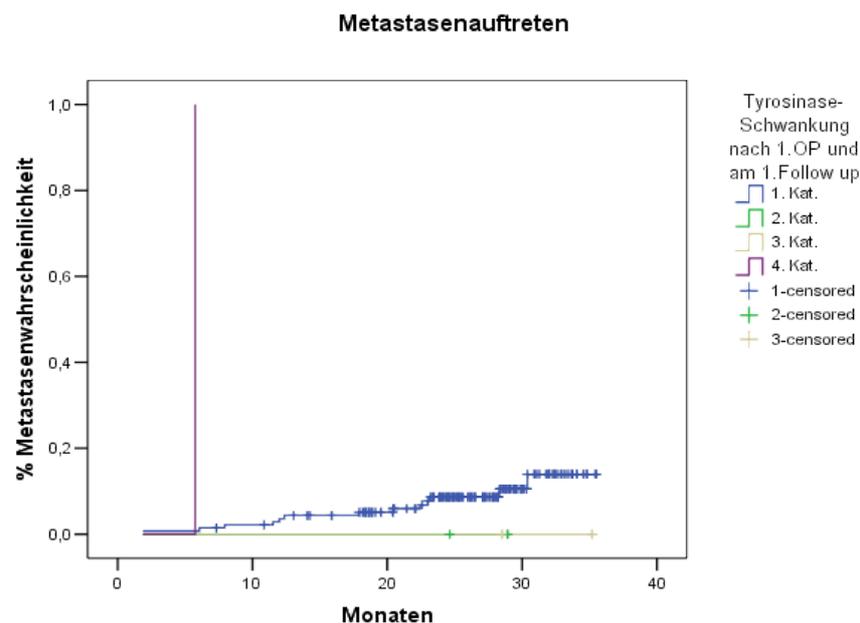


Abb. 10.49.: Kaplan Meier bezüglich der Tyrosinase Schwankung zwischen 2. und 5. Blutentnahme, p-Wert 0,055

Die zweite Einteilung betrifft das MelanA/Mart1-Gen:

Eine Metastase trat bei 7 von 111 (6,3%) Patienten der ersten Kategorie (- -), bei 2 von 12 (16,6%) Patienten der zweiten Kategorie (- +), bei 3 von 18 (16,7%) Patienten der dritten Kategorie (+ -) und bei 2 von 3 (66,7%) Patienten der vierten Kategorie (+ +) für das MelanA/Mart1-Gen Patienten auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,005, und damit gab es einen statistisch einen signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.50.).

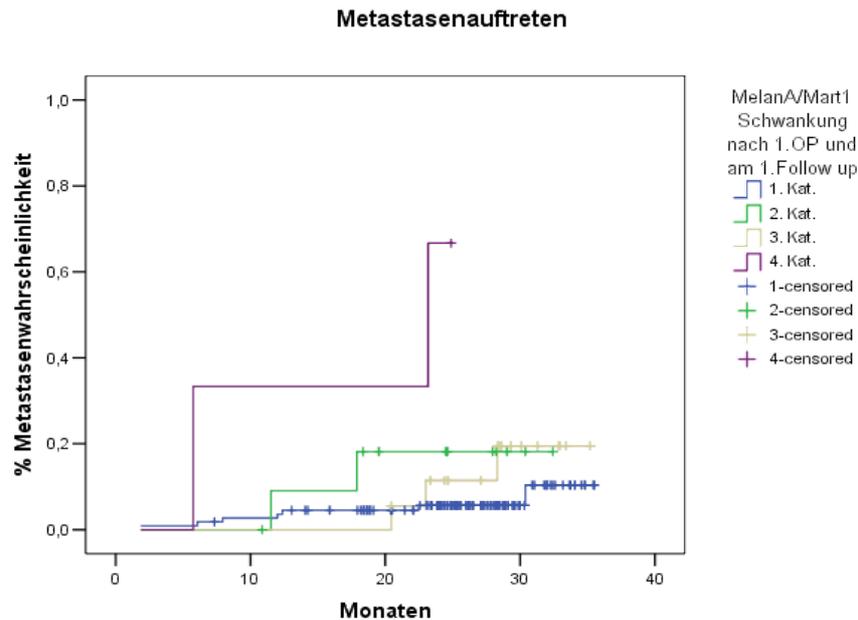


Abb. 10.50.: Kaplan Meier bezüglich der MelanA/Mart1 Schwankung zwischen 2 und 5. Blutentnahme, **p-Wert 0,005**

Die dritte Einteilung betrifft den kombinierten Parameter „T-M“:

Eine Metastase trat bei 7 von 108 (6,5%) Patienten der ersten Kategorie (- -), bei 2 von 14 (14,2%) Patienten der zweiten Kategorie (- +), bei 3 von 19 (15,8%) Patienten der dritten Kategorie (+ -) und bei 2 von 3 (66,7%) Patienten der vierten Kategorie (+ +) für den kombinierten Parameter „T-M“ auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,008, und damit gab es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.51.).

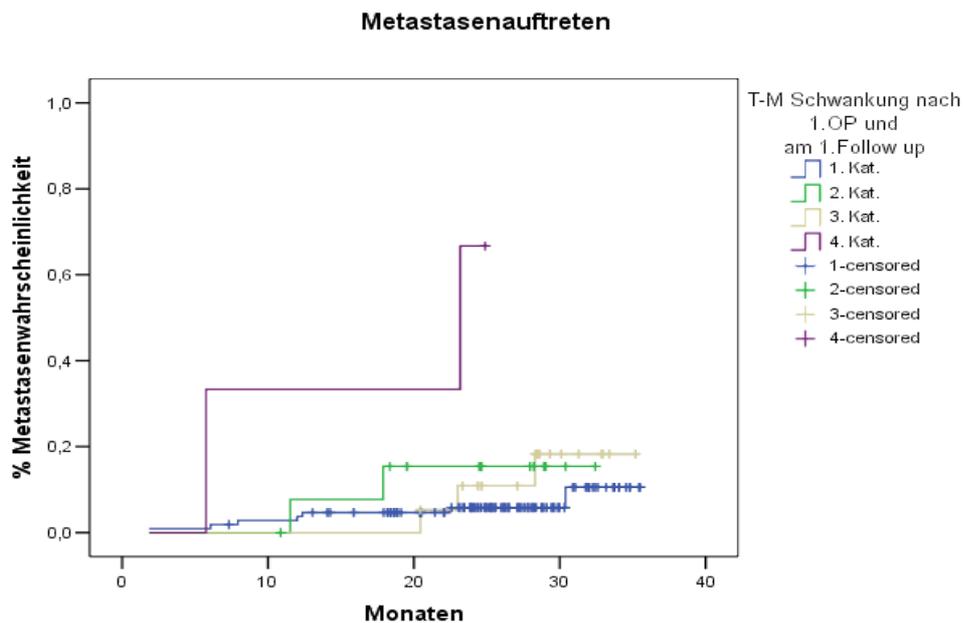


Abb. 10.51.: Kaplan Meier bezüglich der T-M Schwankung zwischen 2 und 5. Blutentnahme, **p-Wert 0,008**

Die Schwankung des PCR-Ergebnisses der Blutentnahme nach der ersten Operation und beim zweiten Follow up Termin:

Die erste Einteilung betrifft das Tyrosinase-Gen:

Eine Metastase trat bei 7 von 101 (6,9%) Patienten der ersten Kategorie (- -), bei 0 von 2 (0%) Patienten der zweiten Kategorie (- +), bei 0 von 1 (0%) Patient der dritten Kategorie (+ -) auf. Es gab keinen Patienten der vierten Kategorie. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,603, und damit gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose.

Die zweite Einteilung betrifft das MelanA/Mart1-Gen:

Eine Metastase trat bei 2 von 79 (2,5%) Patienten der ersten Kategorie (- -), bei 0 von 9 Patienten (0%) der zweiten Kategorie (- +), bei 3 von 14 (21,4%) Patienten der dritten Kategorie (+ -) und bei 2 von 2 (100%) Patienten der vierten Kategorie (+ +) für das MelanA/Mart1-Gen Patienten auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war <0,001, und damit gab es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.52.).

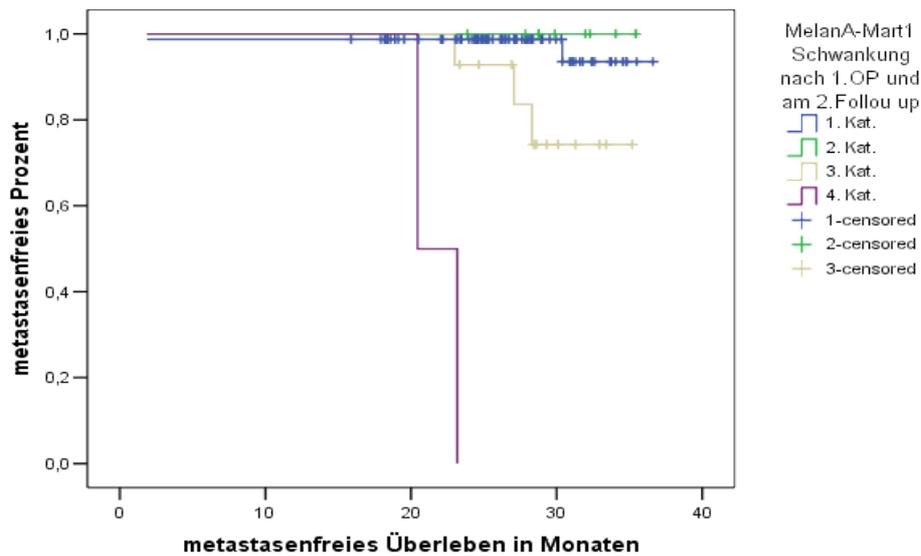


Abb. 10.52.: Kaplan Meier bezüglich der MelanA/Mart1 Schwankung zwischen 2 und 6. Blutentnahme, **p-Wert <0,001**

Die dritte Einteilung betrifft den kombinierten Parameter „T-M“:

Eine Metastase trat bei 2 von 79 (2,5%) Patienten der ersten Kategorie (- -), bei 0 von 9 (0%) Patienten der zweiten Kategorie (- +), bei 3 von 13 (23,1%) Patienten der dritten Kategorie (+ -) und bei 2 von 3 (66,7%) Patienten der vierten Kategorie (+ +), für den kombinierten Parameter „T-M“ Patienten auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war <0,001, und damit gab es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb.10.53.).

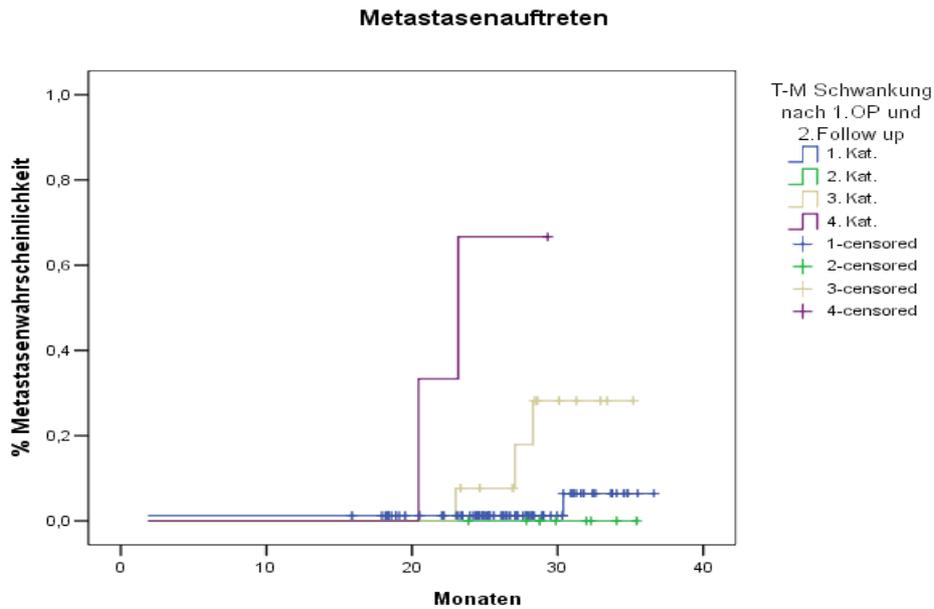


Abb. 10.53.: Kaplan Meier bezüglich der T-M Schwankung zwischen 2 und 6.  
Blutentnahme, **p-Wert < 0,001**

Log-Rank für die Schwankung des RT-PCR Ergebnisses	Tyrosinase	MelanA/Mart1	T-M
	p-Wert		
vor 1.OP und nach 1.OP	0,507	<b>0,008</b>	<b>0,016</b>
vor 1.OP und am 1.Follow up	0,602	0,318	0,421
vor 1.OP und am 2.Follow up	0,623	0,765	0,852
nach 1.OP und am 1.Follow up	0,055	<b>0,005</b>	<b>0,008</b>
nach 1.OP und am 2.Follow up	0,603	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
vor 2.OP und nach 2.OP	0,688	0,967	0,890
nach 2.OP und am 1.Follow up	0,752	0,585	0,546
nach 2.OP und am 2.Follow up	---	0,362	0,362
zwischen 1. und 2.Follow up	0,575	0,322	0,450

Tab 10.12.

### 10.8. Lokales Aderhautmelanom-Rezidiv

5 Patienten entwickelten im Zeitraum nach der primären Therapie ein lokales Aderhautmelanom-Rezidiv. Der Zeitpunkt des Auftretens des Rezidivs war frühestens nach ca. 2 Monaten und spätestens nach 30,38 Monaten, im Durchschnitt nach 18 ( $\pm 12$ ) Monaten. Nach der Analyse betrug die Wahrscheinlichkeit für ein lokales Tumorezidiv 1,5% nach 30 Monaten (Abb. 10.54).

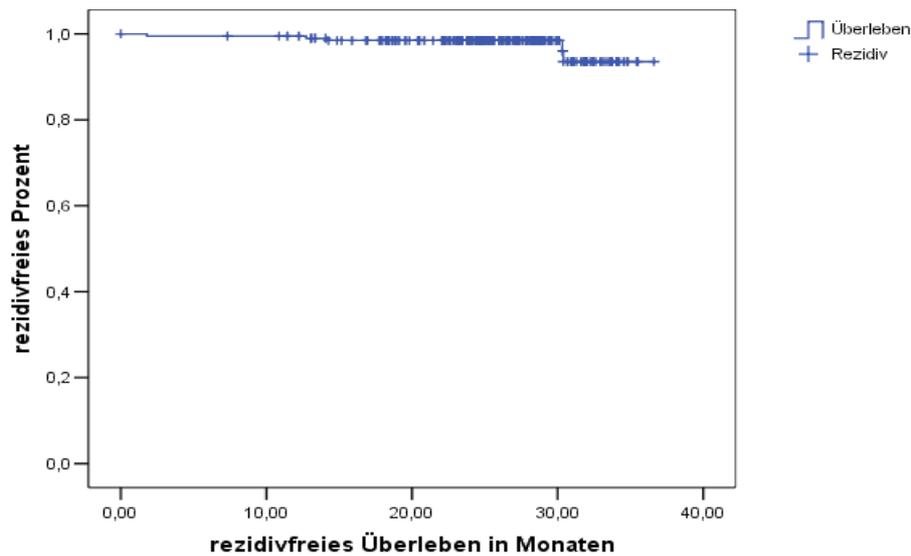


Abb. 10.54.: Rezidivswahrscheinlichkeit nach Kaplan Meier

Mittels Log-Rank Analyse (Abbildung durch Kaplan-Meier Graph) wurden folgende Einflussfaktoren eingebracht: Diagnosealter, Geschlecht, Tumorprominenz, max. Tumorbasis, Ziliarkörperinfiltration, Art der ersten Operation, Art der zweiten Operation, positives oder negatives PCR für das Tyrosinase-Gen, das MelanA/Mart1-Gen, den kombinierten Parameter „T-M“ für jede Blutentnahme und die Schwankung des PCR-Ergebnisses zwischen 2 Zeitpunkten.

Nur das PCR-Ergebnis der Blutentnahme nach der ersten Operation spielte eine statistisch signifikante Rolle bei der Rezidiv-Entwicklung.

Ein Rezidiv trat bei 4 von 174 (2,3%) negativen und bei 1 von 4 (25%) positiven Patienten für das Tyrosinase-Gen auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war  $<0,001$ , und damit gab es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.55.).

Ein Rezidiv trat bei 2 von 153 (1,3%) negativen und bei 3 von 25 (12%) positiven Patienten für das MelanA/Mart1-Gen auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,001, und damit gab es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.56.).

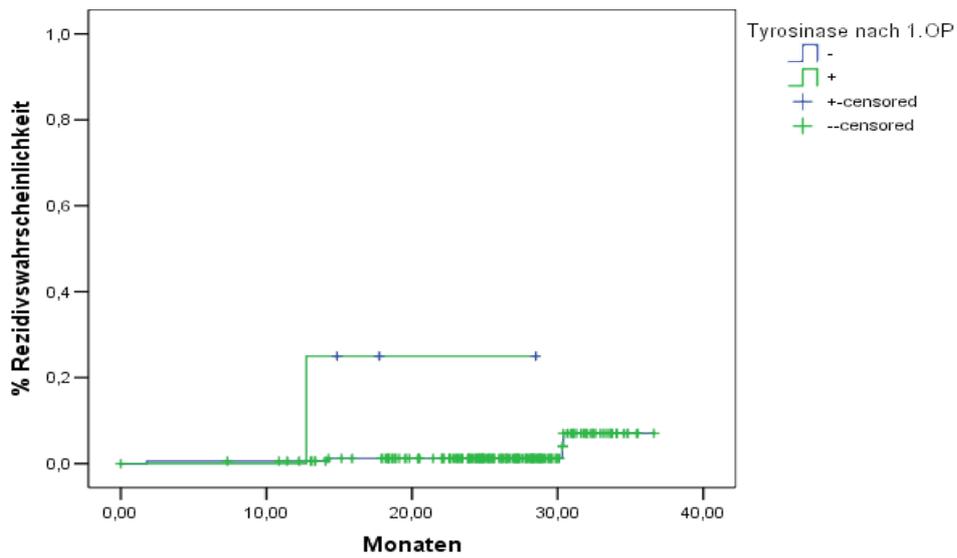


Abb. 10.55.: Kaplan Meier bezüglich des RT-PCR Ergebnisses für Tyrosinase,  
2. Blutentnahme, **p-Wert < 0,001**

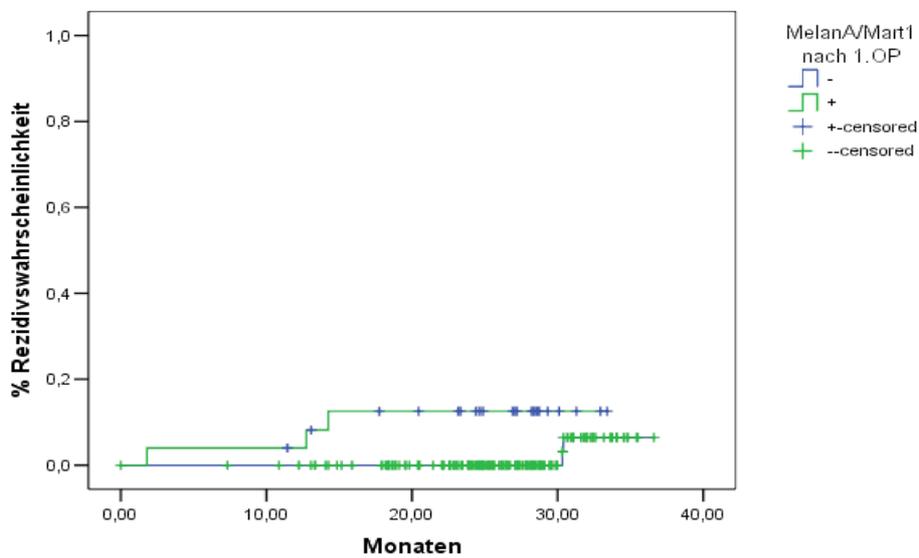


Abb. 10.56.: Kaplan Meier bezüglich des RT-PCR Ergebnisses für MelanA/Mart1,  
2. Blutentnahme, **p-Wert 0,001**

Ein Rezidiv trat bei 2 von 151 (1,3%) negativen und bei 3 von 27 (11,1%) positiven Patienten für den kombinierten Parameter „T-M“ auf. Der p-Wert für die Log-Rank Analyse war 0,001, und damit gab es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Prognose (Abb. 10.57.).

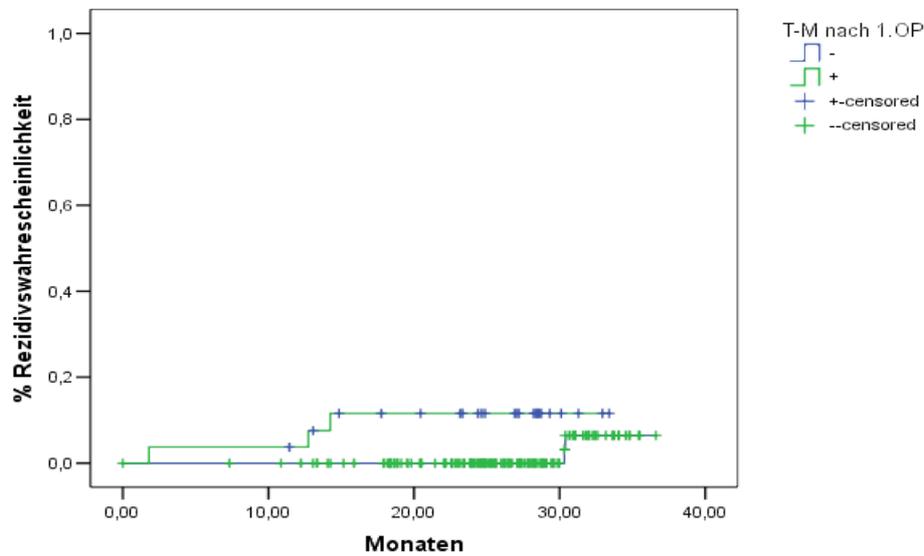


Abb. 10.57.: Kaplan Meier bezüglich des RT-PCR Ergebnisses für T-M,  
2. Blutentnahme, **p-Wert 0,001**

Eine weitere statistische Analyse der mit den lokalen Rezidiven zusammenhängenden Parameter hat aufgrund einer begrenzten Anzahl an Fakten, die auf Zufall zurückzuführen sein könnten, nicht stattgefunden.

## 11. Diskussion

Ziele dieser prospektiven Studie waren:

- 1) die Ermittlung der zirkulierenden Melanomzellen in der Blutbahn der Patienten mit Aderhautmelanom,
- 2) die Dokumentation eines eventuellen Einflusses der operativen Behandlung auf die Gesamtzahl dieser Zellen,
- 3) die Beobachtung des Verlaufs der Patienten, bzw. Rezidiv und Metastasen, hinsichtlich der geometrischen Tumor-Charakteristiken und der Tumorzellen-Charge im Blut.

In der Literatur [89, 96-99] gibt es einige Berichte über die Ermittlung der oben genannten Charakteristika. Jedoch ist bisher noch keine Studie mit einer so großen Population (209 Patienten), mit mehreren Blutentnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten (4 bis 6 Blutentnahmen in einem Zeitraum von ca. 12 Monaten) und mit einem prospektiven Charakter durchgeführt worden.

### 11.1. Ausgangsdaten und PCR-Ergebnis

Ausgangsdaten der Patienten in Bezug auf die Ergebnisse der ersten RT-PCR Analyse

Tyrosinase: Am Tag der Aufnahme: Die Tyrosinase konnte bei 184 Patienten bestimmt werden. Davon waren 182 (98,9%) negativ in Bezug auf das Tyrosinase-Gen und 2 (1,1%) positiv. Bei den positiven Patienten war der Mittelwert  $0.000000051261 (\pm 0.0000006529152)$  pg/ $\mu$ l. Mit Hilfe der Kruskla-Wallis Analyse waren keine statistisch signifikanten Unterschiede beim durchschnittlichen Diagnosealter, beim Geschlecht, beim Durchschnitt der Prominenz der Basis, bei der Frequenz der Ziliarkörperinfiltration, bei der Art des extraokularen Wachstums und beim histologischen Befund zwischen Tyrosinase-negativen und positiven Patienten zu erkennen. Nach der Spearman Analyse zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der gemessenen Tyrosinase und dem Alter, der Prominenz der Basis und des Tumor-Volumens der oben genannten Patienten.

MelanA/Mart1: Am Tag der Aufnahme: Das MelanA/Mart1 konnte bei 184 Patienten bestimmt werden. Davon waren 164 (89,1%) negativ in Bezug auf das Gen und 20 (10,9%) positiv. Bei den positiven Patienten war der Mittelwert  $0.000038112834 (\pm 0.0002758720630)$  pg/ $\mu$ l. Mit

Hilfe der Kruskal-Wallis Analyse (nichtparametrisch für unabhängige Gruppen) waren keine statistisch signifikanten Unterschiede beim durchschnittlichen Diagnosealter, beim Geschlecht, beim Durchschnitt der Prominenz der Basis, bei der Frequenz der Ziliarkörperinfiltration, bei der Art des extraokularen Wachstums und beim histologischen Befund zwischen den MelanA/Mart1-negativen und positiven Patienten zu erkennen. Nach der Spearman Analyse zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der gemessenen Tyrosinase und dem Alter, der Prominenz der Basis und des Tumor-Volumens der oben genannten Patienten.

Nur die Kruskal-Wallis Analyse für die Prominenz wies einen etwas stärkeren, aber immer noch keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen positiven und negativen Patienten nach.

„T-M“: Am Tag der Aufnahme: Das „T-M“ konnte bei 184 Patienten bestimmt werden. Davon waren 162 (88,0%) negativ in Bezug auf das „T-M“ und 22 (12,0%) positiv. Mit Hilfe der Pearson  $\chi^2$  und Fisher Analyse waren keine statistisch signifikanten Unterschiede beim durchschnittlichen Diagnosealter, beim Geschlecht, beim Durchschnitt der Prominenz, der Basis, bei der Frequenz der Ziliarkörperinfiltration, bei der Art des extraokularen Wachstums und beim histologischen Befund zwischen „T-M“-negativen und positiven Patienten zu erkennen. Nach der Mann-Whitney U Analyse zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem „T-M“ Status und dem Alter, der Prominenz der Basis und dem Tumorumfang der oben genannten Patienten. Nur die Fisher Analyse für die Prominenz wies einen etwas stärkeren, aber immer noch keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen positiven und negativen Patienten nach.

Die Präsenz von Melanomzellen wurde von diversen Arbeitsgruppen mittels RT-PCR bzw. durch die Gene Tyrosinase und MelanA/Mart1 evaluiert. Es ist jedoch nicht immer klar, wann das Material im Vergleich zum Behandlungszeitpunkt gesammelt wurde, und meistens wurde jedem Patienten nur einmal Blut entnommen. Die Arbeitsgruppe unseres Krankenhauses - Schuster, Bechrakis, Keilholz - analysierte 2007 das Blut von 110 Patienten durch eine einzige Blutentnahme, entweder vor oder nach der operativen Behandlung, wobei sich 5 Patienten (0,045%) als positiv in Bezug auf Tyrosinase erwiesen, 5 Patienten (0,045%) als positiv in Bezug auf MelanA/Mart1 und 1 Patient (0,009%) als positiv in Bezug auf beide Gene. Insgesamt wurden bei 10% (11) der Patienten durch RT-PCR Tumorzellen entdeckt. Von 6 Patienten mit Melanom war nur einer negativ, 3 waren positiv entweder in Bezug auf das Gen Tyrosinase oder das Gen MelanA/Mart1 und 1 war positiv in Bezug auf beide Gene [98]. In Italien wurden 41 Patienten analysiert, wobei sich bei 20 Patienten eine erhebliche Menge an Tyrosinase ergab und

sich 11 Patienten als Tyrosinase-negativ erwiesen [97]. In der entsprechenden Studie wurde eine Korrelation zwischen Tumorgröße und Tyrosinase- Menge nachgewiesen [97].

## **11.2. Metastasen bei Patienten mit Aderhautmelanom**

In der vorliegenden Studie bildete sich in einer durchschnittlichen Follow-Up-Zeit von 2,5 Jahren bei 22 von 202 Patienten (10,9%) eine Aderhautmelanommetastase. Bei 19 Patienten war die Leber betroffen, in einem Fall das Perikardium und in einem anderen Fall die Nieren. Die statistische Auswertung mittels Berechnung nach Kaplan Meier ergab eine Metastasenrate von 2,0% nach 12 Monaten, 9,4% nach 24 Monaten und 10,8% nach 30 Monaten.

Es ist bekannt, dass trotz einer erfolgreichen Behandlung 50% der Patienten eine Metastase bekommen [23]. Die COMS (Collaborative Ocular Melanoma Study) weist eine Metastasenrate von 25% nach [24]. Shield et al. berichteten im Jahre 1996 von einer Metastasenrate von 16% in drei Jahren, 24% in fünf Jahren und 36% in zehn Jahren bei diffusen Aderhautmelanomen [25]. Unsere Kaplan Meier Modelle zeigen im Vergleich zu den oben vorgestellten Studien keine deutliche Abweichung der Metastasenrate unserer Studie von der entsprechenden Rate in der Literatur.

Einflussfaktoren im Hinblick auf das Auftreten einer Metastase: Als Einflussfaktoren für die Entwicklung einer Aderhautmelanommetastase wurden in der vorliegenden Studie folgende in klinischer und genetischer Hinsicht sinnvolle Variablen untersucht: Alter des Patienten, Geschlecht, Tumorprominenz, maximale Tumorbasis, Beteiligung des Ziliarkörpers, Tumolvolumen, Art der ersten Operation, Art der zweiten Operation und die genetische Untersuchung für das Tyrosinase-Gen und MelanA/Mart1-Gen sowohl zu den verschiedenen Zeitpunkten, als auch die Schwankung der oben genannten Messungen zwischen 2 Blutentnahmen.

### **11.2.1. Geschlecht**

An unserer Studie haben 91 Männer und 111 Frauen teilgenommen. 15 Männer sind von einer Metastase betroffen, aber nur 7 Frauen haben einen ähnlichen Verlauf. Dieser statistisch signifikante Unterschied kann nicht von der Tumorgröße abhängen, da nach dem Mann-Whitney U Test kein Unterschied bei der Tumorprominenz und nach dem T-Test für unabhängige Samples vorhanden war. Die bessere Prognose für weibliche Patienten mit

Aderhautmelanom wurde auch von der retrospektiven Studie des Biomedical Cyclotron Centre (Nice, Frankreich) dokumentiert [100]. Ähnliche prognostische Signifikanz hat das Geschlecht auch bei Patienten mit Hautmelanom [101].

### **11.2.2. Prominenz, Basis**

In der durchgeführten Log Rank Analyse hatte die Tumorprominenz einen signifikanten Einfluss auf das Auftreten einer Metastase. Bei Tumoren mit einer maximalen Prominenz  $> 7$ mm kam es häufiger zu einer Metastase als bei Tumoren mit einer kleineren Prominenz, bzw. 11 von 70 Patienten mit einer Prominenz über 7mm waren betroffen, während nur 4 von 67 mit einer Prominenz bis 3,5mm, und 7 von 70 mit einer Prominenz zwischen 3,5 und 7mm betroffen waren.

Ebenso hatte die Log Rank Analyse für die maximale Tumorbasis einen signifikanten Einfluss auf das Auftreten einer Metastase nachgewiesen. Bei Tumoren mit einer maximalen Basis  $> 14$ mm kam es häufiger zu einer Metastase als bei Tumoren mit einer kleineren Basis, bzw. 14 von 61 Patienten mit einer maximalen Basis über 14mm waren betroffen, während nur 3 von 41 mit einer Basis bis 8mm, und 5 von 97 mit einer maximalen Basis zwischen 8 und 14mm betroffen waren.

Die Prominenz und die maximale Basis zeigten eine starke Korrelation, mit einer Korrelationskoeffizienten von 0,724 und p-Wert  $< 0,001$ . In unserer Studie und in der Literatur wurde nachgewiesen, dass die Prognose bei kleineren Tumoren besser ist als bei größeren [23, 66, 75].

### **11.2.3. Histologie**

Ein histologischer Befund war bei 19 Patienten vorhanden. Diese Population reichte nicht für eine ausreichende statistische Analyse, aber die Patienten mit spindelzelligem Melanom hatten in der Log Rank Analyse eine schlechtere Prognose. McLean et al. hatten 1982 nach Analyse von 3,432 Patienten publiziert, dass die Prognose der Patienten mit gemischtzelligen Tumoren 3 mal schlechter ist als die Prognose der Patienten mit rein spindelzelligen Tumoren [82].

#### **11.2.4. Andere Einflussfaktoren**

Nach erneuter Analyse spielt das Alter der Patienten keine statistisch signifikante Rolle für die Prognose. 12 von 96 Patienten aus der Altersgruppe bis 62 Jahren, sowie auch 10 von 101 Patienten aus der entsprechenden Altersgruppe ab 62 Jahren entwickelten eine Metastase.

In der Literatur ist die Infiltration des Ziliarkörpers von einer schlechteren Prognose begleitet [102]. In der durchgeführten Log Rank Analyse unserer Studie hatte die oben genannte Variable keinen signifikanten Einfluss. 16 der 167 Patienten ohne Ziliarkörper-Infiltration entwickelten eine Metastase, während 6 der 32 Patienten mit Ziliarkörper-Infiltration eine Metastase entwickelten.

In unserer Studie wurde auch die Signifikanz der Operations-Art für die Prognose evaluiert.

Beim größten Patientenanteil wurde eine Clip Aufnähung, eine Applikator Aufnähung, eine Operation oder eine Enukleation durchgeführt. Anhand der Log Rank Analyse gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied bei der Prognose der Patienten aller drei Kategorien.

Ein kleiner Anteil der Patienten wurde ein weiteres Mal operiert (Endoresektion, transklurale Tumorresektion oder Enukleation). Die erneute Log Rank Analyse weist keinen statistisch signifikanten Unterschied bei der Prognose der Patienten der zwei Kategorien nach. Die operative Methode spielt in unserer Studie und in der Literatur keine prognostische Rolle [39, 78-80]. Es ist auch darauf hinzuweisen, dass die Operationstechnik von der Tumorgröße und der Tumorlokalisation abhängig ist.

#### **11.2.5. Genetische Parameter**

Von der großen Reihe der genetischen Parameter werden nur die statistisch signifikanten Messungen für die Metastasierung analysiert.

Die ersten Messungen in Bezug auf Tyrosinase, MelanA/Mart1 Gene und deren Kombination spielten am Tag der Aufnahme keine Rolle.

Von den RT-PCR Ergebnissen der zweiten Blutentnahme (intraoperativ) war eine positive MelanA/Mart1 Messung mit schlechterer Prognose verbunden, sowie die kombinierte Evaluation des Tyrosinase und MelanA/Mart1 Gens.

Die Messungen der Gene vor und nach der zweiten Operation waren statistisch nicht signifikant.

Ebenso waren die Messungen beim ersten und zweiten Follow up nicht signifikant, außer der

MelanA/Mart1 Bestimmung beim ersten Follow up Termin. Im letzten Fall hatten die Patienten mit positiver Messung eine schlechtere Prognose bzw. eine Metastase-Entwicklung.

In der Literatur gibt es eine Reihe von Studien mit ähnlichem Ziel: die Ermittlung bzw. Entdeckung von zirkulierenden Melanomzellen durch RT-PCR und MelanA/Mart1. Von der Arbeitsgruppe unseres Krankenhauses (Schuster, Bechrakis, Keilholz) wurden im Jahr 2007 die Ergebnisse einer großen Population publiziert. Es wurde Blut von 110 Patienten durch eine einzige Blutentnahme analysiert, wodurch sich 5 Patienten (0,045%) als positiv in Bezug auf Tyrosinase, 5 Patienten (0,045%) als positiv in Bezug auf MelanA/Mart1 und 1 Patient (0,009%) als positiv in Bezug auf beide Gene ergaben. Insgesamt sind bei 10% (11) der Patienten durch RT-PCR Tumorzellen entdeckt worden. Die Cox-Analyse wies die prognostische Signifikanz dieser zwei Faktoren bei der Metastasen-Entwicklung nach [96]. In einer Studie mit 20 Tyrosinase-positiven Patienten von insgesamt 40 Patienten mit Aderhautmelanom ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Ergebnis der RT-PCR und dem Überleben der Patienten [97].

In unserer Studie wurde nicht nur die Präsenz der zwei Gene zu den verschiedenen Zeitpunkten, sondern auch die Schwankung der Gen-Messungen zwischen zwei Blutentnahmen und deren Einfluss auf die Metastasierung analysiert.

Für die Prognose der Patienten bzw. in Bezug auf die Entwicklung von Metastasen spielten die folgenden Resultate statistisch eine signifikante Rolle:

- 1) die Schwankungen des Gens Tyrosinase zwischen der zweiten Blutentnahme und dem ersten Follow up,
- 2) die Schwankung des Gens MelanA/Mart1 zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme, zwischen der zweiten Blutentnahme und dem ersten Follow up, zwischen der zweiten Blutentnahme und dem zweiten Follow up.
- 3) die Schwankung des kombinierten Parameters „T-M“ zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme, zwischen der zweiten Blutentnahme und dem ersten Follow up, sowie zwischen der zweiten Blutentnahme und dem zweiten Follow up.

Alle anderen möglichen Kombinationen hatten nach der Log Rank Analyse keinen Einfluss auf die Prognose der Patienten.

Zu diesem Punkt ist zu bemerken, dass die Patienten, die bei den oben genannten Messungen in Bezug auf die entsprechenden Gene immer positiv waren, eine schlechtere Prognose hatten im Vergleich sowohl zu den Patienten, die immer negativ waren, als auch zu denen, die positiv oder negativ geworden sind.

### **11.3. Einflussfaktoren im Hinblick auf das Auftreten eines Rezidivs**

In der vorliegenden Studie fand sich bei einer durchschnittlichen Follow-Up-Zeit von 2,5 Jahren ein lokales Tumorrezidiv bei 5 Patienten. Es wurde eine statistische Bearbeitung durchgeführt, aber wegen der kleinen Anzahl der Rezidiven konnten die Daten nicht weiter analysiert werden. Nur das PCR-Ergebnis der Blutentnahme nach der ersten Operation spielte eine statistisch signifikante Rolle bei der Rezidiv-Entwicklung.

### **11.4. Operativer Eingriff und iatrogene Tumorzellen-Dissemination**

Evaluation der operativen Eingriffe in Bezug auf die iatrogene Tumorzellen-Dissemination. Das primäre Ziel unserer Studie war die Dokumentation einer eventuellen Schwankung der Menge der zirkulierenden Tumorzellen in der Blutbahn im perioperativen Zeitraum. Die Mehrheit der Patienten wurde nur einmal operiert.

#### **11.4.1. Erste Operation**

Evaluation mittels Tyrosinase-Gen:

1. Von den 116 Patienten, die Clips bekamen, waren 112 vor und nach der Operation negativ, 2 wurden positiv, 2 negativ und keiner war positiv in Bezug auf dieses Gen. Eine  $\chi^2$  Pearson Analyse zwischen dieser Gruppe und der gesamten Population zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Von den 40 Patienten, die mittels Ru-Applikator behandelt wurden, waren 39 ständig Tyrosinase-negativ und nur 1 wurde positiv. Nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Alle 16 Patienten, die enukleiert wurden, waren ständig negativ, und in diesem Fall zeigte sich auch nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse kein statistisch signifikanter Unterschied.

2. 112 Clips-Patienten, 39 Applikator-Patienten und 16 E nukleation-Patienten (Gesamtzahl 167) waren vor und nach der Operation Tyrosinase-negativ. Nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

2 Clip-Patienten und 1 Applikator Patient wurden Tyrosinase-positiv, nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

Nur 2 Clip-Patienten wurden negativ. Nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

Kein Patient war vor und nach der Operation Tyrosinase positiv. Aus diesem Grund war eine  $\chi^2$  Pearson Analyse nicht möglich.

Evaluation mittels MelanA/Mart1-Gen:

1. Von den 116 Patienten, die Clips bekamen, waren 92 vor und nach der Operation negativ, 13 wurden positiv, 8 wurden negativ und 3 waren vor und nach der Operation in Bezug auf dieses Gen positiv. Eine  $\chi^2$  Pearson Analyse zwischen dieser Gruppe und des gesamten Kollektives zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Von den 40 Patienten, die mittels Ru-Applikator behandelt wurden, waren 32 ständig MelanA/Mart1-negativ, 3 wurden positiv, 5 wurden negativ und keiner war ständig positiv, und nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Von den 16 Patienten die enukleiert wurden, waren 11 ständig negativ, 3 wurden positiv, 2 wurden negativ und keiner war ständig positiv, und in diesem Fall zeigte sich auch nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse kein statistisch signifikanter Unterschied.

2. 92 Clips-Patienten, 32 Applikator-Patienten und 11 E nukleation-Patienten (Gesamtzahl 135) waren vor und nach der Operation MelanA/Mart1-negativ. Nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

13 Clip-Patienten, 3 Applikator-Patienten und 3 E nukleation-Patienten wurden positiv in Bezug auf MelanA/Mart1. Nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

8 Clip-Patienten, 5 Applikator-Patienten und 2 E nukleation-Patienten wurden negativ. Nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

Nur 3 Clip-Patienten waren ständig positiv in Bezug auf MelanA/. Nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

Evaluation mittels kombinierten Parameter „T-M“:

1. Von den 116 Patienten, die Clips bekamen, waren 88 vor und nach der Operation negativ, 15 wurden positiv, 10 wurden negativ und 3 waren vor und nach der Operation positiv in Bezug auf diesen Parameter. Eine  $\chi^2$  Pearson Analyse zwischen dieser Gruppe und des gesamten Kollektives zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Von den 40 Patienten, die mittels Ru-Applikator behandelt wurden, waren 32 ständig negativ in Bezug auf „T-M“, 3 wurden positiv, 5 wurden negativ und keiner war ständig positiv. Nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Von den 16 Patienten, die enukleiert wurden, waren 11 ständig negativ, 3 wurden positiv, 2 wurden negativ und keiner war ständig positiv. Und in diesem Fall zeigte sich auch nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse kein statistisch signifikanter Unterschied.

2. 88 Clips-Patienten, 32 Applikator-Patienten und 11 E nukleation-Patienten (Gesamtzahl 131) waren vor und nach der Operation negativ in Bezug auf „T-M“. Nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

15 Clip-Patienten, 3 Applikator-Patienten und 3 E nukleation-Patienten wurden positiv in Bezug auf „T-M“. Nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

10 Clip-Patienten, 5 Applikator-Patienten und 2 E nukleation-Patienten wurden negativ. Nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

Nur 3 Clip Patienten waren ständig „T-M“-positiv. Nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

#### **11.4.2. Zweite Operation**

Ein kleiner Anteil der Patienten wurde nach der primären Behandlung ein weiteres Mal operiert.

Evaluation mittels Tyrosinase-Gen:

1. Von den 27 Patienten, die mit Endoresektion behandelt worden sind, waren 26 vor und nach der Operation negativ, keiner wurde positiv, 1 wurde negativ und keiner war in Bezug auf dieses Gen positiv. Eine  $\chi^2$  Pearson und Fisher Analyse zeigte zwischen dieser Gruppe und der gesamten Population keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Von den 10 Patienten, die mit transklarer Tumor-Resektion behandelt wurden, waren alle 10 ständig Tyrosinase-negativ, und nach der  $\chi^2$  Pearson und Fisher Analyse zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

2. 26 Endoresektion-Patienten und 10 transklare Patienten (Gesamtzahl 36) waren vor und nach der Operation Tyrosinase-negativ. Nach der  $\chi^2$  Pearson und Fisher Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied. Keiner wurde positiv in Bezug auf MelanA/Mart1, und eine  $\chi^2$  Pearson oder Fisher Analyse war nicht möglich.

Nur 1 Endoresektion-Patient wurde negativ. Nach der  $\chi^2$  Pearson Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

Kein Patient war vor und nach der Operation Tyrosinase-positiv, und deswegen war eine  $\chi^2$  Pearson Analyse nicht möglich.

Evaluation mittels MelanA/Mart1-Gen:

1. Von den 27 Patienten, die mit Endoresektion behandelt worden sind, waren 19 vor und nach der Operation negativ, 5 wurden positiv, 1 wurde negativ und 2 waren ständig positiv in Bezug auf dieses Gen. Eine  $\chi^2$  Pearson und Fisher Analyse zeigte zwischen dieser Gruppe und der gesamten Population keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Von den 10 Patienten, die mit transklarer Tumorsektion behandelt wurden, waren 9 ständig negativ in Bezug auf MelanA/Mart1, keiner wurde positiv, 1 wurde negativ und keiner war ständig positiv, und nach der  $\chi^2$  Pearson und Fisher Analyse zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dieser Gruppe und der gesamten Population.

2. 19 Endoresektion-Patienten und 9 transklare Patienten (Gesamtzahl 28) waren vor und nach der Operation negativ in Bezug auf MelanA/Mart1. Nach der  $\chi^2$  Pearson und Fisher Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

5 Endoresektion-Patienten und 0 transklare Patienten waren positiv geworden. Nach der  $\chi^2$  Pearson und Fisher Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

1 Endoresektion-Patient und 1 transklarer Patient wurden negativ. Nach der  $\chi^2$  Pearson und Fisher Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

Nur 2 Endoresektion-Patienten waren ständig positiv. Nach der  $\chi^2$  Pearson und Fisher Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

Evaluation mittels kombinierten Parameter „T-M“:

1. Von den 27 Patienten, die mit Endoresektion behandelt worden sind, waren 18 vor und nach der Operation negativ, 5 wurden positiv, 2 wurden negativ und 2 waren ständig positiv in Bezug auf diesen Parameter. Eine  $\chi^2$  Pearson und Fisher Analyse zeigte zwischen dieser Gruppe und der gesamten Population keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Von den 10 Patienten, die mit transklarer Tumorresektion behandelt wurden, waren 9 ständig negativ in Bezug auf MelanA/Mart1, keiner wurde positiv, 1 wurde negativ und keiner war ständig positiv, und nach der  $\chi^2$  Pearson und Fisher Analyse zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dieser Gruppe und der gesamten Population.

2. 18 Endoresektion-Patienten und 9 transklare Patienten (Gesamtzahl 27) waren vor und nach der Operation „T-M“-negativ. Nach der  $\chi^2$  Pearson und Fisher Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

5 Endoresektion-Patienten und 0 transklare Patienten sind positiv geworden. Nach der  $\chi^2$  Pearson und Fisher Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

2 Endoresektion-Patienten und 1 transklarer Patient sind negativ geworden. Nach der  $\chi^2$  Pearson und Fisher Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

Nur 2 Endoresektion-Patienten waren ständig positiv. Nach der  $\chi^2$  Pearson und Fisher Analyse zeigte sich zwischen dieser Gruppe und den anderen 3 Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

Unsere Studie hat nachgewiesen, dass die Zahl der Zellen nach der RT-PCR Analyse für diese 2 Gene vor und nach jeder möglichen operativen Behandlung unverändert bleibt. In diesem Fall könnten wir behaupten, dass die operative Behandlung selbst bei einer eventuellen Disemination von Tumorzellen eine kleine Rolle spielt, und aus diesem Grund könnten wir im Gegensatz zur Zimmermann-Theorie behaupten, dass die E nukleation nicht die Ursache für die erhöhte Mortalität der Patienten ist, sondern dass andere unbekannte mögliche Prozedere eine Rolle spielen. Die operative Behandlung der Melanome wurde von diesem negativen Aspekt befreit, und die Augenärzte dürfen und sollen weiterhin die Melanompatienten operieren.

Die Arbeitsgruppe von Tübingen dokumentierte 2009 nach der Evaluation von 81 Patienten vor und nach der Operation das gleiche Ergebnis [103]. Außerdem hat die Arbeitsgruppe von Graz nach der Beobachtung von 41 Patienten erneut von einer stabilen Situation hinsichtlich der zirkulierenden Tumorzellen durch RT-PCR vor und nach der Behandlung gesprochen [104].

## 12. Zusammenfassung

Mehrere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen dem Nachweis zirkulierender Melanomzellen und der Metastasierungsrate belegen.

Die Änderung des Prozentsatzes der Patienten mit Tumorzellen in ihrer Blutbahn war in unserer Studie nicht statistisch signifikant.

Die häufigen Veränderungen von negativen zu positiven wie auch von positiven zu negativen Proben weisen durch den Vergleich von prä- und postoperativen Proben auf eine teilweise unterbrochene Dissemination hin, bzw. auf eine methodisch bedingte Insuffizienz in der Erfassung der genauen Tumorzell dissemination. Dies lässt sich mit der vermutlichen Empfindlichkeit des Prozederes der Quantifizierung der genannten Gene durch RT-PCR und mittels der mRNA erklären.

Mit den in dieser Studie angewandten Methoden konnte jedenfalls ein Einfluss der operativen Massnahme bei Patienten mit Aderhautmelanomen auf die Tumorzell dissemination nicht festgestellt werden.

Das Besondere an dieser Studie ist:

- 1) Zum ersten mal die systematische prospektive Untersuchung von zirkulierenden Melanomzellen vor und nach operativen Interventionen.
- 2) Die Aufzeichnung einer unveränderten Anzahl von zirkulierenden Melanomzellen vor und nach der operativen Behandlung und zwar unabhängig von der Art der Behandlung sowie
- 3) Die Aufzeichnung einer schlechteren Prognose und die erhöhte Häufigkeit von Metastasen bei denjenigen wenigen Patienten, die sich in mehr als einer Messung ständig als positiv erwiesen haben, ohne dass diese Patienten sich von den übrigen Patienten

unterscheiden, sowohl anhand ihrer demografischen Merkmale und Abmessungen als auch der Art der Therapie.

Aus einem bestimmten Grund muss die Menge der Zellen in ihrer Blutbahn so hoch sein, dass sie die Empfindlichkeitsgrenzwerte unseres Messverfahrens überschreitet und die Patienten aus diesem Grund bei den wiederholten Messungen als positiv hervorgehen, was indirekt die schlechtere Prognose bei diesen Patienten erklärt.

Die Ermittlung der Gene Tyrosinase und MelanA/Mart1 durch RT-PCR ist eine nichtinvasive Methode, die für die Planung des Follow-ups und die Identifizierung von Patienten, die möglicherweise eine ergänzende regelmäßige Therapie brauchen, angewendet werden könnte.

## 13. Literature

1. The Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS) randomized trial of pre-enucleation radiation of large choroidal melanoma II: initial mortality findings. COMS report no. 10. *Am J Ophthalmol* 1998;125:779-96.
2. Stangkos N. *Clinical Ophthalmology*: University Studio Press, 2002.
3. Boissy RE. The melanocyte. Its structure, function, and subpopulations in skin, eyes, and hair. *Dermatol Clin* 1988;6:161-73.
4. Ragnarsson-Olding BK, Nilsson BR, Kanter-Lewensohn LR, et al. Malignant melanoma of the vulva in a nationwide, 25-year study of 219 Swedish females: predictors of survival. *Cancer* 1999;86:1285-93.
5. Belmar-Lopez C, Mancheno-Corvo P, Saornil MA, et al. Uveal vs. cutaneous melanoma. Origins and causes of the differences. *Clin Transl Oncol* 2008;10:137-42.
6. Riley PA. Melanin. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:1235-9.

7. Smith-Thomas L, Richardson P, Thody AJ, et al. Human ocular melanocytes and retinal pigment epithelial cells differ in their melanogenic properties in vivo and in vitro. *Curr Eye Res* 1996;15:1079-91.
8. Riley PA. Melanogenesis and melanoma. *Pigment Cell Res* 2003;16:548-52.
9. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
10. Prescher G, Bornfeld N, Friedrichs W, et al. Cytogenetics of twelve cases of uveal melanoma and patterns of nonrandom anomalies and isochromosome formation. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;80:40-6.
11. Prescher G, Bornfeld N, Hirche H, et al. Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet* 1996;347:1222-5.
12. Sisley K, Rennie IG, Parsons MA, et al. Abnormalities of chromosomes 3 and 8 in posterior uveal melanoma correlate with prognosis. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;19:22-8.
13. Aalto Y, Eriksson L, Seregard S, et al. Concomitant loss of chromosome 3 and whole arm losses and gains of chromosome 1, 6, or 8 in metastasizing primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:313-7.
14. Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, et al. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Res* 2004;64:7205-9.
15. Edmunds SC, Kelsell DP, Hungerford JL, et al. Mutational analysis of selected genes in the TGFbeta, Wnt, pRb, and p53 pathways in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2845-51.
16. Singh AD, Shields CL, Shields JA. Prognostic factors in uveal melanoma. *Melanoma Res* 2001;11:255-63.
17. Henderson E, Margo CE. Iris melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:268-72.
18. Shamma HF, Watzke RC. Bilateral choroidal melanomas. Case report and incidence. *Arch Ophthalmol* 1977;95:617-23.
19. Sturm V, Richard G. [The prevalence of bilateral malignant uveal melanoma]. *Klin Monbl Augenheilkd* 2007;224:770-4.
20. Abdel-Rahman MH, Pilarski R, Ezzat S, et al. Cancer family history characterization in an unselected cohort of 121 patients with uveal melanoma. *Fam Cancer*;9:431-8.
21. Arnesen K. The neural crest origin of uveal melanomas. *Int Ophthalmol* 1985;7:143-7.
22. Singh AD, Kalyani P, Topham A. Estimating the risk of malignant transformation of a choroidal nevus. *Ophthalmology* 2005;112:1784-9.

23. Kujala E, Makitie T, Kivela T. Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4651-9.
24. Diener-West M, Reynolds SM, Agugliaro DJ, et al. Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report No. 26. *Arch Ophthalmol* 2005;123:1639-43.
25. Shields CL, Shields JA, De Potter P, et al. Diffuse choroidal melanoma. Clinical features predictive of metastasis. *Arch Ophthalmol* 1996;114:956-63.
26. Char DH, Phillips T, Daftari I. Proton teletherapy of uveal melanoma. *Int Ophthalmol Clin* 2006;46:41-9.
27. Assessment of metastatic disease status at death in 435 patients with large choroidal melanoma in the Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS): COMS report no. 15. *Arch Ophthalmol* 2001;119:670-6.
28. Petousis V. Indikationen und Limitierungen der transskleralen Tumorresektion beim Aderhautmelanom. Berlin: Charite Humanmedizinuniversitat 2007.
29. Callender G. Malignant melanotic tumors of the eye. A study of histologic types in 111 cases. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1931:131-140.
30. Zimmermann L. Malignant melanoma of the uveal tract. In Spencer WH (Ed) *Ophthalmic Pathology* WB Saunders Comp, Philadelphia 1986.
31. McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE, et al. Inferred natural history of uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980;19:760-70.
32. Zimmerman LE, McLean IW, Foster WD. Does enucleation of the eye containing a malignant melanoma prevent or accelerate the dissemination of tumour cells. *Br J Ophthalmol* 1978;62:420-5.
33. Zimmerman LE, McLean IW. An evaluation of enucleation in the management of uveal melanomas. *Am J Ophthalmol* 1979;87:741-60.
34. Zelen M. A hypothesis for the natural time history of breast cancer. *Cancer Res* 1968;28:207-16.
35. McLean MM. Unpublished observations from the Cancer Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program.
36. Zimmerman LE, McLean IW. Metastatic disease from untreated uveal melanomas. *Am J Ophthalmol* 1979;88:524-34.
37. Schwartz M. A biomathematical approach to clinical tumor growth. *Cancer* 1961;14:1272-94.

38. DeVita V. Cancer: principle and practise of oncology. 5th edition. Principles of cancer managment; chemotherapy. Philadelphia Lippincott-Raven, 1997.
39. Augsburger JJ, Gamel JW, Shields JA. Cobalt plaque radiotherapy versus enucleation for posterior uveal melanoma: comparison of survival by prognostic index groups. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1989;87:348-59; discussion 359-61.
40. Gass JD. Comparison of uveal melanoma growth rates with mitotic index and mortality. *Arch Ophthalmol* 1985;103:924-31.
41. Char DH, Kroll S, Phillips TL. Uveal melanoma. Growth rate and prognosis. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1014-8.
42. Augsburger JJ, Gonder JR, Amsel J, et al. Growth rates and doubling times of posterior uveal melanomas. *Ophthalmology* 1984;91:1709-15.
43. Eskelin S, Pyrhonen S, Summanen P, et al. Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: tumor progression before and after treatment. *Ophthalmology* 2000;107:1443-9.
44. Kramer TR MI, Dithmar S, et all. Vascularization of liver metastase of human uveal melanoma. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:S381.
45. Arbiser JL. Melanoma. Lessons from metastases. *Arch Dermatol* 1998;134:1027-8.
46. Rennie IG. The Ashton Lecture. Uveal melanoma: the past, the present and the future. *Eye* 1997;11 ( Pt 2):255-64.
47. Apte RS, Niederkorn JY, Mayhew E, et al. Angiostatin produced by certain primary uveal melanoma cell lines impedes the development of liver metastases. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1805-9.
48. Folkman J, Beckner K. Angiogenesis imaging. *Acad Radiol* 2000;7:783-5.
49. Jager MJ, Hurks HM, Levitskaya J, et al. HLA expression in uveal melanoma: there is no rule without some exception. *Hum Immunol* 2002;63:444-51.
50. Negroni F. Protonenbestrahlung von Aderhautmelanomen im Hahn-Meitner-Institut Berlin. Berlin: Charite Humanmedizinuniversitat 2003.
51. Moore RF. Choroidal Sarcoma Treated by the Intraocular Insertion of Radon Seeds. *Br J Ophthalmol* 1930;14:145-52.
52. Stallard HB. Radiotherapy for malignant melanoma of the choroid. *Br J Ophthalmol* 1966;50:147-55.
53. Macfaul PA, Bedford MA. Ocular complications after therapeutic irradiation. *Br J Ophthalmol* 1970;54:237-47.

54. MacFaul PA. Local radiotherapy in the treatment of malignant melanoma of the choroid. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1977;97:421-7.
55. Damato B. Developments in the management of uveal melanoma. *Clin Experiment Ophthalmol* 2004;32:639-47.
56. Damato B, Lecuona K. Conservation of eyes with choroidal melanoma by a multimodality approach to treatment: an audit of 1632 patients. *Ophthalmology* 2004;111:977-83
57. Schuler AO, Bornfeld N. [Current therapy aspects of intraocular tumors]. *Ophthalmologie* 2000;97:207-22.
58. Jalkh AE, Trempe CL, Nasrallah FP, et al. Treatment of small choroidal melanomas with photocoagulation. *Ophthalmic Surg* 1988;19:738-42.
59. Oosterhuis JA, Journee-de Korver HG, Kakebeeke-Kemme HM, et al. Transpupillary thermotherapy in choroidal melanomas. *Arch Ophthalmol* 1995;113:315-21.
60. Journee-de Korver JG, Oosterhuis JA, Kakebeeke-Kemme HM, et al. Transpupillary thermotherapy (TTT) by infrared irradiation of choroidal melanoma. *Doc Ophthalmol* 1992;82:185-91.
61. Robertson DM. TTT as rescue treatment for choroidal melanoma not controlled with iodine-125 brachytherapy. *Ocul Immunol Inflamm* 2002;10:247-52.
62. Bechrakis NE, Hocht S, Martus P, et al. Endoresection following proton beam irradiation of large uveal melanomas. *Ophthalmologie* 2004;101:370-6.
63. Damato B, Groenewald C, McGalliard J, et al. Endoresection of choroidal melanoma. *Br J Ophthalmol* 1998;82:213-8.
64. Bechrakis NE, Foerster MH. Neoadjuvant proton beam radiotherapy combined with subsequent endoresection of choroidal melanomas. *Int Ophthalmol Clin* 2006;46:95-107.
65. Foulds WS, Damato BE. Alternatives to enucleation in the management of choroidal melanoma. *Aust N Z J Ophthalmol* 1986;14:19-27.
66. Schmittel A, Bechrakis NE, Martus P, et al. Independent prognostic factors for distant metastases and survival in patients with primary uveal melanoma. *Eur J Cancer* 2004;40:2389-95.
67. Egan KM, Seddon JM, Glynn RJ, et al. Epidemiologic aspects of uveal melanoma. *Surv Ophthalmol* 1988;32:239-51.
68. Li W, Gragoudas ES, Egan KM. Tumor basal area and metastatic death after proton beam irradiation for choroidal melanoma. *Arch Ophthalmol* 2003;121:68-72.
69. Hogan MJ ZL. *Ophthalmic Pathology. An Atlas and Textbook.* 1962.

70. Rones B, Zimmerman LE. The prognosis of primary tumors of the iris treated by iridectomy. *AMA Arch Ophthalmol* 1958;60:193-205.
71. Shields CL, Shields JA, Materin M, et al. Iris melanoma: risk factors for metastasis in 169 consecutive patients. *Ophthalmology* 2001;108:172-8.
72. Gunduz K, Shields CL, Shields JA, et al. Plaque radiotherapy of uveal melanoma with predominant ciliary body involvement. *Arch Ophthalmol* 1999;117:170-7.
73. Seddon JM, Albert DM, Lavin PT, et al. A prognostic factor study of disease-free interval and survival following enucleation for uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 1983;101:1894-9.
74. McLean MJ, Foster WD, Zimmerman LE. Prognostic factors in small malignant melanomas of choroid and ciliary body. *Arch Ophthalmol* 1977;95:48-58.
75. Diener-West M, Hawkins BS, Markowitz JA, et al. A review of mortality from choroidal melanoma. II. A meta-analysis of 5-year mortality rates following enucleation, 1966 through 1988. *Arch Ophthalmol* 1992;110:245-50.
76. Shamma HF, Blodi FC. Prognostic factors in choroidal and ciliary body melanomas. *Arch Ophthalmol* 1977;95:63-9.
77. Histopathologic characteristics of uveal melanomas in eyes enucleated from the Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report no. 6. *Am J Ophthalmol* 1998;125:745-66.
78. Seddon JM, Gragoudas ES, Egan KM, et al. Relative survival rates after alternative therapies for uveal melanoma. *Ophthalmology* 1990;97:769-77.
79. Kroll S, Char DH, Quivey J, et al. A comparison of cause-specific melanoma mortality and all-cause mortality in survival analyses after radiation treatment for uveal melanoma. *Ophthalmology* 1998;105:2035-45.
80. Straatsma BR, Fine SL, Earle JD, et al. Enucleation versus plaque irradiation for choroidal melanoma. *Ophthalmology* 1988;95:1000-4.
81. McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE, et al. Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology. *Am J Ophthalmol* 1983;96:502-9.
82. McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE. Uveal melanoma: location, size, cell type, and enucleation as risk factors in metastasis. *Hum Pathol* 1982;13:123-32.
83. Gamel JW, McCurdy JB, McLean IW. A comparison of prognostic covariates for uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:1919-22.

84. Seddon JM, Polivogianis L, Hsieh CC, et al. Death from uveal melanoma. Number of epithelioid cells and inverse SD of nucleolar area as prognostic factors. *Arch Ophthalmol* 1987;105:801-6.
85. Folberg R, Rummelt V, Parys-Van Ginderdeuren R, et al. The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma. *Ophthalmology* 1993;100:1389-98.
86. Rummelt V, Folberg R, Woolson RF, et al. Relation between the microcirculation architecture and the aggressive behavior of ciliary body melanomas. *Ophthalmology* 1995;102:844-51.
87. de la Cruz PO, Jr., Specht CS, McLean IW. Lymphocytic infiltration in uveal malignant melanoma. *Cancer* 1990;65:112-5.
88. Durie FH, Campbell AM, Lee WR, et al. Analysis of lymphocytic infiltration in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:2106-10.
89. Keilholz U, Goldin-Lang P, Bechrakis NE, et al. Quantitative detection of circulating tumor cells in cutaneous and ocular melanoma and quality assessment by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 2004;10:1605-12.
90. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
91. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006;1:581-5.
92. Max N, Willhauck M, Wolf K, et al. Reliability of PCR-based detection of occult tumour cells: lessons from real-time RT-PCR. *Melanoma Res* 2001;11:371-8.
93. Keilholz U, Willhauck M, Scheibenbogen C, et al. Polymerase chain reaction detection of circulating tumour cells. EORTC Melanoma Cooperative Group, Immunotherapy Subgroup. *Melanoma Res* 1997;7 Suppl 2:S133-41.
94. Hoon DS, Bostick P, Kuo C, et al. Molecular markers in blood as surrogate prognostic indicators of melanoma recurrence. *Cancer Res* 2000;60:2253-7.
95. Voit C, Kron M, Rademaker J, et al. Molecular staging in stage II and III melanoma patients and its effect on long-term survival. *J Clin Oncol* 2005;23:1218-27.
96. Schuster R, Bechrakis NE, Stroux A, et al. Circulating tumor cells as prognostic factor for distant metastases and survival in patients with primary uveal melanoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:1171-8.

97. Pinzani P, Mazzini C, Salvianti F, et al. Tyrosinase mRNA levels in the blood of uveal melanoma patients: correlation with the number of circulating tumor cells and tumor progression. *Melanoma Res*.
98. Fernandes BF, Antecká E, dos Passos G, et al. [Detection of circulating malignant cells in patients with uveal melanoma]. *Arq Bras Oftalmol* 2007;70:593-8.
99. Hanekom GS, Stubbings HM, Johnson CA, et al. The detection of circulating melanoma cells correlates with tumour thickness and ulceration but is not predictive of metastasis for patients with primary melanoma. *Melanoma Res* 1999;9:465-73.
100. Kodjikian L, Roy P, Rouberol F, et al. Survival after proton-beam irradiation of uveal melanomas. *Am J Ophthalmol* 2004;137:1002-10.
101. Faries MB, Wanek LA, Elashoff D, et al. Predictors of occult nodal metastasis in patients with thin melanoma. *Arch Surg*;145:137-42.
102. Li W, Gragoudas ES, Egan KM. Metastatic melanoma death rates by anatomic site after proton beam irradiation for uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1066-70.
103. Suesskind D, Ulmer A, Schiebel U, et al. Circulating melanoma cells in peripheral blood of patients with uveal melanoma before and after different therapies and association with prognostic parameters: a pilot study. *Acta Ophthalmol* 2009.
104. Boldin I, Langmann G, Richtig E, et al. Five-year results of prognostic value of tyrosinase in peripheral blood of uveal melanoma patients. *Melanoma Res* 2005;15:503-7.

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Manolis Bechrakis, der an mich geglaubt hat, Herrn Professor Nikolaos Bechrakis, der mir den Weg in die Augenheilkunde gezeigt hat und Herrn Professor Michael Foerster, der mir vom ersten Tag an sein Vertrauen entgegengebracht hat.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Konstantinos Savvatis, der auf jeder meiner Fragen immer eine Antwort hatte, sowie Herrn Dr. Vasileios Petousis für die ständige Motivation.

Für die Beurteilung des hämatologischen Teils der Studie möchte ich Herrn Professor U. Keilholz und Frau Dr. R. Schuster danken.

Für die aufmerksame sprachliche Überprüfung des Textes danke ich Frau Maria Nikolopoulou.

Inbesondere möchte ich mich bei meinen Eltern dafür bedanken, dass sie mir immer beistehen.

## Erklärung

„Ich, **Georgios Charitoudis** erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: **Tumorzellen-Zirkulation in der Blutbahn vor und nach operativen Behandlungen von Patienten mit Aderhautmelanom. Einflussfaktoren und Metastaserate**, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. Bitte scannen Sie auch keine Unterschriften ein.