

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

DISSERTATION

Die Bedeutung der Tyrosinase RT-PCR aus dem Sentinel Node
bzw. dem Blut beim malignen Melanom in Kombination mit der
ultraschallgesteuerten Feinnadeldiagnostik

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mathias Küsel

aus Karlsruhe

Gutachter/in: 1.: Priv.-Doz. Dr. med. Chr. Voit
2.: Prof. Dr. med. U. Keilholz
3.: Prof. Dr. med. R. Herbst

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einleitung.....	7
1.1 Epidemiologie des malignen Melanoms.....	7
1.2 Klinik und Prognose	8
1.3 Diagnostik	10
1.3.1 Klinische Untersuchung.....	10
1.3.2 Wächterlymphknotenbiopsie	12
1.3.3 Sonographie	13
1.3.4 FNAC.....	14
1.3.5 Tyrosinase RT-PCR in Lymphknoten und peripherem Blut	15
1.3.6 Alternative Diagnostik.....	16
1.4 Studienziel	16
2. Patienten, Material und Methoden.....	18
2.1 Patienten.....	18
2.2 Diagnostischer Evaluierungsgang.....	20
2.3 Methoden	21
2.3.1 Präoperativer Ultraschall (in vivo Ultraschall)	21
2.3.2 Ultraschall des WLK im OP-Saal nach Exstirpation (ex vivo Ultraschall)	23
2.3.4 FNAC.....	23
2.3.5 Histologie und Immunhistologie.....	25
2.3.6 Tyrosinase RT-PCR	27
2.3.7 Statistik.....	29
2.3.8 Follow-Up	29
3. Ergebnisse.....	30
3.1 Patienten- und Tumorcharakteristika	30
3.2 Ultraschall	31
3.2.1 Präoperativer Ultraschall	31
3.2.2 Ex vivo (in vitro) Ultraschall	33
3.3 FNAC	33
3.4 RT-PCR	34
3.4.1 Tyrosinase RT-PCR der Feinnadel-Aspirate (FNA-PCR)	34

3.4.2 Tyrosinase RT-PCR aus dem peripheren Blut	35
3.5 Histologie	38
3.6 Follow-Up und Überleben	42
3.7 Fallbeispiele und Bilder zur Darstellung der sonographischen Morphologie	49
4. Diskussion	58
5. Zusammenfassung	67
6. Literaturverzeichnis	68
7. Anhang	78
7.1 Graphiken und Tabellen	78
7.2 Danksagung	86
7.3 Publikation	86
7.4 Lebenslauf	86
7.5 Erklärung	87

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
µg	Mikrogramm [= 10 ⁻⁶ Gramm]
ABCD-Regel	A-Asymmetrie, B-Begrenzung, C-Farbe, D-Durchmesser
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	Akrolentiginöses Melanom
AWMF	A rbeitsgemeinschaft der W issenschaftlichen M edizinischen F achgesellschaftene.V.
CA	Carcinom
ca.	circa
CDS	colour coded Doppler Ultrasound
cm	Centimeter
CT	Computertomographie
Def	Definition
DTIC	<u>D</u> imethyl <u>t</u> riazen <u>i</u> midazol <u>c</u> arboxamid (=Dacarbazin)
ELND	elective lymph node dissection (=elektive LKD)
FDG	Fluor-Desoxyglucose
fn	falsch negativ
fp	falsch positiv
GLUT	Glukosetransporter
HE	Hämatoxylin Eosin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ITM	in-transit-Metastasen
JÜR	Jahres-Überlebensrate
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
LMM	Lentigo maligna Melanom
mg	Milligramm
MIA	Melanoma inhibitory activity
min	Minute

ml	Milliliter
MM	Malignes Melanom
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
NMM	Nodulär malignes Melanom
NPV	Negativ predictive value (=Negativer prädiktiver Wert)
PET	Positronen-Emissionstomographie
PPV	positive predictive value (=Positiver prädiktiver Wert)
PS	pretreatment performance status
rn	richtig negativ
RöTh	Röntgen-Thorax
rp	richtig positiv
sec	Sekunde
SLN	Sentinel lymph node (=Wächterlymphknoten)
SLND	Sentinel lymph node dissection (= WLK-Entfernung)
SM	Satellitenmetastasen
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
TLND	therapeutic lymph node dissection (=therapeutische Lymphknotenausräumung)
TNM	Tumour-Nodalstatus-Metastasis-Klassifikation nach UICC
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
US	Ultraschall
UV	Ultraviolett
vs.	versus
WLK	Wächterlymphknoten
WLKD	Wächterlymphknoten-Dissektion

1. Einleitung

Das Melanom ist ein sehr aggressiver, vom melanozytären Zellsystem ausgehender Tumor und zählt mittlerweile zu den 10 häufigsten soliden Tumorentitäten [1]. Überwiegend manifestiert es sich an der Haut, darüber hinaus können aber auch mukocutane oder extracutane Lokalisationen wie z.B. die Speiseröhre [2, 3], die Aderhaut [4] sowie die Gallenwege und die Gallenblase [5, 6] betroffen sein. Bezüglich des Verteilungsmusters finden sich die meisten Melanome beim Mann am Stamm (55%), während bei der Frau überwiegend die untere Extremität betroffen ist (45%). Neben den meist stark pigmentierten Melanomen kommen auch amelanotische Formen vor. Im Verhältnis zur Tumormasse besteht eine frühe Tendenz zur lymphogenen und hämatogenen Metastasierung und damit einhergehend eine ungünstige Prognose. Trotz erheblicher Forschungs-Anstrengungen auf dem Gebiet der Therapieoptionen (Chemotherapie, Immuntherapie, Strahlentherapie, Vakzinierung, Gentherapie) bleibt die operative Intervention nach wie vor der einzige kurative Ansatz in der Behandlung des malignen Melanoms.

Zielführend ist daher eine frühzeitige Erkennung des Primärtumors bzw. seiner lokoregionären Metastasen, bevor Fernmetastasen auftreten, insbesondere auch im Rahmen der Nachsorge der Melanompatienten. Patienten mit Fernmetastasierung (Stadium IV) haben eine mittlere Überlebensrate von 6 Monaten und damit eine infauste Prognose. Dieses ist umso wichtiger, da bislang für dieses Stadium IV keine effektiven allgemeingültigen Therapien gefunden wurden; unter Darcabacin-Chemotherapie, die immer noch die Standardtherapie darstellt, liegen die Ansprechraten bei nur 6-12%.

1.1 Epidemiologie des Malignen Melanoms

Die Inzidenz des Melanoms in Deutschland hat in den letzten Jahren schneller als bei allen anderen Tumorentitäten zugenommen und sich von den 70er Jahren bis Mitte der 90er Jahre nahezu verdoppelt [7]. Nach Angaben des Krebsregisters Schleswig-Holstein (2002) werden im Jahr 31 Neuerkrankungen/100.000 Einwohner gemeldet, wobei es hinsichtlich der Geschlechterverteilung keine signifikanten Unterschiede gibt.

Der höchste Anstieg der Inzidenz liegt bei der Altersgruppe > 60 Jahre. Allerdings ist zunehmend auch ein größerer Anteil jüngerer Erwachsener betroffen [8], was sich neben den enormen Kosten für das Gesundheitswesen auch ökonomisch durch Verlust von Lebens- bzw. Arbeitsjahren negativ auswirkt. Allein im Jahr 2002 gingen in Deutschland 9060 Erwerbstätigenjahre aufgrund verminderter Erwerbsfähigkeit durch ein malignes Melanom verloren [9].

Als Haupt-Risikofaktoren für die Entstehung eines Melanoms werden Charakteristika der Pigmentierung wie helle Hautfarbe, eine große Anzahl gewöhnlicher melanozytäre Nävi oder das Vorhandensein von atypischen Nävi [10] sowie Sonnenlicht angesehen. Bei der UV-Belastung (Sonnenlicht, Solarien) der Haut scheinen aber weitere Faktoren wie der Melanocortin-1-Rezeptor (assoziiert mit heller Haut und roten respektive blonden Haaren), Wohnortnähe europäisch abstammender Weißer zum Äquator und intermittierende (im Gegensatz zu chronisch-kummulierende) Exposition hoher UV-Dosen insbesondere in der Kindheit bei der Melanomentstehung eine entscheidende Rolle zu spielen [11, 12]. Bei einem kleineren Anteil der Melanompatienten sind erbliche Mutationen der CDKN2A- und CDK4-Gene beschrieben worden [11, 13]. Auch immunologische Faktoren beeinflussen den Tumor, was sich unter anderem bei Immunsuppression bzw. Spontanremissionen zeigt [14].

1.2 Klinik und Prognose

Das Melanom lässt sich klinisch und histologisch in verschiedene Typen einteilen. Am häufigsten wird das superfiziell spreitende Melanom (SSM) mit ca. 55% diagnostiziert (siehe Abbildung 1), gefolgt vom nodulären Melanom (NM) mit 20%, dem Lentigo-maligna-Melanom (LMM) mit 9% sowie dem akrolentiginösem Melanom (ALM) mit 4%. Neben nicht-klassifizierbaren Melanomen und Mischformen gibt es klinische Sonderformen, wie nävoide Melanome, Aderhaut-Melanome, amelanotische Melanome, desmoplastische Melanome, Schleimhautmelanome oder extracutane Melanome (ca. 5% aller Melanome).



Abbildung 1: Superfiziell spreitendes Melanom mit nodulären Anteilen

In 90% der Erkrankungen wird das primäre Melanom ohne erkennbare Metastasierung diagnostiziert. Hier gelten die vertikale Tumordicke nach Breslow [15], gefolgt vom Vorhandensein histologisch erkennbarer Ulzerationen sowie der Invasionslevel nach Clark [16] als wichtigste prognostische Faktoren. Die 10-Jahres-Überlebensrate im Gesamtkollektiv beträgt ohne Metastasierung 43% - 96% nach dem American Joint Committee on Cancer 2001 (AJCC) [17, 18]. Jede Metastasierung reduziert die 10-Jahres-Überlebensrate auf weniger als 10%.

Die Metastasierung kann primär lymphogen als auch primär hämatogen erfolgen. Man unterscheidet zwischen regionärem Lymphabflussgebiet (Satellitenmetastasen und Intransit-Metastasen), regionären Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen, wobei die Anzahl und das Volumen der betroffenen regionären Lymphknoten im Abstromgebiet die wichtigsten Prognosefaktoren darstellen [19]. In ca. 70% der Fälle metastasiert das Melanom zunächst lokoregionär (als Satellitenmetastasen (SM), intransit-Metastasen (ITM) oder lokoregionäre Lymphknotenmetastasen) [20]. Der Nachweis von Mikro- bzw. Makrometastasen im Wächterlymphknoten (engl.: sentinel lymph node = SLN) nimmt einen besonderen Stellenwert bei der Festlegung des weiteren Procedere ein [21].

Liegen Fernmetastasen vor (entsprechend Stadium IV der TNM-Klassifikation), gilt die Prognose als infaust mit einer mittleren Überlebenszeit zwischen 6 und 9 Monate. Nach Keilholz et al. zeigen der Ort der Fernmetastasen und die Anzahl der Metastasen (Basis

der M-Subkategorie des neuen AJCC Staging Systems) einen geringen, aber nicht signifikanten Einfluß in der Relation zwischen Metastasierungsmuster und Überlebenszeit. Als signifikante Prädiktoren für die Überlebenszeit bei Stadium IV-Melanom-Patienten werden pretreatment performance status (PS), die LDH und die Tumormasse beschrieben [22].

1.3 Diagnostik

1.3.1 Klinische Untersuchung

Die klinische Untersuchung des auffälligen Nävus basiert auf der ABCDE-Regel für die Haut (**A**symmetrie, unscharfe und unregelmäßige **B**egrenzung, unterschiedliches **C**olorit, **D**urchmesser > 5mm, rasche **E**volution/Vergrößerung in den letzten 3 Monaten). Durch die Dermatoskopie (Auflichtmikroskopie) kann die Sensitivität der klinischen Beurteilung des auffälligen Nävus um bis zu 35% auf 89% gesteigert werden, die Spezifität liegt bei 79% [23, 24]. Darüber hinaus können hierdurch unnötige Exzisionen von richtig diagnostizierten benignen Pigmentnävi vermieden werden.

Bei ausreichendem Verdacht erfolgt die Exzision des Hauttumors und die histologische Sicherung der Diagnose mit Bestimmung der Tumordicke nach Breslow, einer möglichen, die Prognose verschlechternden Tumorulzeration und der Invasionstiefe nach Clark. Die histopathologische Diagnose gründet sich auf die morphologischen Merkmale des Tumors in der HE-Färbung. In einigen Fällen kann die immunhistologische Markierung mit S-100 Protein, HMB-45, NKI/C3, Melan-A oder MIB-1 hilfreich sein. Als zusätzlicher Parameter wird auch die Regression aufgeführt. Bei der Regression handelt es sich um ein Phänomen mit Beteiligung zytotoxischer Lymphozyten und betrifft den superfiziellen vaskulären Plexus, ein verdicktes Stratum papillare und die Epidermis. Morphologisch ist die Regression durch eine Fibrose und Melanose gekennzeichnet. Je nach Ausprägung spricht man von einer fokalen, partiellen bzw. kompletten Regression. Entgegen früheren Meinungen bleibt die Regression jedoch ohne prognostische Relevanz [25, 26].

In Kenntnis der Tumordicke (Td) erfolgt dann die Nachexzision mit dem empfohlenen Sicherheitsabstand (Tabelle 1) sowie zusätzlich die SLND bei einer Td > 1mm.

Aufgrund der derzeitigen Studienlage haben die Sicherheitsabstände keinen entscheidenden Einfluss auf das Risiko einer Fernmetastasierung, jedoch wohl auf die Häufigkeit lokoregionärer Rezidive. Bei zunehmender Tumorgöße und kleineren Sicherheitsabständen ist das Risiko von lokalen Satelliten-Metastasen in unmittelbarer Umgebung zum Primärtumor zunehmend erhöht [27].

Tabelle 1: Empfehlungen zu Sicherheitsabstände bei der Melanomexzision [28]

Tumordicke nach Breslow	Sicherheitsabstand
In situ Melanome	0,5 cm
< 2,0 mm	1,0 cm
≥ 2,0 mm	2,0 cm

Der Wert einer weiterführenden Ausbreitungsdiagnostik (Primärstaging) ist umstritten. Nach der deutschen Leitlinie malignes Melanom (Tabelle 2) soll bei einer Tumordicke > 1mm bzw. kann bei dünneren Melanomen eine zusätzliche Diagnostik mittels Lymphknoten-sonographie des regionären Abflusses, Röntgen-Thorax, Sonographie des Abdomens und Labor (BSG, Blutbild, LDH, alkalische Phosphatase und Protein S 100) erfolgen. Bei Risikopatienten müssen weitere Maßnahmen wie CT, MRT-Schädel, PET etc. erwogen werden. Die negativen Konsequenzen einer vermehrten Diagnostik sind erhöhte Kosten und Ängste bei den Patienten. Vor diesem Hintergrund muss kritisch beurteilt werden, welche weitere Untersuchungsmethoden nach der Diagnose eines malignen Melanoms nützlich und durchführbar sind [29, 30].

Tabelle 2: Empfehlungen für die Nachsorge kutaner maligner Melanome der AMWF, Stand 2005. Das Nachsorgeintervall ist in Monaten angegeben.

Stadium und Tumordicke	Körperliche Untersuchung im 1. – 5. Jahr	Körperliche Untersuchung im 6. – 10. Jahr	Lymphknoten-sonographie im 1. – 5. Jahr	Blutuntersuchung Protein S-100 im 1. – 5. Jahr	Bildgebende Untersuchung im 1. – 5. Jahr
I (≤ 1 mm)	6	12	Keine	Keine	Keine
I + II (> 1 mm)	3	6-12	6	3-6	Keine
III	3	6	3-6	3-6	6
IV	Individuell				

1.3.2 Wächterlymphknotenbiopsie

Die Methode der früher regelmäßig durchgeführten elektiven Lymphknotendissektion (ELND) wurde nach Einführung der Wächterlymphknotenbiopsie (WLKB bzw. SLNB= sentinel lymph node biopsy oder SLND= sentinel lymph node dissection) durch Morton im Jahr 1992 weitgehend verlassen [31]. Lediglich bei einem primären Melanom im Kopf-Hals-Bereich kann aufgrund der besonderen Gegebenheiten der Lymphabstrombahnen alternativ zur WLKB die selektive neck dissection und/oder Parotidektomie erwogen werden. Die früher vertretene radikale Behandlung des malignen Melanoms am Kopf und Halsbereich mit ausgedehnter Tumorexzision und radikaler neck dissection gilt bei diesem durch endogene wie exogene Faktoren beeinflussten immunogenen malignen Tumor als nicht länger gerechtfertigt [7]. Als Wächterlymphknoten (WLK bzw. SN = sentinel node) wird der erste drainierende Lymphknoten im Lymphabstromgebiet bezeichnet. Multicenterstudien belegen eine eindeutige Korrelation zwischen dem Status des WLK und der rezidivfreien Überlebenszeit [32-34]. Auch zwischen Tumordicke und Häufigkeit des WLK-Befalls besteht eine positive Korrelation, allerdings können auch bei bereits deutlich dünneren Melanomen (ab 0,35mm ca. 1,5%) Wächterlymphknoten befallen sein. Fallstricke bei der WLKB liegen zum Einen in der Unerfahrenheit des Operateurs (Exstirpation des falschen LK), aber auch in der noch relativ wenig standardisierten histologischen Lymphknotenaufarbeitung und der damit verbundenen Gefahr des Übersehens von Mikrometastasen [35]. Nach dem Göttinger Protokoll werden eine ausreichend hohe Anzahl von Serienschnitten und zusätzlich zur HE-Färbung die immunhistochemische Aufarbeitung mittels S-100, HMB-45 und Melan A / MART-1 gefordert. Starz führte darüber hinaus die mikromorphometrische S-Klassifikation des WLK ein [36], die eine Risikoabschätzung nachgeschalteter regionärer LKs wie auch von Fernmetastasen und damit eine Prognose für das Gesamtüberleben ermöglichen soll. Hierbei wird die Eindringtiefe der Melanomzellen, gemessen von der Innenseite der LK-Kapsel, in drei Klassen eingeteilt (S1-Befund bis 0,3mm, S2-Befund 0,31 bis 1mm und S3-Befund > 1mm). 86% der Metastasen sind subcapsulär lokalisiert. Dies sollte bei unvollständiger Exzision bzw. operativ bedingten Kauterartefakten berücksichtigt werden [37].

In einer aktuellen Studie von van Akkooi wird hingegen allein die Tumormasse als signifikanter prognostischer Faktor für positive post-SN dargestellt [38]. Weder Starz-

Klassifikation, Tumordicke nach Breslow, Clark-Level, Alter noch Geschlecht zeigten in der Studie einen signifikanten Vorhersagewert.

Bei WLK-negativen Patienten ergeben sich keine weiteren therapeutischen Konsequenzen. Bei WLK-positiven Patienten wird die totale Lymphadenektomie der entsprechenden Lymphknotenstationen aus Sicherheitsgründen empfohlen, wenngleich ein prognostischer Vorteil durch bisherige Studien nicht gesichert werden konnte.

1.3.3 Sonographie

Mit Hilfe der hochauflösenden Sonographie der Haut (20, 75 und 100 MHz) kann die Tumordicke des Primärtumors bestimmt werden, wobei die Genauigkeit mit den histologischen Untersuchungen vergleichbar ist [39-41]. Allerdings sind die Ergebnisse ab einer Tumordicke > 0,76mm genauer als bei dünneren Melanomen [42]. Gefäßneubildung werden dabei überwiegend in primären Melanomen mit Tumordicke >> 1mm beobachtet [43].

Ultraschall wird sowohl für das präoperative Staging wie auch für das postoperative Monitoring bei Patienten mit malignem Melanom empfohlen [44]. Ca. 50% der ersten Metastasen liegen außerhalb des Lymphknotensystems (SM+ITM: 22% ; FM: 28%) und würden somit durch eine alleinige Wächterlymphknotenbiopsie nicht detektiert werden [20]. Der präoperative Ultraschall (7,5 – 14 MHz) ermöglicht die Identifikation von WLK und ist deshalb eine wichtige zusätzliche Methode zur Lymphszintigraphie [45, 46]. Unstrittig ist die zusätzliche diagnostische Sicherheit der Sonographie von Lymphknotenmetastasen sowie Satelliten- und Intransit-Metastasen gegenüber der Palpation bzw. klinischen Untersuchung allein [47-50]. Durch die sich ständig verbessernde Technologie können deshalb selbst kleinste Raumforderungen von 3mm³ Volumen dargestellt, gemessen und quantifiziert werden. Verbessert wird die diagnostische Genauigkeit gegenüber der konventionellen Sonographie weiter durch die Farbdopplersonographie (CDS) regionaler LK-Metastasen, wobei die Ausmessung der Dopplerkurven und die Berechnung der Pulsatilität sowie der Widerstand-Indizes aber zeitraubend sind und nur einen fraglichen weiteren diagnostischen Gewinn erbringen [51, 52]. Die Verwendung eines D-Galaktose-basierten Signalverstärkers bei der CDS hat sich als interessantes Diagnostikum zur verbesserten Unterscheidung

zwischen malignen und reaktiven Lymphknoten erwiesen und dürfte seinen speziellen Wert darin haben, unnötige Exstirpationen von kleinen reaktiven Lymphknoten zu vermeiden [53]. Dieses gilt natürlich für diejenigen Diagnostiker, die keine FNAC einsetzen. Bei der Verwendung der CDS (insbesondere des Power Mode) hat sich vor allem die periphere Perfusion der Läsionen als frühester und prognostischer Parameter heraus kristallisiert (eingereicht für ASCO 2009).

Zusammenfassend ermöglicht die Sonographie der Lymphknoten und Metastasen eine vorteilhafte Kombination aus diagnostischer Durchführbarkeit, Genauigkeit, wirtschaftlicher Möglichkeit und Patienten-Akzeptanz [54]. Sie zeichnet sich gerade in der Nachsorge von Melanompatienten mit einem positiven Einfluss auf die Gesamtüberlebensrate aus [55]. Neben den technischen Voraussetzungen ist jedoch die Erfahrung des Untersuchers entscheidend für die Spezifität bzw. Sensitivität der Methode.

1.3.4 FNAC

Die Feinnadelaspirationszytologie (FNAC) stellt eine sichere, schnelle und technisch einfache diagnostische Methode zur Sicherung einer malignen Raumforderung dar. Ihre hohe Sensitivität und Spezifität wurde in zahlreichen Studien belegt [56-61]. Bei Melanompatienten wird diese Methode jedoch bis heute nur selten angewendet, ist jedoch im Rahmen der Nachsorge bereits aufgrund ermutigender Ergebnisse mit hoher Spezifität und Sensitivität anerkannt [58]. Im präoperativen Staging wird diese Methode (FNAC beim WLK) erstaunlich selten umgesetzt. Nach Voit et al. ist die FNAC eine sehr zuverlässige Methode in der frühen Erkennung von Melanom-Metastasen [62, 63] und kann in 16% aller untersuchten Fälle die geplante Durchführung einer WLKB vermeiden [64]. Dies konnte auch in neueren Studien bestätigt werden [65]. Technische Grenzen bestehen insbesondere beim Nachweis von zum Teil nur immunhistochemisch nachweisbaren Mikrometastasen bzw. nekrotischen Läsionen. [66]. Darüber hinaus bedarf es einer gewissen Routine, die Zytologie von Melanomzellen im Ausstrichpräparat sicher beurteilen zu können.

1.3.5 Tyrosinase RT-PCR in Lymphknoten und peripherem Blut

Bisher gilt die Wächterlymphknotenpositivität als der wichtigste prognostische Faktor für das tumor-assoziierte Überleben. Hinsichtlich der Erkennung von Mikrometastasen bzw. Melanomzellen sind den derzeitigen diagnostischen Möglichkeiten, einschließlich der histologischen Beurteilung der LK, Grenzen gesetzt (die falsch-negative Rate bei der WLKB liegt bei ca. 12%). Zur Schließung dieser diagnostischen Lücke wird seit langem nach einem hoch sensitiven und darüber hinaus spezifischen Tumor-Marker gesucht. Keiner der bisher verwendeten Marker kann diese Voraussetzungen bisher erfüllen. Gegenwärtig wird lediglich S100 β zur Früherkennung tumorfreier Patienten bzw. Verlaufskontrolle bei Metastasierung empfohlen. Im Stadium der Fernmetastasierung kann zusätzlich LDH bzw. MIA optional bestimmt werden. Bei allen diesen Markern ist jedoch eine hohe Rate an falsch positiven Werten zu verzeichnen, die unnötige Ausgaben für diagnostische Radiologie nach sich zieht. Zudem sind dies keine frühen Marker – d.h. sie sind erst bei Vorliegen höherer Tumor-Stadien positiv. Somit sind diese Prädiktoren aufgrund fehlender Therapieoptionen im Stadium IV nicht lebensverlängernd. Oft haben die Patienten im Stadium III mit sonographisch bereits sichtbaren LK-Filiae einen normalen MIA-Wert, was vermutlich auf eine geringe Tumorlast durch die Metastasen zurückzuführen ist.

Ein weiterer Marker wurde durch den Nachweis von melanom-assoziiierter mRNA-Sequenzen der Tyrosinase auf Basis der Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) verfügbar [67]. Der Nachweis von Tyrosinase RT-PCR ist sowohl im nativen Lymphknotengewebe, in FNAC-Aspiraten, histologischen Paraffinschnitten sowie im peripheren Blut möglich. Diese RT-PCR zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus [68], allerdings gibt es widersprüchliche Studienergebnisse in puncto der Spezifität. Der Wert der RT-PCR Bestimmung im Wächterlymphknoten wird nach wie vor kontrovers diskutiert [69-73].

Die RT-PCR ist dabei ebenfalls in der Lage einzelne Tumorzellen nachzuweisen. Deren klinischer Wert ist jedoch unklar, da bekannt ist, dass nicht jede nachgewiesene vitale Tumorzelle sich stets in ein Rezidiv verwandelt. Das Gros der Zellen wird immunologisch zerstört oder geht in das G0-Stadium über, in welchem es über Jahre verweilen kann.

1.3.6 Alternative Diagnostik

Es gibt zahlreiche bildgebende Verfahren; jede für sich mit Vorteilen und Einschränkungen [74]. Sowohl der Röntgen-Thorax wie auch die Thorax-CT sind als Standarduntersuchungen im Rahmen der Erstdiagnose nicht geeignet, da sie einen relativ hohen Anteil von falsch-positiven Befunden liefern [75]. Die Skelettszintigraphie zum Aufdecken von Knochenmetastasen ist lediglich als Screeningmethode im Stadium IV (Fernmetastasierung) geeignet und erfordert bei einem suspekten Befund die Kontrolle mit sensitiveren Methoden wie dem MRT, der PET bzw. dem PET-CT [76, 77]. Die Sensitivität der PET ist bei Läsionen < 1cm begrenzt und eignet sich nicht zum Nachweis mikroskopischer Metastasen. Im Vergleich hierzu ist die Ultraschalldiagnostik deutlich einfacher durchzuführen, weniger zeitaufwendig und darüber hinaus auch deutlich preiswerter [78]. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Ausbreitungsdiagnostik besonderen Indikationen angepasst werden muss, und aufwendige respektive teure Verfahren fortgeschrittenen Stadien vorbehalten bleiben.

1.4 Studienziel

In der vorliegenden prospektiven Studie wird die kombinierte prospektive Anwendung von Ultraschall, FNAC und Bestimmung der Tyrosinase RT-PCR im WLK und begleitend im peripheren Blut im Rahmen der Nachsorge über einen Zeitraum von insgesamt 6 Jahren hinsichtlich folgender Fragen beurteilt:

1. Ist die Bestimmung der Tyrosinase RT-PCR am Lymphknoten und im Blut als frühzeitige Diagnostik hilfreich?
2. Werden die Patienten mit positivem Tyrosinase-RT-PCR Ergebnis im Blut ein verkürztes „overall-survival“ (= Gesamtüberleben) bzw. ein kürzeres „disease-free-survival“ (= krankheitsfreies Intervall) haben?
3. Gibt es eine Korrelation zwischen den histologischen Daten der Metastasen-Lokalisation im WLK (z.B. Tumorlast; Nestgröße) und der Überlebensrate?

4. Wie ist die Prognose von Patienten, die sonographisch unauffällig eingestuft wurden, histologisch jedoch einen positiven Wächterlymphknoten aufwiesen?

5. Die Lymphknoten-Sonographie ist mittlerweile etabliert, fordert aber viel Erfahrung seitens des Untersuchers. Wo liegt die untere Nachweisgrenze von Mikrometastasen? Wie klein war die Grenze histologischer Tumornester, die sonographisch nachgewiesen werden konnten? Gibt es weitere sonomorphologische Parameter, die die Spezifität bzw. Sensitivität der Methode erhöhen können?

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

In dieser Studie wurden 127 konsekutive Patienten eingeschlossen, die für eine WLK-Exzision parallel oder nach Exzision eines Melanoms vorgesehen waren (Rekrutierung des Kollektivs von Juli 2001 bis August 2003; klinische Nachbeobachtungphase bis Ende 2007).

Die Untersuchung wurde gemäß den ethischen Standards nach Kriterien der Deklaration von Helsinki (1964) durchgeführt. Im Vorfeld wurde das schriftliche Einverständnis der zuständigen Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin eingeholt. Der Einschluss der Patienten in die Studie erfolgte im Anschluss an die Entfernung eines malignen Melanoms. Die neue Nomenklatur für Melanompatienten AJCC-2002 Staging System [79] wurde für alle Studienpatienten angewendet. Die histologischen Tumordaten waren dem Untersucher bei vielen Patienten noch nicht bekannt. Im Falle einer benignen Histologie des „Primärtumors“ wurden die Patienten aus dem Studienkollektiv entfernt.

Von diesen n=8 Patienten mit anschließender benigner Histologie des „Primärtumors“ wurde in der Sonographie kein Lymphknoten als maligne erachtet, wobei einige aber reaktive (= „dermopathische“) Lymphknoten aufwiesen, was auf die Operation (Exzision des Primärtumors) zurückgeführt werden kann, die oft eine Anregung im nahegelegenen lymphatischen Geweben nach sich zieht.

Tabelle 3: Patientencharakteristika und Tumorparameter bei Patienten mit malignen Melanom der Haut (n=127 Patienten)

		Patienten n = 127	
Geschlecht:	weiblich	66	(52%)
	männlich	61	(48%)
Alter in Jahren:	median (min-max)	60	(20-88)
Breslow Tumor-Dicke in mm:	median (min-max)	2,1	(0,4-18,0)

	≤1mm	30	(24%)
	>1 to ≤ 2mm	31	(24%)
	>2 to ≤ 4mm	35	(28%)
	>4mm	29	(23%)
	Nicht beurteilbar	2	(1%)
Primärtumor-Lokalisation:	Kopf, Nacken	14	(11%)
	Extremitäten	61	(48%)
	Rumpf	51	(40%)
	unbekannt	1	(1%)
Melanom-Typisierung:	SSM	82	(65%)
	NM	30	(24%)
	LMM	2	(2%)
	ALM	5	(4%)
	andere	8	(6%)
Ulzeration:	Nein	74	(58%)
	Ja	53	(42%)
Regression:	Nein	77	(61%)
	Ja	50	(39%)
Clark Level:	II	1	(1%)
	III	49	(39%)
	IV	65	(51%)
	V	10	(8%)
	unbekannt	2	(1%)
AJCC Staging:	IA	26	(20%)
	IB	20	(16%)
	IIA	18	(14%)
	IIB	21	(17%)
	IIC	6	(5%)
	IIIA	12	(9%)
	IIIB	11	(9%)
	IIIC	13	(10%)

Denjenigen Patienten, die eine Tumordicke nach Breslow unter 1mm und weder Ulzeration noch Regression (prognostisch schlechte, histologische Parameter) aufwiesen, wurde nur auf ausdrücklichen Wunsch der Wächterlymphknoten entfernt. Dieses waren 8/127 Patienten, bei denen sich kein metastatischer Befall zeigte und keine Lymphknoten als sonographisch auffällig erachtet wurden. Tabelle 3 stellt die Patientencharakteristika und Tumorparameter aller n = 127 Patienten dar.

2.2 Diagnostischer Evaluierungsgang

Die Untersuchung der Patienten mit Melanom erfolgte in der Reihenfolge klinische Untersuchung, Lymphabstromszintigraphie (LAS) und Ultraschall. Bei allen Patienten wurde präoperativ eine FNAC des WLK vorgenommen. Das durch Aspiration gewonnene Material wurde hälftig zur Zytologie eingesandt; der für eine RT-PCR vorgesehene Anteil in flüssigem Stickstoff bei -80 Grad Celsius schockgefroren. Das kryokonservierte Aspirat wurde mit der Tyrosinase RT-PCR weiter klassifiziert (s.u.).

Der zu exzidierende Lymphknoten wurde nach vorheriger Applikation von ⁹⁹Technecium intraoperativ anhand einer Gamma-Sonde identifiziert, zusätzlich wurde Patentblau zur intraoperativen Anfärbung der Lymphwege verwendet (s. Abbildung 2).



Abbildung 2: Exstirpiertes, mit Patentblau angefarbter Wächterlymphknoten

Unmittelbar nach der Exzision wurde der Lymphknoten im Vorraum des Operationssaals erneut sonographisch untersucht (im weiteren als ex vivo Ultraschall bezeichnet). Das exzidierte Präparat wurde dann wie folgt aufgearbeitet: Der Hilus und die zuführenden Lymphgefäße wurden biopsiert („ex vivo FNAC“) und der PCR zugeführt. Weiterhin wurde eine FNAC aus dem exstirpierten WLK vorgenommen. Das verbleibende Präparat wurde zeitnah in die Abteilung für Pathologie zur weiteren histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchung verbracht.

2.3 Methoden

2.3.1 Präoperativer Ultraschall (in vivo Ultraschall)

Präoperativ wurden die Patienten mittels hochauflösenden Ultraschalls in der Region des Tumors und dessen Abstrombahn, im regionalen Lymphbecken sowie kontralateral

untersucht. Alle Ultraschalluntersuchungen erfolgten mit dem High-End Gerät TECHNOS® (ESAOTE, Italien), welches mit drei variablen Schallköpfen von Frequenzen zwischen 3,5 und 14 MHz (B-Mode, 30 Bilder pro Sekunde, Farbdoppler, Power Mode) ausgestattet ist; Details der Methode sind entsprechend publiziert [48, 55, 66].

Alle Lymphknoten wurden photodokumentiert, sonographische Besonderheiten erfasst und in ihrer Häufigkeit charakterisiert. Der im Sonogramm als WLK identifizierte Lymphknoten wurde in seiner Größe dreidimensional vermessen und anhand der sonomorphologischen Kriterien in puncto Dignität eingeschätzt. Als Wertungen dienten ‚benigne‘, ‚eher benigne‘, ‚eher maligne‘ und ‚maligne‘. Im ersten Falle wurde charakterisiert, dass eine Malignität des Lymphknotens sonographisch weitestgehend ausgeschlossen werden kann, im Falle einer Validierung als ‚eher benigne‘, dass der Lymphknoten nur ein wenig suspekt erscheint, im Falle ‚eher maligne‘, dass der LK bereits deutlich suspekt, aber eben noch nicht wie eine manifeste Metastase erscheint. Im letzten Fall legt sich der Sonographieur anhand der Befunde fest, dass eine Metastase im LK sonographisch nahezu sicher ist. Die Kriterien für eine vermutete Malignität der LK sind in Tabelle 4 dargestellt. Ein Lymphknoten wurde als sicher malignitätsverdächtig klassifiziert, wenn 3 Diagnose-Kriterien gegeben waren; bei Vorliegen von 2 Kriterien (Tabelle 4) wurde er als „eher maligne“ klassifiziert.

Tabelle 4: Kriterien für sonographische Malignitätsdiagnostik. Ein Lymphknoten wurde als sicher malignitätsverdächtig klassifiziert, wenn 3 Diagnose-Kriterien gegeben waren; bei Vorliegen von 2 Kriterien wurde er als „eher maligne“ klassifiziert.

- Asymmetrische Parenchymverbreiterung, auch als „Buckelung“ imponierend
- Erhöhte Gefäßdichte im Doppler-Ultraschall mit insgesamt ausgeprägterer Gefäßverästelung – entweder peripher oder im „Buckel“ lokalisiert.
- Echoarme Inseln
- L/B-Quotient < 2 (Vassallo/Solbiati-Index)
- Ballonierung des Funktionsgewebes, insbesondere bei eigener Gefäßumrandung.
- Zentrale Perfusion

Die Lymphknotenregionen wurden stets im Vergleich mit der gegenüberliegenden Körperseite betrachtet, um Information über die interindividuell stark variable Schallbarkeit und Lymphknotenaktivität des Patienten zu erhalten. Alle gewonnenen Informationen wurden schriftlich dokumentiert und in einer Excel®-Datenbank zusammengetragen.

2.3.2 Ultraschall des WLK im OP-Saal nach Exstirpation (ex vivo Ultraschall)

Der operativ frisch entfernte WLK wurde ex vivo erneut sonographiert. Hierfür wurde dieser zwischen zwei Gelkissen platziert, um die Gesamtgröße des LK messen und Vergleiche über Form, Größe und Echogenität mit den in-vivo-Sonogrammen ermöglichen zu können. Durch den Schallvorlauf im Gelkissen wird die Schallbarkeit des LK wesentlich verbessert. Dieses ist auf das physikalische Phänomen beim Ultraschallverfahren zurückzuführen, dass erst ab einer Mindestdistanz von mehreren Zentimetern zwischen Piezokristall und dem Schallobjekt eine höhere Trennschärfe erreicht werden kann.

2.3.4 FNAC

Die Punktion des WLK erfolgte mit der „Binder-Ventil-Punktionskanüle“ unter Verwendung eines alkoholischen Kontaktmediums zum Ultraschall. Es wurde stets dafür Sorge getragen, kein Ultraschallgel zu verwenden, da Ultraschallgel im Punktat nach Anfärbung mit HE (Hämatoxylin-Eosin) angefärbtes Melanin imitieren und somit die histologischen Ergebnisse verfälschen kann. Des Weiteren können so Infektionen im Rahmen der Punktion ausgeschlossen werden.

Die zur Feinnadelpunktion verwendeten Kanülen haben einen Durchmesser von 0,4mm (26 G) bei einer Länge von 25mm. Für Lymphknoten in größerer Tiefe können, wie in Abbildung 4 dargestellt, auch Nadeln genutzt werden, die sonst zur Lumbalpunktion dienen (0,5 x 90mm, 25 G). Der zur Aspiration notwendige Unterdruck wurde durch eine dem „Binder“-Ventil nachgeschaltete 30ml Spritze erzeugt, die mittels Abstandshalter in

der 10ml-Position fixiert wurde. Das so erzeugt Vakuum beträgt etwa $-300\text{cm H}_2\text{O}$ [62, 80, 81]; Abbildung 3 und Abbildung 4.



Abbildung 3: Sonographisch gesteuerte Punktion mit Binder-Ventil (hier bei einem Patienten im Rahmen der Nachsorge)

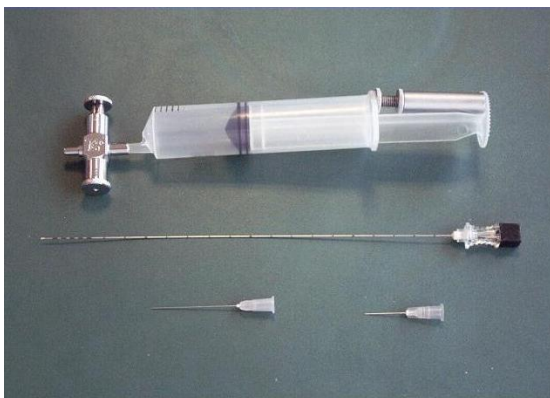


Abbildung 4: Binder-Ventil, Spritze, Nadeln

Um eine repräsentative Menge aus verschiedenen Regionen des Lymphknotens und ausreichend Material für Zytologie und Tyrosinase RT-PCR zu erhalten, wurden wiederholte Punktionen unter sonographischer Kontrolle durchgeführt. Vor der Färbung der zytologischen Ausstriche wurden diese getrocknet, die Aspirationen für die RT-PCR wurden kryoasserviert (Abbildung 5).



Abbildung 5: Objektträger mit Ausstrich (in diesem Falle dunkel gefärbt; daraus kann bereits makroskopisch auf die Melaninhaltigkeit des Ausstrichs geschlossen werden).

Als „repräsentativer“ Ausstrich wurde gewertet, wenn eine Zellzahl von mindestens 100 Zellen auf 2 Objektträgern vorlag. Bei der Durchführung der FNAC mit einer Nadel von nur 0,45mm Durchmesser und so kleinen Zielen wie Areale innerhalb eines ohnehin kleinen Wächterlymphknotens, kann eine solche Zellzahl oft nicht erreicht werden. Daher wurden im Vergleich zur herkömmlichen Zytologie wesentlich öfter sogenannte „unrepräsentative“ Ausstriche diagnostiziert. Bei diesen Patienten wurden deshalb wiederholte FNAC-Punktionen ggf. zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt.

2.3.5 Histologie und Immunhistologie

Alle exstirpierten WLK wurden mit zuführendem Lymphsystem in Serienschnitten und HE-Färbung entsprechend des von der EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) vorgeschlagenen histologischen Protokolls untersucht; immunhistochemisch wurden die Marker HMB-45 und Melan A verwendet. Ebenfalls wurden die histologischen Präparate auf das Vorhandensein von etwaigen Nävuszellen

und Makrophagen untersucht. Anzahl und Typ der Makrophagen und Nävuszellen wurden ebenfalls bestimmt. Gefundene Tumor-Zellen wurden entweder als singulär, frei flottierend oder als Tumor-Zellnester klassifiziert, sowie der Tumorzellnest-Durchmesser vermessen. Der Befall von einem WLK mit mehreren Tumor-Zellnestern wird als multipler Befall, ein einzelner, gut abgrenzbarer Herd als singulär gewertet. Neben der sich hieraus ergebenden Tumorfläche wurde durch Auswertung der histologischen Schnittscheiben auch das Tumornest-Volumen annäherungsweise durch 2 verschiedene Methoden bestimmt (s.u.) und miteinander verglichen.

2.3.5.2 Bewertung der Befallsmuster

Die Tumorlast (engl.: tumor load; tumor burden) beschreibt die Anzahl der Tumorzellen, die Größe eines Tumors bzw. die Menge an Krebszellen im gesamten Körper. Bei der Auswertung der Tumorlast im WLK wird bei Vorhandensein von multiplen Läsionen immer der größte Tumordurchmesser gewählt. Darüber hinaus hat sich eine Einteilung in 3 Gruppen wie folgt bewährt:

1. Sub-Mikrometastasen (Cluster von mehr als 10 Zellen, aber $< 0,1\text{mm}$)
2. Tumorlast von $0,1\text{mm} - 1,0\text{mm}$ und
3. Tumorlast $> 1,0\text{mm}$ [38].

Dies wird in der Literatur seit kurzem neu beschrieben (van Akkooi et al.) und mit dem Überleben korreliert. Dieses System scheint sehr gut mit der Prognose des Patienten zu korrelieren.

Sämtliche positive WLK wurden entsprechend dieser Vorgaben ausgemessen und klassifiziert. Zusätzlich wurden die positiven Lymphknoten nach der alten und neuen Starz-Klassifikation eingeteilt. Nach der Anzahl der in Serienschnitten befallener Lymphknotenscheiben (n) und der größten Eindringtiefe der Melanomzellen zum LK-Zentrum hin, ausgehend vom inneren Rand der Lymphknotenkapsel (d), werden jeweils 3 Kategorien gebildet: Der alten Starz-Klassifikation folgend gibt es die Kategorien S1 ($n \leq 1$ und $d \leq 1\text{mm}$), S2 ($n > 2$ und $d \leq 1\text{mm}$) sowie S3 ($n > 2$ und $d > 1\text{mm}$); nach der neuen Starz-Klassifikation SI ($d \leq 0,3\text{mm}$), SII ($d > 0,3\text{mm} \leq 1\text{mm}$) und SIII ($d > 1\text{mm}$).

Ausgewählte Autoren setzen die Tumorlast in Bezug zur WLK-Fläche (Tumorlast $> 1\%$ der WLK-Fläche [82]). Analog wurde daher im Rahmen der Messung durch OÄ Dr. Audring die Tumorlast durch eine Flächenberechnung bestimmt. Hierfür wurde nicht nur

der größte Tumordurchmesser bestimmt, sondern Länge x Breite des größten Tumornestes gemessen. Sofern es sich um multifokale Herde handelt, wurden die Flächen der übrigen Herde im Verhältnis zum ausgemessenen Tumornest angenähert und mit der Anzahl der vorliegenden Schnittebenen multipliziert.

2.3.6 Tyrosinase RT-PCR

Die Tyrosinase wird als wichtigstes Schrittmacherenzym der Melaninsynthese sowohl im Melanozyten als auch in Melanomzellen, jedoch in keiner anderen Tumorentität exprimiert. Dies macht Tyrosinase als potentiellen Tumormarker interessant. Der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut gelang erstmals 1991 durch Messung von mRNA-Molekülen mittels des Verfahrens der Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) [67].

2.3.6.1 RNA-Extraktion aus dem Lymphknoten

Etwa 0,3 bis 1,0µl des Aspirates wurden unmittelbar nach der Gewinnung aus dem punktierten Lymphknoten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden für die weiteren molekularbiologischen Untersuchungen bei -80 °C gelagert. Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von RNeasy™ total RNA-Kit® (QIAGEN, Hilden, Deutschland) aus dem Aspirat isoliert. Die Zellyse wurde durch wiederholtes Ansaugen der Lösung durch eine feine Kanüle in einer 500µl Lysepuffer-Lösung erreicht. Nach der Extraktion in gepufferten Chloroform-Phenol und anschließender alkoholischer Fällung wurde die RNA in 25µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

Die Konzentration und Reinheit der Gesamt-RNA wurde mittels UV-Photometrie bei 260nm und 280nm bestimmt. Die Integrität der RNA wurde durch eine PCR nach der cDNA-Synthese überprüft, bei der beta-2-Microglobulin als Housekeeping Gen eingesetzt wurde.

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem Superscript™ Preamplifikations System (GIBCO, BRL, Inc., Grand Island N.Y., USA) entsprechend der Herstellerangaben.

2.3.6.2 RNA-Extraktion aus peripherem Blut

Bei allen Patienten wurde ergänzend zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung eine venöse Blutprobe von 2 x 5ml in EDTA-Röhrchen zur Verlaufskontrolle während des Follow-up entnommen.

Die Gesamt-RNA aus 5ml EDTA-Blut wurde mittels des QIAamp® RNA Blood Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) durchgeführt und anschließend mit DNase behandelt. Auf die Erythrozytenlyse folgte die Lyse der pelletierten Leukozyten und Homogenisierung mittels QIAshredder Säulen (QIAGEN, Hilden, Deutschland). Die RNA wurde anschließend an eine Silica-Gel Membran gebunden und mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA wurde bei – 80 °C gelagert.

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde mittels UV-Spektrophotometrie bei den Wellenlängen 260nm und 280nm gemessen. Die RNA wurde auf ihre Intaktheit durch PCR mit dem Housekeeping-Gen β -2M überprüft (β -2-Mikroglobulin). Für die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) mit dem LightCycler-System (Roche, Mannheim, Deutschland) wurden für das Housekeeping-Gen spezifische Primer benutzt (Porphobilinogendesaminase). Um die Integrität der RNA zu überprüfen, wurde parallel zur Tyrosinase-PCR eine PCR mit spezifischen Primern für das Housekeeping-Gen Glycerinaldehyde 3-Phosphatase Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt.

2.3.6.3 Qualitätssicherung

In Anlehnung an die EORTC-Kriterien für laborexperimentelle Qualitätssicherung wurde dafür Sorge getragen, dass eine Kontamination ausgeschlossen werden konnte; dazu wurden bereits etablierte Protokolle verwendet [83]. Im Falle von diskordanten Ergebnissen bei Doppel-Proben wurde die RNA-Gewinnung parallel wiederholt, bis konkordante Ergebnisse zu verzeichnen waren. Alle positiven Nachweise von PCR-Produkten wurden mittels Sequenzierung verifiziert.

2.3.7 Statistik

Die verschiedenen diagnostischen Methoden, Sonographie, Feinnadel-Aspirations-Cytologie (FNAC) und polymerase chain reaktion (PCR) wurden auf ihre Sensitivität und Spezifität statistisch untersucht und mit 95% Konfidenzintervallen berechnet. Die odds ratios wurden zur Berechnung der Signifikanzen von kombinierter FNAC und PCR für prä- und post-sentinel lymph node dissection (SLND) bestimmt. Zur Abschätzung der Korrelation von Lymphknoten-Volumina und möglicher Tumor-Positivität wurde die logistische Regression angewandt. Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm Statistical Analysis System Version 8.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA) durchgeführt. Ein Resultat wurde bei $p < 0,05$ als signifikant gewertet.

2.3.8 Follow-Up

Die Patienten wurden vom dermatologischen Tumorzentrum im Hause in ein Nachsorgeprogramm eingebunden. Dieses sieht eine klinische Nachsorge bei einer Melanomdicke von 1mm oder weniger von 6-monatigen Abständen für die ersten 5 Jahre nach Tumor-Resektion vor. Patienten mit einer Tumor-Dicke > 1 mm oder histopathologischen Anzeichen von Regression und Ulzeration werden über 5 Jahre 3-monatlich im Wechsel mit der niedergelassenen Praxis gesehen; danach die Untersuchungszeiträume auf 6 bzw. 12 Monate ausgedehnt. Patienten mit malignen Melanom im Stadium III wurden alle 3 Monate gesehen (Tabelle 2). Alle Patienten wurden darüber hinaus geschult, das Auftreten eines möglichen Zweitmelanoms oder einer möglichen Tumorerkrankung zur erkennen und sich auch vor dem regulären Nachsorgetermin bereits wieder vorzustellen.

2 Patienten von 127 nahmen das Angebot einer regelmäßigen Nachsorge nicht wahr (1,2%).

3. Ergebnisse

3.1 Patienten- und Tumorcharakteristika

Bei 127 Patienten wurden 141 Wächterlymphknoten (WLK) exstirpiert. Behandelt wurden 66 Frauen und 61 Männer; das mediane Alter betrug 60 Jahre (Spannbreite 20 bis 88 Jahre). Die Exzisionen des malignen Melanoms wurden in 48% (61 von 127) an den Extremitäten vorgenommen, gefolgt von 40% (51 von 127) am Stamm. Weitere 11% der Patienten zeigten einen Befall mit malignem Melanom im Hals-Kopfbereich. Histologisch am häufigsten wurden superfiziell spreitende Melanome (SSM) gefunden (82/127), gefolgt vom nodulären Melanom (NM) in 30 von 127 Fällen. Ein Lentigo maligna Melanom (LMM) wurde 2 mal nachgewiesen, ein akrolentiginöses Melanom (ALM) 5 mal. Weitere 8 Melanome ließen sich den vorgeschriebenen Kategorien nicht zuordnen (z.B. amelanotisches Melanom, nävoïdes Melanom).

Eine Ulzeration des Tumors wurde in 42% der Patienten beschrieben. Die Majorität der Patienten in unserem Patientengut (58% entsprechend 74 von 127) zeigte keine Ulzerationen des Tumors.

Histologisch wurden alle Tumoren zusätzlich auf eine Regression des Tumors hin untersucht; eine Regression war in 39% der Tumoren zu verzeichnen (50/127). Insgesamt waren 61% (77/127) ohne histologische Zeichen einer Regression des Tumors oder von Tumor-Anteilen.

Die Breslow-Tumordicke und der Clark-Level konnten in 125/127 Fällen bestimmt werden 2 Patienten wiesen einen Primärtumor auf, bei dem Breslow und Clark-Level nicht bestimmt werden konnten.

Die Breslow-Tumordicke betrug bei 30 Patienten (24%) ≤ 1 mm, bei 31 Patienten (24%) > 1 bis ≤ 2 mm, bei 35 Patienten (28%) > 2 bis ≤ 4 mm und bei 29 Patienten (23%) > 4 mm. Der Median lag bei 2,1mm (0,4 bis 18,0). Die Einteilung erfolgte nach der T-Klassifikation der Melanoms nach AJCC 2002 . Insgesamt betrug die Breslow-Tumordicke bei mehr als $\frac{3}{4}$ der Patienten > 1 mm, d.h. ca. 75% konnten der Tumorklassifikation T2 bis T4 zugeordnet werden (derzeit aktuelle Indikation für die

WLK-Exstirpation). Wie bereits oben ausgeführt, erfolgte bei 8 Patienten mit einer Breslow-Tumordicke < 1mm auf ausdrücklichen Wunsch der Patienten hin die Entfernung der WLK.

Der Clark-Level betrug II bei 1 Patient (1%), III bei 49 Patienten (39%), IV bei 65 Patienten (51%) und V bei 10 Patienten (8%). Damit zeigten ca. 90% der untersuchten Patienten einen Clark-Level III oder IV.

Nach den Kriterien des AJCC konnten 26 Patienten (20%) dem Stadium IA, 20 Patienten (16%) dem Stadium IB, 18 Patienten (14%) dem Stadium IIA, 21 Patienten (17%) dem Stadium IIB und 6 Patienten (5%) dem Stadium IIC zugeordnet werden. Bei 72% der Patienten sind hierbei jede Tumordicke (T1 bis T4) ohne Nachweis von Lymphknotenbefall bzw. Metastasierung subsummiert. 12 Patienten (9%) wurden dem Stadium IIIA, 11 Patienten (9%) dem Stadium IIIB und 13 Patienten (10%) dem Stadium IIIC zugeordnet. Zusammengefasst zeigten sich bei 28% der Patienten ein Lymphknotenbefall. Eine Fernmetastasierung (Stadium IV) wurde bei den untersuchten Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nicht festgestellt. Die Charakteristika und Tumorparameter unserer Patienten-Gruppe sind in Tabelle 3 auf der Seite 18 dargestellt.

3.2 Ultraschall

3.2.1 Präoperativer Ultraschall

Die ersten 20 Patienten dieser Studie wurden unter Verwendung des Sonokontrastmittel Sono Vue® untersucht. Da sich keine Verbesserung der Darstellung zeigte, wurde in der Folge auf die Applikation von SonoVue® verzichtet.

In 120/141 der Wächterlymphknoten zeigte sich eine Übereinstimmung der Untersuchungen („matching“), d.h. der präoperativ zum WLK erklärte und präoperativ sonographisch ausgemessene Lymphknoten entsprach in Größe und Morphologie dem exziierten und postoperativ sonographisch ausgemessenen Lymphknoten. Von den 21/141 Lymphknoten waren 14 tatsächlich nicht übereinstimmend. In weiteren 3 Fällen wurden sonographisch keine Lymphknoten gesehen („sonographisch“ kein Korrelat). In weiteren 2 Lymphknoten der „Nicht übereinstimmend“-Gruppe wurde sonographisch

kein Malignitätsverdacht geäußert; die Histologie ergab jedoch einen positiven Tumor-Befund als kleinere subcapsuläre Metastasierungen ausschließlich im WLK. Bei beiden Patienten waren keine weiteren Lymphknoten betroffen, sie sind jedoch im klinischen Verlauf an hämatogener Metastasierung verstorben, ohne jemals einen weiteren Lymphknotenbefall gezeigt zu haben. In 2 weiteren Fällen ließen sich weder im Ultraschall noch chirurgisch/histologisch - also übereinstimmend - Wächter-Lymphknoten nachweisen. Die Sensitivität von Ultraschall allein beträgt somit im Kollektiv 78,8% (CI 95%: 61-91); die Spezifität beträgt 71,6% (CI 95%: 61-81). Sensitivität und Spezifität in Kombination mit FNAC werden im Kapitel 3.3 FNAC weiter ausgeführt.

34/120 der in vivo und ex vivo übereinstimmenden Lymphknoten wurden von den Pathologen als Tumor-befallen oder „malignitäts-suspekt“ (Nachweis einzelner Tumor-Zellen mittels Immunhistochemie; IHC) klassifiziert. In 12/120 Wächterlymphknoten wurden histopathologisch Nävus-Zellen nachgewiesen, von denen lediglich 2 in der weiteren Immunhistochemie zusätzlich Malignitätskriterien (= Nachweis von Melanomzellen) erfüllten.

Bei den 34 histologisch positiven Wächterlymphknoten wurden 7 per Ultraschall als Tumor-negativ klassifiziert (falsch-negativ). Von diesen 7, im Ultraschall zunächst als negativ klassifizierten Lymphknoten, konnte 1 Lymphknoten mittels FNAC als positiv erkannt werden.

Die Sensitivität von verschiedenen sonomorphologischen Lymphknoten-Befallsmustern beträgt für das Fehlen von zentralen Echos 82% ($p < 0,001$), für das Kriterium Nachweis einer „Buckelung“ 55% ($p < 0,001$), Nachweis echoarmer Inseln 59% ($p < 0,001$), Nachweis einer Ballonierung 96% ($p < 0,001$) sowie der Nachweis einer peripheren Mehrdurchblutung 52% ($p < 0,001$). Weder kappenartige Strukturen noch eine vermehrte zentrale Perfusion konnten Wächterlymphknoten-Metastasen nachweisen ($p > 0,05$). Auch der Vassallo/Solbiati Index zeigte keine Signifikanz für den Nachweis von WLK-Metastasen. Diese Angaben wurden durch Follow-Up-Daten von derzeit insgesamt 650 Patienten seit 2001 bestätigt [84].

3.2.2 Ex vivo (in vitro) Ultraschall

An allen exziierten Lymphknoten wurde postoperativ, d.h. nach Exzision der Wächterlymphknoten der Ultraschall nach oben beschriebener Methode durchgeführt. Die Ergebnisse sind konkordant mit denen von Schäfer [85], der eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen den in vivo und in vitro Ultraschallmessungen gefunden hat. Die geringe Ungenauigkeit in der Volumenbestimmung (Median von 3mm³) wird auf das umgebende Fettgewebe in vivo zurückgeführt, das zu Teilen mitgemessen wurde und dann in einigen Fällen zu größeren Messwerten geführt hat. Diese Ungenauigkeit schlägt aber eher bei größeren Lymphknoten zu Buche.

3.3 FNAC

In der Kombination von Ultraschall und FNAC konnten 28/34 histologisch als maligne oder malignitätsverdächtig klassifizierten Exzidate klassifiziert werden. Hieraus ergibt sich eine diagnostische Sicherheit von 82% (CI 95%: 65 bis 93%). Die Kombination von Ultraschall und FNAC ermöglicht die korrekte Identifizierung von 62/86 histologisch als benigne klassifizierten WLKs. Dieses ergibt eine Spezifität von 72% (CI 95%: 61 bis 81%). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Sensitivität und Spezifität von Ultraschall (US), Feinnadelaspirationscytologie (FNAC) und der ultraschall gestützten Feinnadelaspirationscytologie (US und FNAC kombiniert). (PVW = positiver Vorhersagewert, NVW = negativer Vorhersagewert).

	Sensitivität	Spezifität	PVW	NVW
US	79%	72%	53%	90%
FNAC	59%	100%	100%	85%
US und FNAC kombiniert	82%	72%	54%	91%

Während der gesamten Studienzeit wurden bei der Ultraschall gesteuerten Feinnadelpunktion keine Komplikationen festgestellt. Es gab keinen Anhalt für eine durch die Feinnadelpunktion hervorgerufene Stichkanalmetastasierung.

3.4 RT-PCR

3.4.1 Tyrosinase RT-PCR der Feinnadel-Aspirate (FNA-PCR)

Mittels RT-PCR wurden die FNAC-Aspirate zu unterschiedlichen Follow-up-Zeiten (vor und nach der Wächterlymphknoten-Dissektion) und aus verschiedenen Lokalisationen (afferentes Lymphgefäß und Lymphknoten-Hilus) analysiert. Hierdurch konnten jedoch keine neuen Metastasen entdeckt werden, die nicht bereits durch Ultraschall und FNA-Zytologie bekannt gewesen wären. Die Sensitivität und Spezifität der Tyrosinase RT-PCR in diesem Setting wird in der Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Sensitivität und Spezifität der RT-PCR von Aspirationsmaterial aus dem Wächterlymphknoten.

	Sensitivity	Specificity
Prä-WLKD RT-PCR	50%	99%
Post-WLKD RT-PCR	76%	92%
Post-WLKD-RT-PCR (afferentes Lymphgefäß)	50%	92%
Post-WLKD-RT-PCR (Lymphknoten-Hilus)	85%	72%

3.4.2 Tyrosinase RT-PCR aus dem peripheren Blut

Es konnten über einen Zeitraum von durchschnittlich 40 Monaten 573 Blutproben gewonnen werden (Spannbreite der Blutentnahmen pro Patient im Follow-up 0 bis 60 Monate). Zur Quantifizierung der Tyrosinase wurde darin der Spiegel mittels qRealTime-PCR bestimmt, wobei als Housekeeping-Gen die Porphobilinogen-Deaminase verwendet wurde [86]; s.a. Abbildung 6 und Abbildung 7).

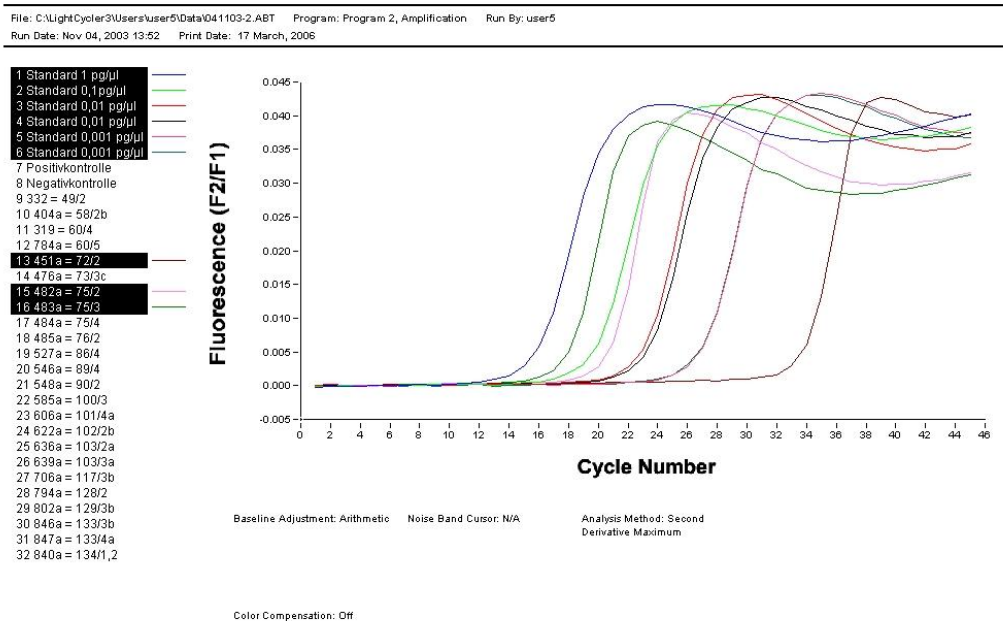


Abbildung 6: Abhängigkeit der Substratmenge an Tyrosinase im peripheren Blut (Fluoreszenzintensität) von der Zahl der Zellzyklen in der qRT-PCR.

File: C:\LightCycler3\Users\user5\Datas\041103-2.ABT Program: Program 2, Amplification Run By: user5
 Run Date: Nov 04, 2003 13:52 Print Date: 17 March, 2006

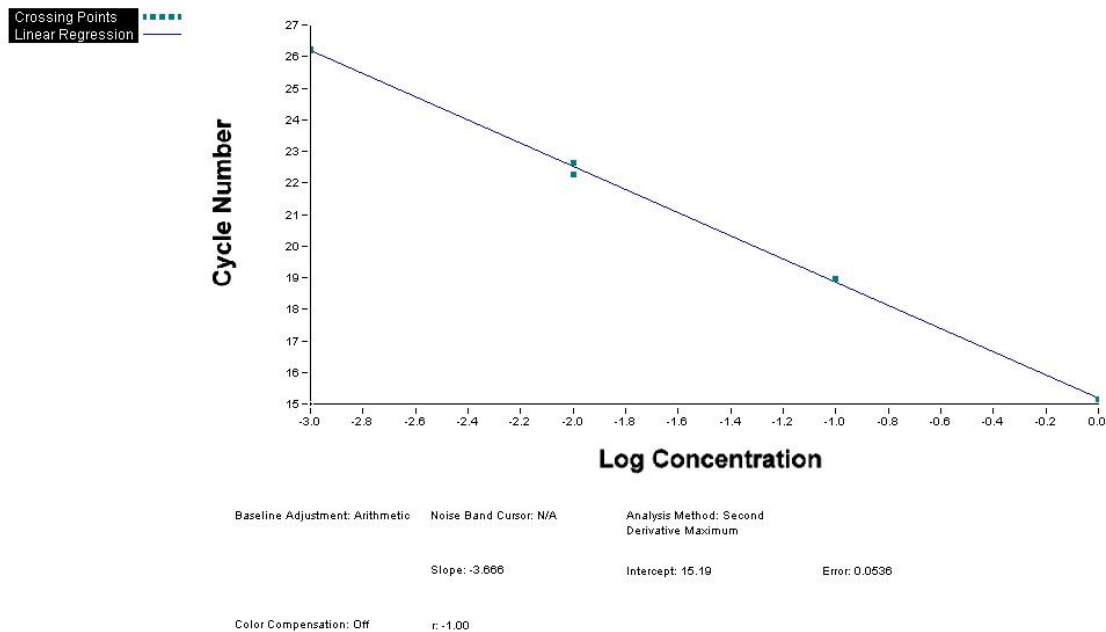


Abbildung 7: Exponentielle Zunahme der DNA-Kopien mit steigender Zahl der qRT-PCR-Zyklen; hier log invers zur Festlegung der standard crossing points dargestellt.

Bei 18 der 127 Patienten war der Tyrosinase RT-PCR-Befund mindestens einmal bzw. wiederholt positiv. Abbildung 8 zeigt die Kaplan-Meier Auswertung der krankheitsfreien Überlebenszeit (disease free survival = DFS) von Patienten mit einem positiven Nachweis der Tyrosinase RT-PCR aus dem Blut, ferner das DFS von stets negativ getesteten Patienten. Analog wird in Abbildung 9 die Gesamt-Überlebenszeit (overall survival = OS) angegeben.

Mit dem Cox-Modell (proportionales Hazard Modell) konnte mit den RT-PCR-Ergebnis als zeitabhängige Variable ein Hazard-Ratio für DFS von 11,7 (95% CI 4,6 – 29,7; $p < 0,001$) sowie ein Hazard-Ratio für OS von 25,4 (95% CI 10,9-59,3; $p < 0,001$) gezeigt werden.

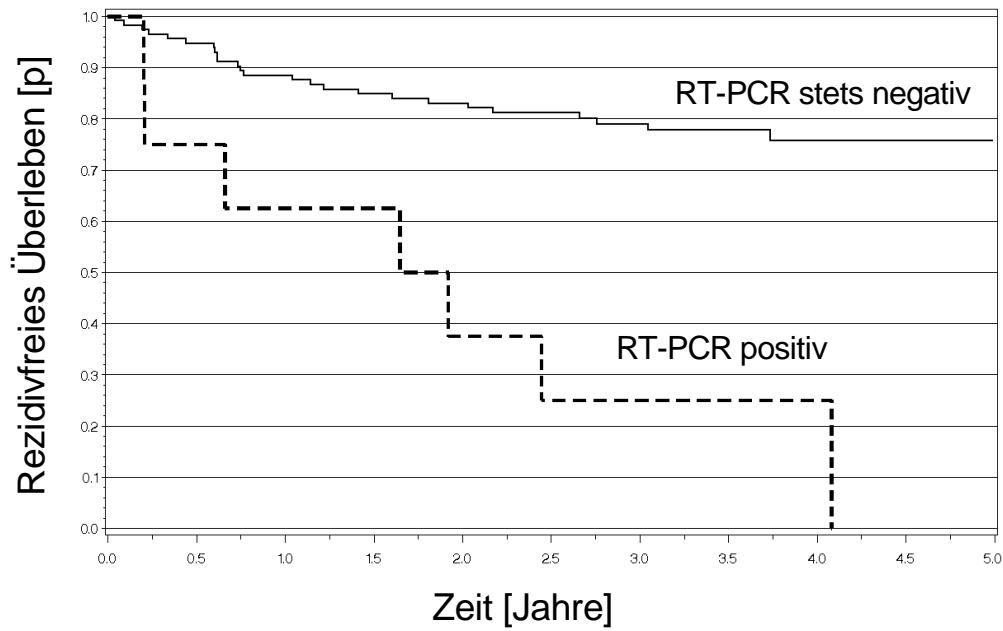


Abbildung 8: Krankheitsfreies Überleben vom Zeitpunkt der ersten Blutprobe getrennt für RT-PCR (reverse transcriptase – polymerase chain reaction), die immer negativ war und der RT-PCR, die mindestens einmal positiv ausfiel.

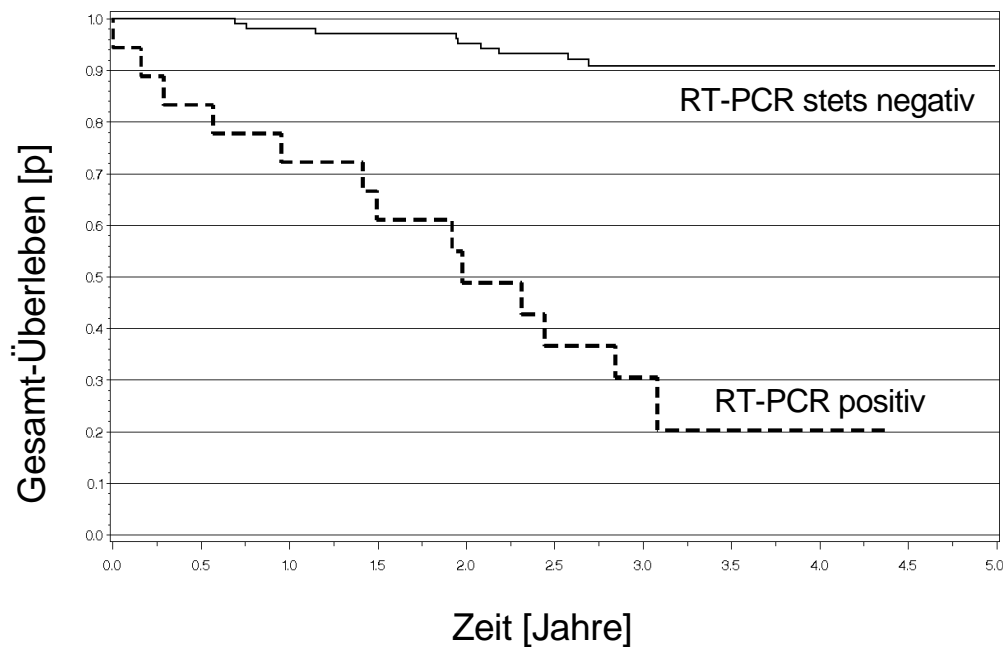


Abbildung 9: Gesamtüberleben vom Zeitpunkt der ersten Blutprobe getrennt für RT-PCR (reverse transcriptase – polymerase chain reaction), die immer negativ war und der RT-PCR, die mindestens einmal positiv ausfiel.

3.5 Histologie

In der Histologie der gewonnenen WLKs ließen sich verschiedene Ausmaße an Tumor-Befall sowie unterschiedliche Befallsmuster darstellen. Das Ausmaß der Tumor-Invasion in den LKs reichte von einer vollständigen Durchsetzung des LKs (Abbildung 10 und Abbildung 11),

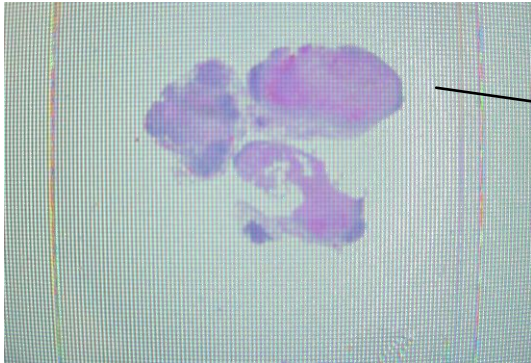


Abbildung 10: HE-Färbung

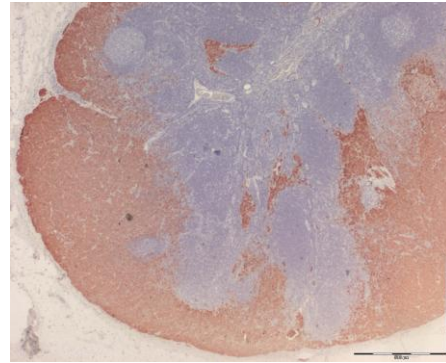


Abbildung 11: Melan A-Färbung

über eine partielle Umwandlung des LKs (Abbildung 12 und 13)

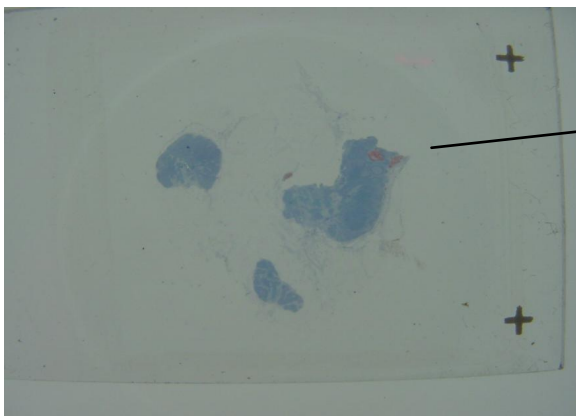


Abbildung 12: HMB 45-Färbung

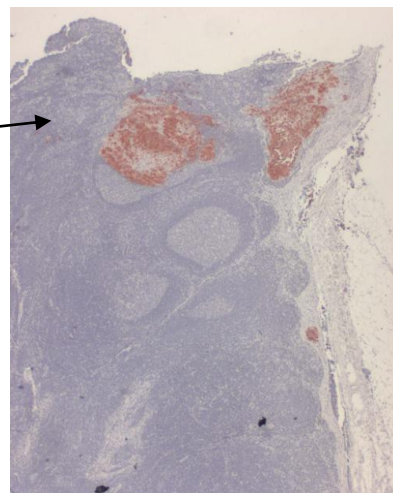


Abbildung 13: HMB 45-Färbung

bis hin zu vereinzelt Tumor-Zellen, die nur immunhistochemisch klassifiziert werden konnten (Abbildung 14 und Abbildung 15).

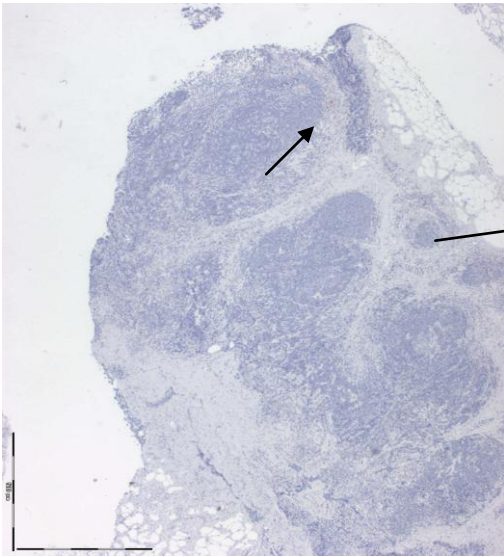


Abbildung 14: Melan A

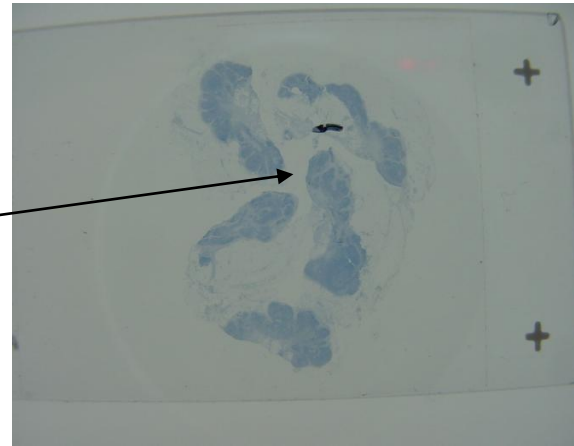


Abbildung 15: Melan A. Wurde sonographisch klar als maligne erkannt; die FNAC war jedoch negativ, ebenso die Tyrosinase-PCR.

In der Abbildung 16 ist die Anzahl der WLK-positiven Patienten gegen die Tumornestgröße in mm² aufgetragen. Ausgewertet wurden die messbaren Flächen aus den Längs- und Querdurchmessern multipliziert mit der Anzahl der Schnittebenen. Im Ergebnis zeigt sich, dass die kleinen Tumornestflächen im Kollektiv deutlich überwiegen. Die Größe der Fläche hat eine Spannweite von 0,01 bis 640mm². Im Mittel beträgt die Fläche 81mm² mit einer Standardabweichung von ± 174 mm². Der Median liegt bei 5,1 mm².

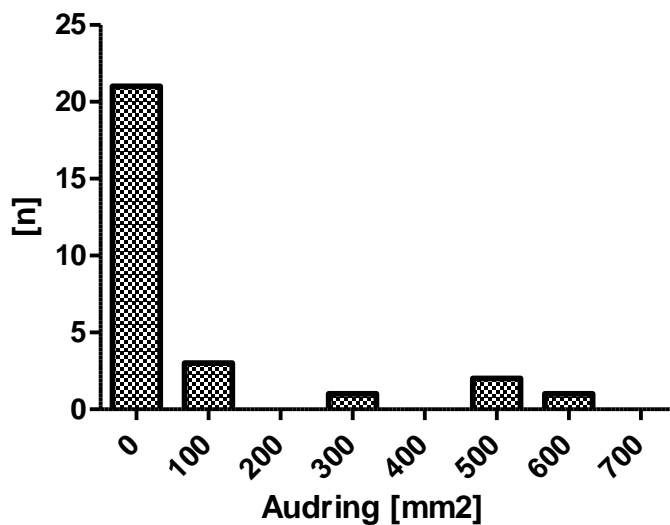


Abbildung 16: Verteilung der Tumornestfläche der positiven WLK in mm²

Es fanden sich solitäre, aber auch multiple Zellnester. Darüber hinaus ist auch ein diffuser Befall möglich. Hier lassen sich keine abgrenzbaren Zellnester finden, wohl aber einzelne Zellen bzw. Zellcluster. Alle Histologien wurden von zwei Untersuchern ausgewertet (Audring und van Akkooi), Lokalisation und Ausmaß des Tumor-Befalls kategorisiert. Diese Befunde sind in Tabelle 7 und 8 dargestellt. 34 der 120 Wächterlymphknoten wurden als histologisch maligne eingestuft. In einem Fall (ID#15) war der Wächterlymphknoten selbst nicht befallen, einzelne Tumorzellen wurden jedoch im afferenten Lymphgefäß nachgewiesen und dieser somit ebenfalls als maligne beurteilt. Bei 6 der 34 histologisch malignen Wächterlymphknoten konnten keine histologischen Tumornest-Ausmessungen vorgenommen werden, da hier nur einzelne Zellen vorlagen bzw. eine direkte Lymphknoten-Dissektion durchgeführt wurde. Solitäre Nester (subcapsulär, parenchymatös oder kombiniert subcapsulär-parenchymatös) fanden sich bei 11 der 28 Lymphknoten, in 17 der 28 Lymphknoten wurden multiple Tumorzell-Nester nachgewiesen.

Die Größe der Tumornestfläche ist in unseren Daten ein prognostisches Kriterium. Des weiteren wurde das Befallsmuster des Lymphknoten (singulär/multipel/diffus) gegeneinander ausgewertet; hier zeigte sich kein signifikanter Überlebensvorteil bei Patienten mit einem singulären versus diffusem Befallsmuster.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Patienten mit histologisch positivem Wächterlymphknoten

Pat.-Nr.:	Histomuster des betroffenen WLK (solitär, multipel)	Lokalisation (subcapsulär)	Lokalisation intralymphatisch (=parenchymatös)	Tumornestgröße (mm)	In vivo PCR (.../1 positives oder negatives Test-Ergebnis)	In vivo Validierung durch den Sonographen (sicher maligne= ++, suspekt= +, sicher benigne= --)	FNAC-Ergebnis	Post WLK-Positivität	Follow-up (Nachsorge)
# 11	Solitär	-	+	0,89x1,15	-	++	Zu wenige Zellen	0/13	DOD
#15	Zellen nur im afferenten lymphatischen Gefäß des Negativ SLN	-	-	LK selbst negativ.	-	--	-	0/16	alive, NED
#29	Solitär	-	+	0,25x1	-	++	-	0/15	alive, NED
#33	Solitär	+	(+)	0,1x0,22	-	++	-	verweigerte TLND	DOD
#43	Multipel	+	-	0,05x0,06	+	++	+	0/12	DOD
#45	Multipel	+	-	0,1x0,3	+	++	+	1/13	alive, NED
#48	Multipel	+	(+)	0,25x0,3	-	--	-	0/11	DOD
#55	Solitär	((+))	-	0,002	-	--	-	0/10	alive, NED
#56	Solitär	+	+	0,02x0,025	-	--	-	verweigerte TLND	DOD
#58	Multipel	+	((+))	0,1x0,1	+	++	+	5/20	DOD
#60	Multipel	+	+	1,1x1,64	-	--	Konnte nicht mehr rechtzeitig erfolgen	4/16	DOD
#69	Multipel	+	+	0,83x1,5	-	++	+	0/13	DOD
#72	Multipel	+	+	0,7x1,05	-	++	-	0/14	alive, NED

#75	Solitär	-	+	5x10	+	++	+	21/21	DOD
#83	Solitär	+	+	0,5x0,6	+	++	+	1/11	alive, NED
#86	Multipel	--	+	0,9x0,95	-	-	-	0/21	DOD
#89	Multipel	(+)	+	0,72x1,1	-	+	+	2/8	DOD
#90	Multipel (<0.1mm größter Durchmesser)	+	-	0,25x1	-	++	-	0/7	alive, NED
#94	Solitary	-	+	5x16	+	++	-	8/21	DOD
#102	Multipel (<0.1mm, größter Durchmesser)	+	-	0,05x0,1	-	+	-	0/14	alive, NED
#107	Multipel	-	+	4x5	+	+	+	0/4	DOD
#110	Solitär	-	+	5x12	+	++	+	1/13	DOD
#111	Multipel	-	+	1,5x3	-	-	+	verweigerte TLND	DOD
#113	Multipel	-	+	6x6	+	++	+	0/6	alive with tumor, AWD
#115	Multipel	+	+	4x8	-	++	+	2/4	alive, NED
#116	direkt TLND geplant, da FNAC positiv	n.a.	n.a.	n.a.	+	++	+	verweigerte TLND, nur SLND: aber nur Ausmessung des größten Nestdurchmessers (1,3mm)	alive, NED
#117	Multipel	+	-	1,4x0,55	-	+	-	1/8	DOD
#119	Multipel	-	+	0,8x1,2	+	++	+	0/11	alive, NED
#124	direkt TLND da FNAC positiv	n.a.	n.a.	n.a.	+	++	+	0/4	DOD
#126	direkt TLND da FNAC positiv	n.a.	n.a.	n.a.	+	++	+	7/14	DOD
#130	direkt TLND da FNAC positiv	n.a.	n.a.	n.a.	+	++	+	0/5	alive, NED
#131	Solitär	+	-	0,31x0,11	+	+	-	0/10	alive, NED
#132	Solitär	-	+	6x11	+	++	+	0/2	DOD
#134	direkt TLND da FNAC positiv	n.a.	n.a.	n.a.	+	++	+	0/9	DOD
<p>SLND = Sentinel Lymph Node dissection (+) wenige Zellen ++ = maligne NED = no evidence of disease (Kein Nachweis der Erkrankung)</p> <p>TLND = Therapeutic lymph node dissection ((+)) sehr wenige Zellen + = suspekt AWD = alive with disease (Lebt mit der Erkrankung)</p> <p>n.a. = nicht auswertbar -- = benigne DOD = died of disease (Verstorben an der Erkrankung)</p> <p>n.d. = nicht durchgeführt</p>									

Tabelle 8: Gegenüberstellung der histologischen Auswertungen nach Audring und van Akkooi

	Audring	Audring	van Akkooi
Lfd. Nr.	Nestfläche insges. (mm²)	Größtes Nest (mm)	Tumorlast (mm)
11	2,047	0,89x1,15	0,6
15	-	LK selbst negativ (Tm-Zellen nur im Vas afferens)	floating cells = negativ
29	0,25	0,25x1	0,7
33	0,022	0,1x0,22	0,2
43	0,03	0,05x0,06	<0,1
45	1,33	0,1x0,3	1,2
48	1,5	0,25x0,3	0,4
55	0,002	0,002	floating cells = negativ

56	0,0015	0,02x0,025	floating cells = negativ
58	0,42	0,1x0,1	3,5
60	5,41	1,1x1,64	1,8
69	10,11	0,83x1,5	0,7
72	4,85	0,7x1,05	1,3
75	50	5x10	6,5
83	0,6	0,5x0,6	1,4
86	5,17	0,9x0,95	0,7
89	8,04	0,72x1,1	1,2
90	5	0,25x1	<0,1
94	640	5x16	4
102	0,05	0,05x0,1	<0,1
107	453,6	4x5	2,5
110	60	5x12	2,8
111	13,5	1,5x3	1,2
113	310,5	6x6	2,5
115	97,8	4x8	4,5
116	-	n.a.	1,3
117	3,85	1,4x0,55	0,6
119	30,24	0,8x1,2	1,4
124	-	n.a.	n.a.
126	-	n.a.	0,6
130	-	n.a.	n.a.
131	0.034	0,31x0,11	0,3
132	528	6x11	8
134	-	n.a.	5

3.6 Follow-Up und Überleben

Im untersuchten Patientenkollektiv betrug der Altersdurchschnitt 56 Jahre; diese Patienten befinden sich mitten im arbeitsfähigen Alter und werden in der Regel noch über 10 Jahre bis zur Berentung im Arbeitsleben verbleiben. Über 30% der untersuchten Patienten befinden sich in einer Altersgruppe von 45 Jahren und jünger, so dass auch sozio-ökonomische Aspekte eine erhebliche Rolle spielen.

Die Abbildung 17 stellt die Altersverteilung der WLK-positiven Patienten dar. Im Mittel sind die Patienten im Kollektiv 56 ($\pm 15,3$) Jahre alt. Der Median liegt bei 58,0 Jahren.

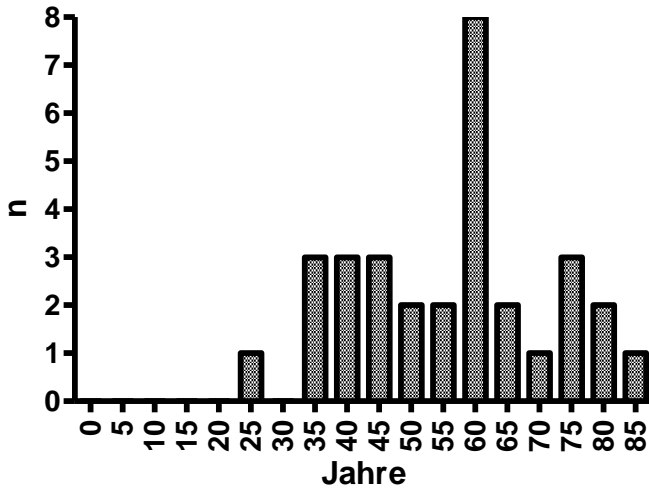


Abbildung 17: Altersverteilung der WLK-positiven Patienten

Die von uns diagnostizierten und therapierten Patienten wurden einer regelmäßigen Nachsorge unterworfen; in der Auswertung der Überlebenszeiten zeigte sich, dass die meisten Todesfälle noch vor Ablauf des 4. Jahres nach Erstdiagnose eingetreten sind (wobei nach 76 Monaten Follow-Up bisher kein weiterer Patient verstorben ist). Die Gesamtüberlebensrate der Patienten mit positiven WLK beträgt 44%. Dies entspricht ebenfalls der 5-Jahresüberlebensrate. In der Abbildung 18 wird die durchschnittliche Überlebenszeit der WLK-positiven Patienten in Monaten dargestellt.

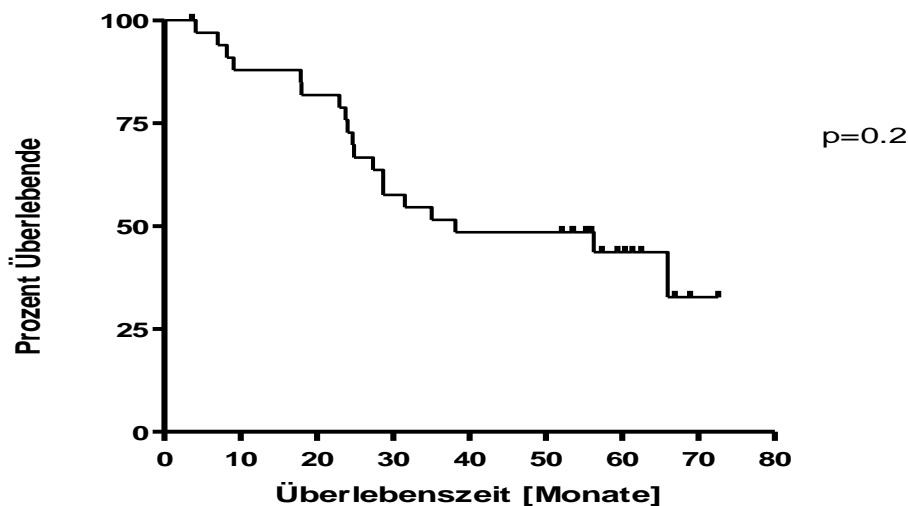


Abbildung 18: Überlebenszeit der WLK-positiven MM-Patienten

In einer detaillierten Analyse der Überlebenszeit der Patienten mit positivem WLK zeigte sich, dass die Spannweite der Überlebenszeit von 4 bis 76 Monaten reicht; im Mittel überleben diese Patienten 39 (± 21) Monate (\pm Standardabweichung). Die Spannweite umfasst einen Bereich von 4 bis 73 Monaten, der sich in seinen Grenzen um den Faktor 18 unterscheidet (Abbildung 19).

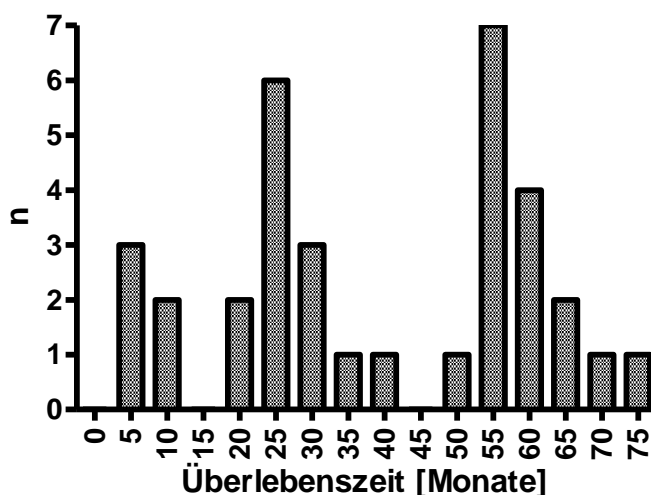


Abbildung 19: Überlebenszeit der Patienten mit positivem WLK in Monaten

Auf der Suche mortalitätsbeeinflussender Faktoren wurden die post-WLK und ihr Tumor-Befall analysiert. Es wurde bei 30 Patienten eine TLND durchgeführt, 4 Patienten verweigerten die TLND. Bei den 30 TLND wurden zwischen 2 bis 21 Lymphknoten entfernt. Bei 19 Patienten fand sich kein weiterer Lymphknotenbefall, bei den übrigen 11 Patienten betrug die Anzahl positiver Lymphknoten zwischen 1 und 21. Das Ergebnis ist in Tabelle 7 dargestellt. Ferner wurde der Lymphknoten-Quotient (LNR = lymph node ratio) des Resektats der post Wächter-Lymphknoten aus allen vorliegenden Präparaten berechnet (Tabelle 9).

Bei gastrointestinalen Tumoren hat sich aufgrund der sehr variablen „Lymphknoten-Ernte“ die Betrachtung des Lymphknoten-Quotienten (engl.: lymph node ratio - LNR) als nützlich erwiesen; gerade beim colorektalen- und Rektum-Karzinom gibt es hier beeindruckende Ergebnisse, wie die LNR mit der Überlebenszeit korreliert [87]. Deshalb wurde der Lymphknoten-Quotient aus den post-WLK gebildet, indem die Anzahl der

positiven Lymphknoten durch die Gesamtanzahl der entnommenen Lymphknoten dividiert wird.

Im vorliegenden Kollektiv findet sich eine durchschnittliche tumorbedingte Mortalität von 47% (16/34). Es zeigt sich, dass Patienten ohne Tumorbefall der post-WLK eine Mortalität von 37% aufweisen; die Patienten mit einem post-WLK-Tumorbefall weisen eine Mortalität von 64% auf.

Tabelle 9: LK-Quotienten der post-WLK und Mortalität. Weitere 4 Patienten verweigerten die TLND, davon verstarben n=3 an einem Tumorprogress.

LNR	alive, NED	AWD	DOD	Total	Mortalität [%]
0,00	9	1	9	19	47
0,08	1	0	1	2	50
0,09	1	0	0	1	0
0,13	0	0	1	1	100
0,25	0	0	3	3	100
0,38	0	0	1	1	100
0,50	2	0	0	2	0
1,00	0	0	1	1	100
verweigerten TLND	1	0	3	4	75

LNR = Lymph node ratio (Anzahl der positiven Lymphknoten im Verhältnis zur Gesamtzahl aller entfernten Lymphknoten)

NED = no evidence of disease (kein Nachweis der Erkrankung)

AWD = alive with disease (lebt mit der Erkrankung)

DOD = died of disease (verstorben an der Erkrankung)

In der Abbildung 20 ist die Anzahl (in%) der WLK-positiven Patienten ohne post-WLK und der WLK-positiven Patienten mit 1 oder mehr post-WLK bezogen auf die Überlebenszeit in Monaten gegenübergestellt. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei den negativen post-WLK-Patienten bei 46% und bei den positiven post-WLK-Patienten bei 36%, entsprechend einer Gesamtmortalität unseres Kollektivs von 43,6%. Im Ergebnis zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit, wengleich als Tendenz festgehalten werden kann, dass Patienten mit LNR = 0 eine größere Überlebensrate zeigen.

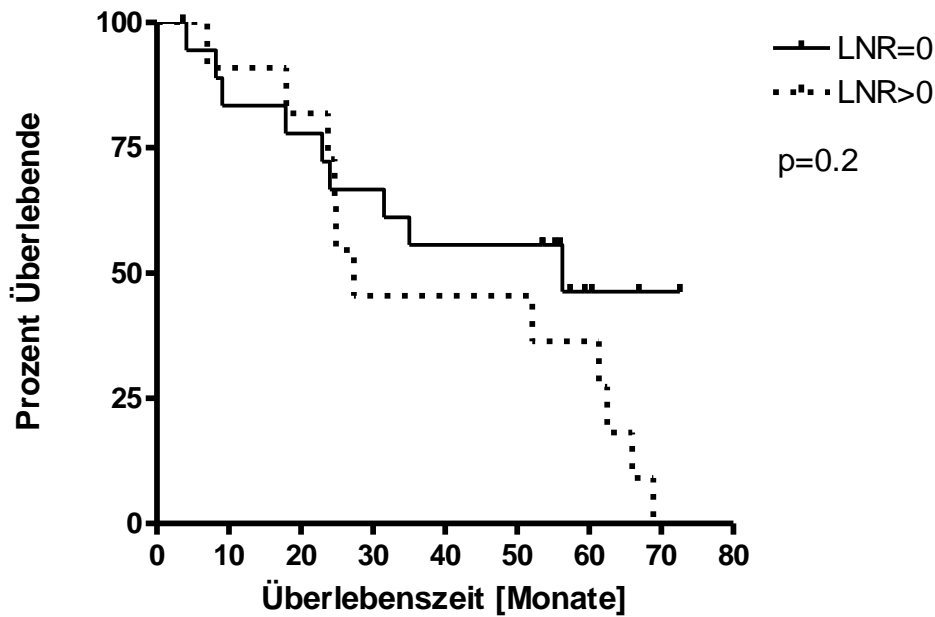


Abbildung 20: Überlebenszeit der Patienten für LNR bei WLK-positiven MM-Patienten.
 LNR=Lymph node ratio; Quotient befallener zu gesamten LK.

Des Weiteren wurde die Anzahl der positiven post-WLK in Bezug auf das Überleben mittels Kaplan-Meier-Methodik analysiert. In der Abbildung 21 wird die Anzahl (in%) der WLK-positiven Patienten mit 0-2 post-WLK und der WLK-positiven Patienten mit > 2 post-WLK bezogen auf die Überlebenszeit in Monaten gegenübergestellt. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei den 0-2 post-WLK-Patienten bei 55% und bei den > 2 post-WLK-Patienten bei 20%. Im Ergebnis zeigt sich auch hier kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit, allerdings ein Trend zu Gunsten der Patienten mit 0-2 positiven post-WLK im Vergleich zu den Patienten mit > 2 post-WLK ($p=0,26$; Logrank Test). Dieses wird in der Literatur bestätigt [48, 88]

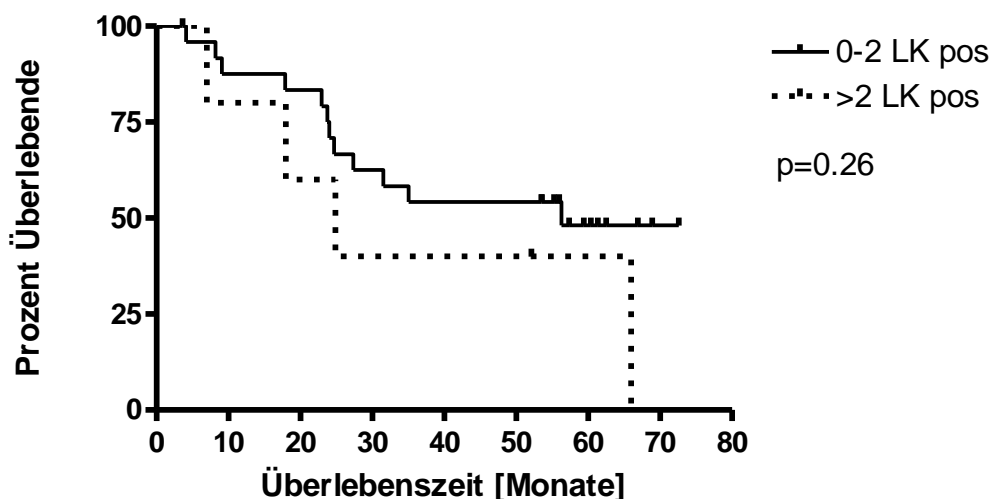


Abbildung 21: Überlebenszeit der Patienten für LNR bei WLK-positiven MM-Patienten mit 0-2 positiven post-WLK im Vergleich zu Patienten mit > 2 positiven post-WLK.

In unserem Kollektiv lässt sich kein signifikanter Unterschied darstellen, wenngleich ein geringer Trend zu Gunsten einer verbesserten Überlebenswahrscheinlichkeit bei post-WLK-negativen Patienten mit malignem Melanom zu finden ist.

Bei allen als sonographisch „negativ“ beschriebenen Wächterlymphknoten (n=86) waren sowohl die HE-Färbung, die immunhistologische Färbung wie auch die ultraschallgesteuerte Feinnadelaspirationscytologie (US-FNAC) negativ. Darüber hinaus waren auch alle Blutuntersuchungen in Bezug auf Tyrosinase RT-PCR bis auf eine Ausnahme negativ. Die sonographisch bzw. mittels Feinnadelaspirationscytologie als positiv gewerteten Wächterlymphknoten (n=34) waren in der HE-Färbung in 31 Fällen positiv; alle 34 Lymphknoten waren jedoch in der immunhistologischen Färbung positiv. Bei den o.g. Ausnahmen wurden vereinzelte Melanom-Zellen nachgewiesen, die nach van Akkooi als „floating cells“ charakterisiert werden, d.h. in der Rotterdamer Auswertung als negativ gelten. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 10 und 11 bzw. 12 (Anhang) zusammengefasst.

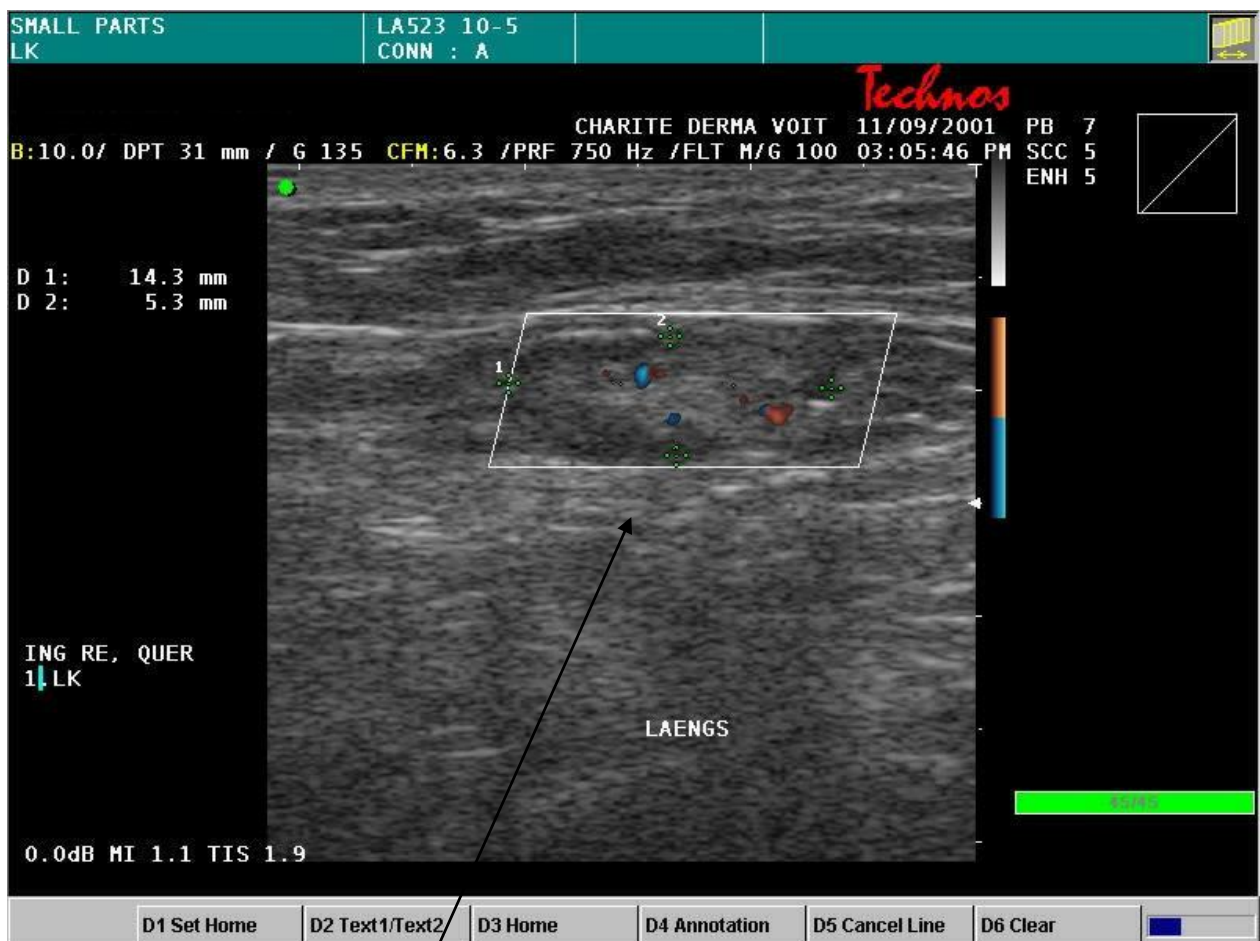
Tabelle 10: Tabellarische Gegenüberstellung der histologischen Ergebnisauswertungen von n = 120 Lymphknoten.

n= 120	Histologie		US-FNAC	RT-PCR aus dem WLK
	HE-Färbung	Immunhistologische Färbung		
negativ n= 86	86 (100%)	86 (100%)	86 (100%)	85 (99%)
positiv n= 34	31 (91%)	34 (100%)	19 (56%)	17 (50%)

3.7 Fallbeispiele und Bilder zur Darstellung der sonographischen Morphologie

Fall-Nr. 15:

Bei dem Patient (m) wurde ein noduläres Melanom (NM, Cl 4, TD 6,0mm; pT 4a, AJCC post WLK-Dissektion IIB – da der WLK selbst ja negativ ist) an der Großzehe diagnostiziert. Weder in der Ultraschalluntersuchung, noch in der FNAC gab es einen Anhalt für Metastasen. In der Histologie fanden sich lediglich einzelne HMB-45 und Melan A-positive Zellen in der afferenten Lymphbahn. Ohne Teilnahme an der Studie wäre die Diagnose nicht gestellt worden. In der sich anschließenden TLND im November 2002 wurden keine weiteren Lymphknoten-Metastasen festgestellt (0/16). Bereits im Dezember 2002 konnte im Rahmen der engmaschigen Nachkontrolle eine Intransit-Metastase am Oberschenkel und im Juni 2004 eine weitere Metastase popliteal sonographisch detektiert werden, die operativ entfernt wurden. Zusätzlich wurde eine adjuvante Therapie mit Interferon alfa durchgeführt. Ausweislich der letzten Nachsorgeuntersuchung am 29.01.2009 lebt der Patient noch immer.



WLK rechts inguinal

Sonomorphologisch: > 1<2 cm, L/B-Index >2, zentral echoreich, kappenartig echoarm, wirkt benige

FNAC: Negativ

Histologisch: WLK intranodal tumorfrei, also FNAC des WLK korrekt negativ; im Vas afferens des LK fanden sich jedoch vereinzelte Tumorzellen.

Post-WLK: 0/16 (keine weiteren Lymphknoten befallen).

Der Patient lebt noch; bisher 90 Monate nach der Erstdiagnose (ED) im September 2001. Die Tyrosinase aus dem Blut war stets negativ.

Fall-Nr. 111:

Bei der Patientin wurde im Januar 2003 ein superfiziell spreitendes Melanom (SSM) am linken Oberschenkel diagnostiziert mit den Tumordaten Cl V, TD 6,0mm, ulceriert, pT 4b, Stadium IIIB AJCC (nach WLK-Diagnostik). Erste Fernmetastasen wurden im Februar 2004 im Bereich der Leber und paraaortal diagnostiziert. Die Patientin verstarb mit 82 Jahren 29 Monate nach der ED an einer anderen, gleichzeitig bestehenden Tumorerkrankung (Pankreas-Carcinom).

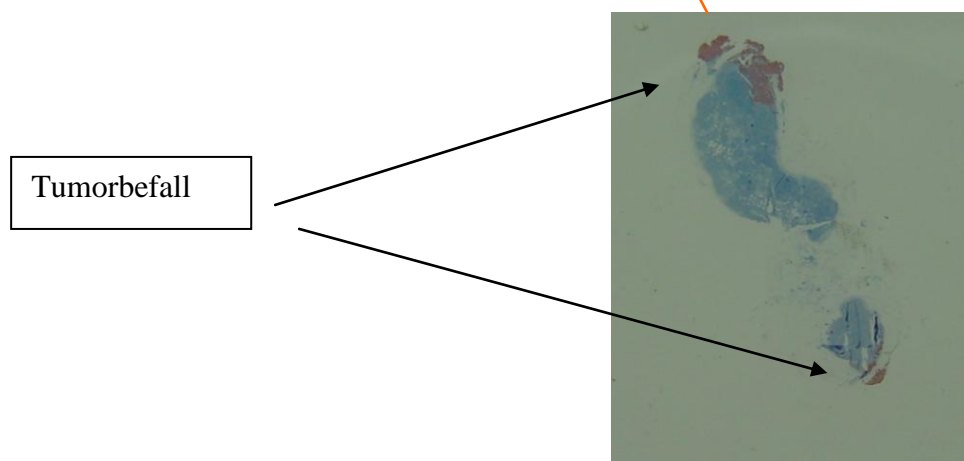
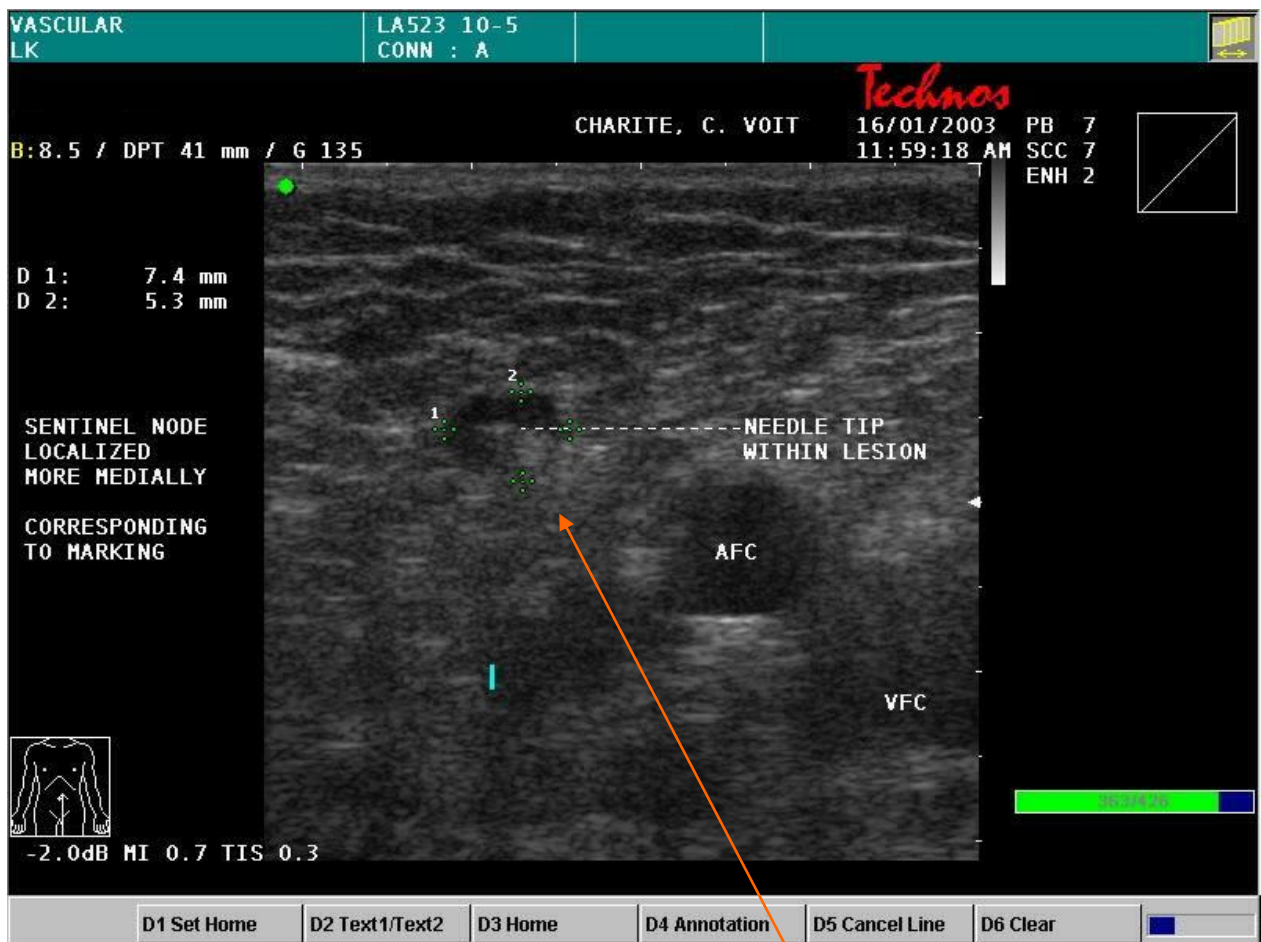


Sonomorphologisch: Zentrale und periphere Mehrdurchblutung, balloniert, < 1cm, L/B-Index < 2, zentral echoreich mit echoarme asymmetrische Kappe, Hilus verschoben.

FNAC: Positiv (in Abbildung FNAC-Nadelspitze erkennbar)

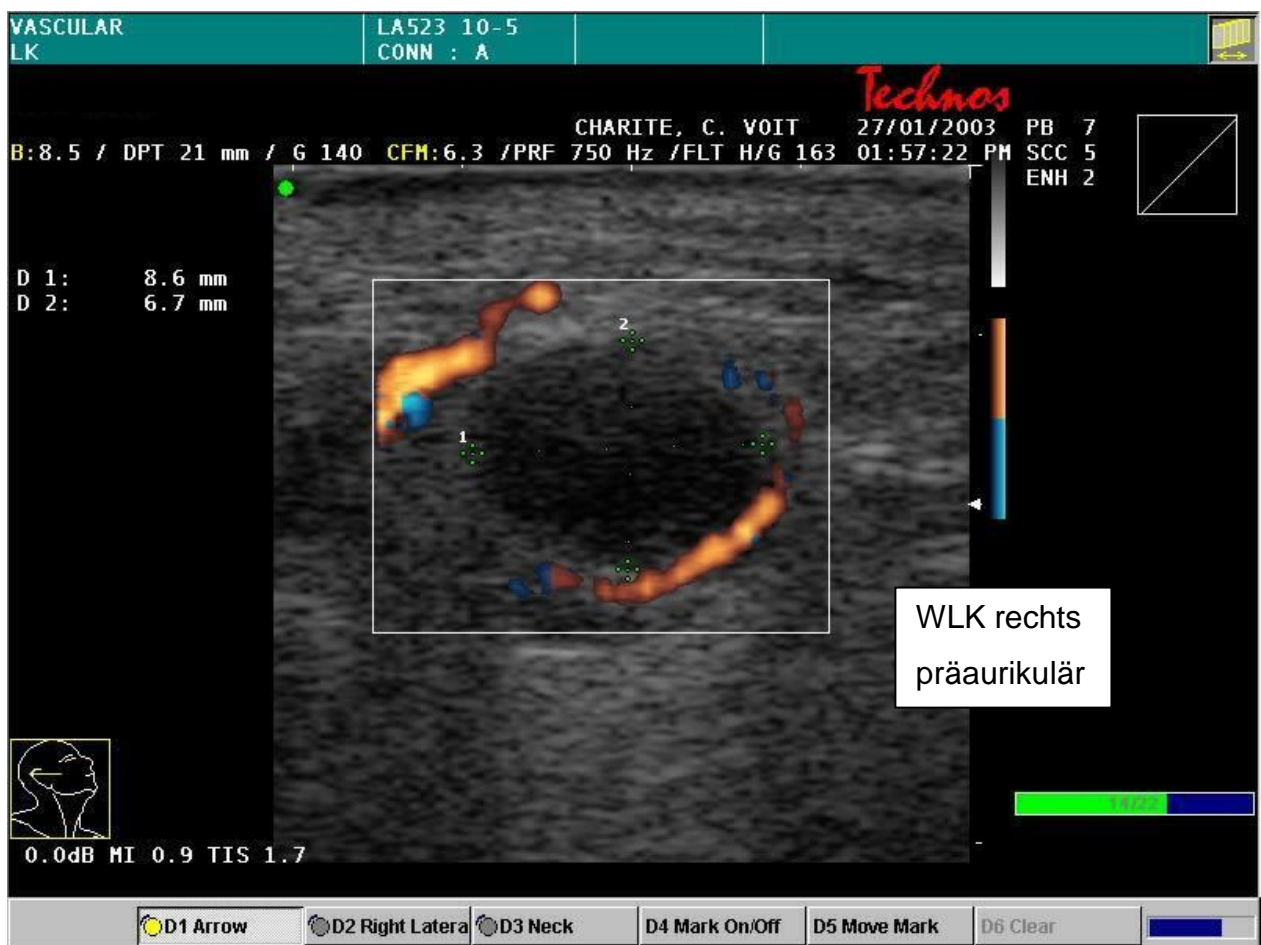
Histologisch: Multipler, intralymphatischer Befall; größter Durchmesser 1,5 x 3 mm

Post-WLK: Eine TLND wurde von der Patientin verweigert.



Fall-Nr. 115:

Im Januar 2003 wurde ein superfiziell spreitendes ulceriertes Melanom am rechten Ohr diagnostiziert. Die Tumordicke betrug 2,89mm, Clarklevel IV, pT3b sowie Stadium IIIC nach AJCC. Die Tyrosinase-PCR aus dem Blut war immer negativ (3 Abnahmen). Eine komplette Lymphknotendissektion wurde vom Patienten verweigert. Insgesamt konnten 4 post-WLK entfernt werden von denen 2 Lymphknoten befallen waren. Auch eine regelmäßige Follow-Up-Untersuchung wurde vom Versicherten abgelehnt. Aufgrund jährlicher telefonischer Nachfragen lebt der Versicherte noch immer (zuletzt 15.11.2007, entspricht ~ 59 Monate nach der Erstdiagnose).

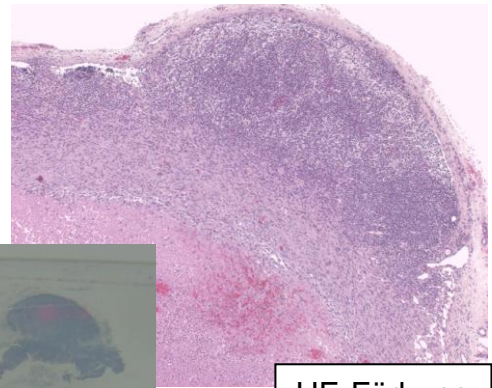


Sonomorphologisch: Ausgesprochen deutlich darstellbare periphere Mehrdurchblutung, balloniert, < 1cm, L/B-Index <2, wirkt maligne.

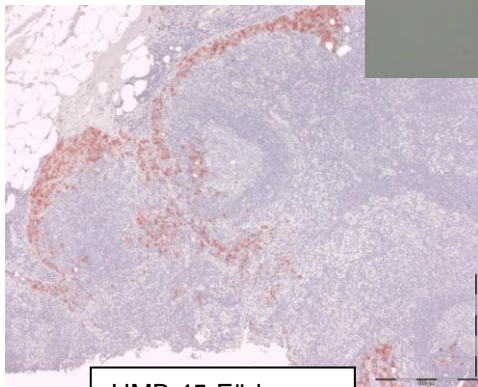
Histologisch: Multipler subcapsulärer und intralymphatischer Befall, größter Durchmesser 4x8mm.

FNAC: Positiv.

Post-WLK: 2/4 befallen.



HE-Färbung



HMB 45-Färbung

VASCULAR LK LA523 10-5 CONN : A

CHARITE, C. VOIT 27/01/2003 PB 7
CFM:6.3 /PRF 750 Hz /FLT H/G 128 02:00:13 PM SCC 5
ENH 2

D 1: 12.1 mm
D 2: 8.1 mm
D 3: 11.5 mm
D 4: 9.5 mm

Nachgeschalteter Lymphknoten

PRAEAURICULAER RE
CAUDALERE RF

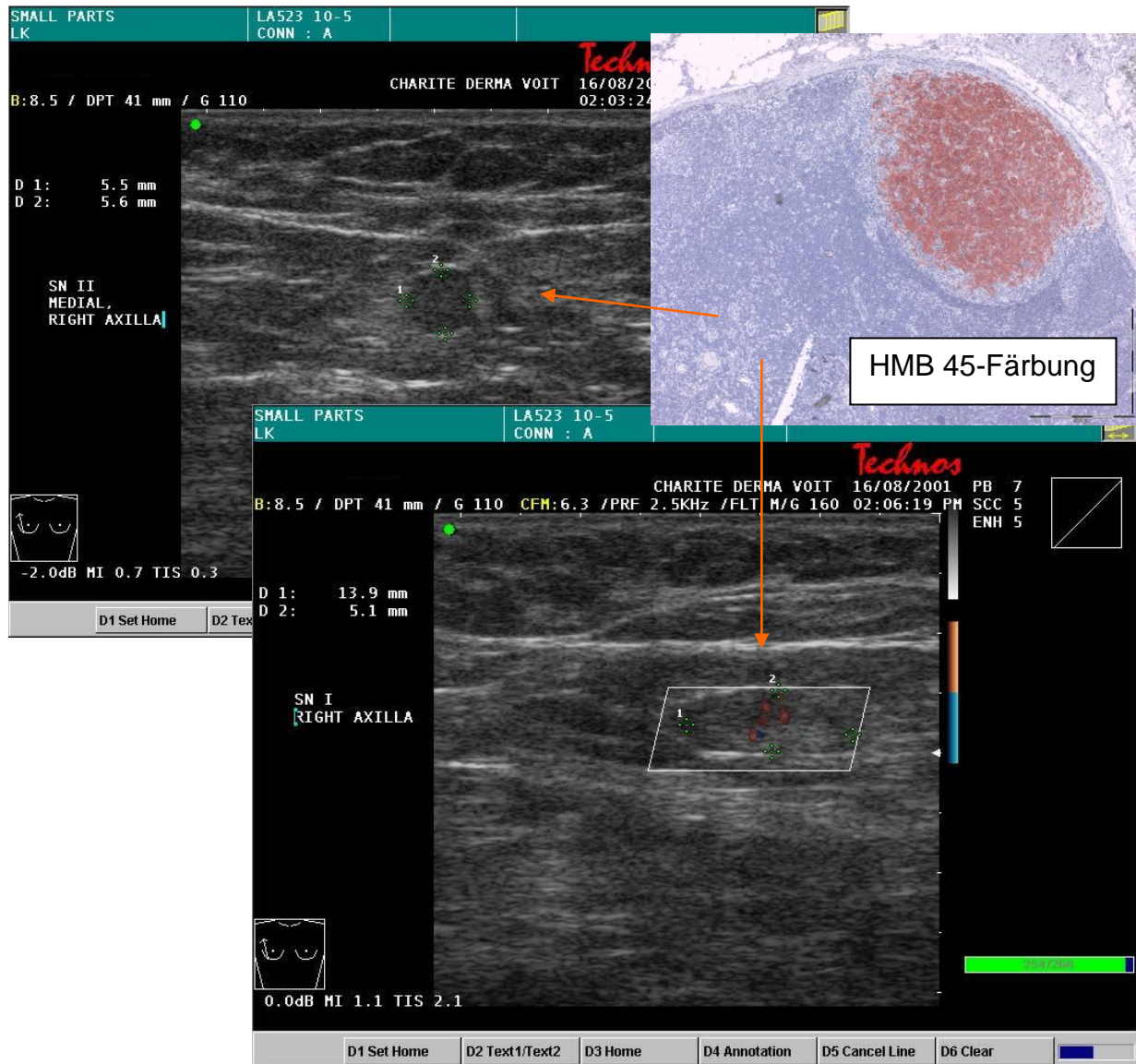
0.0dB MI 0.9 TIS 1.5

D1 VASCULAR D2 RIGHT D3 D4 D5 Angle D6 Clear

0/0
231/231

Fall-Nr. 11:

In der Erstdiagnose im Juli 2001 fand sich ein noduläres Melanom (NM) am Rücken, TD 3,0mm, Clarklevel IV, pT3a sowie Stadium IIIA nach AJCC nach der WLK-Entfernung. Im September 2005 waren Fernmetastasen nachweisbar. Ab diesem Zeitpunkt war auch die PCR-Tyrosinase im Blut nachweisbar. Im März 2006 – 57 Monate nach der Erstdiagnose – verstarb der Patient am Tumor (mit 35 Jahren).



Sonomorphologisch: Längsoval, > 1cm, L/B-Index >2, wirkt maligne.

Histologisch: Solitär intralymphatischer Befall, größter Durchmesser 0,89 x 1,15 mm.

FNAC: Nicht diagnostisch (zu wenig Zellen)

Post-WLK: 0/13 (kein weiterer Lymphknotenbefall).

Fall-Nr. 90:

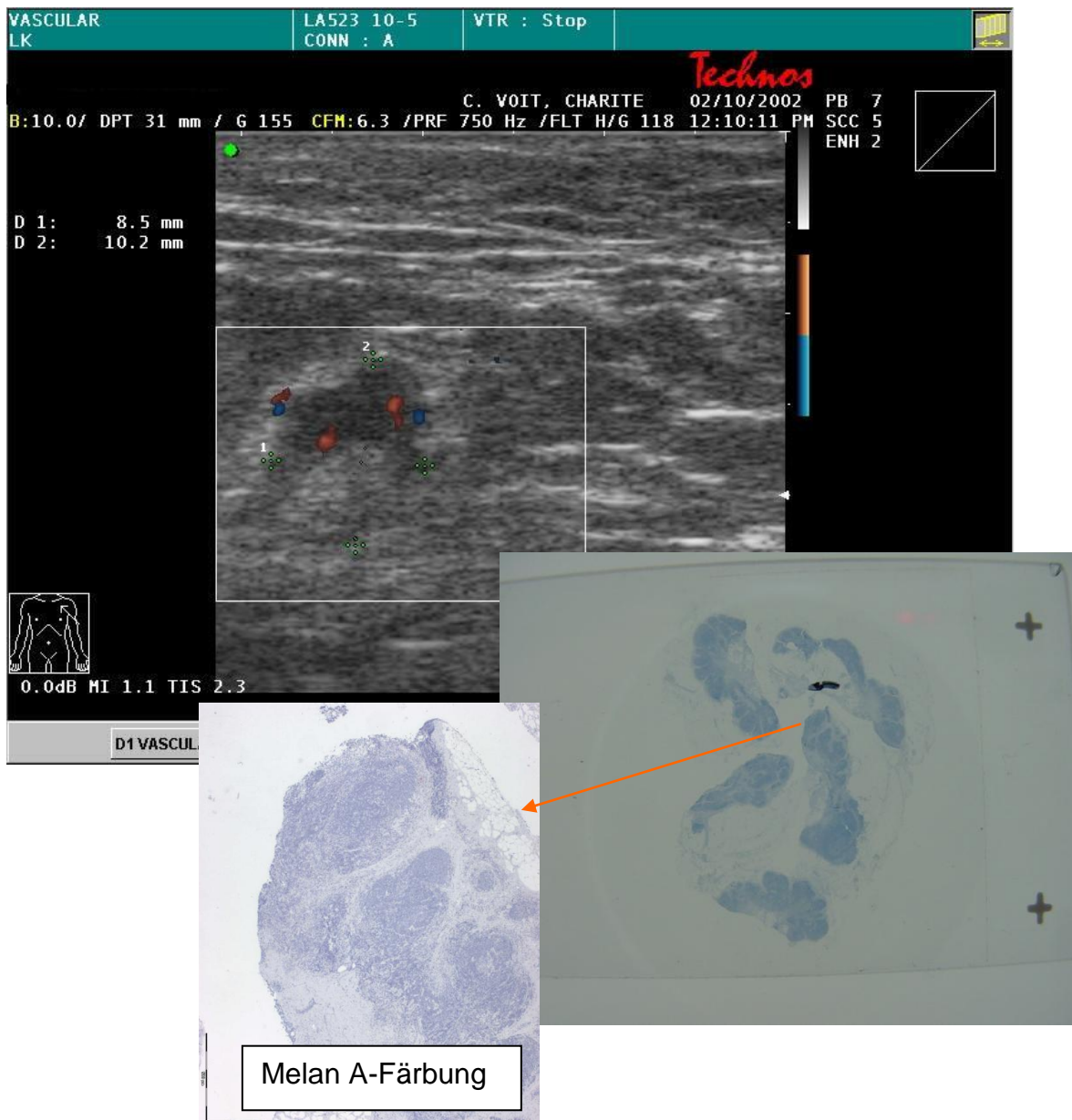
Die Erstdiagnose erfolgte im August 2002. Es fand sich ein SSM, Clark-Level III, Tumordicke 1,56mm mit Regression, pT2a; nach Entfernung des WLK Stadium IIIA nach AJCC. Die Tyrosinase aus dem Blut war negativ. Das letzte Follow-Up ist vom Mai 2007 dokumentiert. Der 60-jährige Patient lebt zu diesem Zeitpunkt 56 Monate rezidivfrei.

Sonomorphologisch: Periphere Mehrdurchblutung, asymmetrischer Parenchybuckel, < 1cm, echoarme Inseln, L/B-Index >2, wirkt maligne.

Histologisch: Multipler subcapsulärer Befall, größter Durchmesser < 1mm.

FNAC: Negativ

Post-WLK: 0/7 (keine weiteren Lymphknoten befallen).

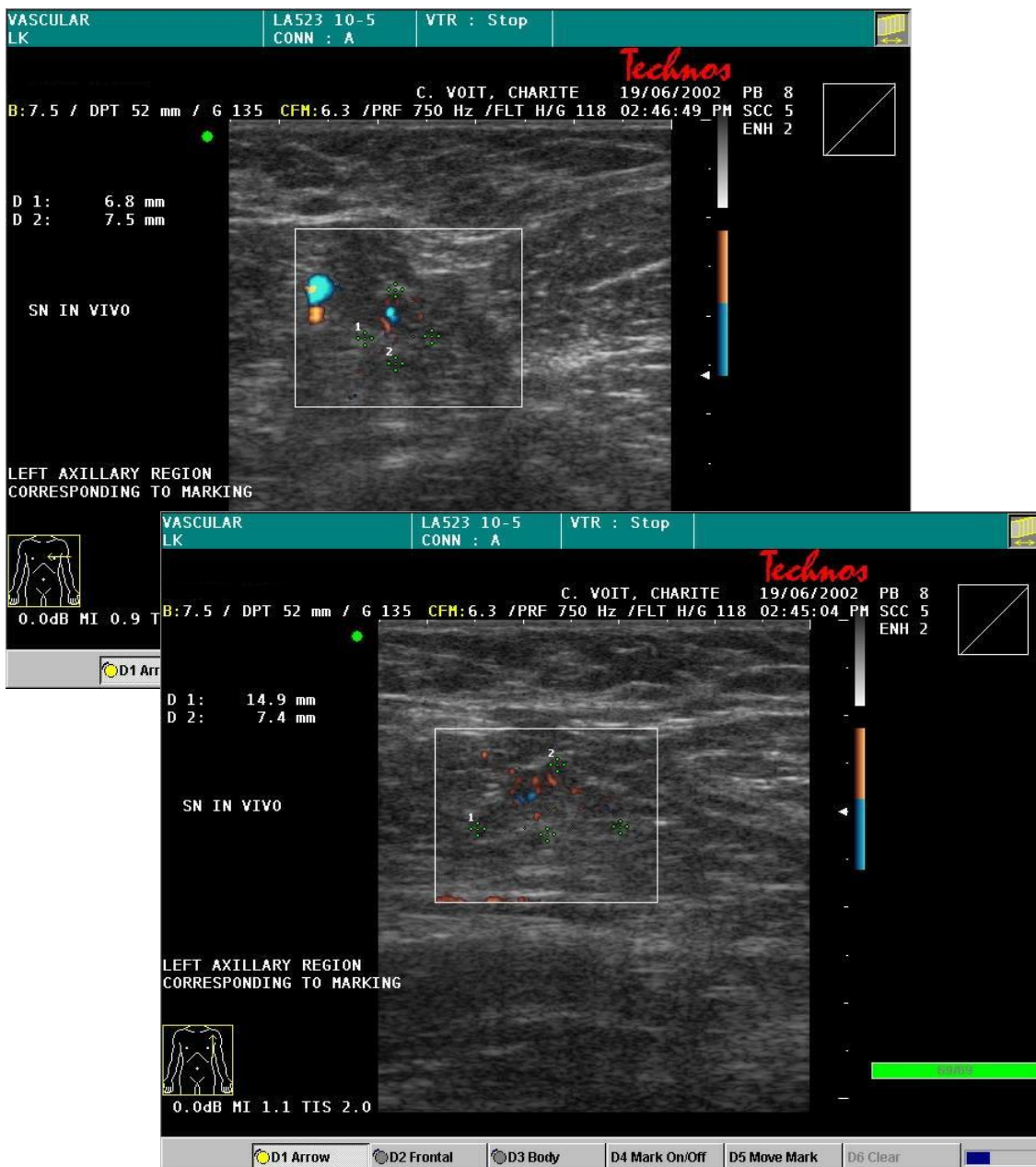


Fall-Nr. 69:

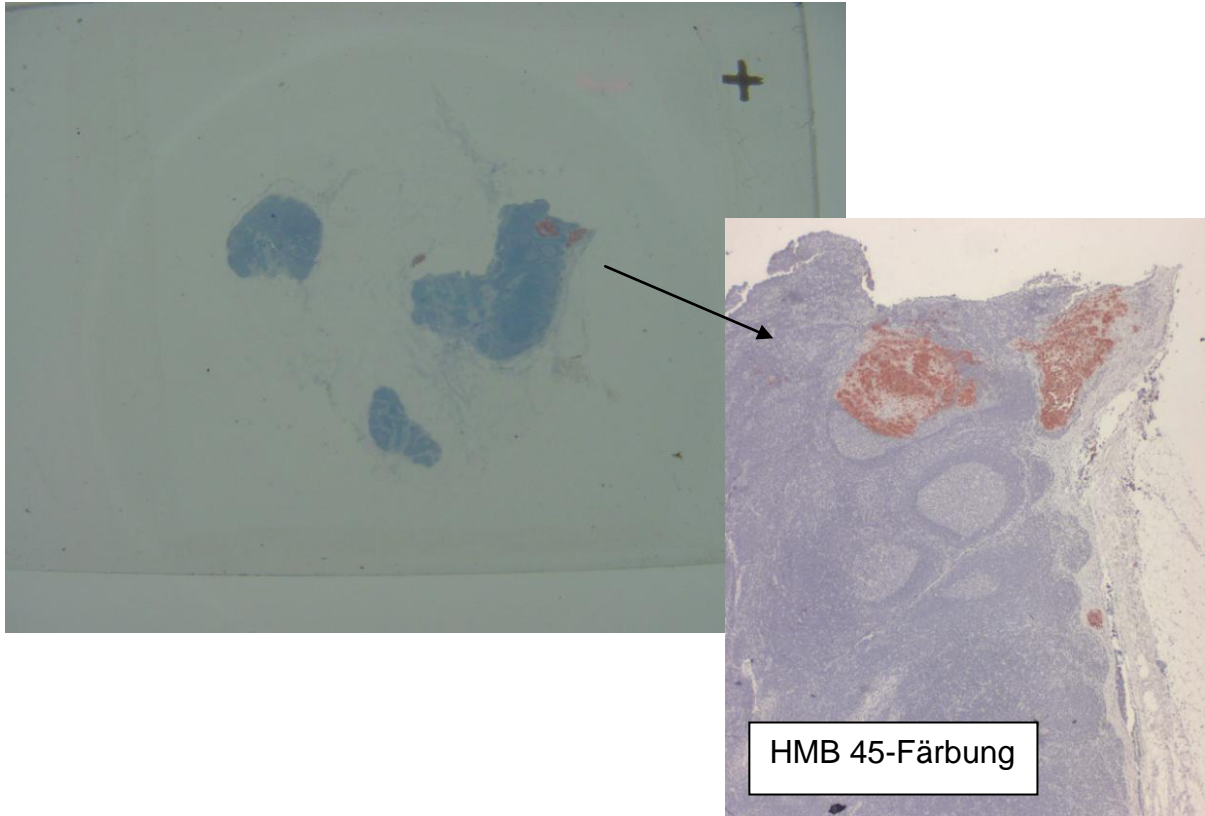
Bei diesem Patienten fand sich im Rahmen der Erstdiagnose im Mai 2002 ein ulzeriertes noduläres Melanom am Rücken, Tumordicke 7,0mm, Clark-Level IV, pT4b; nach WLK-Entfernung Stadium IIIB nach AJCC. Die Tyrosinase aus dem Blut war bis zum Oktober 2004 negativ. Der Patient verstarb mit 26 Jahren am 15.01.2005, 32 Monate nach der Erstdiagnose am malignen Melanom.

Sonomorphologisch: Periphere Mehrdurchblutung, Parenchymbuckel, >1<2 cm, zentral echoreich mit echoarmen Inseln, L/B-Index >2, wirkt maligne.

RT-PCR: Negativ; FNAC: Positiv; Post-SN: 0/13 (keine weiteren Lymphknoten befallen).



Histologisch: Multipler subcapsulärer und intralymphatischer Befall, größter Durchmesser 0.83 x 1,5 mm.



4. Diskussion

Im untersuchten Patientenkollektiv betrug der Altersdurchschnitt 56 Jahre; diese Patienten befinden sich mitten im arbeitsfähigen Alter und werden in der Regel noch über 10 Jahre bis zur Berentung im Arbeitsleben verbleiben. Über 30% der untersuchten Patienten befinden sich in einer Altersgruppe von 45 Jahren und jünger, so dass auch sozio-ökonomische Aspekte eine erhebliche Rolle spielen. Eine schnelle Diagnostik sowie eine zügige effektive Therapie sind entscheidend für die Prognose (Überleben).

Die ersten 20 Patienten dieser Studie wurden in Kombination mit SonoVue® sonographisch untersucht. Bei SonoVue® handelt es sich um ein Sonokontrastmittel mit dem wirksamen Bestandteil Schwefelhexafluorid (einem in Blut nicht löslichem Gas), das intravenös appliziert wird und zur Bildung von Mikrobläschen im Blut führt. Eine bessere sonographische Darstellung der Mikrozirkulation ist für Leber und Brustläsionen klinisch belegt, nicht jedoch für Läsionen im Pankreas, den Nieren, den Ovarien und der Prostata. Im Rahmen unserer Untersuchung konnte keine Verbesserung der Lymphknoten-Darstellung erzielt werden, da durch Definition von sonomorphologischen Kriterien bereits eine hohe Trefferquote vorliegt, wie auf dem diesjährigen amerikanischen Krebskongress (ASCO) 2009 vorgestellt [89].

Nachteilig sind die intravenöse Medikamentenapplikation, der Personalaufwand (s.u.) sowie die Nebenwirkungen mit Kopfschmerzen, Übelkeit, Schmerzen, Brennen, Bluterguss und Parästhesien an der Injektionsstelle. Darüber hinaus wurden ausweislich des „Rote-Hand-Reports“ vom 03.06.2004 zwar seltene, aber schwere allergoide Reaktionen mit Todesfolge in 3 Fällen beschrieben. Vom Hersteller wird daher bis auf weiteres empfohlen, Patienten während der Untersuchung und für mindestens 30min nach Gabe von SonoVue® engmaschig medizinisch zu überwachen. Weiterhin soll eine entsprechende Notfallausstattung vorhanden sein und erfahrendes Fachpersonal bereitstehen.

Entgegen der Annahme in früheren Studien [90] handelt es sich bei der Wächterlymphknotenbiopsie um eine Staging-Untersuchung (Diagnostik/Prognostik) und nicht um eine therapeutische Maßnahme im Hinblick auf eine wirksame

Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit (Evidenzlevel III; Leitlinie malignes Melanom 02/2005 S. 13, bzw. MSLT-1 Studie).

In der vorliegenden Arbeit wurde die prospektive Anwendung von Ultraschall, FNAC und Tyrosinase RT PCR in den Medien Wächterlymphknoten und Blut einzeln und in Kombination bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die ultraschallgestützte Feinnadelaspirationszytologie am WLK ein wichtiges Instrument ist, um metastatische Absiedelungen bei Patienten mit malignen Melanom frühzeitig zu detektieren. Durch Einsatz von Ultraschall lassen sich auch Melanom-Patienten identifizieren, die keine WLKD benötigen [91]. Dieses ist eine für die Patienten wichtige Entwicklung, da die grundsätzliche Lymphknotenbiopsie bei nachweisbarer Morbidität bisher keinen Überlebensvorteil nachweisen kann [92, 93]. Diese Ergebnisse werden in der großen MSLT-1-Studie bestätigt, jedoch abschließend von den Autoren anders interpretiert [94]. In der MSLT-1-Studie wurden in einem Studienarm im Fall eines positiven Wächterlymphknoten sofort die Lymphknoten der Region entnommen, im anderen Studienarm nach Operation des Primärtumors zunächst nur beobachtet und erst klinisch auffällige, d.h. palpable Lymphknoten entfernt. In beiden Gruppen war das melanomspezifische Überleben nach 10 Jahren praktisch identisch. Dennoch kommen die Autoren unter Berücksichtigung von Subgruppenanalysen zum Schluss, dass sich die Wächterlymphknotenbiopsie und ggf. sofortige Lymphknotenentfernung prognostisch günstig auswirken kann. Diese Einschätzung wird gerade in letzter Zeit kontrovers diskutiert [94]. Zunehmend setzt sich jedoch die Einsicht durch, dass zumindest die CLND (komplette Lymphknotenentfernung) bei Patienten mit histologisch positivem Wächterlymphknoten keinen Vorteil im Gesamtüberleben bringt und daher nur noch in randomisierten Studien durchgeführt werden sollte. Zur Klärung dieser Frage läuft aktuell die internationale MSLT-2 Studie sowie eine multizentrische deutsche Studie (ADO).

Die Nachweisgrenze von Tumordeposits im Wächterlymphknoten liegt nach Untersuchungen von Starritt et al. kleiner 4,5mm [95]; nach Untersuchungen von anderen Wissenschaftlern liegt die Nachweisgrenze bereits unterhalb von 4mm [96, 97]. In unserem Kollektiv wurden z.T. auch Lymphknoten mit noch kleineren Tumordeposits sonographisch als „sicher maligne“ eingeschätzt. Das kleinste sonographisch detektierte Tumordesposit betrug im Histoschnitt lediglich 0,5mm. Hier ist jedoch festzuhalten, dass sonographisch nicht nur die Tumorzellen bzw. die Tumormasse

selbst, sondern auch das tumorbedingt reaktiv veränderte Umgebungsgewebe bei der sonographischen Beurteilung des Lymphknotens zum Tragen kommt. Im konkreten Fall war der Lymphknoten selbst 4,5x7,5mm groß und damit punktierbar.

In der Diagnostik und Nachsorge des malignen Melanoms werden verschiedene sonomorphologische Kriterien beschrieben, die Hinweise auf Malignität geben können [98]. Dieses spiegelt sich in den Daten unserer Arbeit wieder. So konnte nachgewiesen werden, dass sonomorphologische Kriterien wie „Buckelung“ und Perfusionsmuster des Lymphknotens mit einem sehr zuverlässigen und frühzeitigem Vorhersagewert verknüpft sind. Weitere in der Literatur beschriebene sonomorphologische Parameter wie z.B. die Hilusverlagerung mit fehlenden Hilusechos oder der Roundness- bzw. Vasallo-Index zeigten dies in unserem Kollektiv nicht. Die Untersuchungsmethode des Ultraschall erweist sich jedoch stark als Untersucher abhängig, so dass auch noch heutzutage Tumordeposits > 5mm teilweise nicht zuverlässig erkannt werden [99].

Die diagnostische Aussagekraft des Ultraschalls konnte in Kombination mit der FNAC zusätzlich deutlich verbessert werden. Dies führen wir darauf zurück, dass die FNAC des Lymphknotens bereits sehr früh beim Vorliegen einer Buckelung bzw. einer Parenchymverbreiterung mit Mehrperfusion durchgeführt wurde, entgegen dem üblichen Vorgehen in anderen Zentren bzw. Arbeitsgruppen, die in der Regel erst deutlich später beim Vorliegen von ballonierten bzw. echoarmen Lymphknoten punktieren. Bei der ultraschallgesteuerten FNAC kommt es zu Synergieeffekten. Zum einen kann die Treffsicherheit der FNAC durch den Ultraschall erhöht und damit die Sensitivität der FNAC verbessert werden. Zum anderen konnte die Sensitivität der alleinigen Ultraschalldiagnostik durch die FNAC im vorliegenden Patientengut auf insgesamt 82% gesteigert werden. Die FNAC stellt somit in der Melanomnachsorge eine wichtige Ergänzung dar und ist sowohl in der Primärdiagnostik des Wächterlymphknotens, als auch im Rahmen der Nachsorge einsetzbar. Die Spezifität dieser Untersuchungskombination lag bei 72%. Wir fanden einen negativen Prädiktionwert von 91%. Diese Zahlen sind vergleichbar mit denen der Rotterdam Brustkrebs-Studie [100].

Erstaunlicherweise lässt sich die durch ultraschallgesteuerte FNAC erreichte Sensitivität nicht durch die zusätzliche Anwendung der Tyrosinase-RT-PCR aus dem lymphatischen Gewebe der Punktate bzw. der exzidierten Lymphknoten erhöhen. Diese Ergebnisse werden durch eine unlängst publizierte Studie unterstützt [72]; auch

Scoggins et al. findet keine wesentliche Erhöhung der prognostischen Power bei Einsatz von RT-PCR in der Analyse von Wächterlymphknoten beim malignen Melanom. Allerdings befindet sich die Rolle von neueren immunohistopathologischen Methoden zur Analyse von „single cells“ und „floating cells“ noch in der Diskussion. Während früher nur der Nachweis von massiv positiv befallenen Lymphknoten möglich war, ermöglichen uns diese neuesten Techniken, bis hin auf den zellulären Level, Tumorzellen nachzuweisen. Auch die RT-PCR ist in der Lage, eine einzelne DNA-Kopie mehrfach zu duplizieren und nachzuweisen. Es bleibt hingegen unklar, welchen klinischen Wert diese einzelnen Zellen haben. Aus Untersuchungen zum Zellverlust von Tumoren (Differenz von Verdopplungsrate zu tatsächlichem Tumolvolumenwachstum) ist bekannt, dass bis zu 60% der produzierten Tumorzellen nicht die Tumormasse vor Ort vergrößern, sondern nekrotisch werden, immunologisch bekämpft werden, oder in den Kreislauf des Wirts abgeschwemmt werden. Dieses ist vor allem bei Tumoren der Fall, die über ein reiches Gefäßnetz oder die Fähigkeit zur Neoangiogenese verfügen [43].

Da selbst Tumoren mit größeren Zellverlusten nicht durchgehend metastatische Tumoren sind, müssen Co-Faktoren vorhanden sein, die eine aktive Metastasierung der Zellen über die Migration hinaus ermöglichen oder unterstützen. Einer der möglichen Faktoren für das Vorhandensein von einzelnen Melanomzellen ohne Progression in das Rezidivstadium ist das Verbleiben von Tumorzellen im G0-Stadium. Auch können Änderungen des Mikro-Environments zum Ableben dieser einzelnen Zellen, jedoch auch zum Wiedereintritt in den Zellzyklus und zur Tumorprogression führen.

Manche Autoren sehen in den immer empfindlicheren Nachweismöglichkeiten einzelner Tumorzellen im Wächterlymphknoten die Gefahr einer Überbewertung im Sinne höherer Fallzahlen von positiven, aber klinisch nicht relevanten, d.h. „falsch-positiven“ Wächterlymphknoten [38, 93, 94]. Insofern ist es notwendiger denn je, frühere, prognostisch sichere und zuverlässige Tumormarker zu finden. Durch RT-PCR können auch im peripheren Blut verschiedene Marker für Melanom-Zellen nachgewiesen werden (u.a. Tyrosinase, MART-1, MAGE-3, GP-100). Die prognostische Aussagekraft dieser Marker wird in verschiedenen Studien diskrepant beurteilt. In der großen Sunbelt-Studie [72] wird bei Vorliegen von mehr als einem Marker lediglich ein kürzeres DFS bzw. DMFS, jedoch kein Einfluss auf das OS beschrieben. Zwischenzeitlich wurde dieses Ergebnis allerdings unter Berücksichtigung der Zeitachse in Bezug auf das „Outcome“ relativiert. In 2 weiteren Studien hingegen korreliert das Ergebnis mit einer

schlechteren Prognose [73, 101]. In unserer Studie wurde nicht der Multimarker-Test, sondern allein die RT-PCR zum Nachweis der Tyrosinase als zeitabhängige Variable verwendet. Bei einer durchschnittlichen Nachuntersuchungszeit von 6,3 Jahren (0,9 bis 8,6 Jahre) und einem Patientenspektrum im Stadium II und III, fand sich hier eine eindeutige Korrelation zwischen dem Nachweis einer positiven Tyrosinase-RT-PCR und dem Gesamtüberleben (= Tumoprogession; schlechtere Prognose).

Die Ergebnisse der Lymphnoderatio (LNR) sind diskordant mit denen beim colorektalen Karzinom; es muss jedoch angemerkt werden, dass beim colorektalen Karzinom alle Lymphknoten in den Lymphknotenstationen hinter dem Tumor zugleich betrachtet werden. Mit der Entfernung des WLK ist grundsätzlich auch bei Patienten mit malignem Melanom bei den mit LNR=0 bezeichneten WLK-positiven Patienten bereits ein Tumorpositiver Lymphknoten, nämlich der positive Wächterlymphknoten, vorhanden. Dies würde beim colorektalen Karzinom bereits als eindeutige Streuung und damit prognostisch als Verschlechterung der Überlebenszeit zu werten sein (wie letztendlich auch beim malignen Melanom). Dennoch ist aus den vorliegenden Daten nicht abschließend zu beurteilen, ob die Anzahl der positiven Lymphknoten oder die Lymphknotenratio (LNR) nach TLND das potentere prognostische Kriterium für das Überleben von Malignompatienten ist. In der Literatur wird der Nachweis positiver Nicht-Wächterlymphknoten als prognostisch ungünstig bewertet [102] und findet auch seine Entsprechung bei der Stadieneinteilung nach AJCC 2002, jedoch findet sich in der publizierten Literatur bei einer Recherche nicht ein einziger Artikel unter den Stichworten „LNR“ und „malignant melanoma“.

Wegweisender ist die nach Starz beschriebene S-Klassifikation [36] bzw. die Tumorlast nach Dewar [103]. Wobei neuere Studien zeigen, dass insbesondere die Tumorlast insgesamt (Tumorburden) und weniger die Tumorlokalisierung als prognostischer Faktor für einen post-WLK Befall und das Gesamtüberleben gewertet werden kann.

Daten von van Akkooi et al. deuten darauf hin, dass Mikrometastasen des malignen Melanoms von einem Durchmesser $< 0,1\text{mm}$ (sogen. Submikrometastasen) der Lymphknoten prognostisch so günstig wie ein unbefallener Wächterlymphknoten klassifiziert werden sollten [38].

In der Beurteilung der maximalen und minimalen Tumor-Fläche wurden in unserem Kollektiv die Maße des größten Tumor-Zellnestes (van Akkooi) verwendet bzw. die Summe aller Einzelnest-Flächen unter Einbeziehung aller vorhandenen positiven

histologischen Schnittebenen gebildet (Audring). In Tabelle 8 sind die Nestgrößen (Fläche) im Vergleich zum größten Tumordurchmesser gegenübergestellt. Wenn die Werte bei van Akkooi linear ansteigen, steigen die Werte bei Audring exponentiell an; diese Korrelation ist hochsignifikant (Abbildung 22).

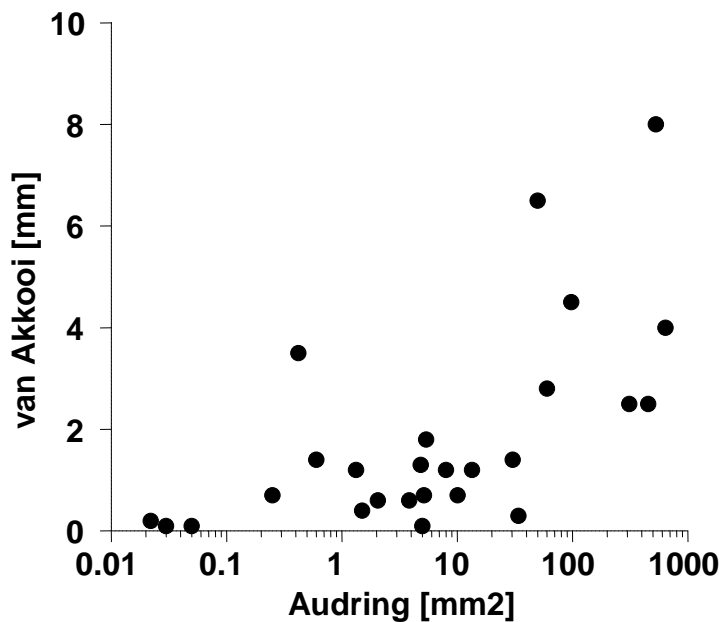


Abbildung 22: Korrelation der Auswertungsparameter, definiert nach Audring und van Akkooi; die Tumornestfläche nach Audring ist logarithmisch auf der x-Achse aufgetragen.

In der vorliegenden Untersuchung konnten die Anwendung von Ultraschall, FNAC und Tyrosinase RT-PCR und ihr prognostischer Wert untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung der Tyrosinase RT-PCR am Lymphknoten und im Blut als frühzeitige Diagnostik hilfreich ist und Patienten mit positivem RT-PCR Ergebnis im Blut ein verkürztes „overall-survival“ (= Gesamtüberleben) bzw. ein kürzeres „disease-free-survival“ (= krankheitsfreies Intervall) zeigen. Der Nachweis von Melanom-Produkten in Form der Tyrosinase - nachgewiesen mittels RT-PCR im peripheren Blut - wurde in der vorliegenden Untersuchung als hochsignifikant prognostisch ungünstiger Marker identifiziert. Es konnte nachgewiesen werden, dass allein der einmalige Nachweis zu einer Reduktion des 5-Jahresüberlebens von 90% auf 20% führt. Diese Patienten benötigen eine engmaschigen Nachsorge und können somit für weitere Studien (adjuvante Therapieoptionen) gebahnt werden.

Es konnte ferner gezeigt werden, dass es eine Korrelation zwischen den histologischen Daten der Metastasen-Lokalisation im WLK (Tumorlast; Tumornestgröße) und der Überlebensrate gibt. So waren in unserem Kollektiv mit positivem Wächterlymphknoten ($n = 34$) Überlebende nur dann zu beobachten, wenn der von van Akkooi gemessene Score des Tumorburden unterhalb von 5mm und die von Audring gemessene Tumornestfläche kleiner 333 mm^2 ist (Abbildung 23). Da der Score von van Akkooi viel einfacher anwendbar und mit anderen Ergebnissen vergleichbar ist, und gleichzeitig gut mit dem Überleben der Patienten korreliert, scheint auch aus unserer Erfahrung dieses die Meßmethode der Zukunft in der Nachsorge des malignen Melanoms zu sein. Ein Mehraufwand, wie er bei der Methode von Audring zu erbringen ist, bringt, wie wir zeigen konnten, keine zusätzlichen prognostischen Informationen mit sich; beide Methoden sind hingegen gut korreliert und im Ergebnis vergleichbar (Abbildung 22).

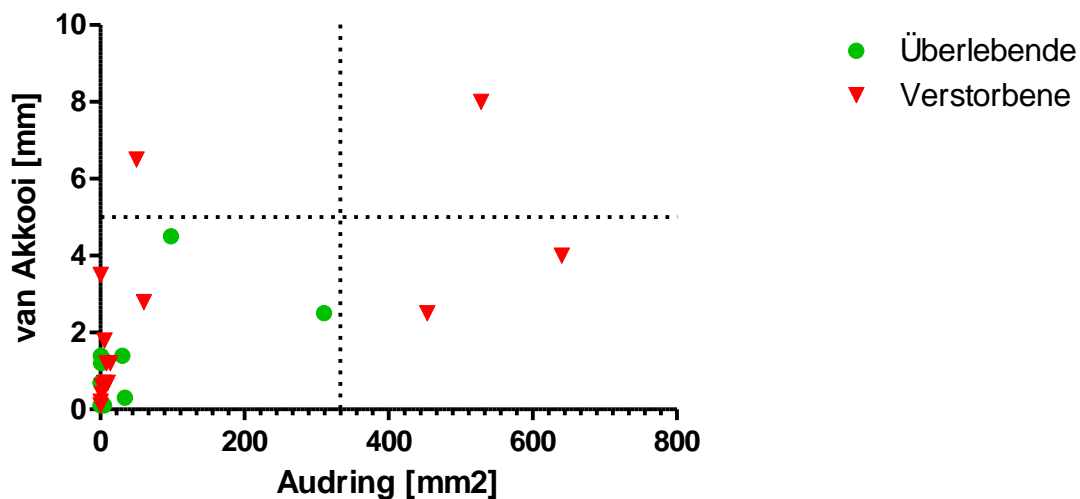


Abbildung 23: Darstellung der Überlebenden und Nichtüberlebenden in Korrelation der Auswertungsparameter, definiert nach Audring und van Akkooi.

In der vorliegenden Untersuchung konnten die etablierten sonomorphologischen Parameter bestätigt werden; Haupteinflußfaktor auf die Spezifität bzw. Sensitivität der Methode bleibt nach wie vor die Erfahrung des Untersuchers. Die Einbringung neuer Parameter ist aus unserer Sicht nicht zweckdienlich; vielmehr ist hieraus hergeleitet die Zusammenführung der Patientennachsorgen an spezialisierten Zentren zu fordern.

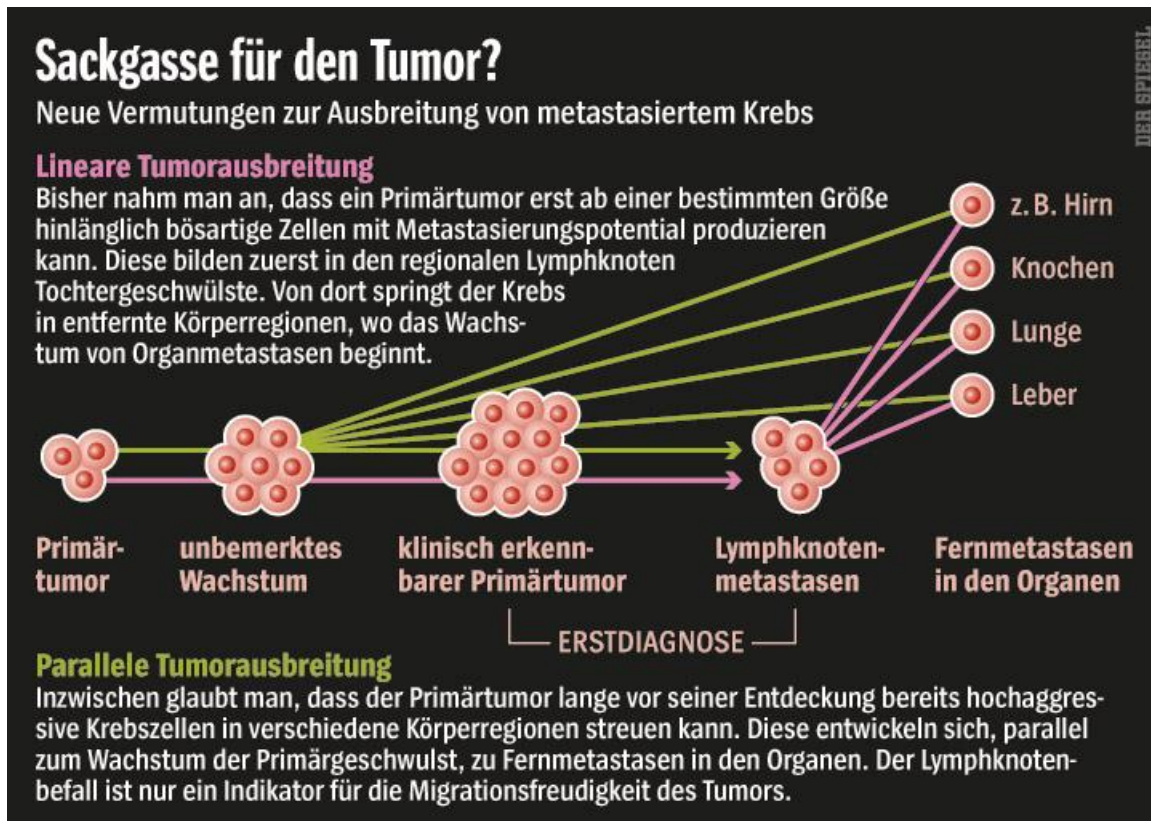
Die Auswirkungen der mit der beschriebenen Methodenkombination (Sonographie, FNAC, WLK-Immunhistologie und Molekularbiologie) durchgeführten Nachuntersuchung mit

der erreichten höheren diagnostischen Akkuratessse bleiben unklar. Es ist unzweifelhaft, dass mit der WLK-Diagnostik Patienten höher gestaged werden, als wenn eine abwartende Nachsorge nach makroskopischen Kriterien erfolgt. Ob die Höherstufung in Tumorstadium und therapeutischer Eskalation zu einer Lebensverlängerung und / oder einer Verbesserung der Lebensqualität der Patienten führen, bleibt dennoch unklar; dieses spiegelt sich in der aktuellen Diskussion wider, wie „floating cells“ und „single tumor cells“ tumorbiologisch zu bewerten sind.

Natürlich werden nachuntersuchte Patienten ohne WLKD erst später einer Therapie zugeführt, wenn sonographisch auf Zeichen der Lymphknotenschwellung, Ballonierung und der Echoreduktion gewartet wird. Ob dieses einen therapeutischen Nachteil im Vergleich zu der früher statt findenden Diagnostik mit FNAC und RT-PCR mit sich bringt, ist offen. Sicher ist, dass die akkuratere Diagnostik ein anderes (höher gewichtetes) Tumorstadienspektrum mit sich bringt, andererseits bei negativem Befund die Zahl der Wächterlymphknoten-Dissektionen und damit auch die konsekutiv kompletten Lymphknotendissektionen reduzieren bzw. vermeiden kann. Zusätzlich kann es manchen Patienten mit tatsächlich günstiger Prognose bisweilen erspart werden, einer adjuvanten Therapie zugeführt zu werden [104]. Insofern ist unser Procedere nur bedingt mit den Spektren anderer Arbeitsgruppen vergleichbar.

O.g. Ausführungen spiegeln zum Teil das Dilemma wider, das sich aus den unterschiedlichen Interpretationen von Studienergebnissen in Bezug auf die Prognose und dem damit verbundenen Procedere ergibt. Einer der Gründe könnte darin liegen, dass man bisher davon ausgeht, dass das Melanom (und auch andere Tumoren) primär lymphogen metastasiert und erst bei weiterer Progression Fernmetastasen entwickelt. Dies wird als sogenannte lineare Tumorausbreitung beschrieben (Kaskaden-Modell). Neuere Erkenntnissen lassen jedoch darauf schließen, dass alle Metastasierungen Jahre bis wenige Tage vor der radikalen Entfernung des Primärherdes bereits initiiert werden und somit eine parallele Tumorausbreitung statt findet („seed and soil“-Modell). Die Zahl der positiven Lymphknoten ist zwar ein wichtiger Prognosefaktor, aber befallene Lymphknoten sind nicht die Ursache für die letztlich das Überleben bestimmende Fernmetastasierung [105]. Genetische Untersuchungen von Metastasen bestätigen aufgrund großer Unterschiede in den Gendefektmustern, dass diese bereits sehr früh – unabhängig vom Primärtumor - ihren eigenen Weg gehen. Der Befall

nahegelegener Lymphknoten sei eher eine Sackgasse in der Tumorentwicklung und weniger der Ausgangspunkt für eine weitere Ausbreitung im Körper.



Quelle: „Der Spiegel“ 20/2009

Eine mögliche Erklärung für einige Verläufe von Patienten unseres Kollektivs ist möglicherweise genau diese Theorie der parallelen Tumorausbreitung („seed and soil“). So zeigte sich bei 2 Patienten, bei denen sonographisch der Wächterlymphknoten als unauffällig/benigne eingestuft wurde, histologisch ein subcapsulärer Befall. Weitere Lymphknoten waren nicht betroffen, dennoch verstarben die Patienten im weiteren Verlauf an einer hämatogenen Streuung. Darüber hinaus verstarben 5 von 85 Patienten, bei denen weder histologisch ein positiver Wächterlymphknoten noch ein positiver Nachweis von Tyrosinase nachgewiesen werden konnte.

5. Zusammenfassung

Der Ultraschall für Wächterlymphknoten ist ein günstiger und aussagekräftiger Prädiktor in Bezug auf den Befall. Morphologische Kriterien konnten herausgearbeitet werden und sind in der Vorhersage sehr zuverlässig. Die übersehenen Nester sind klein und die betroffenen Patienten haben meist ein exzellentes Überleben.

Die Messmethoden der Tumornester (Tumorlast) nach van Akkooi und Audring korrelieren hochsignifikant in Bezug auf das „Outcome“ der Patienten. Allerdings ist die Methode nach van Akkooi weitaus einfacher und schneller durchzuführen. Die Methode nach Audring (Flächen/Volumenberechnung) ist deutlich aufwendiger und bringt keinen zusätzlichen Informationsgewinn in Bezug auf die Prognose. Die Nestposition (nach Dewar) hat nur einen bedingten Vorhersagewert.

Die zusätzliche Gewinnung der Tyrosinases RT-PCR aus dem Wächterlymphknoten schafft keine höhere Spezifität und Sensitivität gegenüber der FNAC alleine. Demgegenüber scheint die Tyrosinase RT-PCR aus dem peripheren Blut ein guter Prädiktor für das Überleben der Patienten zu sein.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Garbe C, Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001 Sep;14(5):280-90.
- [2] Boni L, Benevento A, Dionigi G, Dionigi R. Primary malignant melanoma of the esophagus: a case report. *Surg Endosc* 2002 Feb;16(2):359-60.
- [3] Kanamori N, Igaki H. A case of primary malignant melanoma of the esophagus. *Jpn J Clin Oncol* 2008 Mar;38(3):233.
- [4] Kivela T, Summanen P. Retinoinvasive malignant melanoma of the uvea. *Br J Ophthalmol* 1997 Aug;81(8):691-7.
- [5] Safioleas M, Agapitos E, Kontzoglou K, Stamatakos M, Safioleas P, Mouzopoulos G, et al. Primary melanoma of the gallbladder: does it exist? Report of a Case and review of the literature. *World J Gastroenterol* 2006 Jul 14;12(26):4259-61.
- [6] Bejarano GN, Garcia MN, Darnell MA, nares Fernandez MC, Laporte RE, Navarro SS. Primary malignant melanoma of the common bile duct: a case report and literature review. *Gastroenterol Hepatol* 2005 Aug;28(7):382-4.
- [7] Schwipper V. [Malignant melanoma in the area of the head and neck]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2000 May;4 Suppl 1:S177-S186.
- [8] Pierard-Franchimont C, Pierard GE. [How I explore ... a patient with cutaneous melanoma: actualisation of an algorithm]. *Rev Med Liege* 2006 Dec;61(12):837-43.
- [9] Berichterstattung des Bundes. Krebs, malignes Melanom, Basalzellkarzinom. Reihe "Gesundheitsberichterstattung des Bundes". Themen-Heft 22 ed. 2004.
- [10] Bauer J, Garbe C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res* 2003 Jun;16(3):297-306.
- [11] Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005 Feb 19;365(9460):687-701.
- [12] Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 2003 May 19;22(20):3042-52.

[13] Lukowsky A, Schafer-Hesterberg G, Sterry W, Voit C. Germline CDKN2A/p16 mutations are rare in multiple primary and familial malignant melanoma in German patients. *J Dermatol Sci* 2008 Feb;49(2):163-5.

[14] Wagner SN, Schultewolter T, Wagner C, Briedigkeit L, Becker JC, Kwasnicka HM, et al. Immune response against human primary malignant melanoma: a distinct cytokine mRNA profile associated with spontaneous regression. *Lab Invest* 1998 May;78(5):541-50.

[15] Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970 Nov;172(5):902-8.

[16] Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969 Mar;29(3):705-27.

[17] Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001 Aug 15;19(16):3635-48.

[18] Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001 Aug 15;19(16):3622-34.

[19] Blum A, Schlagenhauff B, Stroebel W, Breuninger H, Rassner G, Garbe C. Ultrasound examination of regional lymph nodes significantly improves early detection of locoregional metastases during the follow-up of patients with cutaneous melanoma: results of a prospective study of 1288 patients. *Cancer* 2000 Jun 1;88(11):2534-9.

[20] Meier F, Will S, Ellwanger U, Schlagenhauff B, Schitteck B, Rassner G, et al. Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 2002 Jul;147(1):62-70.

[21] Wojas-Pelc A, Rajzer L, Jaworek A, Wozniak W. [The latest diagnostical methods and therapy in melanoma]. *Przegl Lek* 2006;63(8):674-80.

[22] Keilholz U, Martus P, Punt CJ, Kruit W, Mooser G, Schadendorf D, et al. Prognostic factors for survival and factors associated with long-term remission in patients with advanced melanoma receiving cytokine-based treatments: second analysis of a randomised EORTC Melanoma Group trial comparing interferon-alpha2a (IFNalpha) and interleukin 2 (IL-2) with or without cisplatin. *Eur J Cancer* 2002 Jul;38(11):1501-11.

- [23] Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S, Talamini R, Corona R, Sera F, et al. Dermoscopy of pigmented skin lesions: results of a consensus meeting via the Internet. *J Am Acad Dermatol* 2003 May;48(5):679-93.
- [24] Kittler H. Use of digital dermoscopy to monitor melanocytic lesions: risks and benefits. *J Drugs Dermatol* 2003 Jun;2(3):309-11.
- [25] Leiter U, Buettner PG, Eigentler TK, Garbe C. Prognostic factors of thin cutaneous melanoma: an analysis of the central malignant melanoma registry of the german dermatological society. *J Clin Oncol* 2004 Sep 15;22(18):3660-7.
- [26] Warycha MA, Christos PJ, Mazumdar M, Darvishian F, Shapiro RL, Berman RS, et al. Changes in the presentation of nodular and superficial spreading melanomas over 35 years. *Cancer* 2008 Dec 15;113(12):3341-8.
- [27] Kaufmann R, Tilgen W, Garbe C. [Malignant melanoma. Quality Assurance Committee of the German Society of Dermatology and the Professional Organization of German Dermatologists e. V.]. *Hautarzt* 1998 Oct;48 Suppl 1:S30-S38.
- [28] Hauschild A, Rosien F, Lischner S. Surgical standards in the primary care of melanoma patients. *Onkologie* 2003 Jun;26(3):218-22.
- [29] Garbe C. Cutaneous melanoma: baseline and ongoing laboratory evaluation. *Dermatol Ther* 2005 Nov;18(6):413-21.
- [30] Hofmann U, Szedlak M, Rittgen W, Jung EG, Schadendorf D. Primary staging and follow-up in melanoma patients--monocenter evaluation of methods, costs and patient survival. *Br J Cancer* 2002 Jul 15;87(2):151-7.
- [31] Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992 Apr;127(4):392-9.
- [32] Gershenwald JE, Buzaid AC, Ross MI. Classification and staging of melanoma. *Clin Lab Med* 2000 Dec;20(4):785-815.
- [33] Jansen L, Nieweg OE, Peterse JL, Hoefnagel CA, Olmos RA, Kroon BB. Reliability of sentinel lymph node biopsy for staging melanoma. *Br J Surg* 2000 Apr;87(4):484-9.
- [34] Dubois RW, Swetter SM, Atkins M, McMasters K, Halbert R, Miller SJ, et al. Developing indications for the use of sentinel lymph node biopsy and adjuvant high-dose interferon alfa-2b in melanoma. *Arch Dermatol* 2001 Sep;137(9):1217-24.
- [35] Cochran AJ. The pathologist's role in sentinel lymph node evaluation. *Semin Nucl Med* 2000 Jan;30(1):11-7.

- [36] Starz H, Balda BR, Kramer KU, Buchels H, Wang H. A micromorphometry-based concept for routine classification of sentinel lymph node metastases and its clinical relevance for patients with melanoma. *Cancer* 2001 Jun 1;91(11):2110-21.
- [37] Murray CA, Leong WL, McCready DR, Ghazarian DM. Histopathological patterns of melanoma metastases in sentinel lymph nodes. *J Clin Pathol* 2004 Jan;57(1):64-7.
- [38] van Akkooi AC, de Wilt JH, Verhoef C, Schmitz PI, van Geel AN, Eggermont AM, et al. Clinical relevance of melanoma micrometastases (<0.1 mm) in sentinel nodes: are these nodes to be considered negative? *Ann Oncol* 2006 Oct;17(10):1578-85.
- [39] Pennasilico G, Santini A, Bono R, Cacciaguerra MG, Puddu P, Falappa P. [Preoperative ultrasonographic measurement of melanoma thickness with 20 MHz probe]. *Radiol Med (Torino)* 1994 Oct;88(4):388-91.
- [40] Guitera P, Li LX, Crotty K, Fitzgerald P, Mellenbergh R, Pellacani G, et al. Melanoma histological Breslow thickness predicted by 75-MHz ultrasonography. *Br J Dermatol* 2008 Jun 18.
- [41] Gambichler T, Moussa G, Bahrenberg K, Vogt M, Ermert H, Weyhe D, et al. Preoperative ultrasonic assessment of thin melanocytic skin lesions using a 100-MHz ultrasound transducer: a comparative study. *Dermatol Surg* 2007 Jul;33(7):818-24.
- [42] Serrone L, Solivetti FM, Thorel MF, Eibenschutz L, Donati P, Catricala C. High frequency ultrasound in the preoperative staging of primary melanoma: a statistical analysis. *Melanoma Res* 2002 Jun;12(3):287-90.
- [43] Lassau N, Lamuraglia M, Koscielny S, Spatz A, Roche A, Leclere J, et al. Prognostic value of angiogenesis evaluated with high-frequency and colour Doppler sonography for preoperative assessment of primary cutaneous melanomas: correlation with recurrence after a 5 year follow-up period. *Cancer Imaging* 2006;6:24-9.
- [44] Prayer L, Winkelbauer H, Gritzmann N, Winkelbauer F, Helmer M, Pehamberger H. Sonography versus palpation in the detection of regional lymph-node metastases in patients with malignant melanoma. *Eur J Cancer* 1990;26(7):827-30.
- [45] Kahle B, Hoffend J, Hartschuh W, Petzoldt D. [Ultrasound imaging of the sentinel lymph node in malignant melanoma]. *Hautarzt* 2000 Dec;51(12):915-9.
- [46] Goldberg BB, Merton DA, Liu JB, Thakur M, Murphy GF, Needleman L, et al. Sentinel lymph nodes in a swine model with melanoma: contrast-enhanced lymphatic US. *Radiology* 2004 Mar;230(3):727-34.

[47] Stutte H, Erbe S, Rassner G. [Lymph node sonography in the after care of malignant melanoma]. *Hautarzt* 1989 Jun;40(6):344-9.

[48] Voit C, Mayer T, Kron M, Schoengen A, Sterry W, Weber L, et al. Efficacy of ultrasound B-scan compared with physical examination in follow-up of melanoma patients. *Cancer* 2001 Jun 15;91(12):2409-16.

[49] Blum A, Schmid-Wendtner MH, Mauss-Kiefer V, Eberle JY, Kuchelmeister C, Il-Muller D. Ultrasound mapping of lymph node and subcutaneous metastases in patients with cutaneous melanoma: results of a prospective multicenter study. *Dermatology* 2006;212(1):47-52.

[50] Guitera P, Bourrier P, Basset-Seguin N, Dubertret L. [Echography should become the examination of choice in detection of melanoma lymph node involvement]. *Ann Dermatol Venerol* 2004 Nov;131(11):937-9.

[51] Moehrle M, Blum A, Rassner G, Juenger M. Lymph node metastases of cutaneous melanoma: diagnosis by B-scan and color Doppler sonography. *J Am Acad Dermatol* 1999 Nov;41(5 Pt 1):703-9.

[52] Omlor G, Il-Muller D, Gross G, Kautz G, Schuder G, Zaun H, et al. [Elective lymph node dissection in malignant melanoma--status of color Doppler findings]. *Zentralbl Chir* 1996;121(6):469-73.

[53] Schmid-Wendtner MH, Il-Muller D, Baumert J, Wagner A, Eberle J, Tilgen W, et al. Lymph node metastases in patients with cutaneous melanoma: improvements in diagnosis by signal-enhanced color Doppler sonography. *Melanoma Res* 2004 Aug;14(4):269-76.

[54] Lohnert JD, Bongartz G, Wernecke K, Peters PE, Macher E, Brocker EB. [Sensitivity and specificity of sonographic diagnosis of the lymph nodes in malignant melanoma]. *Radiologe* 1988 Jul;28(7):317-9.

[55] Voit C, Schoengen A, Schwurzer-Voit M, Weber L, Ulrich J, Sterry W, et al. The role of ultrasound in detection and management of regional disease in melanoma patients. *Semin Oncol* 2002 Aug;29(4):353-60.

[56] Rossi CR, Seno A, Vecchiato A, Foletto M, Tregnaghi A, De CA, et al. The impact of ultrasound scanning in the staging and follow-up of patients with clinical stage I cutaneous melanoma. *Eur J Cancer* 1997 Feb;33(2):200-3.

[57] Perry MD, Seigler HF, Johnston WW. Diagnosis of metastatic malignant melanoma by fine needle aspiration biopsy: a clinical and pathologic correlation of 298 cases. *J Natl Cancer Inst* 1986 Nov;77(5):1013-21.

[58] Fornage BD, Lorigan JG. Sonographic detection and fine-needle aspiration biopsy of nonpalpable recurrent or metastatic melanoma in subcutaneous tissues. *J Ultrasound Med* 1989 Aug;8(8):421-4.

[59] Layfield LJ, Ostrzega N. Fine needle aspirate smear morphology in metastatic melanoma. *Acta Cytol* 1989 Sep;33(5):606-12.

[60] Zeelen U, Binder T, Bauer U, Weber L, Schoengen A. [The value of fine-needle aspiration cytology in the after-care of malignant melanoma]. *Hautarzt* 1990 Jan;41(1):34-8.

[61] Jaffer S, Zakowski M. Fine-needle aspiration biopsy of axillary lymph nodes. *Diagn Cytopathol* 2002 Feb;26(2):69-74.

[62] Voit C, Mayer T, Proebstle TM, Weber L, Kron M, Krupienski M, et al. Ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology in the early detection of melanoma metastases. *Cancer* 2000 Jun 25;90(3):186-93.

[63] Voit C, Mayer T, Proebstle T, Schwurzer-Voit M, Kron M, Weber L, et al. [Ultrasound-guided fine needle aspiration cytology (FNAC) of unclear lesions in melanoma patients]. *Ultraschall Med* 2000 Oct;21(5):218-22.

[64] Voit C, Kron M, Schafer G, Schoengen A, Audring H, Lukowsky A, et al. Ultrasound-guided fine needle aspiration cytology prior to sentinel lymph node biopsy in melanoma patients. *Ann Surg Oncol* 2006 Dec;13(12):1682-9.

[65] Schafer-Hesterberg G, Schoengen A, Sterry W, Voit C. Use of ultrasound to early identify, diagnose and localize metastases in melanoma patients. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007 Dec;7(12):1707-16.

[66] Voit C, Schoengen A, Schwurzer M, Weber L, Mayer T, Proebstle TM. Detection of regional melanoma metastases by ultrasound B-scan, cytology or tyrosinase RT-PCR of fine-needle aspirates. *Br J Cancer* 1999 Jul;80(10):1672-7.

[67] Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991 Nov 16;338(8777):1227-9.

[68] Ulrich J, Bonnekoh B, Bockelmann R, Schon M, Schon MP, Steinke R, et al. Prognostic significance of detecting micrometastases by tyrosinase RT/PCR in sentinel lymph node biopsies: lessons from 322 consecutive melanoma patients. *Eur J Cancer* 2004 Dec;40(18):2812-9.

[69] Blaheta HJ, Schitteck B, Breuninger H, Sotlar K, Ellwanger U, Thelen MH, et al. Detection of melanoma micrometastasis in sentinel nodes by reverse

transcription-polymerase chain reaction correlates with tumor thickness and is predictive of micrometastatic disease in the lymph node basin. *Am J Surg Pathol* 1999 Jul;23(7):822-8.

[70] Shivers SC, Wang X, Li W, Joseph E, Messina J, Glass LF, et al. Molecular staging of malignant melanoma: correlation with clinical outcome. *JAMA* 1998 Oct 28;280(16):1410-5.

[71] Bostick PJ, Morton DL, Turner RR, Huynh KT, Wang HJ, Elashoff R, et al. Prognostic significance of occult metastases detected by sentinel lymphadenectomy and reverse transcriptase-polymerase chain reaction in early-stage melanoma patients. *J Clin Oncol* 1999 Oct;17(10):3238-44.

[72] Scoggins CR, Ross MI, Reintgen DS, Noyes RD, Goydos JS, Beitsch PD, et al. Prospective multi-institutional study of reverse transcriptase polymerase chain reaction for molecular staging of melanoma. *J Clin Oncol* 2006 Jun 20;24(18):2849-57.

[73] Osella-Abate S, Savoia P, Quaglino P, Fierro MT, Leporati C, Ortoncelli M, et al. Tyrosinase expression in the peripheral blood of stage III melanoma patients is associated with a poor prognosis: a clinical follow-up study of 110 patients. *Br J Cancer* 2003 Oct 20;89(8):1457-62.

[74] Frija J, Bourrier P, Zagdanski AM, De KE. [Diagnosis of a malignant lymph node]. *J Radiol* 2005 Feb;86(2 Pt 1):113-25.

[75] Wang TS, Johnson TM, Cascade PN, Redman BG, Sondak VK, Schwartz JL. Evaluation of staging chest radiographs and serum lactate dehydrogenase for localized melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2004 Sep;51(3):399-405.

[76] Schoder H, Larson SM, Yeung HW. PET/CT in oncology: integration into clinical management of lymphoma, melanoma, and gastrointestinal malignancies. *J Nucl Med* 2004 Jan;45 Suppl 1:72S-81S.

[77] Bliss JM, Ford D, Swerdlow AJ, Armstrong BK, Cristofolini M, Elwood JM, et al. Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer* 1995 Aug 9;62(4):367-76.

[78] Blessing C, Feine U, Geiger L, Carl M, Rassner G, Fierlbeck G. Positron emission tomography and ultrasonography. A comparative retrospective study assessing the diagnostic validity in lymph node metastases of malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1995 Dec;131(12):1394-8.

[79] Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001 Aug 15;19(16):3635-48.

[80] Zimmer L, Johnson J. Fine-needle Aspiration of Neck Masses 9/2003. 2003.

[81] Voit C, Schoengen A, Weber L, Proebstle T. Identification of melanoma metastases by tyrosinase-reverse transcription-polymerase chain reaction of fine needle aspirates. *J Am Acad Dermatol* 1998 Dec;39(6):1030-2.

[82] Frankel TL, Griffith KA, Lowe L, Wong SL, Bichakjian CK, Chang AE, et al. Do Micromorphometric Features of Metastatic Deposits Within Sentinel Nodes Predict Nonsentinel Lymph Node Involvement in Melanoma? *Ann Surg Oncol* 2008 Jul 15.

[83] Keilholz U, Willhauck M, Rimoldi D, Brasseur F, Dummer W, Rass K, et al. Reliability of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)-based assays for the detection of circulating tumour cells: a quality-assurance initiative of the EORTC Melanoma Cooperative Group. *Eur J Cancer* 1998 Apr;34(5):750-3.

[84] Voit CA, Schafer-Hesterberg G, Kron M, van Akkooi AC, Rademaker J, Lukowsky A, et al. Impact of molecular staging methods in primary melanoma: reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) of ultrasound-guided aspirate of the sentinel node does not improve diagnostic accuracy, but RT-PCR of peripheral blood does predict survival. *J Clin Oncol* 2008 Dec 10;26(35):5742-7.

[85] Schaefer G. Sonografische, zytologische und molekularbiologische Charakterisierung des Sentinel Nodes aus Feinnadelaspiraten bei Patienten mit malignem Melanom. Berlin: Charité University, Berlin; 2006.

[86] Keilholz U, Goldin-Lang P, Bechrakis NE, Max N, Letsch A, Schmittel A, 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 Mar 1;10(5):1605-12.

[87] Wang J, Hassett JM, Dayton MT, Kulaylat MN. Lymph node ratio: role in the staging of node-positive colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2008 Jun;15(6):1600-8.

[88] Buzaid AC, Tinoco LA, Jendiroba D, Tu ZN, Lee JJ, Legha SS, et al. Prognostic value of size of lymph node metastases in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 1995 Sep;13(9):2361-8.

[89] ASCO Proceedings 2009. *J Clin Oncol* 2009;27(Suppl., abstr. #9015):464.

[90] Morton DL, Hoon DS, Cochran AJ, Turner RR, Essner R, Takeuchi H, et al. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early-stage melanoma: therapeutic utility and implications of nodal microanatomy and molecular staging for improving the accuracy of detection of nodal micrometastases. *Ann Surg* 2003 Oct;238(4):538-49.

[91] Testori A, Lazzaro G, Baldini F, Tosti G, Mosconi M, Lovati E, et al. The role of ultrasound of sentinel nodes in the pre- and post-operative evaluation of stage I melanoma patients. *Melanoma Res* 2005 Jun;15(3):191-8.

[92] Rosenberg SA. Why perform sentinel-lymph-node biopsy in patients with melanoma? *Nat Clin Pract Oncol* 2008 Jan;5(1):1.

[93] Thomas JM. Prognostic false-positivity of the sentinel node in melanoma. *Nat Clin Pract Oncol* 2008 Jan;5(1):18-23.

[94] Thomas JM, Hayes JA. Sentinel Lymph Node Biopsie in Melanoma in 2008. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer. Principles & Practice of Oncology*. 7th edition edn. Lippincott, Williams & Wilkins; 2009. p. 1-9.

[95] Starritt EC, Uren RF, Scolyer RA, Quinn MJ, Thompson JF. Ultrasound examination of sentinel nodes in the initial assessment of patients with primary cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol* 2005 Jan;12(1):18-23.

[96] Voit C, Schoengen A, Schwurzer-Voit M, Weber L, Ulrich J, Sterry W, et al. The role of ultrasound in detection and management of regional disease in melanoma patients. *Semin Oncol* 2002 Aug;29(4):353-60.

[97] Eggermont AM. Reducing the need for sentinel node procedures by ultrasound examination of regional lymph nodes. *Ann Surg Oncol* 2005 Jan;12(1):3-5.

[98] Saiag P, Bernard M, Beauchet A, Bafounta ML, Bourgault-Villada I, Chagnon S. Ultrasonography using simple diagnostic criteria vs palpation for the detection of regional lymph node metastases of melanoma. *Arch Dermatol* 2005 Feb;141(2):183-9.

[99] Sibon C, Chagnon S, Tchakerian A, Bafounta ML, Longvert C, Clerici T, et al. The contribution of high-resolution ultrasonography in preoperatively detecting sentinel-node metastases in melanoma patients. *Melanoma Res* 2007 Aug;17(4):233-7.

[100] de Kanter AY, van Eijck CH, van Geel AN, Kruijt RH, Henzen SC, Paul MA, et al. Multicentre study of ultrasonographically guided axillary node biopsy in patients with breast cancer. *Br J Surg* 1999 Nov;86(11):1459-62.

[101] Voit C, Kron M, Rademaker J, Schwurzer-Voit M, Sterry W, Weber L, et al. Molecular staging in stage II and III melanoma patients and its effect on long-term survival. *J Clin Oncol* 2005 Feb 20;23(6):1218-27.

[102] Ariyan C, Brady MS, Gonen M, Busam K, Coit D. Positive nonsentinel node status predicts mortality in patients with cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol* 2009 Jan;16(1):186-90.

[103] Dewar DJ, Newell B, Green MA, Topping AP, Powell BW, Cook MG. The microanatomic location of metastatic melanoma in sentinel lymph nodes predicts nonsentinel lymph node involvement. *J Clin Oncol* 2004 Aug 15;22(16):3345-9.

[104] Wheatley K, Ives N, Hancock B, Gore M, Eggermont A, Suci S. Does adjuvant interferon-alpha for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials. *Cancer Treat Rev* 2003 Aug;29(4):241-52.

[105] Holzel D, Engel J, Lohrs U. [Elective lymph node dissections--still a standard in cancer surgery?]. *Zentralbl Chir* 2008 Dec;133(6):582-9.

7. Anhang

7.1 Graphiken und Tabellen

Abbildung 1: Superfiziell spreitendes Melanom mit nodulären Anteilen	9
Abbildung 2: Exstirpiertes, mit Patentblau angefärbter Wächterlymphknoten	21
Abbildung 3: Sonographisch gesteuerte Punktion mit Binder-Ventil (hier bei einem Patienten im Rahmen der Nachsorge)	24
Abbildung 4: Binder-Ventil, Spritze, Nadeln.....	24
Abbildung 5: Objektträger mit Ausstrich (in diesem Falle dunkel gefärbt; daraus kann bereits makroskopisch auf die Melaninhaltigkeit des Ausstrichs geschlossen werden).	25
Abbildung 6: Abhängigkeit der Substratmenge an Tyrosinase im peripheren Blut (Fluoreszenzintensität) von der Zahl der Zellzyklen in der qRT-PCR.	35
Abbildung 7: Exponentielle Zunahme der DNA-Kopien mit steigender Zahl der qRT-PCR-Zyklen; hier log invers zur Festlegung der standard crossing points dargestellt. ...	36
Abbildung 8: Krankheitsfreies Überleben vom Zeitpunkt der ersten Blutprobe getrennt für RT-PCR (reverse transcriptase – polymerase chain reaction), die immer negativ war und der RT-PCR, die mindestens einmal positiv ausfiel.	37
Abbildung 9: Gesamtüberleben vom Zeitpunkt der ersten Blutprobe getrennt für RT-PCR (reverse transcriptase – polymerase chain reaction), die immer negativ war und der RT-PCR, die mindestens einmal positiv ausfiel.	37
Abbildung 10: HE-Färbung	38
Abbildung 11: Melan A-Färbung	38
Abbildung 12: HMB 45-Färbung	38
Abbildung 13: HMB 45-Färbung	38
Abbildung 14: Melan A	39
Abbildung 15: Melan A. Wurde sonographisch klar als maligne erkannt; die FNAC war jedoch negativ, ebenso die Tyrosinase-PCR.....	39
Abbildung 16: Verteilung der Tumornestfläche der positiven WLK in mm ²	39
Abbildung 17: Altersverteilung der WLK-positiven Patienten.....	43
Abbildung 18: Überlebenszeit der WLK-positiven MM-Patienten	43
Abbildung 19: Überlebenszeit der Patienten mit positivem WLK in Monaten	44

Abbildung 20: Überlebenszeit der Patienten für LNR bei WLK-positiven MM-Patienten. LNR=Lymph node ratio; Quotient befallener zu gesamten LK.....46

Abbildung 21: Überlebenszeit der Patienten für LNR bei WLK-positiven MM-Patienten mit 0-2 positiven post-WLK im Vergleich zu Patienten mit > 2 positiven post-WLK.....47

Abbildung 22: Korrelation der Auswertungsparameter, definiert nach Audring und van Akkooi; die Tumornestfläche nach Audring ist logarithmisch auf der x-Achse aufgetragen.63

Abbildung 23: Darstellung der Überlebenden und Nichtüberlebenden in Korrelation der Auswertungsparameter, definiert nach Audring und van Akkooi.64

Tabelle 11: Korrespondierende Ergebnisse aller auswertbaren Patienten der Studie in Bezug auf Histologie des WLK, der US-FNAC, der RT-PCR aus dem Lymphknoten sowie ihrem Outcome.

Patient	Histologie	US-FNAC	RT-PCR	Outcome
2	Negativ	Negativ	Negativ	NED.22/11/06
3	Negativ	Negativ	Negativ	NED.18/09/03
4	Negativ	Negativ	Negativ	NED.14/11/07
5	Nicht übereinstimmend			
6	Negativ	Negativ	Negativ	NED.18/07/06
8	Negativ	Negativ	Negativ	NED.22/11/06
9	Negativ	Negativ	Negativ	NED.18/10/96
10	Negativ	Negativ	Negativ	NED.08/08/07
11	Negativ	Nicht auswertbar	Negativ	DOD.24/03/06
11	Positiv	Nicht auswertbar	Negativ	DOD.24/03/06
12	Negativ	Negativ	Negativ	NED.08/08/06
14	Negativ	Negativ	Negativ	NED.25/01/07
15	Negativ Pos. nur im Vas afferens	Negativ	Negativ	NED.26/09/07 Rückfall in- transit

16	Negativ	Negativ	Negativ	NED 22/11/2006
16	Negativ	Negativ	Negativ	“
17	Negativ	Negativ	Negativ	NED1/12/2005
18	Negativ	Negativ	Negativ	NED 12/10/2006
19	Negativ	Negativ	Negativ	NED 25/10/2006
20	Negativ	Negativ	Negativ	NED16/8/2006
21	Negativ	Negativ	Negativ	NED11/12/2007
22	Nicht übereinstimmend			
23	Negativ	Negativ	Negativ	NED 23/02/2006
24	Negativ	Negativ	Negativ	NED 11/12/2007
24	Negativ	Negativ	Negativ	NED 11/12/2007
24	Negativ	Negativ	Negativ	NED 11/12/2007
25	Nicht übereinstimmend			
26	Negativ	Negativ	Negativ	NED28/11/2006
27	Negativ	Negativ	Negativ	NED13/11/2007
28	Negativ	Negativ	Negativ	NED12/12/2007
29	Positiv	Negativ	Negativ	NED 22/05/2007
30	Negativ	Negativ	Negativ	NED15/05/2007
31	Negativ	Negativ	Negativ	NED27/11/2007
33	Positiv	Negativ	Negativ	DOD21/03/2004
34	Negativ	Negativ	Negativ	NED18/05/2006
35	Nicht übereinstimmend			

36	Negativ	Negativ	Negativ	NED 19/10/2006
36	Negativ	Negativ	Negativ	NED 19/10/2006
37	Negativ	Nicht auswertbar	Negativ	NED 09/08/2006
37	Negativ	Nicht auswertbar	Negativ	NED 09/08/2006
39	Nicht übereinstimmend			
40	Negativ	Negativ	Negativ	NED 06/03/2007
41	Negativ	Negativ	Negativ	NED 2/11/2007
42	Negativ	Negativ	Negativ	NED 12/06/07
42	Negativ	Negativ	Negativ	NED 12/06/07
43	Positiv	Positiv	Positiv	DOD 24/12/04
44	Negativ	Negativ	Negativ	DOD 14/11/06
45	Positiv	Positiv	Positiv	NED 14/12/07
46	Negativ	Negativ	Negativ	NED 19/07/05 Relapse
46	Negativ	Negativ	Negativ	NED 19/07/05 Relapse LN
47	Negativ	Negativ	Negativ	NED 09/05/07
48	Positiv	Negativ	Negativ	DOD 21/01/04
49	Nicht übereinstimmend			
50	Negativ	Negativ	Negativ	NED 19/06/07
51	Negativ	Negativ	Negativ	DOC 06/11/03
52	Nicht übereinstimmend			
53	Negativ	Negativ	Negativ	NED 20/08/07
54	Negativ	Negativ	Negativ	NED 09/01/07
55	Positiv (nur IH)	Negativ	Negativ	NED 22/07/02

56	Positiv (nur IH)	Negativ	Negativ	DOD 22/05/05
57	Kein WLK nachweisbar			
58	Positiv	Positiv	Positiv	DOD 21/10/07
59	Negativ	Negativ	Negativ	NED 22/07/07
60	Positiv	Nicht durchgeführt	Negativ	DOD 28/04/04
61	Negativ	Negativ	Negativ	DOD 18/02/05
62	Negativ	Negativ	Negativ	NED 14/06/05
63	Negativ	Negativ	Negativ	NED 01/02/05
64	Nicht übereinstimmend			
65	Nicht übereinstimmend			
66	Negativ	Negativ	Negativ	NED 09/08/06
67	Negativ	Negativ	Negativ	NED 13/01/06
68	Negativ	Negativ	Negativ	NED 14/03/07
69	Positiv	Positiv	Negativ	DOD 14/01/05
69	Negativ	Negativ	Negativ	“
70	Nicht übereinstimmend			
70	Negativ	Negativ	Negativ	NED 22/11/06
71	Negativ	Negativ	Negativ	DOD 18/08/03
72	Positiv	Negativ	Negativ	NED 02/07/07
73	Nicht übereinstimmend			
73	Negativ	Negativ	Negativ	NED 13/09/05
75	Positiv	Positiv	Positiv	DOD 31/01/03
76	Negativ	Negativ	Negativ	NED 07/11/07
77	Negativ	Negativ	Negativ	NED 22/11/06
78	Nicht übereinstimmend			
80	Negativ	Negativ	Negativ	NED 18/12/07

				Relapse in transit
81	Negativ	Negativ	Negativ	13/01/07
82	Nicht übereinstimmend			
83	Positiv	Positiv	Positiv	NED 22/11/07
84	Negativ	Negativ	Negativ	NED 01/03/06
86	Positiv	Negativ	Negativ	DOD 01/09/04
87	Negativ	Negativ	Negativ	NED 05/12/07
88	Negativ	Negativ	Negativ	DOD 01/12/04
89	Positiv	Positiv	Negativ	DOD 01/09/04
90	Positiv	Negativ	Negativ	NED 02/05/07
91	Negativ	Negativ	Negativ	NED28/06/07
92	Negativ	Negativ	Negativ	AWD 13/09/06
93	Negativ	Negativ	Negativ	DU 06/08/04
94	Positiv	Negativ	Positiv	DOD 28/03/04
95	Negativ	Negativ	Negativ	NED 03/07/07
96	Negativ	Negativ	Negativ	NED 07/02/06
97	Negativ	Negativ	Negativ	NED 11/10/07
98	Negativ	Negativ	Negativ	NED 24/08/06
99	Negativ	Negativ	Negativ	NED 12/07/07
100	Nicht übereinstimmend			
101	Negativ	Negativ	Negativ	NED 24/08/06
102	Positiv	Negativ	Negativ	NED 13/11/07
103	Negativ	Negativ	Negativ	NED 22/11/07
103	Negativ	Negativ	Negativ	NED 22/11/07
104	Negativ	Negativ	Negativ	NED 05/12/07
105	Nicht übereinstimmend			
106	Kein WLK nachweisbar			
107	Positiv	Positiv	Positiv	DOD 01/09/03

108	Negativ	Negativ	Negativ	NED 27/08/07
109	Nicht übereinstimmend			
110	Positiv	Positiv	Positiv	DOD 01/05/05
111	Positiv	Positiv	Negativ	DOD 08/06/07
112	Nicht übereinstimmend			
113	Positiv	Positiv	Positiv	AWD 14/06/07
114	Negativ	Negativ	Negativ	NED 22/12/05
115	Positiv	Positiv	Negativ	NED 15/11/07
116	Positiv	Positiv	Positiv	NED 12/09/07 Stage IV disease
117	Positiv	Negativ	Negativ	DOD 28/01/05
118	Negativ	Negativ	Negativ	NED 25/09/07
119	Positiv	Positiv	Positiv	NED 02/10/07
120	Negativ	Negativ	Negativ	NED 06/06/07
121	Negativ	Negativ	Negativ	NED 05/12/07
122	Nicht übereinstimmend			
123	Negativ	Negativ	Negativ	NED 09/03/05
124	Positiv	Positiv	Positiv	DOD 16/12/03
125	Negativ	Negativ	Negativ	NED 26/06/07
126	Positiv	Positiv	Positiv	NED 26/06/07
127	Negativ	Negativ	Negativ	NED 08/05/07
128	Negativ	Negativ	Negativ	NED 11/09/07
129	Negativ	Negativ	Negativ	NED 25/09/07
129	Nicht übereinstimmend			NED 25/09/07
130	Positiv	Positiv	Positiv	NED 20/12/07
131	Positiv	Negativ	Positiv	NED 20/12/07
132	Positiv	Positiv	Positiv	DOD 11/11/03
133	Negativ	Negativ	Positiv	NED 21/02/07

133	Negativ	Negativ	Negativ	NED 21/02/07
134	Positiv	Positiv	Positiv	DOD 19/01/05
135	Negativ	Negativ	Negativ	DOD 19/12/05

Tabelle 12: Patienten mit nicht-übereinstimmenden Befunden (in Bezug auf die Tabelle 11) und ihrem Outcome

Patient	Histology	US-FNAC	RT-PCR	Outcome
11	Positiv	Nicht auswertbar	Negativ	DOD.24/03/06
29	Positiv	Negativ	Negativ	NED 22/05/2007
33	Positiv	Negativ	Negativ	DOD21/03/2004
48	Positiv	Negativ	Negativ	DOD 21/01/04
55	Positiv (nur IH)	Negativ	Negativ	NED 22/07/02
56	Positiv (nur IH)	Negativ	Negativ	DOD 22/05/05
60	Positiv	Not Done	Negativ	DOD 28/04/04
69	Positiv	Positiv	Negativ	DOD 14/01/05
72	Positiv	Negativ	Negativ	NED 02/07/07
86	Positiv	Negativ	Negativ	DOD 01/09/04
89	Positiv	Positiv	Negativ	DOD 01/09/04
90	Positiv	Negativ	Negativ	NED 02/05/07
94	Positiv	Negativ	Positiv	DOD 28/03/04
102	Positiv	Negativ	Negativ	NED 13/11/07
111	Positiv	Positiv	Negativ	DOD 08/06/07
115	Positiv	Positiv	Negativ	NED 15/11/07
117	Positiv	Negativ	Negativ	DOD 28/01/05
131	Positiv	Negativ	Positiv	NED 20/12/07
133	Negativ	Negativ	Positiv	NED 21/02/07

7.2 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Sterry (Chefarzt der Klinik für Dermatologie der Charité) für die Möglichkeit der Promotion und Vergabe des Themas. Frau Dr. Audring und Herrn Professor Dr. van Akkooi für wertvolle Diskussionen und Anregungen zur Quantifizierung der Tumorhistologien. Frau Prof. Dr. Martina Kron herzlichen Dank für die Beratung und Kalkulation der statistisch aufwendigen Analysen. Herrn Dr. Dietrich Doll für Ideen und konstruktive Kritik in der Auswertung.

Im Besonderen möchte ich mich bei Frau PD Dr. Christiane Voit bedanken, die mich über die gesamte Zeit von der ersten Probennahme bis zur Schlusskorrektur der Doktorarbeit uneingeschränkt unterstützt und ausgebildet hat. Ganz herzlichen Dank!

7.3 Publikation

Die Arbeit wurde in großen Teilen aktuell im Journal of Clinical Oncology publiziert [84]. Auf eine Coautorenschaft habe ich bewusst verzichtet, da ich bereits voll im Berufsleben stehe und eine Universitätskarriere nicht anstrebe.

7.4 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.5 Erklärung

„Ich, Mathias Küsel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Bedeutung der Tyrosinase RT-PCR aus dem Sentinel Node bzw. dem Blut beim malignen Melanom in Kombination mit der ultraschallgesteuerten Feinnadeldiagnostik 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.“

05.10.2009

Unterschrift: