

Aus dem
Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Pathologie und Neuropathologie
Abteilung Allgemeine Pathologie und Molekulare Pathologie
und Pathologische Anatomie

**Nachweis von Melanomzellen im Wächterlymphknoten:
Möglichkeiten und Grenzen der quantitativen
Immunzytologie und der Pathologie. Vergleich beider
Methoden im Rahmen von Qualitätskontrolle und
Wirtschaftlichkeit.**

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

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

**vorgelegt von
Pfefferle, Vanessa**

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. H.-C. Bösmüller
2. Berichterstatter: Professorin Dr. B. Schittek

Tag der Disputation: 10.08.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	7
1.1 Das maligne Melanom.....	7
1.1.1 Epidemiologie.....	7
1.1.2 Pigmentsystem der Haut	7
1.1.3 Subtypen	8
1.1.4 Ätiologie und Risikofaktoren.....	9
1.1.5 Diagnostik und Klassifikation.....	10
1.1.6 Therapie und Prognose	13
1.2 Der Wächterlymphknoten	15
1.2.1 Geschichte, Lymphoszintigraphie und Biopsie	15
1.2.2 Bedeutung des Wächterlymphknotenstatus	17
1.2.3 Untersuchung.....	18
1.3 Problemstellung und Studienziel	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Herkunft des Probenmaterials	23
2.2 Quantitative Immunzytologie.....	24
2.2.1 Materialien, Geräte und Hersteller in der Immunzytologie.....	24
2.2.2 Aufarbeitung des Wächterlymphknotens.....	25
2.2.3 Immunzytologische Färbung	26
2.2.4 Beurteilung der Präparate.....	27
2.3 Histopathologie	28
2.4 Untersuchungen der vorliegenden Studie.....	28
2.4.1 Materialien, Geräte und Hersteller der histopathologischen (Nach-) Untersuchungen.....	29

2.4.2	Bestimmung der Metastasengröße.....	30
2.4.3	Nachschnitte initial negativer Wächterlymphknoten.....	31
2.5	Statistische Auswertungen und Analysen	35
2.5.1	Verwendete statistische Begriffe, Größen und Tests.....	35
2.5.2	Zusammenhang des DCCD mit der histopathologisch vermessenen Metastasengröße.....	36
2.5.3	Zusammenhang des DCCD bzw. der histopathologischen Metastasengröße mit der Tumordicke	37
2.5.4	Verwendete EDV-Programme	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Studienkollektiv	38
3.2	TNM-Klassifikation und Staging des Studienkollektivs	40
3.3	Vierfeldertafeln	44
3.4	Quantitative Immunzytologie – deskriptive Statistik.....	45
3.5	Histopathologie – deskriptive Statistik	47
3.6	Histopathologisch positive und immunzytologisch negative Wächterlymphknoten.....	49
3.7	Nachschnitte der histopathologisch negativen, immunzytologisch positiven Wächterlymphknoten.....	50
3.7.1	Gesamt.....	50
3.7.2	Protokoll 1.....	51
3.7.3	Protokoll 2.....	52
3.7.4	Protokoll 3.....	53
3.7.5	Zeit- und Kostenaufwand	54
3.7.6	Gegenüberstellung der drei verschiedenen Nachschnitt-Protokolle – Übersicht.	56

3.8	Korrelation des DCCD mit der histopathologisch bestimmten Metastasengröße	57
3.9	Korrelation des DCCD bzw. der Metastasengröße mit der Tumordicke nach Breslow.....	60
4	Diskussion	64
4.1	Die Studie und eine Übersicht der wichtigsten Ergebnisse.....	64
4.2	Diskussion der einzelnen Ergebnisse.....	65
4.2.1	Positivitätsrate der Wächterlymphknoten-Biopsie in Tübingen.....	65
4.2.2	Mehr Metastasen durch ein genaueres Untersuchungs-Protokoll.....	66
4.2.3	Relevanz isolierter Tumorzellen.....	67
4.2.4	Quantifizierung der Tumorlast im Wächterlymphknoten	68
4.2.5	Die 4-Felder-Tafeln	70
4.2.6	Korrelation des DCCD mit der histopathologischen Metastasengröße ...	74
4.2.7	Korrelation des DCCD bzw. des maximalen Metastasendurchmessers mit der Primärtumordicke nach Breslow	75
4.2.8	Vergleich der beiden Untersuchungsmethoden bezüglich Zeit- und Kostenaufwand.....	77
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	78
5	Zusammenfassung.....	80
6	Literaturverzeichnis	82
7	Verzeichnisse	93
7.1	Abbildungsverzeichnis	93
7.2	Tabellenverzeichnis	94
7.3	Hersteller der (Verbrauchs-) Materialien und Geräte.....	96
8	Erklärung zum Eigenanteil.....	96
9	Danksagung	97

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	Antikörper
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
CLND	complete lymph node dissection, Lymphadenektomie
DCC	disseminated cancer cells
DCCD	disseminated cancer cell density
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
HE	Hämatoxylin-Eosin
HP	Histopathologie
ITZ	Isolierte, einzeln liegende Tumorzellen im WLK
LK	Lymphknoten
Max.	Maximum
Min.	Minimum
MM	malignes Melanom
Non-SLN	Lymphknoten, der kein Wächterlymphknoten ist.
OT	Objektträger
PTC	Potential tumor cell, wahrscheinliche Tumorzelle
QIZ	Quantitative Immunzytologie
SLN	sentinel lymph node, Wächterlymphknoten
SLNB	Sentinel-Lymph-Node-Biopsie
TC	tumor cell, sichere Tumorzelle
TNM	Tumor, Node, Metastase. Stagingssystem bei malignen Tumoren.
WLK	Wächterlymphknoten

1 Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom, auch schwarzer Hautkrebs genannt, ist ein bösartiger Tumor, der von entarteten Melanozyten ausgeht. Entsprechend treten über 90 % dieser Tumoren in der Haut auf, allerdings können Melanome prinzipiell überall entstehen, beispielsweise an Schleimhäuten, im Auge (konjunktival und uveal), sowie an den Meningen des ZNS.

1.1.1 Epidemiologie

Mit 4 % ist das maligne Melanom (MM) der dritthäufigste bösartige Tumor der Haut nach dem Basalzell- und dem Plattenepithel-karzinom, dabei jedoch für 90 % der Todesfälle an Hauttumoren verantwortlich¹⁻³. Es ist ebenfalls der Tumor mit dem weltweit stärksten Inzidenzanstieg^{4,5}: Seit den 1970er Jahren kam es in Deutschland zu einer Verfünffachung der Neuerkrankungen mit insgesamt 23.200 Fällen im Jahr 2016 und einer Inzidenz von ca. 20 pro 100.000 Einwohnern. Das Melanom steht in Deutschland somit an vierter Stelle der Krebsneuerkrankungen bei den Männern und an fünfter Stelle bei Frauen, wobei letztere mit 60 Jahren im Mittel 8 Jahre früher erkranken^{5,6}. Das derzeitige Risiko zu erkranken beträgt über 2 % für Hellhäutige, dunkler pigmentierte Hauttypen sind deutlich seltener betroffen⁷⁻⁹. Die Sterberate hingegen hat sich in den letzten Jahrzehnten relativ stabil gehalten und ist insbesondere vom Zeitpunkt der Diagnosestellung, dem Tumorstadium, sowie dem Melanom-Subtyp abhängig. In Deutschland werden über zwei Drittel der Melanome Stadium I erkannt und sind dem prognostisch günstigen oberflächlich-spreitenden Subtyp zuzuordnen, sodass das 5-Jahres-Überleben im Mittel über 90 % beträgt^{5,6}. Weltweit sind die höchsten Fallzahlen in Australien und Neuseeland zu verzeichnen, innerhalb Europas sind vor allem die skandinavischen Länder betroffen^{2,5,7,8}.

1.1.2 Pigmentsystem der Haut

Das Pigmentsystem der Haut wird durch die Melanozyten reguliert. Deren Vorläufer wandern während der Embryonalentwicklung aus dem Neuralrohr in die Haut, das Auge, die Schleimhäute und die Meningen ein^{3,8,10}. In der Basalzellschicht der Epidermis gelegen, synthetisieren sie in speziellen Zellorganellen, den Melanosomen, das sogenannte Melanin. Dieses wird über dendritische Ausläufer in die um- und

überliegenden Keratinozyten transportiert und schützt deren DNA durch Absorption von schädigendem UV-Licht, zudem gilt es als freier Radikalfänger, Antioxidans und Kationen-Binder¹¹. Ein Melanozyt und die durch diesen versorgten, durchschnittlich 35 Keratinozyten bezeichnet man als „Epidermale Melanin Einheit“¹².

1.1.3 Subtypen

Das MM kann nach seiner klinischen Präsentation und histopathologischen Eigenschaften in verschiedene Subtypen unterteilt werden^{3,4,13}.

Superfiziell spreitendes Melanom: Mit mehr als 60 % ist das superfiziell spreitende bzw. pagetoide Melanom (SSM) der häufigste Subtyp. Es kommt vergleichsweise häufig bei Jüngeren (30-60 Jahre) vor und findet sich gehäuft an Rücken und Brust bei Männern, sowie den Extremitäten bei Frauen. Makroskopisch präsentiert es sich als unscharf begrenzte, unregelmäßig pigmentierte und zentral oft depigmentierte Makula.

Noduläres Melanom: Das noduläre Melanom (NM) ist der zweithäufigste Subtyp (15-30 %) und tritt vor allem am Oberkörper älterer Menschen auf. Oft handelt es sich um einen schwarzbraunen, deutlich dem Hautniveau erhabenen Knoten, der leicht ulzeriert oder blutet. Da er durch ein schnelles und vertikales Wachstum, sowie eine dadurch bedingte frühe Metastasierung gekennzeichnet ist, handelt es sich um den aggressivsten Subtyp mit der schlechtesten Prognose.

Lentigo maligna Melanom: Das lentigo maligna Melanom (5-10 %, LMM) entsteht aus einer Lentigo maligna (einem Melanoma in situ) in sonnengeschädigter Haut. Entsprechend häufig betrifft es das Gesicht über 65-Jähriger. Makroskopisch ähnelt es dem SSM und kann durch Vorsorgeuntersuchungen und dank eines langjährigen horizontalen Wachstums frühzeitig erkannt und behandelt werden.

Akrolentiginöses Melanom (ALM): Diese Gruppe repräsentiert 2-3 % aller Melanomfälle, ist jedoch der häufigste Subtyp bei dunkelhäutigen und asiatischen Menschen. Besonders häufig entwickelt es sich an den Handflächen, Fußsohlen, Schleimhäuten und unter den Nägeln (sogenanntes Hutchinson-Zeichen). Aufgrund dieser unkonventionellen Lokalisation wird es oft erst in einem späten Stadium diagnostiziert und hat mit einem 5-Jahres-Überleben von ca. 80 % eine schlechte Prognose.

Zudem sind weitere seltenere Subtypen, beispielsweise das Dermale und Amelanotische Melanom, sowie Nävus-assoziierte Melanome und Schleimhautmelanome bekannt.

1.1.4 Ätiologie und Risikofaktoren

Die genauen Mechanismen, die zur Entstehung und Progression des Melanoms führen, sind bis heute noch nicht vollständig geklärt, allerdings wird von einem Mehrstufenmodell der Melanompathogenese ausgegangen. Als erster Schritt wird dabei die Akkumulation von Mutationen in Schlüsselgenen für die Regulation des Zellzyklus angesehen. Deren dauerhafte Aktivierung oder ihr Funktionsverlust erzeugen ein Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose und begünstigen so die Entstehung eines Tumors. Weitere genetische Veränderungen bedingen den Übergang eines lokalisierten in ein metastasierendes Melanom¹⁴. Zentrale Rolle beim Erwerb dieser Alterationen spielen, neben ererbten Mutationen, insbesondere verschiedene Umwelteinflüsse, die mit dem genetischen Material der Zellen interagieren und DNA-Schäden verursachen. So führen UV-Strahlen beispielsweise über die Induktion von Pyrimidin-Dimeren in der DNA zu Punktmutationen (Cytosin→Thymin) in verschiedenen Genen^{8,13,14}.

Zu den bisher identifizierten, entscheidenden Mutationen beim MM gehört die aktivierende Mutation von BRAF bei 40-60 % der Melanompatienten^{15,16}. Durch den Austausch der Aminosäure Valin gegen Glutamin kommt es zur dauerhaften Aktivierung dieser Kinase des RAS-RAF-MEK-ERK Pathways und zur unkontrollierten Proliferation der Zellen. Allerdings weisen auch ca. 80 % der melanozytären Nävi Mutationen in BRAF auf, sodass für die Progression zum malignen Klon die Akkumulation von Gendefekten und Störung weiterer Signalwege notwendig erscheint. Solche bereits in Melanomzellen identifizierte Pathways sind beispielsweise der PI3K-AKT Pathway (NRAS, PI3K-AKT) sowie der c-Kit-Signaltransduktionsweg (MCR1 und CDKN2A) und spielen eine immer größere Rolle in der gezielten Therapie (targetet therapie)^{13,16,17}.

Risikofaktoren: Der stärkste externe Risikofaktor für die Entstehung des MM ist die Exposition gegenüber schädlicher UV-Strahlung. Dabei scheint vor allem die intermittierende Belastung, beispielsweise in den Ferien und im Solarium, sowie häufige Sonnenbrände in Kindheit und Jugend ein starkes Risiko zu bergen^{8,18,19}. Außerdem ist das Risiko für die Entwicklung eines MM bei bestimmten phänotypischen

Charakteristika, wie hellem oder rotem Haar, blasser, sonnenempfindlicher Haut mit zahlreichen Sommersprossen und hellen Augen um ca. 50 % erhöht^{8,20}. Der Großteil der Melanome entsteht auf gesunder Haut, allerdings sind ca. 25 % der Fälle mit einem vorbestehenden Nävus assoziiert²¹. Entsprechend haben sowohl Menschen mit einer sehr großen Anzahl (≥ 100) an melanozytären Nävi, als auch Betroffene des dysplastischen Nävussyndroms (≥ 50 gewöhnliche melanozytäre Nävi und ≥ 5 atypische Nävi) ein besonders Risiko zu erkranken²²⁻²⁴. Circa 8-12 % der Patienten haben mindestens einen ebenfalls am MM erkrankten Verwandten, was eine familiäre Prädisposition vermuten lässt^{20,25}. Diese Patienten erkranken im Mittel früher, mit dünneren, häufig multilokulären Primärtumoren und haben eine insgesamt etwas bessere Prognose⁸. Auch für Patienten, die bereits ein diagnostiziertes Melanom in ihrer Vorgeschichte haben, sowie bei dauerhaft Immunsupprimierten ist die Wahrscheinlichkeit zu erkranken erhöht.

1.1.5 Diagnostik und Klassifikation

Als Besonderheit des Melanoms im Vergleich zu anderen Tumoren gilt, dass es zumeist in einem verhältnismäßig frühen Stadium identifiziert werden kann. Häufig bemerken die Patienten selbst neue, auffällige oder sich verändernde Nävi. Um primär zwischen einer benignen melanozytären Läsion und einem Melanom unterscheiden zu können, sollte die Läsion auf die ABCDE-Regeln hin geprüft werden:

A: Asymmetrie

B: irreguläre, unscharfe Begrenzung

C: unregelmäßige Colorierung

D: Durchmesser von >6 mm

E: Veränderung des Mals in Größe, Form oder Farbe

Ebenfalls auffällig kann eine Rötung oder Schwellung, sensorische Missempfindungen bis hin zu Nässen und Blutungen sein. Treffen mehrere der Kriterien zu, sind weitere diagnostische Untersuchungen notwendig^{2,26}: Mit einem Dermatoskop können mit bloßem Auge nicht sichtbare Charakteristika von Farbe, Struktur und Wachstumsmuster auflichtmikroskopisch genauer betrachtet werden. Die in vivo konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM) ist eine ebenfalls nicht-invasive Untersuchung des verdächtigen Hautareals mit einem Laserstrahl. Aus dem Grad der Reflexion lassen sich Rückschlüsse

auf zelluläre Strukturen ziehen, was eine Unterscheidung zwischen dysplastischen Nävi, MM und anderen pigmentierten Hautläsionen ermöglicht.

Bei dringendem Verdacht sollte möglichst eine vollständige Exzision der Läsion vorgenommen und diese histopathologisch untersucht werden. Dabei sollten Informationen zur Malignität, dem Subtyp, der Tumordicke nach Breslow (=maximaler Abstand vom Stratum granulosum der Epidermis bis zum tiefsten Tumorgewebe in mm), dem Ulzerationsstatus sowie dem Abstand zu den Exzisionsrändern erhoben werden. Die Dokumentation weiterer Tumorcharakteristika, wie der Eindringtiefe anhand des Clark-Levels (Lage der Tumorzellen in den Hautschichten: Oberhalb der Basalmembran, im Stratum papillare oder reticulare oder noch tiefer), der Mitoserate sowie dem Vorliegen einer Tumorregression, infiltrierender Lymphozyten oder einer Angio- bzw. Nerveninvasion wird empfohlen^{27,28}. Für diese Untersuchungen sind immunhistochemische Färbungen mit molekularen Biomarkern wie S-100 Protein, HMB 45, MelanA, MIB-1 und Ki-67 hilfreich. Da die verschiedenen Antikörper (AK) sich in Sensitivität und Spezifität zum Teil deutlich unterscheiden, ist eine Kombination sinnvoll (vgl. 1.2.3).

Bei Bestätigung des Malignitätsverdachtes sollte zur Bestimmung der Tumorausdehnung eine vollständige körperliche Untersuchung inklusive der einsehbaren Schleimhäute und eine Sonographie der regionalen Lymphknoten (LK) erfolgen. Je nach Stadium sind auch ein Röntgen des Thorax/Abdomens/Beckens und eine weiterführende Bildgebung (CT, MRT, PET) unabdingbar. Zur späteren Verlaufskontrolle sollten außerdem die Serumlevel von S100 und der Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt werden. Zusätzlich wird ab einer Tumordicke von 1 mm eine Biopsie und Untersuchung des sogenannten Wächterlymphknotens (WLK) empfohlen (vgl. 1.2)^{2,29}.

Klassifikation: Wird in obigen Untersuchungen ein Melanom diagnostiziert, so wird dieses nach dem TNM-System (Tumor, Node, Metastase) klassifiziert und das Tumorstadium bestimmt. Die neueste Version dieses Stagingsystems wurde 2017 vom AJCC (American Joint Committee on Cancer) veröffentlicht und ist seit Januar 2018 gültig^{30,31}.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des malignen Melanoms nach der 8. Version des AJCC-Melanoma stagings (2017)³¹, Gershenwald et al. (2017)³⁰.

T-Kategorie	Tumordicke	Ulzerationsstatus
Tx	nicht bestimmbar	k.A. ¹
T0	kein Anhalt für Primärtumor	k.A.
Tis	Melanoma in situ	k.A.
T1	< 0,8 mm	a: negativ b: positiv
	0,8 mm – 1,0 mm	b: negativ/positiv
T2	> 1,0–2,0 mm	a: negativ b: positiv
T3	> 2,0-4,0 mm	a: negativ b: positiv
T4	> 4,0 mm	a: negativ b: positiv
N-Kategorie	Anzahl befallener LKs	Ausmaß der Metastasierung
Nx	keine Beurteilung stattgefunden (z.B. keine WLK-Biopsie erfolgt)	k.A.
N0	0 LK	negativ
N1	1 LK	a: klinisch okkult ² b: klinisch detektierbar ³ c: NUR Intransit- oder Stellitenmetastase
		a: klinisch okkult ² b: davon ≥ 1 Metastase klinisch detektierbar ³ c: 1 positiver LK + Intransit- oder Satellitenmetastase
N2	2 - 3 LKs	a: klinisch okkult ² b: davon ≥ 1 Metastase klinisch detektierbar ³ c: 1 positiver LK + Intransit- oder Satellitenmetastase
N3	≥ 4 LKs	a: klinisch okkult ² b: davon ≥ 1 klinisch detektierbar ³ c: ≥ 2 positive LKs + Intransit- oder Satellitenmetastase
M-Kategorie	Lokalisation der Metastasierung	LDH-Wert im Serum
M0	negativ	
M1	a: Haut, Weichteile inkl. Muskel/nicht regionale LKs	(0): normal (1): erhöht
	b: andere viszerale Lokalisationen ohne ZNS-Beteiligung	(0): normal (1): erhöht
	c: ZNS	(0): normal (1): erhöht

¹keine Angabe, ²Metastase nur mikroskopisch detektierbar, ³Metastase klinisch detektierbar (körperliche/apparative Untersuchung)

Wie in Tabelle 1 dargestellt, ergibt sich die Einordnung des Primärtumors (T-Kategorie) aus der Tumordicke nach Breslow und dem Ulzerationsstatus. Der Lymphknotenstatus (N-Kategorie) wird anhand der Anzahl der betroffenen LKs, sowie der Unterscheidung zwischen „klinisch detektierbaren“ Metastasen (früher „Makrometastasen“) und

„klinisch okkulter“ Metastasen definiert. Dabei kategorisiert schon der Nachweis einer einzigen Tumorzelle im gesamten LK (zumeist WLK) diesen als positiv. Eine weitere Subkategorisierung („c“) erfolgt bei Vorliegen sogenannter Satellitenmetastasen (bis zu 2 cm vom Primärtumor entfernt) oder Intransit-Metastasen (im Verlauf des Lymphabflusses, > 2 cm vom Primärtumor entfernt). Bei der Fernmetastasierung (M-Kategorie) wird zwischen verschiedenen Lokalisationen mit normaler oder erhöhter Serum-LDH unterschieden.

Nach dieser TNM-Klassifikation erfolgt die Einteilung in verschiedene Stadien, welche insbesondere für die Prognose, den Einschluss in Studien und die eingeleiteten Therapien relevant sind (Tabelle 2).

Tabelle 2: Pathologisches Stadium des malignen Melanoms nach der 8. Version des AJCC-Melanoma stagings (2017)³¹, Gershenwald (2017)³⁰.

T-Klassifikation	N-Klassifikation	M-Klassifikation	Stadium
Tis	N0	M0	0
T1a/b	N0	M0	IA
T2a			IB
T2b, T3a	N0	M0	IIA
T3b, T4a			IIB
T4b			IIC
T0	N1b, N1c	M0	IIB
T0	N2b, N2c, N3b/c		IIC
T1a/b–T2a	N1a, N2a		IIIA
T1a/b–T2a	N1b/c, N2b		IIB
T2b/T3a	N1a–N2b		
T1a–T3a	N2c, N3a/b/c		IIC
T3b/T4a	Jedes N \geq N1		
T4b	N1a–N2c		
T4b	N3a/b/c		IIID
Jedes T, Tis	Jedes N		M1

1.1.6 Therapie und Prognose

Laut der 2019 vom AWMF veröffentlichten S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms ist bei lokalisiertem Tumorbefall (Stadium 0 (Melanoma in situ), I, II) eine vollständige Exzision des Tumors ausreichend. Während beim CIS (Carcinoma in situ) seitliche Sicherheitsabstände von 0,5 cm genügen, sollte ab dem bereits invasiven Stadium I bis ins subkutane Fettgewebe exzidiert und bei einer Tumordicke von \leq 2 mm seitliche Sicherheitsabstände von 1 cm, bzw. 2 cm bei größeren

Primärtumoren, eingehalten werden. An besonderen Lokalisationen (Gesicht, Schleimhaut) kann eine knappere Exzision erfolgen, jedoch möglichst unter Einsatz der 3D-Histologie, um einen Resttumor auszuschließen. Lentigo maligna Melanome lassen sich bei operativen Schwierigkeiten (hohes Patientenalter, Lage, Ausdehnung) auch primär mit einer Radiotherapie behandeln².

LK-Metastasen (Stadium III) unterscheidet man nach klinisch detektablen Makrometastasen (via Ultraschall, CT, MRT) und solchen, die nur histologisch als tumorbefallen identifiziert werden können (Mikrometastasen). Bei Ersteren sollte eine komplette Lymphknotendissektion (CLND= complete-lymph-node-dissektion= Lymphadenektomie) des betroffenen Lymphabflussgebietes durchgeführt werden, wohingegen der therapeutische Nutzen einer CLND bei Mikrometastasen aktuell kontrovers diskutiert wird. Die AWMF empfiehlt derzeit Patienten mit einem Tumorbefall >1 mm im WLK eine vollständige Lymphadenektomie anzubieten. Zwischen 0,1 mm und 1 mm sind weitere Risikofaktoren, wie der maximale Metastasendurchmesser, eine Kapselinfiltration, die Anzahl der betroffenen WLKs und die Charakteristika des Primärtumors zu berücksichtigen. Bei einer Metastase <0,1 mm oder einzelnen Tumorzellen kann auf eine vollständige LK-Entfernung verzichtet werden. Bei mehr als 3 befallenen LKs, >3 cm großen LK-Metastasen sowie einem Kapseldurchbruch oder Rezidiv sollte außerdem eine adjuvante Radiotherapie (5 x 1,8–2,5 Gy/Woche) erfolgen. Zudem wird ab Stadium III eine adjuvante Therapie mit einem anti-PD1-AK bzw. BRAF- und MEK-Inhibitoren bei entsprechendem Mutationsstatus empfohlen².

Insbesondere im Stadium IV, d.h. bei nicht komplett resezierbaren Fernmetastasen, kommt die Immuntherapie mit Checkpoint-Inhibitoren (Pembrolizumab, Nivolumab), möglichst in Kombination mit dem CTLA-4-AK Ipilimumab, zum Einsatz³². Bei nachgewiesener BRAF-V600-Mutation ist eine Therapie mit einem BRAF-Inhibitor kombiniert mit einem MEK-Inhibitor möglich³³. Weitere Therapieoptionen sind die Behandlung mit einem c-KIT-Kinaseinhibitor bei nachgewiesener c-KIT-Mutation, die Monochemotherapie mit beispielsweise Dacarbazin oder eine systemische Polychemotherapie. Die Tumornachsorge erfolgt über mindestens zehn Jahre, wobei neben einer im Zeitintervall risikoadaptierten medizinischen Ganzkörperuntersuchung

eine regelmäßige Selbstuntersuchung des Patienten essenziell ist, um Rezidive, Metastasen und Zweitmelanome frühzeitig zu detektieren.

Die Prognose bei Erkrankung ist von multiplen Faktoren abhängig. Die heute bestätigten wichtigsten Prädiktoren sind die Tumordicke, der Ulzerations- und der Wächterlymphknotenstatus^{30,34,35}. Mit steigendem Tumorstadium bei Diagnose lässt sich eine schlechtere Prognose beobachten: So beträgt das Melanom-Spezifische-Überleben für Stadium I für 5 Jahre 98 %, 90 % im Stadium II und 77 % im Stadium III³⁰. Für das fernmetastasierte Stadium IV wurden vom AJCC 2008 1-Jahres-Überlebensraten zwischen 32 % und 65 % beschrieben²⁹.

1.2 Der Wächterlymphknoten

Der Wächterlymphknoten (WLK), auch sentinel lymph node (SLN), ist der erste LK in welchen die Lymphe und somit auch potentiell darin enthaltene Zellen einer malignen Erkrankung drainiert werden und in dem entsprechend die Wahrscheinlichkeit für Metastasen am größten ist. Wenn sich in diesem keine Tumorzellen befinden, so geht man davon aus, dass auch die folgenden LKs tumorfrei sind und der Tumor noch lokal begrenzt ist^{36,37}.

1.2.1 Geschichte, Lymphoszintigraphie und Biopsie

Virchows Beschreibung des Lymphabflusses einer jeden Körperregion über spezifische LKs (1863) scheint der Ursprung der Theorie des WLK zu sein^{38,39}. Bereits 1892 empfahl der britische Chirurg Herbert Snow in einer Publikation mit Verweis auf die Arbeit Virchows eine radikale LK-Entfernung zur Behandlung von Patienten mit MM durchzuführen^{40,41}. Auch der US-amerikanische Chirurg William Halsted wurde von Virchow inspiriert und führte 1894 bei Brustkrebspatientinnen zusätzlich zur Mastektomie eine en-bloc Entfernung der axillären LKs ein, um eine weitere Tumorausbreitung zu verhindern⁴². Damit wurde die Chirurgie des regionalen Lymphknotengebietes für verschiedene Tumorentitäten, insbesondere aber das Mamma-Karzinom und Melanom, ein wichtiger Bestandteil der operativen Onkologie⁴³. Die über ein Jahrhundert anhaltende Forschung zu dieser Thematik mündete 1992 in einer Publikation von Morten et al., die als vielleicht wichtigste Landmarke in der Geschichte des Sentinel lymph nodes zu sehen ist. In dieser wurde erstmals die Lymphoszintigraphie und Wächterlymphknotenbiopsie als risikoarme Alternative zur bisher praktizierten

radikalen und dadurch nebenwirkungsbehafteten Lymphknotendissektion beschrieben⁴⁴. Die Lymphoszintigraphie ermöglicht es dem Chirurgen, den Lymphabflussweg vom Primärtumor bis ins regionäre Lymphabflussgebiet darzustellen und dadurch den WLK zu identifizieren, anstatt alle regionalen LKs entnehmen zu müssen (Sentinel-Lymph-Node-Biopsie = SLNB) (vgl. 1.2.2).

Die Untersuchung des WLK gehört heute zur Standarddiagnostik bei Brustkrebs und wird inzwischen auch beim MM ab einer Tumordicke von 1 mm weltweit angewandt. Dabei hat sich die Technik der Lymphoszintigraphie seit der Erstbeschreibung 1992 stets weiterentwickelt, sodass heute zusätzlich zur primär farblichen Markierung des Lymphabflussgebietes mit Methylenblau auch radioaktiv markierte Nanokolloide zum Einsatz kommen. Bereits präoperativ wird Technetium-99m-Schwefel-Kolloid intradermal um den Primärtumor injiziert und mit Hilfe eines γ -Counters der Lymphabflussweg mit den zwischengeschalteten LKs verfolgt (Abbildung 1). An der Stelle der frühesten und stärksten γ -Emission als Äquivalent des WLKs wird die Haut markiert und später die Operation erfolgen. Bei dieser wird zunächst der Farbstoff Isosulfan Blue ebenfalls intradermal um den Primärtumor injiziert und anschließend mit Hilfe des intraoperativ gemessenen radioaktiven Signals (in vivo Counts) und durch Verfolgung des sich blau darstellenden Lymphabflusses der WLK in bis zu 99 % der Fälle eindeutig identifiziert und entnommen⁴⁵⁻⁴⁷. In einigen Fällen färben sich mehrere LKs zeitgleich an, sodass empfohlen wird alle LKs mit Counts von ≥ 10 % des Maximums zu biopsieren⁴⁸.

Einleitung

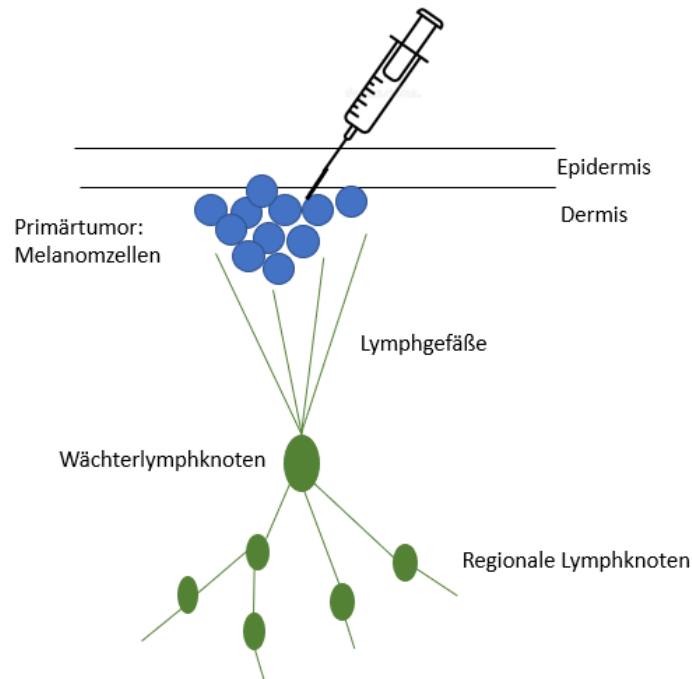


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Lymphabflusses. Dieser erfolgt vom Primärtumor der Haut über die afferenten Lymphgefäße zunächst in den WLK und anschließend ins regionale Lymphabflussgebiet. Entsprechende zeitliche Verteilung des radioaktiven und blauen Markers, der bei der Lymposzintigraphie injiziert.

1.2.2 Bedeutung des Wächterlymphknotenstatus

Primäres Ziel ist es, eine voraussagende Aussage zum Status der weiteren LKs und damit über das Ausmaß der Metastasierung treffen zu können und die Patienten so dem korrekten Tumorstadium zuzuordnen. Beim Brustkrebs hat die Detektion von Metastasen direkte therapeutische Konsequenzen und auch für das Melanom wurde über viele Jahre bei Befall des WLK eine CLND des regionalen Lymphabflussgebietes durchgeführt. Diese blieb Patienten bei negativem Untersuchungsbefund dagegen erspart, zumindest solange klinisch keine Lymphknotenmetastasen in späteren Kontrolluntersuchungen detektiert wurden⁵⁰. In neueren Studien zeigte sich durch eine direkt folgende CLND bei positivem WLK allerdings nur eine Verbesserung der regionalen Tumorkontrolle, jedoch kein Einfluss auf die Ausbildung von Fernmetastasen oder gar das Gesamtüberleben der Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, deren LK-Status regelmäßig durch klinische, Blut- und Ultraschalluntersuchungen beobachtet wurde⁵⁰⁻⁵³. Da zudem nur in etwa 20 % der im Rahmen einer CLND entnommenen LKs tatsächlich Metastasen gefunden werden, stellt sich die Frage, ob und bei welcher Patientenpopulation die mit dieser großen Operation verbundenen Kosten und vor allem Morbidität, wie Wundinfekte, Serome und chronische sekundäre Lymphödeme, in Kauf genommen

werden sollten^{51,53-57}. Vergleichbare Komplikationen werden zwar auch bei der Wächterlymphknotenbiopsie beschrieben, diese sind jedoch deutlich seltener und zumeist nur vorübergehend⁵⁷.

Es gibt daher inzwischen Empfehlungen, eine CLND nicht generell bei positivem WLK anzustreben, sondern erst bei Vorliegen weiterer Risikofaktoren oder ab einer bestimmten Tumorlast im WLK - wobei diese noch nicht einheitlich festgelegt wurde^{53,58}. Die S3-Leitlinie der AWMF empfiehlt eine CLND ab einer Metastasengröße von >1,0 mm und erwägt eine solche im Bereich zwischen 0,1 mm und 1,0 mm bei weiteren Risikofaktoren, wie großem maximalen Metastasendurchmesser und Tiefenausdehnung im WLK (Starz-Klassifikation), Kapselinfiltration, hoher Anzahl betroffener WLKs, großer Primärtumordicke und Ulzeration des Primärtumors².

Der Status und die Tumorlast des WLK sind relevant für die Klassifikation des Tumorstadiums und gemeinsam mit der Tumordicke nach Breslow die wichtigsten prognostischen Faktoren im frühen Stadium des MM und den Einschluss in klinische Studien und adjuvante Therapien^{29,59}. Daher wird heute die Untersuchung des WLK allen Patienten mit Primärtumoren einer Dicke von $\geq 1,00$ mm und klinisch unauffälligen LKs empfohlen, da ab dieser das Risiko für LK-Metastasen bis zu 12 % beträgt. Bei Tumoren $\geq 0,8$ mm zeigen sich in den nachgeschalteten LK in weniger als 5 % Melanommetastasen, sodass man diesen Patienten die SLNB nur bei Vorliegen weiterer Risikofaktoren wie Ulzeration des Primärtumors, erhöhter Mitoserate oder jungem Patientenalter (<40 Jahre) empfiehlt^{2,30,60,61}. Bei Tumordicken von >4 mm nimmt der Wert des WLK als prognostischer Marker wieder ab, da diese Tumoren vermutlich deutlich häufiger bereits hämatogen metastasieren⁵⁰.

1.2.3 Untersuchung

Seit der 2009 vom AJCC veröffentlichten siebten Version des Stagingystems bei MM ist bereits eine einzige immunhistochemisch detektierte Tumorzelle im WLK ausreichend, um diesen als positiv zu befunden und den Patienten somit in Stadium III hochzustufen²⁹. Dies verdeutlicht die Relevanz jedes noch so minimalen Tumorbefalls und stellt eine große Herausforderung an die Untersuchung dar. Dabei wird zwischen sogenannten „klinisch detektierbaren“ Metastasen, welche in der klinischen, sonographischen oder radiologischen Untersuchung identifiziert werden können, und

„klinisch okkulten“ Metastasen unterschieden. Letztere können ausschließlich in der mikroskopischen Untersuchung detektiert werden und haben eine bessere Prognose^{29,30,62,63}. Von diesen Mikrometastasen sind wiederum sogenannte „Submikrometastasen“, also Tumorzellaggregate <0,1 mm oder isoliert liegende Tumorzellen (ITZ), abzugrenzen. Zumeist sind diese einzelnen Zellen in der histologischen Routinediagnostik mit einer Hämatoxylin & Eosin (HE) Färbung nicht zu sehen, sondern erst durch die Anfärbung eines Antigens der Zelle mit einem melanomspezifischen AK⁶⁰. Die häufigsten zum Einsatz kommenden AKs richten sich dabei gegen S100, das Glykoprotein gp100 und MelanA.

S100: Das saure, Kalzium-bindende Protein S100 wurde erstmals in Gliazellen entdeckt, wird heute jedoch häufig als sensitiver Marker des MM eingesetzt⁶⁴⁻⁶⁶. Eine Expression findet sich allerdings beispielsweise auch in dendritischen Zellen, Langerhanszellen, benignen Nävuszellen und Adipozyten, sodass die Spezifität eher gering ist^{67,68}. In Melanomzellen kommt es zu einer nukleären und zytoplasmatischen Färbung.

Gp100: Das Glykoprotein gp100 ist ein Transmembranprotein der zytoplasmatischen Prämelanosomen und kann u.a. mit dem Antikörperklon HMB45 nachgewiesen werden⁶⁵. Zwar sind nur circa 80 % der Melanome positiv, allerdings weist es eine sehr hohe Spezifität auf^{64,67-69}: In der Regel werden keine intranodalen Nävi oder andere physiologisch im LK vorkommenden Zellen gefärbt^{28,35,70,71}.

MelanA: Dieses auch MART-1 (melanoma antigen recognized by T-cells) genannte Protein ist für die Differenzierung der Melanosomen verantwortlich und kann mit verschiedenen Klonen angefärbt werden. Es hat ähnliche Sensitivitäts- und Spezifitätsraten wie HMB45^{67,68}, allerdings sind benigne Nävuszellen ebenfalls oft positiv^{64,72}.

SOX10: Das “Sex Determining Region Y-Box 10” ist ein für einen Transkriptionsfaktor codierendes Gen, welches bereits in Zellen der Neuralleiste, sowie in allen Entwicklungsstadien der aus diesen hervorgehenden Melanozyten und Schwannzellen exprimiert wird. Daher werden mit entsprechenden AKs bis zu 100 % benigner und maligner melanozytärer Läsionen gefärbt, genauso jedoch auch beispielsweise Schwannome, Neurofibrome und Granularzelltumoren. Andere LK-Komponenten, wie Fibroblasten, Sinushistiozyten und dendritische Zellen bleiben zumeist negativ⁷³⁻⁷⁸.

Aufgrund der unterschiedlichen Sensitivitäten und Spezifitäten wird häufig eine Kombination der AKs empfohlen^{60,69,79,80}.

Zwar wurde gezeigt, dass die Tumorlast im WLK ein wichtiger prognostischer Faktor für das Overall survival und die Non-SLN (weitere LKs des Lymphabflussgebietes, jedoch keine WLKs) Positivität ist, allerdings besteht Uneinigkeit über eine geeignete Quantifizierung^{59,62,81,82}. Parameter, die in diesem Sinne häufig erhoben werden, sind u.a. der maximale Durchmesser der Metastase (sog. Rotterdam-Kriterium), der maximale Abstand der Tumorzellen von der LK-Kapsel (Starz-Klassifikation) und die mikroanatomische Lokalisation nach Dewar^{59,68,83,84}. Außerdem wird aktuell kontrovers diskutiert, ob diese Signifikanz auch für Submikrometastasen gilt: Während in einigen Studien keine positiven Non-SLNs und ein nahezu identisches Überleben von Patienten mit minimalen Metastasen und Patienten mit negativem WLK beobachtet wurden^{59,85-88}, hatte ebendiese Patientengruppe in anderen Untersuchungen ein signifikant schlechteres Überleben als Patienten ganz ohne Wächterlymphknotenbefall^{35,89,90}. Die Relevanz solch eines geringen Tumorbefalls (Submikrometastase oder ITZ) des WLK, sowie dessen optimale und einheitliche Quantifizierung ist in weiteren Studien mit längerem Follow-up zu klären, insbesondere vor dem Hintergrund, ob einigen der über 80 % der Patienten mit negativen Non-SLNs trotz positivem WLK die CLND erspart bleiben kann^{86,91-93}.

1.2.3.1 Histopathologie

Den Goldstandard der Untersuchung des WLK beim Melanom stellt die Histopathologie (HP) dar: Dazu wird das LK-Gewebe zunächst in Formaldehydlösung (sog. Formalin) fixiert. Anschließend werden circa 2,5 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt, die mit HE und immunhistochemischen Markern gefärbt werden. Vom Pathologen werden diese Schnitte anschließend auf Tumorzellen mikroskopisch untersucht und so Positivitätsraten der WLKs zwischen 15-30 % erhalten^{64,71,94-96}. Diese Spannweite ist vermutlich auf die große Variabilität der Aufarbeitung der LKs in den verschiedenen Pathologieinstituten zurückzuführen: Es wurde gezeigt, dass durch das Erhöhen der Anzahl der Schnitte und immunhistochemischen Färbungen die Detektionsrate um über 10 % gesteigert werden kann^{69,80,97-99}. Da zur Detektion eines Aggregats aus ca. zehn Tumorzellen in einem gewöhnlichen WLK Berechnungen zufolge 139 Stufenschnitte mikroskopiert werden müssten und ein Pathologe im Mittel eine Minute pro Schnitt benötigt, ist allerdings stets ein Mittelweg zwischen der möglichst vollständigen Gewebeaufarbeitung und dem in der

klinischen Praxis realisierbaren Zeit- und Kostenaufwand zu finden^{97,100}. Die EORTC melanoma group empfiehlt beispielsweise ein Protokoll mit 6 Stufen à 50 µm Abstand und insgesamt 20 Schnitten pro LK-Hälfte, von welchen 14 mit HE, S100 und HMB45 gefärbt werden. So werden circa 250 µm Gewebe pro LK-Hälfte aufgearbeitet und Detektionsraten bis zu 34 % erreicht⁹⁴. Ein einfacheres Protokoll praktizieren Scolyer et al. an der Sydney Melanoma Unit, demzufolge von jeder WLK-Hälfte vier zentrale Stufenschnitte angefertigt werden, von welchen wiederum der erste und vierte mit HE, der zweite mit S100 und der dritte Schnitt mit HMB45 gefärbt werden^{60,66}. Da bislang jedoch kein Konsens existiert, mit wie vielen Schnitten, in welchen Intervallen und mit welchen Färbungen die WLKs optimal untersucht werden, kommen aktuell weltweit und institutsabhängig verschiedene Untersuchungsmethoden zur Anwendung, was neben differierender Positivitätsraten auch die Vergleichbarkeit verschiedener Studien erschwert¹⁰¹.

1.2.3.2 Molekulargenetische Nachweismethoden

Bei Einsatz der RT-PCR zum Nachweis von mRNA, welche beispielsweise die Tyrosinase, MART-1 oder gp100 in Melanomzellen codiert, werden Sensitivitäten von bis zu 70 % beschrieben^{99,102-105}. Da jedoch auch benignen Nävuszellen, Melanophagen und Schwannzellen diese Proteine codieren werden falsch positive Ergebnisse in 7 – 11 % der Fälle berichtet und die RT-PCR aktuell noch nicht als alleinige Untersuchungsmethode der WLKs empfohlen^{102,104,106,107}. Zudem ist dadurch keine Quantifizierung der Tumorlast im WLK möglich, da nicht die Tumorzellen selbst gezählt werden, sondern Transkripte bzw. Nukleinsäuren. Hohe Werte können sowohl durch wenige hochexprimierende oder aber auch viele niedrigexprimierende Zellen entstehen³⁵. Dennoch schlagen Starz et al. (2003) vor, einen zusätzlichen via RT-PCR voruntersuchten Schnitt als kostengünstiges Screening einzusetzen, das bei positivem Ergebnis durch ein direkt anschließendes histologisches Korrelat bestätigt werden könnte^{68,108}.

1.2.3.3 Quantitative Immunzytologie

Seit einigen Jahren existiert in der quantitativen Immunzytologie (QIZ) eine weitere Methode zur Detektion von Melanomzellen im WLK⁷¹. Dabei wird das in der Lymphknotenbiopsie erhaltene Gewebe zerkleinert und in eine Einzelzellsuspension überführt. Die Tumorzellfraktion wird durch weitere Dichtegradientenzentrifugation

angereichert und zwei Millionen Zellen auf Objektträger (OTs) aufgetragen. Diese werden anschließend mit dem immunhistochemischen Marker HMB45 gefärbt und lichtmikroskopisch auf Tumorzellen untersucht. Die Anzahl der so detektierten Tumorzellen (DCC= disseminated cancer cells) wird in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt (DCCD= disseminated cancer cell density= Tumorzellen pro 1 Millionen Zellen), wodurch eine einfache Quantifizierung der Tumorlast im WLK möglich ist. Ziel dieser neuen Methode ist es, die Limitationen der bisher praktizierten Untersuchungen zu umgehen: Zum einen besteht nicht die Gefahr mRNA-Transkripte benigner Zellen als malignen Ursprungs zu verkennen wie bei der RT-PCR. Zum anderen wird durch die Einzelzellsuspension das lymphatische Gewebe im Gesamten repräsentiert und so die Problematik möglichst vieler histologischer Schnitte zur Detektion aller inhomogen im WLK verteilten Tumorzellen umgangen^{71,109,110}. Ulmer et al. (2005) konnten sowohl eine signifikante Assoziation zwischen dem DCCD und dem histopathologischen Ergebnis als auch zwischen DCCD und der Breslow-Dicke des Primärtumors nachweisen⁷¹. In weiteren Studien wurde sogar eine stärkere prognostische Aussagekraft des DCCD gegenüber der Histopathologie und ein bereits signifikant schlechteres 5-Jahres-Überleben bei nur 3 Tumorzellen in einer Millionen Zellen beschrieben⁷¹. Einer hohen Sensitivität dieser neuen Methode stehen jedoch eigene Limitationen gegenüber: Es besteht die Gefahr der unspezifischen Färbung bei nur einem verwendeten immunhistochemischen Marker, sowie insbesondere eine eingeschränkte morphologische Beurteilbarkeit und fehlende Lokalisationsangabe der Metastase im WLK durch die Überführung in die Einzelzellsuspension^{35,111}.

1.3 Problemstellung und Studienziel

Eine korrekte Bestimmung des Tumorstadiums ist beim MM von großer Relevanz, um eine stadiengerechte Therapie einleiten und die Prognose des Patienten abschätzen zu können. Im Staging nimmt der WLK eine zentrale Rolle ein, denn bereits eine einzige Melanomzelle in diesem beweist eine Dissemination des Tumors ins lymphatische System. Das Problem besteht darin, diese möglicherweise tatsächlich einzelnen Zellen im Gewebe des WLK zu finden. Es ist bekannt, dass bei der histopathologischen Untersuchung des LK die Wahrscheinlichkeit eine Metastase zu detektieren mit der Anzahl der angefertigten Gewebeschnitte und spezifischen Färbungen steigt. Da dies jedoch mit einem enormen finanziellen und zeitlichen Aufwand verbunden ist, werden in

den Instituten weltweit verschiedenste, mehr oder weniger präzise Protokolle zur Aufarbeitung des Gewebes angewandt. Seit einigen Jahren existiert mit der QIZ eine weitere Möglichkeit, um den WLK zu untersuchen. Die Homogenisierung des Gewebes durch Herstellung einer Einzelzellsuspension löst dabei das Problem der begrenzten Schnittebenen. Eine anschließende Färbung mit HMB45 und mikroskopische Erhebung der Anzahl an Melanomzellen in einer Million abgeählter Zellen ermöglicht zudem eine einfache und eindeutige Quantifizierung der Tumorlast (DCCD). Am Universitätsklinikum Tübingen werden die WLKs je zur Hälfte histopathologisch und immunzytologisch untersucht, breitere Anwendung findet die neue Methodik beim Melanom bisher nicht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, zunächst die QIZ auf ihre Eignung bei der Untersuchung des WLK des MM zu untersuchen, indem deren Ergebnisse in Bezug zu denen des Goldstandards Histopathologie gesetzt werden. Es sollte getestet werden, ob der DCCD die Tumorlast im LK vergleichbar adäquat repräsentiert, wie die histopathologische Ausmessung einer Metastase und ob sich eine zunehmende Tumordicke und damit ein fortgeschritteneres Stadium auch im DCCD widerspiegelt. Gleichzeitig sollte die aktuelle histopathologische Untersuchung in Tübingen analysiert und eine mögliche Verbesserung durch eine zusätzliche Gewebeaufarbeitung erprobt werden. Daraus sollte abschließend ein Urteil darüber gezogen werden, ob für eine präzise und wirtschaftliche Untersuchung der WLKs des Melanoms in Tübingen ein noch breiterer Einsatz der QIZ erfolgen sollte, wie dieser aussehen könnte und ob sie die Histopathologie gar vollständig zu ersetzen vermag.

2 Material und Methoden

2.1 Herkunft des Probenmaterials

Die in dieser Studie verwendeten WLKs stammen von volljährigen Patienten mit diagnostiziertem Melanom, welche zwischen dem 07.01.2013 und dem 17.08.2017 im Universitätsklinikum Tübingen biopsiert wurden. Zum Ausschluss von Fernmetastasen wurde abhängig von der Dicke des Primärtumors bereits eine vollständige körperliche Untersuchung, eine Sonographie der regionalen, abdominellen und/oder thorakalen LKs, ein Röntgen des Thorax und ein MRT des Gehirns durchgeführt. Sofern dieses präoperative Staging negativ ausfiel, erfolgte bei allen zustimmenden Patienten mit einer

Tumordicke nach Breslow von >1,0 mm oder weiteren Risikofaktoren, wie einem hohen Patientenalter oder Ulzeration des Primärtumors, eine Biopsie und Untersuchung des WLK. In diese Studie wurden explizit nur WLKs einbezogen, die sowohl histopathologisch im Institut für Pathologie und Neuropathologie Tübingen, als auch immunzytologisch in der Universitäts-Hautklinik Tübingen aufgearbeitet und deren Daten zusätzlich im Melanomregister erfasst wurden. Es wurden somit insgesamt 1205 WLKs von 907 Patienten untersucht. Ein Einverständnis der Patienten zur Aufbewahrung und Untersuchung der ihnen entnommenen Gewebeproben liegt vor, ein positives Votum der Ethik-Kommission in Tübingen (Projekt Nummer 835/2017BO2) wurde ebenfalls eingeholt.

Die bei der Operation entnommenen WLKs wurden in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Medium bei 4 °Celsius in der Dermatologie gelagert, bis im dortigen Labor die Aufarbeitung und Untersuchung des LK begann.

2.2 Quantitative Immunzytologie

Die Aufarbeitung und Untersuchung der WLKs in der Dermatologie erfolgte im Anschluss an die WLK-Biopsien bei unserem Studienkollektiv bereits ab 2013 und daher nicht im Rahmen dieser Arbeit. Dennoch wurden für ein genaueres Verständnis der Methode sowohl aktuelle WLK-Untersuchungen direkt mitverfolgt als auch die verwendeten Geräte und Reagenzien recherchiert. Da die Immunzytologie als Teil und Basis der Untersuchungen dieser Studie anzusehen ist, soll auch sie an dieser Stelle genauer beschrieben werden.

2.2.1 Materialien, Geräte und Hersteller in der Immunzytologie

Tabelle 3: In der immunzytologischen Untersuchung verwendete Geräte, Materialien, Reagenzien und Antikörper. Herstellerverzeichnis siehe Anhang.

Geräte und Verbrauchsmaterialien:	Hersteller:
Medicon Consult T.S. 50 µm	Dako
Medimachine	BD Biosciences
Countess automated Cell Counter	Life Technologies GmbH
Diagnostica Epoxy Objektträger, 2 Kammern à 18 mm	Langenbrinck
Dako Autostainer	Dako
Färbeautomat Bond	Leica
Covertiles	Leica
Mikroskop eclipse 50i	Nikon

Reagenzien, Medien und Lösungen:

RPMI 1640, F1215	Biochrom
L-Glutamin (200 mM), K0283	Biochrom
Hepes (1 M), FG1215	Biochrom
Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin), L1613 oder A2213	Biochrom
FCS (fetal calf serum), S0115	Biochrom
Percoll Plus, 17-5445-01	GE Healthcare
NaCl 0,9 %	Universalapotheke
Hank's Salt Solution, L2045 oder PAA/ H15-009	Biochrom
PBS, L1825 oder PAA/ H15-002	Biochrom
Trypan Blau 0,4 %, T10282	Life Technologies GmbH
Formalin 4,5 %	Langenbrinck
Poly-L-Lysin, P8920	Sigma-Aldrich
Permanent AP Red Kit	Zytomed Systems
Aqua dest.	Universalapotheke
Tris Puffer (10x konzentriert)	Sigma-Aldrich
Polymer System	Zytomed Systems
Epitope Retrieval Sol 1 (ER1), AR 9961	Leica
Bond Polymer-Refine-Red-Kit, DS 9390	Leica
Ampuwa Aqua dest.	Universalapotheke
Waschpuffer Bond Wash, AR 9590	Leica
Humanserum (AB-Serum)	Sigma-Aldrich
Hämatoxilin	Dako
Kaiser's Glyceringelatine, phenolfrei	Carl Roth GmbH

RPMI-Medium

RPMI + 5ml Glutamin + 5ml Pen/Strep + 5ml Hepes + 50ml FCS mischen und kühlen

Percoll-Stammlösung

100ml Percoll Plus + 9ml Hanks Salt Solution mischen, mit HCl (1N) auf pH 7,4 einstellen und kühlen. Durch Verdünnen mit 0,9% NaCl 60%ige Percoll-Lösung herstellen, kühlen.

Tris-Puffer (10x konzentriert) - Gebrauchslösung

60,57g TrisPuffer Trockensubstanz + 43,83g NaCl Trockensubstanz + 1L Aqua dest. mischen, mit HCl 1 M auf pH 7,5 einstellen und 100ml mit 900ml Aqua dest. verdünnen

AB-Serum 10% - AK-Verdünnungsmedium

1,5ml AB-Serum + 13,5ml Tris-Puffer Gebrauchslösung

Antikörper:	Hersteller:
Monoclonal HMB45	Dako
MOPC21	Sigma-Aldrich

2.2.2 Aufarbeitung des Wächterlymphknotens

Ziel des ersten Arbeitsschrittes der QIZ war die Herstellung einer Einzelzellsuspension aus dem LK-Gewebe, welche den zentralen Unterschied zur histopathologischen Aufarbeitung darstellt. Der entnommene LK wurde dazu zunächst vermessen, entlang

seiner Längsachse halbiert und die eine Hälfte zur histopathologischen Untersuchung ins Institut für Pathologie und Neuropathologie Tübingen geschickt. Die andere Hälfte verblieb zur immunzytologischen Untersuchung in der Hautklinik und wurde dafür mit dem Skalpell von umgebendem Fettgewebe befreit und in 1 mm große Stückchen zerteilt. Die Proben wurden anschließend in RPMI-Medium in einer Einwegdisaggregationskammer (sogenanntes Medicon, Dako) zerkleinert und in einer Medimachine (BD Biosciences) in eine Einzelzellsuspension überführt. In mehreren Spülschritten mit 60 % Percoll und Zentrifugationsschritten wurde das Material weiter aufgereinigt und mit Trypanblau 0,4 % gefärbt. Eine Bestimmung der Zellzahl in Millionen/ml, sowie der Anteil an lebenden und toten Zellen erfolgte im Countess Cell Counter (Life Technologies GmbH). Anschließend wurden drei mit Poly-L-Lysin beschichtete 2-Kammer OT (Langenbrinck) mit je 1 Millionen in PBS gelösten Zellen (0,5 Mio/ Kammer sofern genug Material vorhanden) benetzt, über Nacht getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °Celsius eingefroren. Wurden von einem Patienten mehrere WLKs entnommen, so wurde mit jedem wie bereits beschrieben verfahren. War ein LK zu klein, um halbiert zu werden, so wurde dieser vollständig zur histologischen Untersuchung in die Pathologie gegeben und in die vorliegende Studie nicht eingeschlossen.

2.2.3 Immunzytologische Färbung

Anschließend erfolgte die immunhistochemische Färbung der Präparate, wofür zwei unterschiedliche Färbegeräte und leicht abweichende Protokolle verwendet wurden: Von Januar 2013 bis Juni 2016 wurde der Autostainer von Dako eingesetzt, ab Juli der Bond Färbeautomat von Leica. Es wurden pro LK zwei OTs mit dem monoklonalen AK HMB45 (Dako), sowie ein dritter OT mit MOPC21 (Sigma) als Negativkontrolle gefärbt. Während am Automaten von Bond eine 10-minütige Vorbehandlung bei 80 °Celsius mit ER1 (Citratpuffer) und Blockingsolution (10 % Humanserum) stattfand, erfolgte diese im Autostainer von Dako mit AB-Serum 10 %, bevor die beiden AK titriert und für 15 Minuten (Bond) bzw. 30 Minuten (Dako) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Reagenzien des Bond Polymer-Refine-Red-Kit (Leica) aufgetragen und 65 Minuten inkubiert. Entsprechend betrug die Inkubationszeit des Polymer Systems und Permanent AP Red Kits (Zytomed) für die Färbung mit den Dako-Autostainer 60 Minuten. Die Gegenfärbung des Kerns erfolgte abschließend mit Hämatoxylin (Dako) und die OTs

wurden unter Leitungswasser gebläut. Zwischen den einzelnen Färbeschritten fanden mehrere Waschschriffe statt, für welche Waschpuffer (Leica) und Ampuwa aqua dest. (Bond-Automat) bzw. Tris-Puffer (Sigma Aldrich) und Aqua dest. (Dako-Färbegerät) verwendet wurden. Zum Eindecken wurde Kaiser's Glyceringelatine (Carl Roth GmbH) eingesetzt.

2.2.4 Beurteilung der Präparate

Die angefertigten Schnitte wurden zunächst von geschultem Personal auf maligne Zellen vormikroskopiert und die erhobenen Messungen anschließend ärztlich kontrolliert. Zur Beurteilung als Tumorzelle wurden die derzeit gültigen morphologischen und immunhistochemischen Kriterien des AJCC zugrunde gelegt. Entsprechend wurden "sichere Tumorzellen" (TCs=tumor cell) definiert als Zellen, mit mindestens 75 % intakter Zelloberfläche und einer intrazellulären Expression von HMB45, bei gleichzeitig typischen Zeichen der Tumorzellmorphologie. Dies beinhaltet einen deutlich vergrößerten, hypochromen Zellkern, mehrere Kerne unterschiedlicher Größe oder Cluster von mindestens zwei Tumorzellen. Waren diese Kriterien nicht vollständig erfüllt, so handelte es sich um sogenannte "potentielle oder wahrscheinliche Tumorzellen" (PTCs=potential tumor cell). Bei Detektion bereits einer einzigen sicheren Tumorzelle wurde der WLK als positiv befundet und der DCC, die Summe der sicheren und wahrscheinlichen Tumorzellen, ausgezählt. Zur noch einheitlicheren Quantifizierung der Tumorlast wurde dieser DCC durch die Zahl aller gezählten Zellen in Millionen

geteilt und so der DCCD als die Tumorzellzahl in einer Millionen Zellen erhalten.

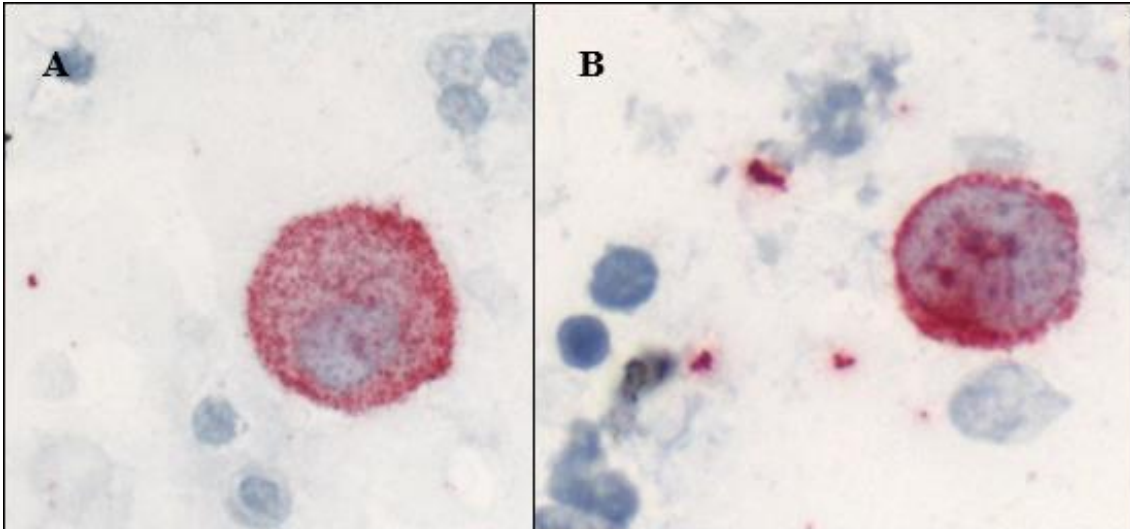


Abbildung 2: HMB45-positive Zellen mit typischer Tumorzellmorphologie. Die Zellen sind deutlich größer als die umliegenden Lymphozyten und besitzen einen vergrößerten, hypochromatischen Zellkern. 40-fache Vergrößerung. A: LK-Nr.26235/17, DCCD=1823. B: LK-Nr. 4552/17, DCCD=143.

2.3 Histopathologie

Die Untersuchung der anderen Hälfte des entnommenen WLK erfolgte im Institut für Pathologie und Neuropathologie Tübingen. Dazu wurde zunächst ein zentraler histopathologischer Schnitt mit HE von der Schnittfläche des erhaltenen Lymphknotenmaterials gefärbt und beurteilt. War in diesem keine eindeutige Metastasierung erkennbar, so wurden direkt anschließende immunhistochemische Färbungen mit den AKs HMB45, MelanA und S100 angefertigt und ebenfalls auf Tumorzellen hin untersucht. Bei positivem Befund erfolgte nur teilweise die Ausmessung und Dokumentation der Metastasengröße. Das nach der Anfertigung der Schnitte übrig gebliebene Probenmaterial wurde in Paraffin eingebettet im Archiv des Institutes verwahrt. An diesem archivierten Gewebe erfolgten die in dieser Studie vorgenommenen Arbeiten und Untersuchungen.

2.4 Untersuchungen der vorliegenden Studie

In der vorliegenden Studie sollten alle WLKs mit immunzytologisch und histopathologisch bestätigtem Tumorbefall auf eine potentielle Assoziation zwischen dem ausgezählten DCCD der QIZ und der histopathologisch erhobenen Tumorlast geprüft werden. Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, ob in initial histopathologisch negativen WLKs, welche immunzytologisch jedoch eine

Metastasierung aufwiesen, durch eine genauere Aufarbeitung des LK diese nachträglich detektiert werden kann. Eine weitere Intention der Arbeit war es Informationen über einen möglichen Zusammenhang zwischen dem DCCD bzw. der histopathologischen Metastasengröße im WLK und der Dicke des Primärtumors zu erheben. Aus den gewonnenen Daten sollte eine Aussage darüber getroffen werden, wie geeignet die QIZ zur Untersuchung von WLKs des Melanoms ist und ob oder durch welche Veränderungen die aktuelle Art der Aufarbeitung in Tübingen verbessert werden könnte.

2.4.1 Materialien, Geräte und Hersteller der histopathologischen (Nach-) Untersuchungen

Tabelle 4: In der histopathologischen Untersuchung verwendete Geräte, Materialien, Reagenzien und Antikörper. Herstellerverzeichnis siehe Anhang.

Geräte	Hersteller
Microtom Microm HM 355S, cool cut	Thermo Fisher Scientific
Tissue-Tek Prisma Färbestraße	Sakura
Färbegerät BenchMark, Seriennummer 713556	Ventana
Eindeckautomat Microm CTM6	Thermo Fisher Scientific
Mikroskop AxioStar Imager.A1	Zeiss
Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Objektträger: Microscope KP Frost Slide, REF KP-3042	Klinipath
Objektträger: TOMO IHC Adhesive Glass Slide, REF TOM-11	Matsunami
Menzel-Gläser	Thermo Fisher Scientific
Verstellbare Pipetten (10,20,200,1000µl)	Gilson
Pipettenspitzen	Eppendorf
SafeSeal Reagiergefäße	Sarstedt
Tubes	Sarstedt
Reagenzien und Medien	Hersteller
<u>HE Färbung:</u>	
Hämatoxylin, A3865	AppliChem
Natriumjodat, Nr. 1,06525	Merck
Aluminiumkaliumsulfat, Nr. 1,04936	Merck
Chloralhydrat, Nr. 1,02425	Merck
Citronensäure, Nr. 00244	Merck
Eosin gelb, Nr. 7089.2	Carl Roth GmbH
Essigsäure 100%, Nr. UN2789	VWR
<u>Immunhistochemische-Färbung:</u>	
OptiView, REF: 760-700	Ventana
CC1, Katalog-Nr. 950-124	Ventana
Bluing Reagent, Katalog-Nr. 760-2037	Ventana

Hematoxylin, Katalog-Nr. 760-2021	Ventana
Antibody Diluent, REF ZUC025-100	Zytomed Systems
Isopropanol	SAV LP GmbH
Xylen, Bestellnummer: 131769.1612	AppliChem
Cytoseol	Universalapotheke
Aqua dest.	Universalapotheke

Antikörper

Hersteller

Monoclonal Mouse Anti-Human Melanosome, Clone HMB45, Bestell-Nr. M0634	Dako
Monoclonal Mouse Anti-Human Melan-A, Klon A103, Bestell-Nr. M7196	Dako

Programme und Software

Hersteller

Ventana Medical Systems, BenchMark XT IHC/IFS Färbemodul, Modul: v10.22; Software: NexESv10.6	Ventana
ProgRes C10 Plus Kamera and Software	Jenoptik

2.4.2 Bestimmung der Metastasengröße

Um die vermutete Korrelation zwischen dem DCCD der QIZ und der histopathologischen Tumorlast erheben zu können, wurde der maximale Durchmesser der größten angeschnittenen Metastase als Parameter für das Ausmaß der Metastasierung verwendet. Da dieser initial nicht immer erhoben oder dokumentiert wurde, mussten daher die archivierten Schnitte aller positiven WLKs mikroskopisch reevaluiert und vermessen werden. Dabei handelte es sich sowohl um WLKs, die in beiden Methoden initial als positiv befundet wurden, als auch um LKs, in denen nur histopathologisch Tumorzellen detektiert werden konnten. Mit dem Mikroskop Axio Imager.A1(Zeiss) wurden die Metastasen zunächst aufgesucht und dann mit der ProgRes C10 Plus Kamera und Software (Jenoptik) eine Aufnahme angefertigt. Mit einem Mess-Tool konnte anschließend die Größe der Metastase bestimmt werden, wobei diese auf ein zehntel Millimeter genau erhoben wurde. Von allen Fällen wurden, sofern vorhanden, die immunhistochemisch gefärbten Schnitte präferiert. Lagen von diesen mehrere vor (S100, MelanA, HMB45) so wurde die Färbung mit dem AK HMB45 ausgemessen, um die bestmögliche Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit der QIZ zu erhalten. Gemessen wurde der maximale Durchmesser des größten detektierten Tumorzellaggregats. Bei subkapsulär bogenförmigen Metastasen erfolgte die Messung in einer geraden Linie zwischen den beiden Enden der Läsion. In einigen Fällen lagen ausschließlich vereinzelte (isolierte) Tumorzellen vor, welche einzeln ausgezählt wurden. Um auch diese ITZ in die

rechnerischen Auswertungen miteinbeziehen zu können, wurde keine Differenzierung bei unterschiedlicher Anzahl an ITZ gemacht, sondern der durchschnittliche Durchmesser einer Melanomzelle in mm als fixer Wert verwendet. Dazu wurden 50 Tumorzellen von 15 verschiedenen Patienten ausgemessen und der Mittelwert bestimmt. Dieser betrug 16,4 µm (Min. 9µm, Max. 29µm), sodass allen Metastasen mit einzelnen verstreuten Tumorzellen eine Metastasengröße von 0,016 mm zugeschrieben wurde. Diese lag unter dem Durchmesser des kleinsten ausgemessenen Tumorzellaggregats.

2.4.3 Nachschnitte initial negativer Wächterlymphknoten

Ausgehend von der Frage, ob durch eine präzisere histopathologische Aufarbeitung im Sinne ergänzender Gewebeschnitte immunzytologisch ermittelte Tumorzellen nachträglich auch histopathologisch bestätigt werden können, sollte untersucht werden, wie viel Lymphknotengewebe dazu aufgearbeitet werden muss, in welchem Stufenabstand und welche Färbung (HE, HMB45 oder MelanA) für den Metastasierungsnachweis am besten geeignet ist. Dafür wurde ein erstes Nacharbeitungsprotokoll mit drei Stufen im Abstand von je 300 µm entworfen, wobei auf jeder Stufe eine Färbung mit HE angefertigt wurde. Ein zusätzlicher Schnitt in Stufe 2 wurde mit dem AK HMB45 gefärbt. Das Gewebe zwischen den Stufen wurde verworfen. 67 WLKs von 54 Patienten wurden nach diesem Protokoll 1 aufgearbeitet.

Tabelle 5: Protokoll 1. Darstellung der Abstände der drei Schnittebenen/-Stufen und der jeweils verwendeten Färbungen.

Protokoll 1:

Stufe 1:	HE 300 µm
Stufe 2:	HE + HMB 45 300 µm
Stufe 3:	HE

Da sich bei der ersten Evaluation dieser neuen Schnitte bereits abzeichnete, dass die Färbung mit HE keinen klaren Nutzen in der Detektion von Tumorzellen erbrachte, wurde ein zweites Protokoll entworfen, welches 34 WLKs von 30 Patienten unterliefen. Dieses Protokoll 2 umfasste ebenfalls drei Stufen, jedoch mit einer Distanz von nur 50 µm und je einer immunhistochemischen Färbung mit HMB45 und MelanA auf jeder Stufe.

Tabelle 6: Protokoll 2. Darstellung der Abstände der drei Schnittebenen/-Stufen und der jeweils verwendeten Färbungen.

<u>Protokoll 2:</u>	Stufe 1:	HMB 45 + MelanA 50 μ m
	Stufe 2:	HMB 45 + MelanA 50 μ m
	Stufe 3:	HMB 45 + MelanA

Insbesondere aus Gründen des Zeit- und Kostenaufwandes entschieden wir uns ein drittes Protokoll auszutesten, welches eine Vereinfachung von Protokoll 2 darstellte. Dies bedeutet, dass statt drei nur zwei Stufen jedoch mit gleichem Abstand und denselben immunhistochemischen Färbungen angefertigt wurden. Nach diesem Protokoll 3 wurden ebenfalls 30 Patienten mit 32 WLKs reevaluiert.

Tabelle 7: Protokoll 3. Darstellung der Abstände der zwei Schnittebenen/-Stufen und der jeweils verwendeten Färbungen.

<u>Protokoll 3:</u>	Stufe 1:	HMB 45 + MelanA 50 μ m
	Stufe 2:	HMB 45 + MelanA

Abbildung 3 zeigt, wie sich die drei Protokolle auf eine LK-Hälfte angewandt darstellen. Mit Protokoll 1 wurde insgesamt ca. 610 μ m zusätzliches Gewebe aufgearbeitet, im Vergleich zu 115 μ m in Protokoll 2 und 55 μ m in Protokoll 3 (inklusive der Schnittdicke von ca. 2,5 μ m). Zur Umsetzung der Protokolle mussten zunächst aus dem in Paraffin eingebetteten archivierten Lymphknotengewebe neue Schnitte hergestellt und gefärbt werden, bevor diese reevaluiert werden konnten.

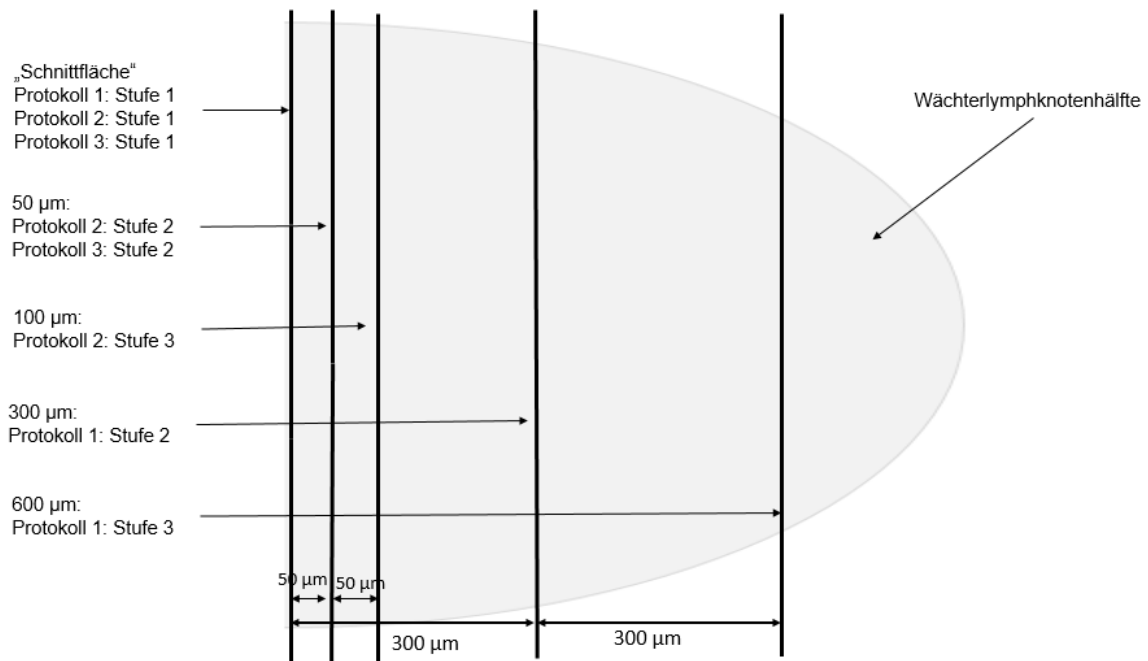


Abbildung 3: Schematische Darstellung der drei Protokolle an einer WLK-Hälfte. Zu sehen ist die Verteilung der verschiedenen Stufen von der zentralen Schnittfläche aus.

2.4.3.1 Anfertigung der Stufenschnitte

Für die immunhistochemische Färbung wurden speziell beschichtete OTs von Matsunami verwendet, für die HE-Färbung Slides von Klinipath. Lagen in der Pathologie mehrere archivierte Blöcke mit WLK-Gewebe einer Biopsie vor, so wurden diese alle vollständig neu aufgearbeitet, auch wenn laut Dermatologie nur ein WLK eingesandt wurde, da dieser äußerlich nicht immer klar identifiziert werden konnte. Die Paraffinblöcke wurden zunächst auf Eis gekühlt und anschließend mit dem Mikrotom Microm HM 355S (Thermo Scientific) 2,5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden im Wasserbad den OTs aufgezogen und bis zur Weiterverarbeitung bei 37 °Celsius im Brutschrank aufbewahrt. Das Material zwischen den einzelnen Stufen wurde verworfen.

2.4.3.2 Färbung der Schnitte

Die neu angefertigten Stufenschnitte für die standardmäßige Färbung mit Hämatoxylin (AppliChem) und Eosin (Fa. Roth) wurden hierfür ins Hauptlabor des pathologischen Instituts gegeben und unterliefen das dortige Routineprotokoll. Für die immunhistochemische Färbung wurde zum einen der monoklonale Maus AK Melanosome (Klon HMB45, Bestell-Nr. M0634) von Dako verwendet, welcher das

melanosomale Glykoprotein gp100 nachweist. Da dieser bereits in der QIZ verwendet wurde, ermöglichte er eine gute Vergleichbarkeit der beiden Methoden. Beim zweiten AK handelte es sich um den zur Melanomdiagnostik ebenfalls häufig verwendeten AK MelanA von Dako (Klon A103, Bestell-Nr. M7196). Da die Färbung neben manuell durchgeführten Arbeitsschritten auch automatisiert im Färbegerät BenchMark XT (Ventana) von statten ging, musste für dieses zunächst ein Protokoll erstellt werden. Dazu wurde für beide Färbungen das im Routinelabor zur Melanomdiagnostik genutzte Protokoll für HMB45 verwandt, jedoch erfolgte eine geringe Veränderung im Sinne einer 20- anstatt 8-minütige Gegenfärbung mit HE. Jeder der Färbeläufe umfasste mindestens zwei OTs mit einer Positivkontrolle des MM zur Kontrolle der AK-Bindung. Zunächst wurden die Proben auf 60 °Celsius erwärmt, woraufhin die Entparaffinierung mit EZPrep, dem ersten der sechs Reagenzien des verwendeten Detektionskit OptiView DAB (Ventana) folgte. Um das Epitop des Antigens (in diesem Fall beispielsweise gp100) für die Antikörperbindung freizulegen, fand anschließend durch das Reagenz CCI und Erhitzen auf 99 °Celsius für 64 Minuten die sogenannte Demaskierung statt. Nach Inhibition der endogenen Peroxidase durch H₂O₂ und somit einer unspezifischen Färbung, fand die manuelle Titration von jeweils 100 µl des Primärantikörpers statt. Der verwendete monoklonale Maus-AK, Klon HMB45, wurde dafür zuvor auf 1:400 in Antibody Diluent (Zytomed) verdünnt, die Verdünnung des AK MelanA betrug 1:600. Nach 32 Minuten Inkubationszeit wurde vollautomatisch ein an ein Hapten gekoppelter Sekundärantikörper (HQ-Linker) aufgetragen und erneut inkubiert, bevor es zur Titration des sogenannten HRP Multimers kam. Dabei handelt es sich um einen an den zweiten AK bindenden Tertiärantikörper, an welchen wiederum sieben HRP Enzyme gekoppelt sind. Diese katalysierten die Reaktion von H₂O₂, DAB und Kupfer, aus welcher der gewünschte braune Farbniederschlag hervorgeht. Um das Gewebe später optimal histologisch beurteilen zu können, fand abschließend die Gegenfärbung mit Hematoxylin und Bluing Reagent (beides Ventana) statt. Es folgte eine je 5-minütigen Spülung mit Seifenlösung, doppelt destilliertem Wasser und Rehydration in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 96 %, 100 %, 100 %, 100 %, 100 % Ethanol). Diese schloss mit weiteren viermal 5 Minuten in Xylol. Die Deckgläser wurden vom Eindeckautomat Mikrom CTM6 (Thermo) auf Cytoseol aufgelegt und die Proben mindestens eine Nacht unter dem Abzug verwahrt.

2.4.3.3 *Evaluation der Nachschnitte und Auswertung*

Alle neu hergestellten Schnitte wurden mit dem Mikroskop Axiostar (Zeiss) mikroskopiert und auf die Kriterien einer Tumorzelle hin untersucht. Wurden in einem HE oder immunhistochemischen Schnitt Melanomzellen detektiert, so wurden die übrigen Schnitte nochmals untersucht, um eine Aussage darüber treffen zu können, in welchen weiteren Stufen und Färbungen die Metastase zu finden ist. Das größte gefundene Tumorzellaggregat wurde wie unter 2.4.2 bereits beschrieben ausgemessen bzw. die ITZ gezählt. Die drei verschiedenen Protokolle wurden unter verschiedenen Gesichtspunkten, wie den Positivitätsraten, Metastasengrößen und dem Zeit- und Kostenaufwand miteinander verglichen und deskriptiv ausgewertet. Es wurde zudem geprüft, ob es durch diese neuen Ergebnisse zu einer Änderung der histopathologischen N-Klassifikation oder gar des Tumorstadiums der nachgeschnittenen Fälle kam. Außerdem folgte, wie unter 2.5.2. genauer beschrieben, eine Korrelationsanalyse nach Spearman aller finalen Messungen auf einen möglichen Zusammenhang zu den DCCDs. Korrelationsanalysen zu einem Zusammenhang zur Primärtumordicke nach Breslow wurden ebenfalls durchgeführt (siehe 2.5.3).

2.5 Statistische Auswertungen und Analysen

2.5.1 Verwendete statistische Begriffe, Größen und Tests

In der deskriptiven Datenauswertung wurde zur Beschreibung der Häufigkeitsverteilung zumeist der Median verwendet, der mittlere Wert der nach Größe sortierten Daten, da er deutlich robuster gegenüber Ausreißern ist, als das arithmetische Mittel (Mittelwert). Er wird auch 50%-Quartil genannt. Ebenfalls zur Beschreibung der Daten verwendet wurden Minimum (Min.) und Maximum (Max.), deren Differenz der sogenannte Range bzw. die Spannbreite darstellt¹¹². Vierfeldertafeln dienen unter anderem dazu, die Sensitivität und Spezifität verschiedener Methoden darzustellen. Dabei entspricht die Sensitivität der Richtig-Positiv-Rate, also die Fähigkeit eines Tests ein positives Ereignis als solches zu identifizieren, in dieser Studie dem Anteil der Metastasen, die durch die QIZ bzw. die HP korrekt als solche identifiziert wurden. Die Spezifität, auch Richtig-Negativ-Rate genannt, hingegen beschreibt die Fähigkeit einer Methode negative Ereignisse, also beispielsweise einen tumorfreien WLK, auch tatsächlich als negativ zu erkennen (Tabelle 8). Beide sind wichtige Gütekriterien für die Qualität eines Test- oder Messverfahrens.

Tabelle 8: Vierfeldertafel zur Verdeutlichung der Sensitivität und Spezifität diagnostischer Tests, sowie richtig- und falsch-Positivität bzw. -Negativität.

	<u>Wahrer Status (Goldstandard)</u>		
	positiv	negativ	
<u>Testergebnis</u>	positiv	Richtig positiv (a)	Falsch positiv (b)
	negativ	Falsch negativ (c)	Richtig negativ (d)
		↓	↓
		Sensitivität = $a/(a+c)$	Spezifität = $d/(b+d)$

Eine Korrelation beschreibt sich zwei (oder mehr) gleichmäßig zueinander verhaltende Variablen, wie beispielsweise vermutet der DCCD und die Metastasengröße. Dabei unterscheidet man die sogenannte positive/gleichsinnige Korrelation, bei welcher bei steigendem x-Wert auch der y-Wert zunimmt und umgekehrt, von der negativen/gegensinnigen Korrelation. Diese beschreibt eine Abnahme des y-Wertes bei Zunahme des x-Wertes und invers. Um die Stärke eines solchen Zusammenhangs zu beschreiben, werden sogenannte Korrelationskoeffizienten verwendet.

2.5.2 Zusammenhang des DCCD mit der histopathologisch vermessenen Metastasengröße

Zur Untersuchung einer Korrelation zwischen dem DCCD und der Metastasengröße wurde in der vorliegenden Arbeit eine Korrelationsanalyse nach Spearman (Korrelationskoeffizient r_s [$-1 \leq r_s \leq +1$]) angewandt, welche für mindestens ordinalskalierte, metrische und nicht normalverteilte Merkmale geeignet ist. Ist der Korrelationskoeffizient $r_s > 0$, so weist dies auf einen positiven Zusammenhang hin, bei $r_s < 0$ kann ein negativer und bei $r_s = 0$ kein Zusammenhang angenommen werden. Je näher r_s bei -1 oder +1 liegt, desto stärker ist der Zusammenhang der Variablen. Zunächst wurde die Analyse auf alle histopathologisch ausgemessenen Metastasen und DCCDs der 1205 WLKs (lymphknotenbezogene Auswertung) zu Beginn der Studie angewandt. Eine zweite Analyse umfasste nur die 100 WLKs, welche mit beiden Methoden bereits initial positiv befundet wurden. Weitere Korrelationsanalysen nach Spearman wurden durchgeführt unter Einschluss der neu detektierten Metastasen durch die Nachschnitte initial histopathologisch negativer WLKs. Auch diese Analyse umfasste sowohl das gesamte Kollektiv aus 1205 WLKs als auch eine Auswertung der nun final

übereinstimmenden 127 positiven LKs. Bei allen Analysen wurde ein p-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant definiert. In der graphischen Auftragung der Messungen wurde aufgrund der großen Spannweite der Messwerte eine logarithmische Achsenskalierung (\log_{10}) gewählt, zudem wurde die best-fitting-line generiert, um die Darstellung weiter zu veranschaulichen.

2.5.3 Zusammenhang des DCCD bzw. der histopathologischen Metastasengröße mit der Tumordicke

Um den DCCD auch auf seinen prognostischen Wert hin zu prüfen, wurde ebenfalls eine Korrelationsanalyse nach Spearman für die Variablen DCCD und die Primärtumordicke durchgeführt. Den von der Literatur bereits beschriebenen Zusammenhang des Metastasendurchmessers im WLK zur Tumordicke wollten wir für unser Kollektiv durch entsprechende Korrelationsanalysen ebenfalls prüfen. Die Analysen wurden patientenbezogen durchgeführt, das bedeutet, dass bei Entnahme mehrerer LKs eines Patienten der mit der größten Tumorlast – also dem höchsten DCCD bzw. dem größten Metastasendurchmesser - als tatsächlicher WLK definiert und verwendet wurde. Es wurden zunächst Korrelationsanalysen zwischen DCCD bzw. maximalem Durchmesser und der Primärtumordicke nach Breslow für alle 907 Patienten durchgeführt, folgende Untersuchungen schlossen nur die 134 Patienten mit positiver histopathologischer bzw. 218 Patienten mit immunzytologisch bestätigter Metastasierung ein. Auch die 118 Patienten, welche in beiden Untersuchungen Tumorzellen zeigten, wurden nochmals gesondert ausgewertet. Für alle Analysen wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ definiert und die graphische Darstellung der Werte durch eine logarithmische Achsenskalierung (\log_{10}) und die best-fitting-line veranschaulicht.

2.5.4 Verwendete EDV-Programme

Tabelle 9: Verwendete Programme der deskriptiven Statistik, Korrelationsanalysen und der schriftlichen Dokumentation.

Programme:	
Microsoft Office 365 ProPlus	Microsoft Corporation
R version 3.6.1 (7)	R Core Team
SPSS Statistics 25	IBM

3 Ergebnisse

3.1 Studienkollektiv

Die Studienpopulation der vorliegenden Arbeit umfasste insgesamt 910 Patienten, welchen zwischen dem 07.01.2013 und dem 28.09.2017 in der Universitäts-Hautklinik aufgrund eines Melanoms ein oder mehrere WLKs entnommen wurden. Einschlusskriterium für die im Gesamten 1210 exzidierten WLKs war, dass diese sowohl histopathologisch als auch immunzytologisch untersucht und die Patienten mit der Registrierung ihrer Tumordaten im Melanomregisters einverstanden waren. Aus der Auswertung ausgeschlossen werden mussten drei Patienten mit insgesamt fünf LKs. Der Ausschluss erfolgte in zwei der Fälle aufgrund fehlender studienrelevanter Daten, die nachträglich nicht mehr erhoben werden konnten. Im dritten Fall stellte sich heraus, dass es sich bei der initialen Diagnose, wegen derer ursprünglich die SNB erfolgte, nicht um ein MM gehandelt hatte. Somit ergab sich final ein Kollektiv von 907 Patienten mit 1205 WLKs. Ein positives Ethikvotum liegt vor (Projekt Nummer 835/2017BO2), ebenso ein schriftliches Einverständnis für die Untersuchungen des entnommenen Gewebes zu wissenschaftlichen Zwecken.

Männlichen Geschlechts waren 54 % (488 Patienten), weiblich 46 % (419 Patienten) der Patienten, mit einem medianen Alter von 61 Jahren (17 bis 94 Jahre) bei Lymphknotenentnahme (Abbildung 4).

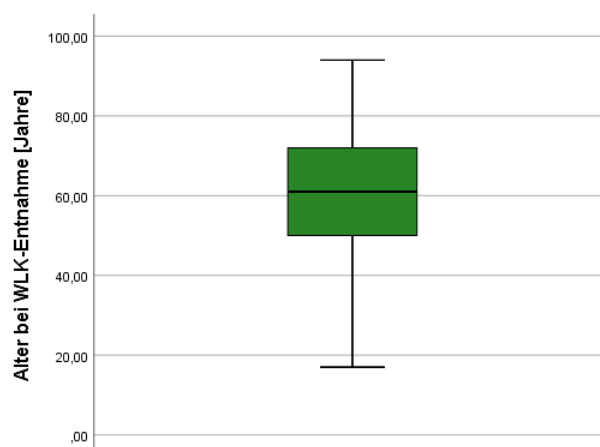


Abbildung 4: Box-Plot der Altersverteilung der 907 Patienten bei WLK-Entnahme.

Über die Hälfte der Exzisionen erfolge axillär (59 %, 535 Patienten), gefolgt von der Leiste (38 %, 348 Patienten) und sonstigen Lokalisationen (3%, 24 Patienten, Abbildung 5). 53 % der Operationen (485) wurden linksseitig durchgeführt, 47 % (422) rechtsseitig. Im Median wurde pro Patient ein WLK entnommen, mindestens jedoch ein und maximal sechs LKs (Abbildung 6). Daher unterscheiden sich in den Auswertungen die Zahlen der Patienten von denen der WLKs.

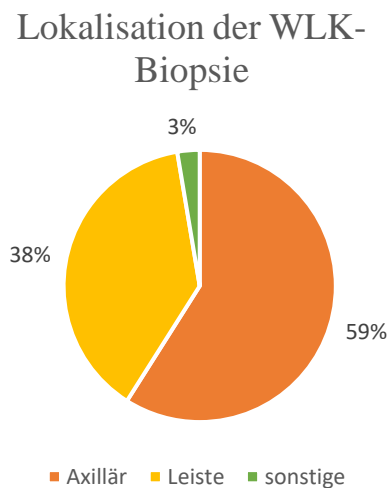


Abbildung 5: Lokalisation der WLK-Biopsie, n=907.

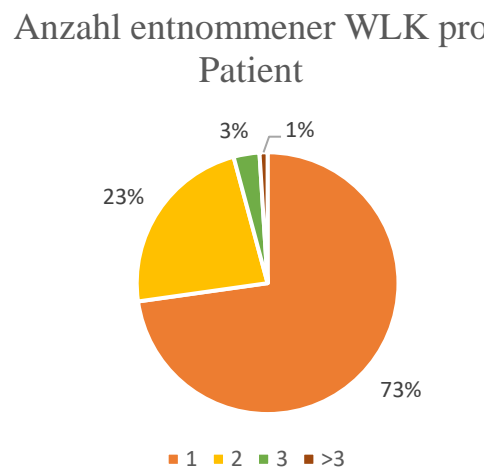


Abbildung 6: Anzahl der entnommenen WLKs pro Patient, n=907.

Die mediane Tumordicke des Primärtumors nach Breslow betrug 1,7 mm (Min. 0,35 mm, Max. 30 mm). Eine WLK-Biopsie bei sehr dünnem Primärtumor ohne weitere Risikofaktoren (beispielsweise 0,35 mm) wurde durchgeführt, da zumeist externe Untersuchung eine größere Tumordicke (im Beispielfall 1,1 mm) und somit eine Indikation zur WLK-Entnahme ergab. Erst die Nachbeurteilung in der Dermatologie Tübingen, bei schon vorbereiteter oder erfolgter Lymphknotenbiopsie, erbrachte die korrekte Tumordicke. Bei vier Patienten lag keine Information über die Tumordicke vor. Eine Ulzeration des Primärtumors konnte bei 298 Patienten (33 %) nachgewiesen werden. Tabelle 10 gibt die Baseline-Charakteristika des Studienkollektivs wieder.

Ergebnisse

Tabelle 10: Baseline-Charakteristika des Studienkollektivs, n=907 Patienten.

Merkmal		Anzahl Patienten (n=907)	Prozent	
Geschlecht	männlich	488	54	
	weiblich	419	46	
Alter bei WLK-Entnahme (Jahre)	Median	61		
	Min.-Max.	17 - 94		
Lokalisation	Axilla	535	59	
	Leiste	348	38	
	sonstige	24	3	
Seite	links	485	53	
	rechts	422	47	
Anzahl entnommene LKs/ Patient	Median	1		
	Min.-Max.	1 - 6		
	1	660	73	
	2	209	23	
	3	29	3	
Tumordicke nach Breslow (im mm)	>3	9	1	
	Median	1,7		
	Min.-Max.	0,35 - 30		
	Ulzeration des Primärtumors	ja	298	33
		nein	609	67
Immunzytologie	positiv	218 ¹ , 218 ²	24	
	negativ	689 ¹ , 689 ²	76	
Histopathologie	positiv	111 ¹ , 134 ²	12, 15	
	negativ	796 ¹ , 773 ²	88, 85	

¹zu Beginn der Studie; ²zum Abschluss der Studie (d.h. inkl. Nachschnitte)

3.2 TNM-Klassifikation und Staging des Studienkollektivs

Bei keinem der Patienten des Studienkollektivs lagen zum Zeitpunkt der WLK-Entnahme Fernmetastasen vor (folglich M0), ebenso keine klinisch detektierbaren Lymphknotenmetastasen.

Die Verteilung der Primärtumore in der T-Klassifikation nach aktueller AJCC Klassifikation ergaben sich für das Studienkollektiv wie folgt: 166 Tumoren (18 %) waren T1, 381 (42 %) T2, 225 Tumoren (25 %) T3 und 131 (14 %) T4. Drei der vier Patienten ohne bekannte Tumordicke lassen sich Tx zuordnen (kein Anhalt für einen Primärtumor), ein Patient der Kategorie T0 (Tumordicke nicht bestimmt), siehe Abbildung 7³⁰.

Ergebnisse

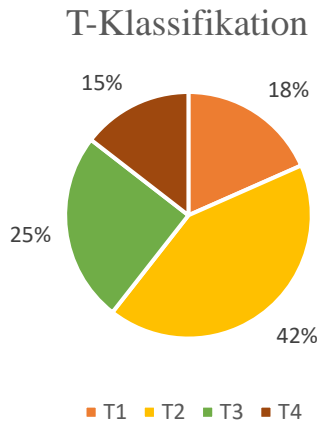


Abbildung 7: T-Klassifikation der 903 Primärtumoren nach AJCC 2017.

Bei der initialen histopathologischen Untersuchung der WLKs wurde bei 12 % (111) der Patienten eine Metastase des MM diagnostiziert, was der Detektion von Tumorzellen in 117 der 1205 WLKs (10 %) entspricht. Die immunzytologische Untersuchung der Dermatologie wies in 264 (22 %) der WLKs Zellen des malignen Hauttumors nach und befundete somit 24 % (218) der Patienten als positiv. Die daraus erfolgte Zuordnung der Patienten zu einem N-Stadium entspricht den Informationen zum Zeitpunkt der Untersuchung der WLKs. Der Status weiterer LKs, die im Rahmen einer möglicherweise anschließend vorgenommenen CLND entnommen wurden, wurde in dieser nicht berücksichtigt. Allein nach der histopathologischen Beurteilung befanden sich 796 Patienten (88 %) im Stadium N0, 105 Patienten (12 %) im Stadium N1a und 6 Patienten im Stadium N2a. Unter alleiniger Berücksichtigung der immunzytologischen Befundung

Histopathologische N-Klassifikation

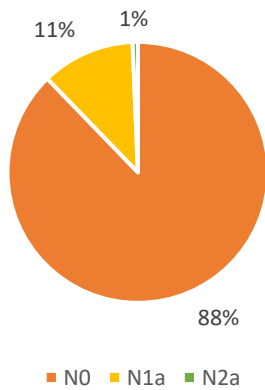


Abbildung 9: N-Klassifikation nach histopathologischer Befundung nach AJCC 2017, n=907.

Immunzytologische N-Klassifikation

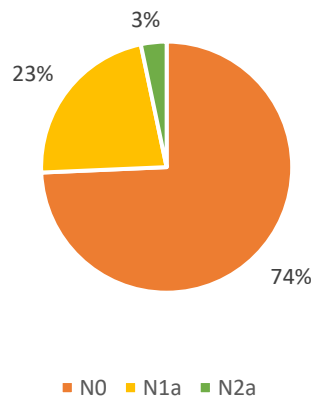


Abbildung 8: N-Klassifikation nach immunzytologischer Befundung nach AJCC 2017, n=907.

Ergebnisse

ergab sich ein N0 Stadium für 674 Patienten (74 %), 203 Patienten (22 %) waren Stadium N1a und 30 Patienten (3 %) Stadium N2a zuzuordnen (Abbildung 8, 9).

Das Staging unterscheidet sich folglich ebenfalls für die HP und QIZ: Gemäß der histopathologischen Befundung befanden sich 49 % der Patienten (448 Patienten) in Stadium I, 38 % (344) in Stadium II und 12 % (111) im Stadium III. Dahingegen betrug nach der immunzytologischen Beurteilung der Anteil der Patienten in Stadium I 44 % (397), 30 % im Stadium II (274) und 26 % im Stadium III (232). In beiden Untersuchungsmethoden war für die vier Patienten mit fehlender Angaben zur Tumordicke keine Stadiumzuordnung möglich (Abbildung 10 und 11). Tabelle 11 gibt eine Übersicht über die TNM-Klassifikation und das Staging aller 907 Patienten.

Histopathologisches Stadium

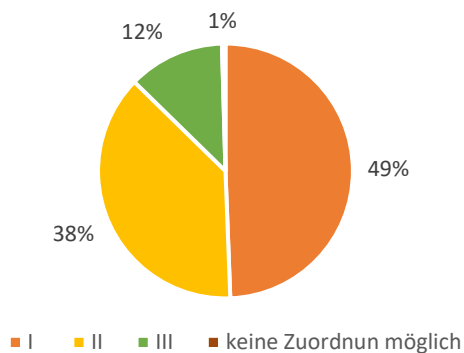


Abbildung 10: Stadium nach histopathologischem Befund nach AJCC 2017, n=907.

Immunzytologisches Stadium

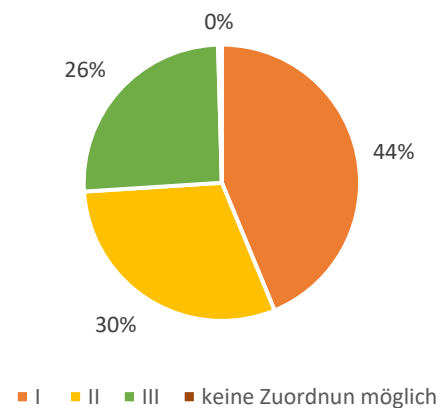


Abbildung 11: Stadium nach immunzytologischem Befund nach AJCC 2017, n=907.

Änderungen der N-Kategorie und dadurch auch des Tumorstadiums durch die in der Studie durchgeführten Gewebenachschnitte werden unter dem Punkt 3.7 bei den einzelnen Protokollen beschrieben.

Ergebnisse

Tabelle 11: Übersicht TNM-Klassifikation und Staging des Studienkollektivs (n=907 Patienten), gemäß AJCC 2017, alle Patienten M0.

T Kategorie:	Anzahl Patienten	Prozent (n=907)	
Tx/0	3/1	<1 %	
T1	166	18%	
T1a	37	4%	
T1b	129	14%	
T2	381	42%	
T2a	305	34%	
T2b	76	8%	
T3	225	25%	
T3a	107	12%	
T3b	118	13%	
T4	131	14%	
T4a	39	4%	
T4b	92	10%	

N Kategorie:	Histopathologie		Quantitative Immunzytologie	
N0	796	88%	674	74%
N1a	105	12%	203	23%
N2a	6	<1%	30	3%

Stadium:	Histopathologie		Quantitative Immunzytologie	
nicht bekannt	4	<1%	4	<1%
I	448	49%	397	44%
IA	161	18%	144	16%
IB	287	32%	253	28%
II	344	38%	274	30%
IIA	159	18%	135	15%
IIB	120	13%	93	10%
IIC	65	7%	46	5%
III	111	12%	232	26%
IIIA	23	2%	74	8%
IIIB	24	3%	48	5%
IIIC	64	7%	110	12%

3.3 Vierfeldertafeln

Eine Auftrennung der Patienten und WLKs nach ihrem histopathologischen und immunzytologischen Befund im Rahmen einer Vier-Felder-Tafel ergab die in Tabelle 12 und 13 dargestellte Verteilung.

Tabelle 12: 4-Feldertafel der 907 Patienten zu Studienbeginn, anhand histopathologischem und immunzytologischem WLK-Status.

Patienten (n=907):		<u>Histopathologie</u>		
		positiv	negativ	
<u>Quantitative Immunzytologie</u>	positiv	95 (10%)	123 (14%)	218 (24%)
	negativ	16 (2%)	673 (74%)	689 (76%)
		111 (12%)	796 (88%)	907

Tabelle 13: 4-Feldertafel der 1205 WLKs zu Studienbeginn, anhand histopathologischem und immunzytologischem WLK-Status.

Wächterlymphknoten (n = 1205):		<u>Histopathologie</u>		
		positiv	negativ	
<u>Quantitative Immunzytologie</u>	positiv	100 (8%)	164 (14%)	264 (22%)
	negativ	17 (1%)	924 (77%)	941 (78%)
		117 (10%)	1088 (90%)	1205

Wie daraus ersichtlich ist, wiesen zu Beginn der Studie 10 % der Patienten sowohl histopathologisch als auch immunzytologisch Metastasen auf. Negativ übereinstimmend waren hingegen die Beurteilungen bei 74 % der Patienten. Bei 16 % der Patienten zeigten sich Diskrepanzen zwischen den Methoden. Während 2 % der Patienten ausschließlich in der HP als positiv befundet wurden, wiesen 14 % nur in der immunzytologischen Untersuchung Tumorzellen auf. Da pro Patient teilweise mehr als ein WLK entnommen wurde, differierten die Zahlenwerte dieser 4-Felder-Tafeln auf Lymphknotenebene leicht von denen auf Patientenebene (siehe Tabelle 13).

Vorausgreifend werden folgend diese 4-Felder-Tafeln zum Ende der Studie abgebildet: Durch die Nachschnitte initial histopathologisch negativer WLKs kam es nachträglich zu einer Detektion weiterer Melanometastasen und dadurch zu einem Anstieg der doppelt positiv befundenen Patienten auf 13 % (bzw. 11% der WLKs) auf Kosten der Subgruppe, die initial ausschließlich immunzytologisch Tumorzellen aufwies.

Ergebnisse

Tabelle 14: 4-Feldertafel der 907 Patienten zum Studienende (d.h. inkl. Nachschnitte), anhand histopathologischem und immunzytologischem WLK-Status.

Patienten (n = 907):		<u>Histopathologie</u>		
		positiv	negativ	
<u>Quantitative Immunzytologie</u>	positiv	118 (13%)	100 (11%)	218 (24%)
	negativ	16 (2%)	673 (74%)	689 (76%)
		134 (15%)	773 (85%)	907

Tabelle 15: 4-Feldertafel der 1205 WLK zu Studienende (d.h. inkl. Nachschnitte), anhand histopathologischem und immunzytologischem WLK-Status.

Wächterlymphknoten (n = 1205):		<u>Histopathologie</u>		
		positiv	negativ	
<u>Quantitative Immunzytologie</u>	positiv	127 (11%)	137 (11%)	264 (22%)
	negativ	17 (1%)	924 (77%)	941 (78%)
		144 (12%)	1061 (88%)	1205

3.4 Quantitative Immunzytologie – deskriptive Statistik

Durch die QIZ wurden 1205 WLKs von 907 Melanompatienten aufgearbeitet und die ausführlichen Ergebnisse in Tab. 16 dargestellt.

Die mediane Zellzahl pro WLK betrug 19,4 Millionen Zellen (0,16 Millionen – 1.060 Millionen) für das Gesamtkollektiv und pro LK wurden mediane 2 Millionen HMB45 gefärbte Zellen untersucht (0,16 Millionen – 2 Millionen). Der mediane DCCD des Gesamtkollektivs betrug 0 Tumorzellen in einer Million untersuchten Zellen (0 - 900.000). Insgesamt hatten 264 WLKs (22 %) einen positiven DCCD mit einem Median von 36,5 (0,5–900.000). Mindestens eine potentielle Tumorzelle, jedoch keine sicheren Tumorzellen ließen sich in 196 WLKs nachweisen (16 %). Die mediane Tumordicke aller 907 Patienten betrug 1,7 mm (0,35 mm – 30 mm) im Vergleich zu medianen 2,7 mm (0,6 mm – 30 mm) der Patienten mit positivem WLK (n=218) und 1,7 mm (0,6 mm – 14 mm) bei Patienten mit ausschließlich PTCs (n=154).

Ergebnisse

Tabelle 16: Ergebnisse der quantitativen Immunzytologie der 1205 Wächterlymphknoten, aktiv= messbare γ -Emission, blau= Blaufärbung des LK bei Entnahme.

alle Wächterlymphknoten, n = 1205		Anzahl	Prozent
DCCD	Median	0	
	Min.-Max.	0 - 900.000	
	positiv (>0)	264	22
	negativ (≤ 0)	941	78
Zellzahl in Mio.	Median	19,4	
	Min.-Max.	0,16 – 1.060,0	
Vitalität in %	Median	61	
	Min.-Max.	2 - 96	
Aktiv	ja	1170	97
	nein	35	3
Blau	ja	784	65
	nein	421	35
Untersuchte Zellen in Mio.	Median	2	
	Min.-Max.	0,16 - 2,0	
positive Wächterlymphknoten, n = 264		Anzahl	Prozent
DCCD	Median	36,5	
	Min.-Max.	0,5 – 900.000	
	DCCD ≤ 10	103	39
	DCCD $>10 \leq 100$	56	21
	DCCD $> 100 \leq 1000$	47	18
	DCCD >1000	58	22
Zellzahl in Mio.	Median	24,5	
	Min.-Max.	1,1 – 1.060,0	
Vitalität in %	Median	63,5	
	Min.-Max.	1,1 - 96	
Aktiv	ja	260	98
Blau	ja	192	72
Untersuchte Zellen in Mio.	Median	2	
	Min.-Max.	1 - 2	
mindestens 1 PTC, keine TC, n=196		Anzahl	Prozent
DCCD	positiv (>0)	0	0
	negativ (≤ 0)	196	100
Zellzahl in Mio.	Median	20	
	Min.-Max.	0,9 - 231,0	
Untersuchte Zellen in Mio.	Median	2	
	Min.-Max.	0,9 - 2	

3.5 Histopathologie – deskriptive Statistik

Histopathologisch wurden ebenfalls 1205 WLKs von 907 Patienten mit MM untersucht (Tabelle 17).

Tabelle 17: Ergebnisse der histopathologischen Untersuchungen vor Anfertigung der Nachschnitte, n=1205, HE= Hämatoxylin & Eosin, IHC= Immunhistochemie, ITZ= isolierte Tumorzellen.

Wächterlymphknoten, n=1205		Anzahl (% von 1205)	
		Negativ:	1088 (90%)
		Positiv:	117 (10%)
HE positiv	72 (62% von 117)	nur IHC positiv	45 (38% von 117)
davon Mikrometastase ¹	69	davon Mikrometastase ¹	33
davon ITZ ²	3	davon ITZ ²	12
Mikrometastase¹	102 (87% von 117)	ITZ - Metastase²	15 (13% von 117)
davon HE positiv	69	davon HE positiv	3
davon nur in IHC positiv	33	davon nur in IHC positiv	12
Mediane Größe	2 mm	Mediane Anzahl an TZ	13
Min.-Max.	0,098 mm - 21 mm	Min.-Max.	2 - 40

¹Mikrometastase aus ausmessbarem Tumorzellaggregat, ab circa 0,1 mm

²ITZ wurden zu einheitlichen 0,016 mm-Angaben transformiert, anhand des medianen Durchmessers einer einzelnen Tumorzelle.

Die Reevaluation der archivierten Schnitte und Bestimmung des maximalen Durchmessers der größten Metastase erfolgte bei allen 117 initial histopathologisch positiven WLKs (111 Patienten). Lagen mehrere Färbungen eines LK vor, so wurde die Färbung mit HMB45 bevorzugt, da diese auch in der QIZ verwendet wurde. Einzelne liegende Tumorzellen (ITZ) wurden gezählt, für weitere Analysen wurde jedoch, unabhängig von der Anzahl der ITZ, ein Wert von 0,016 mm als Größe verwendet. In 62 % der positiven LKs waren bereits in der HE Färbung Melanomzellen zu sehen, in 38 % wurden diese erst durch die Immunhistochemie sicher detektierbar. 87 % der Metastasen (102 LKs) hatten einen Durchmesser im Millimeterbereich (0,098 mm – 21 mm). Dahingegen bestanden 15 der Metastasen (13 %) ausschließlich aus ITZ, welche wiederum überwiegend (80 %, 12 LKs) nur durch die spezifische Färbung zu detektieren waren.

Ergebnisse

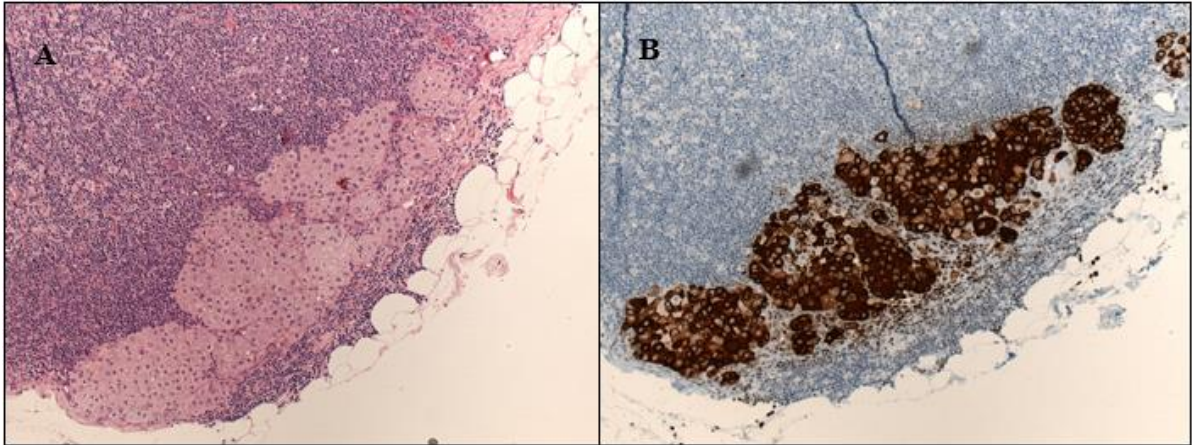


Abbildung 12: LK-Nr. 11501/14, 10-fache Vergrößerung, Metastasendurchmesser 1,2 mm, DCCD=2130. **A:** Hämatoxylin-Eosin, **B:** HMB45-Färbung.

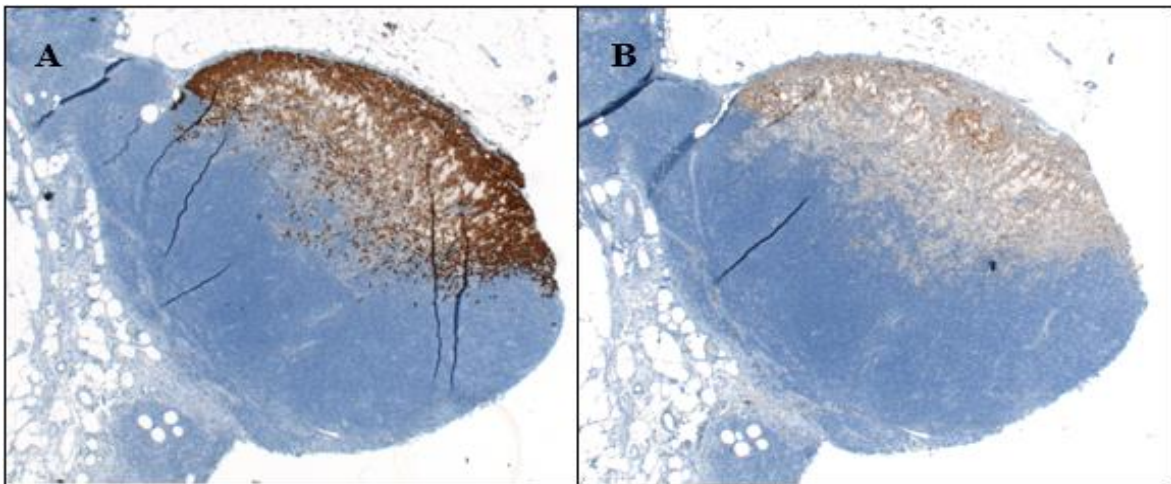


Abbildung 13: LK-Nr. 23758/15, 2,5-fache Vergrößerung, Metastasendurchmesser 4,1 mm, DCCD=10. **A:** HMB45-Färbung, **B:** MelanA-Färbung.

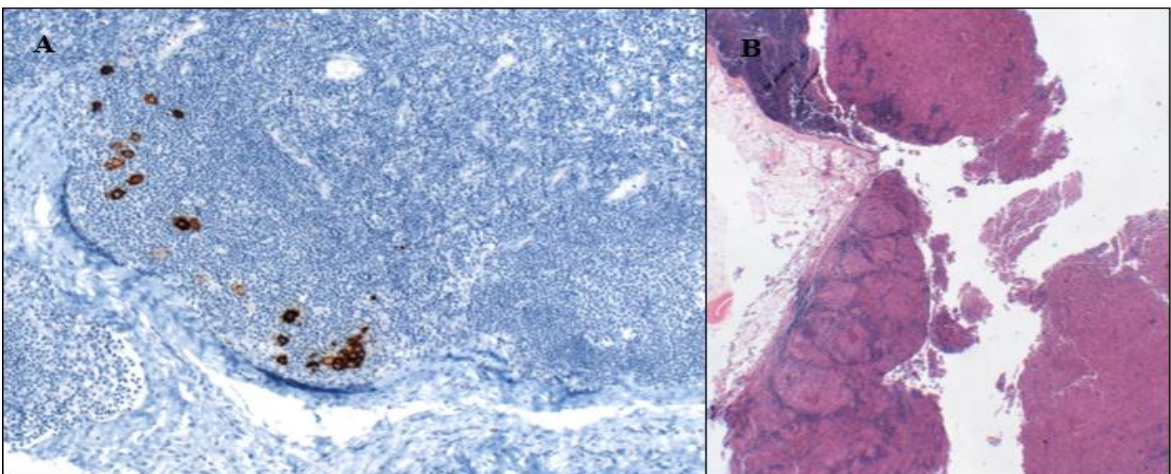


Abbildung 14: Beispiele für geringen (A) und ausgeprägten Tumorbefall des WLK (B). **A:** LK-Nr. 21483/17, HMB45-Färbung, 10-fache Vergrößerung, 28 ITZ, DCCD=8,5. **B:** LK-Nr.34307/16, HE-Färbung, 1,25-fache Vergrößerung, Metastasendurchmesser, 8 mm, DCCD=400.000.

Die mediane Metastasengröße aller 1205 Wächterlymphknoten betrug 0 mm, die der 117 positiven WLKs lag bei 1,6 mm (0,016 mm - 21 mm). Der mediane DCCD dieser positiven WLKs betrug 149 (0 – 900.000). Die Tumordicke nach Breslow aller 907 Patienten lag mit 1,7 mm unter der der Patienten mit histopathologisch gesicherter WLK-Metastasierung (n=111 zu Studienbeginn, Median 3,0 mm (0,9 mm – 30 mm)) und über der Tumordicke der 796 Patienten ohne Nachweis von Tumorzellen im WLK (Median 1,5 mm (0,4 mm –15 mm)). Die Abbildungen 12 – 14 zeigen exemplarisch verschiedene Färbungen und unterschiedlichen Tumorlasten in den WLKs.

Die 117 in der HP positiv befundenen WLKs lassen sich weiter unterteilen in QIZ negative und positive LKs. Die relevanten Parameter (DCCD, Metastasengröße, Tumordicke) dieser Untergruppen, sowie der aus ausschließlich in der QIZ positiven und doppelt negativ evaluierten WLKs sind in Tabelle 18 gegenübergestellt.

Tabelle 18: Vergleich DCCD, Metastasengröße und Tumordicke verschiedener Subgruppen: Doppelt positiv und negativ befundene LKs, sowie diskrepante Fälle. HP= Histopathologie, QIZ= quantitative Immunzytologie.

		<u>Histopathologie</u> <u>positiv</u>	QIZ + HP positiv	<u>QIZ positiv</u> HP negativ	QIZ + HP negativ
		QIZ negativ			
n (WLK)		17	100	164	924
DCCD	Median	0	243,5	9	0
	Min.-Max.	0	1 - 900.000	0,5 - 10.907	0
Metastasengröße (mm)	Median	0,8	1,7	0	0
	Min.-Max.	0,016 - 6	0,016 - 21	0	0
Breslow-Tumordicke (mm)	n (Patienten)	16	95	123	673
	Median	2,8	3,1	2,2	1,5
	Min.-Max.	1,1 - 6,0	0,9 - 30	0,6 - 10	0,5 - 15

3.6 Histopathologisch positive und immunzytologisch negative Wächterlymphknoten

Bei einem kleinen Teil des Studienkollektivs fanden sich diskrepante Befunde in der initialen Beurteilung des WLK-Status, im Sinne eines positiven histopathologischen Befundes, jedoch keiner detektablen Metastasierung durch die QIZ. Dabei handelte es sich um 17 entnommene WLKs (16 Patienten), deren mediane Metastasengröße mit 0,8 mm (0,016 mm - 6 mm) unter dem aller HP-positiven WLKs lag (Median 1,6 mm). Auch

der Anteil an durch HE allein detektierter Metastasen war in dieser Subgruppe mit 35 % geringer als der aller 117 positiven WLKs (62 %), bei einem etwas größeren Teil an ITZ (24 % vs. 13 %). Immunzytologisch waren in keinem WLK sichere Tumorzellen gefunden worden, bei 5 Patienten und WLKs konnten jedoch zwischen 1 und 17 PTCs (Median 4) bestimmt werden. Die mediane Tumordicke dieser 16 Patienten lag mit 2,8 mm (1,1 mm – 6,0 mm) über dem des Gesamtkollektivs (1,7 mm) und unter dem der in beiden Untersuchungen positiven Patienten (3,1 mm). Eine Reevaluation der Färbungen der QIZ, um die histopathologisch detektierten Tumorzellen möglicherweise doch noch in den Schnitten zu finden, war aufgrund der durch die Zeit verblassten Färbungen nicht mehr möglich.

3.7 Nachschnitte der histopathologisch negativen, immunzytologisch positiven Wächterlymphknoten

3.7.1 Gesamt

Die primäre histopathologische und quantitativ-immunzytologische Untersuchung zeigte Diskrepanzen im Sinne einer ausschließlich immunzytologisch nachweisbaren Tumoraussaat in 164 WLKs. Der mediane DCCD dieser LKs betrug 9 (0,5 – 10.907), die mediane Tumordicke der 123 Patienten betrug 2,2 mm (0,6 mm – 10 mm). Von diesen wurde das Restgewebe von 133 WLKs (101 Patienten) einem der drei Nachschnitt-Protokolle zugeteilt und nach diesem aufgearbeitet: 67 WLKs (41 %) nach Protokoll 1, 34 LKs (21 %) nach Protokoll 2 und 32 LKs (20 %) nach Protokoll 3. Die verbleibenden 31 WLKs (19 %) wurden nicht weiter untersucht.

In 27 dieser WLKs (20 %) konnte nachträglich eine Metastasierung bestätigt werden, 14 von diesen bestanden aus ITZ, 13 aus Tumorzellaggregaten über 0,1 mm. Der mediane DCCD der positiven Nachschnitte lag über dem der negativ verbliebenen (19,5 vs. 8), wohingegen die medianen Tumordicken vergleichbar waren (1,9 mm vs. 2,0 mm) (Tabelle 19). Die neu detektierten Metastasen verschoben den medianen Metastasendurchmesser aller nun positiven WLKs (n=144) von 1,6 mm bei Studienbeginn (n=117) auf 1,0 mm, der Range blieb jedoch gleich (0,016 mm – 21 mm). Insgesamt wurden 744 zusätzliche Schnitte angefertigt, von welchen in 90 (12 %) mindestens eine Tumorzelle gefunden wurde. Sie setzten sich aus 201 HE Schnitten (27

Ergebnisse

%, darunter einer positiv), 305 HMB45 Schnitten (41 %, 49 positive) und 238 MelanA Schnitten (32 %, 40 positive) zusammen.

Tabelle 19: Übersicht DCCD, Metastasengröße und Tumordicke der immunzytologisch positiven, nachgeschnittenen Fälle: 133 WLK von 101 Patienten, HP=Histopathologie, QIZ=quantitative Immunzytologie.

		QIZ positiv, HP negativ			
		alle	Nachschnitte erfolgt:	positiv	negativ
n (WLK)		164	133	27 (20 %)	106 (80 %)
DCCD	Median	9	9	19,5	8
	Min.-Max.	0,5 - 10.907	0,5 – 8.415	0,5 – 2.331	0,5 – 8.415
Metastasengröße (mm)	Median	0	0	0,016	0
	Min.-Max.	0	0 - 3,7	0,016 - 3,7	0
n (Patienten)		123	101	23 (23 %) ¹	78 (77%)
Tumordicke (mm)	Median	2,2	2,0	1,9	2,0
	Min.-Max.	0,6 - 10	0,6 – 8,6	0,7 – 6,0	0,6 – 8,6

¹drei Patienten, deren WLK im Nachschnitt positiv wurde, hatten bereits einen weiteren doppelt positiven WLK

3.7.2 Protokoll 1

Protokoll 1 unterliefen 49 Patienten mit insgesamt 67 WLKs. Die mediane Tumordicke dieser 49 Patienten betrug 2,0 mm (0,6 mm – 6,0 mm). Pro archivierter LK-Hälfte wurden 3 Stufen im Abstand von 300 µm angefertigt mit je einer HE Färbung sowie einer zusätzlichen HMB45 Färbung auf Stufe 2. Es wurde somit ca. 610 µm Gewebe aufgearbeitet. 7 HMB45-Schnitte und 1 HE-Schnitt, alle auf Stufe 2, wurden positiv evaluiert, was einem Anteil von 10% der LKs und 14 % der Patienten entspricht. In einem LK wurden auffällige einzelne, „suspekte“ Zellen gefunden, welche jedoch nicht mit Sicherheit als Tumorzellen identifiziert werden konnten und in weiteren Analysen den negativen LKs zugezählt wurden. Der mediane DCCD der negativ verbliebenen WLKs lag mit 6,5 deutlich unter dem der nachträglich positiv befundeten WLKs von 32,5. Die mediane Metastasengröße betrug 0,3 mm, wobei sich in drei der sieben positiven WLKs ausschließlich 6, 12 und 12 ITZ fanden. In Tabelle 20 sind die Schnitte grau hervorgehoben, in welchen die Tumorzellen detektiert werden konnten.

Bei fünf der sieben Patienten kam es durch diese Reevaluation zu einem histopathologischen Up-staging. In zwei Patienten (Fälle 6 und 7) wurde bereits initial in einem weiteren entnommenen WLK eine Metastase des Melanoms diagnostiziert, sodass sich bei diesen das initiale Stadium von IIIB bzw. IIIC nicht veränderte.

Ergebnisse

Tabelle 20: Protokoll 1 - Positive WLKs. Die positiven Färbungen sind in der Tabelle grau hinterlegt.

Fall-Nr.	Stufe 1		Stufe 2		Stufe 3	DCCD	Metastasengröße		Staging-Änderung	
	HE	HE	HE	HMB45	HE		ITZ	mm	von	nach
1						32,5		0,3	IIA	IIIC
2						60,5	12		IIA	IIIC
3						2130,5		1,2	IIA	IIIC
4						19,5		0,7	IIB	IIIC
5						3	6		IA	IIIA
6						4,5	12			IIIC ¹
7						165		1,6		IIIB ¹

¹ein weiterer WLK des Patienten wurde bereits initial in beiden Untersuchungen positiv befundet

3.7.3 Protokoll 2

Protokoll 2 wurde auf 34 WLKs von 26 Patienten mit einer medianen Tumordicke von 2,3 mm (0,7 mm – 7,5 mm) angewandt. Es wurden 3 Stufen einer Distanz von 50 µm hergestellt mit je einer Färbung HMB45 und MelanA und auf diese Weise insgesamt ca. 115 µm Gewebe aufgearbeitet. In 12 WLKs (35 %) von 11 Patienten (42 %) ließ sich eine Metastasierung nachweisen. Genau die Hälfte der positiven Schnitte war je HMB45 und MelanA positiv, etwa je ein Drittel lag in Stufe 1, 2 und 3 (35 %, 33 %, 31 %). Zwei der 12 LKs wurden erst in Stufe 2 positiv, Stufe 3 hingegen erbrachte keine neuen positiven LKs – im Gegenteil konnte die Metastasierung in zwei WLKs bereits nicht mehr nachgewiesen werden. Bei der Hälfte der Metastasen handelt es sich um ITZ (zwischen 1 und 28 Zellen), die Mikrometastasen maßen zwischen 0,2 mm und 3,7 mm. Der DCCD der positiven LKs lag mit einem Median von 26 (1 - 457) unter dem der negativ verbliebenen LKs mit 32 (0,5 - 8415), siehe Tabelle 21. Von den elf positiv reevaluierten Patienten kam es bei zehn zu einer Erhöhung des histopathologischen Stagings auf Stadium III.

Ergebnisse

Tabelle 21: Protokoll 2 - Positive WLK. Die positiven Färbungen sind in der Tabelle grau hinterlegt.

Fall-Nr.	Stufe 1		Stufe 2		Stufe 3		DCCD	neue maximale Metastase		Staging-Änderung	
	HMB45	Melan A	HMB45	Melan A	HMB45	Melan A		ITZ	in mm	von	nach
1							1	0,2		IIB	IIIC
2							12,5	0,7		IIC	IIIC
3							157,5	28		IB	IIIA
4.1 ²							200,5		0,3	IA	IIIA
4.2 ²							55	15			
5							2	1		IA	IIIA
6							4,5	3		IIB	IIIC
7							457		0,7	IB	IIIA
8							32	16		IB	IIIA
9							19,5		0,7	IB	IIIA
10							390		3,7		IIIC ¹
11							1	2		IIA	IIIB

¹ein weiterer WLK des Patienten wurde bereits initial in beiden Untersuchungen positiv befundet

²zwei WLK des Patienten wurden entnommen und nachgeschnitten, in beiden wurden Metastasen detektiert

3.7.4 Protokoll 3

Protokoll 3 unterschied sich von Protokoll 2 allein darin, dass nur die ersten beiden Stufen angefertigt und somit nur ca. 55 µm Gewebe aufgearbeitet wurde. Es wurden ebenfalls 26 Patienten (mediane Tumordicke 2,2 mm (1,0 mm – 8,6 mm)) mit 32 WLKs reevaluiert. Eine Metastasierung konnte in 19 Schnitten (15 %) nachgewiesen werden, welche sich relativ gleichmäßig auf HMB45 und MelanA (47 % vs. 53 %), sowie Stufe 1 und 2 (52 % vs. 48 %) verteilen. Zwei der acht positiven LKs wurden erst auf Stufe 2 als solche identifiziert, in weiteren zwei LKs konnten die in Stufe 1 bereits gefundenen Tumorzellen nicht bestätigt werden. Auch in Protokoll 3 lag der mediane DCCD der negativ verbliebenen LKs über dem der positiv reevaluierten WLKs (10 vs. 6,5). Die Metastasen bestanden zu 63 % (5 der 8 LKs) ausschließlich aus 2 bis 18 ITZ, die Mikrometastasen maßen zwischen 0,5 mm und 0,9 mm. Bei allen 8 Patienten kam es durch den neuen metastatisch befallenen WLKs zu einem histopathologischen Up-Staging in Stadium III (Tabelle 22).

Ergebnisse

Tabelle 22: Protokoll 3 - Positive WLK. Die positiven Färbungen sind in der Tabelle grau hinterlegt.

Fall-Nr.	Stufe 1		Stufe 2		DCCD	neue maximale Metastase		Staging Änderung	
	HMB45	MelanA	HMB45	MelanA		ITZ in mm	mm	alt	neu
1					371		0,5	IIA	IIIB
2					1		0,6	IIB	IIIC
3					0,5	2		IB	IIIA
4					5,5	2		IB	IIIA
5					7,5	13		IIC	IIIC
6					5	11		IIA	IIIB
7					7	18		IIB	IIIC
8					2331		0,9	IB	IIIA

3.7.5 Zeit- und Kostenaufwand

Der Zeit- und Kostenaufwand für einzelne Schnitte und hochgerechnet auf ein gesamtes Protokoll bzw. eine Untersuchung setzte sich aus verschiedenen Größen zusammen, welche in der vorliegenden Arbeit zu großen Teilen auch auf Angaben und Schätzungen fachkundiger Ärzte und Personals beruhen.

Der zeitliche Aufwand für die standardisierten und routinierten Abläufen der Histopathologie wurde mit etwa drei Minuten aktiver Zeit pro WLK für das Gießen des Paraffinblockes, das Schneiden, Aufziehen der Schnitte und Navigieren der Färbeautomaten bei geschultem Personal berechnet. Dahingegen nahm die unter 2.2.2 und 2.2.3 beschriebene Aufarbeitung der WLK-Hälfte in der Dermatologie circa eine Stunde Zeit in Anspruch. Die reine Zeit der ärztlichen Mikroskopie der Präparate betrug in der HP etwa drei Minuten pro Schnitt und in der Dermatologie – nach Vormikroskopie durch geschultes labortechnisches Personal – fünf Minuten pro Objektträgerkammer. Das bisherige Routine-Protokoll der HP umfasste in der Regel einen HE Schnitt, sowie wenn dieser negativ war je eine Färbung HMB45, MelanA und S100, sodass sich eine gesamte Zeit am Mikroskop von circa 12 Minuten pro WLK ergab. Gleiches gilt für Protokoll 1 und 3 mit ebenfalls 4 OTs. In Protokoll 2 mussten sechs Schnitte beurteilt werden, was circa 18 Minuten dauerte. In der QIZ waren pro WLK je drei OTs (2x HMB45 und eine MOPC1-Kontrolle) mit je 2 Kammern zu beurteilen, sodass sich ein gesamter Zeitaufwand für den ärztlichen Beurteiler von ca. 30 Minuten ergab.

Ergebnisse

Tabelle 23: Zeitaufwand der Histopathologie und quantitativen Immunzytologie. Zu großen Teilen auf Schätzungen fachkundiger Ärzte und Personals beruhend. HP=Histopathologie, QIZ=quantitative Immunzytologie, LTA=labortechnische*r Assistent*in.

Zeitaufwand	HP		QIZ	
Mikroskopie durch Arzt pro Schnitt bzw. Kammer	3 Minuten		5 Minuten	
Anzahl der Schnitte/Kammern	Schnitte		Kammern	
Routine	4	→ 12 Min.	6 ¹	→ 30 Min.
Protokoll 1	4	→ 12 Min.		
Protokoll 2	6	→ 18 Min.		
Protokoll 3	4	→ 12 Min.		
Mikroskopie durch LTA	-		variabel ²	
Aufbereitung einer WLK-Hälfte	3 Min.		60 Min.	

¹bei 3 OT (2x HMB45, 1x MOPC1) mit je 2 Kammern; ²stark abhängig von der Positivität des LK

Zur Abschätzung des finanziellen Aufwandes wurden ausschließlich Materialkosten für OTs, AKs und Färbereagenzien berücksichtigt, nicht aber die Wartungs- oder Stromkosten der verwendeten Geräte sowie die Personalkosten. Pro OT setzten sich die Kosten aus dem AK, dem Färbekit, den Verdünnungsmedien und dem OT selbst zusammen. So kostete eine fertige HMB45 Färbung in der HP beispielsweise 13,85 € und in der Dermatologie 6,30 €. Hochgerechnet für die QIZ mit je zwei OTs HMB45 und einem mit MOPC1 ergaben sich Kosten von geschätzten 18,45 €/WLK. Protokoll 1 der HP kostete etwa 15,95 €/WLK im Vergleich zu Protokoll 3 mit 55,32 €/WLK und 82,98 €/WLK für Protokoll 2.

Tabelle 24: Kostenaufwand der Histopathologie und der quantitativen Immunzytologie. Zu großen Teilen auf Schätzungen fachkundiger Ärzte und Personals beruhend. HP=Histopathologie, QIZ=quantitative Immunzytologie, OT=Objekträger.

Kostenaufwand		HP	QIZ	
Antikörper	HMB45	0,22	0,90	€/OT ¹
	MOPC1	-	0,45	€/OT
	MelanA	0,18	-	€/OT
Färbekit		10,25	4,60	€/OT
Verdünnungsmedien		1,08	0,20	€/OT
Objekträger		2,30	0,60	€/OT
HE komplett		0,70	-	€/OT
HMB45 komplett		13,85	6,30	€/OT
MOPC1 komplett		-	5,85	€/OT
MelanA komplett		13,81	-	€/OT
Protokoll 1 bzw. QIZ-Routine ²		15,95	18,45	€/LK
Protokoll 2		82,98		€/LK
Protokoll 3		55,32		€/LK

¹Objekträger; ²zwei OT mit HMB45, ein OT mit MOPC1

3.7.6 Gegenüberstellung der drei verschiedenen Nachschnitt-Protokolle – Übersicht.

In Tabelle 25 werden sich die drei Protokolle in verschiedenen Aspekten vergleichend gegenübergestellt, darunter die inhaltliche Umsetzung und der Aufwand, die Detektionsraten und differierenden Kollektive.

Tabelle 25: Vergleich der drei Nachschnitt-Protokolle – Übersicht.

	Protokoll 1	Protokoll 2	Protokoll 3
Patienten	49	26	26
LKs	67	34	32
Schnitte gesamt	268	204	128
Schnitte/LK	4	6	4
Schnitte/Pat.	5,5	7,8	4,9
Nachgearbeitetes Material	610 µm	115 µm	55 µm
Stufen, Färbungen	3, HE (3x), HMB45 (1x)	3, HMB45 (3x), MelanA (3x)	2, HMB45 (2x), MelanA (2x)
geschätzte Kosten/LK	15,95 €	82,98 €	55,32 €
geschätzte ärztl. Mikroskopie-Zeit	12 min.	18 min.	12 min.
Positive Schnitte	8 (3%)	54 (26%)	19 (15%)
Positive WLKs	7 (10%)	12 (35%)	8 (25%)
Positive Patienten	7 ¹ (14%)	11 ¹ (42%)	8 (31%)
DCCD (TC/1Mio.Zellen), alle LKs	7,5 (0,5- 4.743,5)	27,5 (0,5 – 8.415)	8,0 (0,5 – 3.496)
Negative LKs	6,5 (0,5 – 4.743,5)	32 (0,5 – 8.415)	10 (0,5 – 3.496)
Positive LKs	32,5 (3 – 2.130,5)	26 (1 - 457)	6,5 (0,5 – 2.331)
Metastasengröße (mm), alle LKs	0 (0 - 1,6)	0 (0 - 3,7)	0 (0 - 0,9)
Positive LKs	0,3 (0,016 - 1,6)	0,1 (0,016-3,7)	0,016 (0,016-0,9)
Tumordicke (mm), alle Pat.	2,0 (0,6 - 6,0)	2,3 (0,7 - 7,5)	2,2 (1,0 - 8,6)
Positive Patienten	3,1 (1,4 - 6)	1,7 (0,7 - 5,0)	3,1 (1,4 - 6,0)
Negative Patienten	2,0 (0,6 - 6,0)	2,8 (0,7 - 7,5)	1,9 (1,0 - 8,6)
LKs mit ITZ	3 (43% der LKs)	6 (50%)	6 (75%)
Staging – Änderung	5 (71%)	10 (91%)	8 (100%)
positive Schnitte	13% HE, 88% HMB45	50% HMB45, 50% MelanA	47% HMB45, 53% MelanA

¹ein weiterer WLK des Patienten wurde bereits initial in beiden Untersuchungen positiv befundet

3.8 Korrelation des DCCD mit der histopathologisch bestimmten Metastasengröße

Um zu überprüfen, ob größere histopathologisch ausgemessene Metastasen im WLK auch mit höheren DCCDs assoziiert sind, wurden entsprechende Korrelationsanalysen nach Spearman durchgeführt. Beispiele für zwei in Metastasendurchmesser und DCCD gut korrelierende WLKs zeigen die Abbildungen 15 und 16.

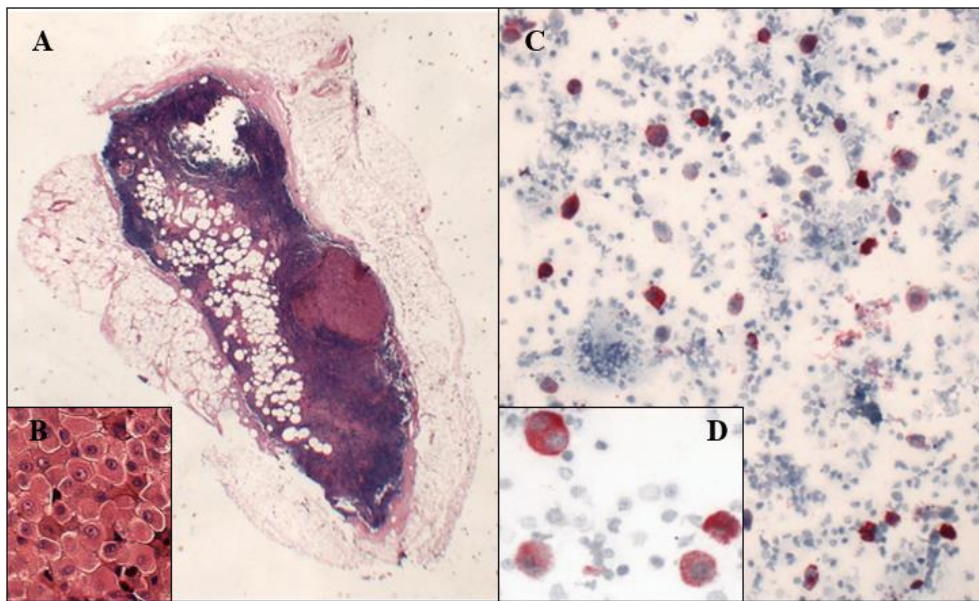


Abbildung 15: Histopathologisches und immunzytologisches Präparat des LK 19631/17. Ausgeprägter Tumorbefall in beiden WLK-Hälften. **A:** HE, 1,25-fache Vergrößerung, 1,1mm. **B:** Ausschnitt. HE, 40-fache Vergrößerung. **C:** HMB45, 10-fache Vergrößerung, DCCD: 5728,5. **D:** Ausschnitt. HMB45, 20-fache Vergrößerung.

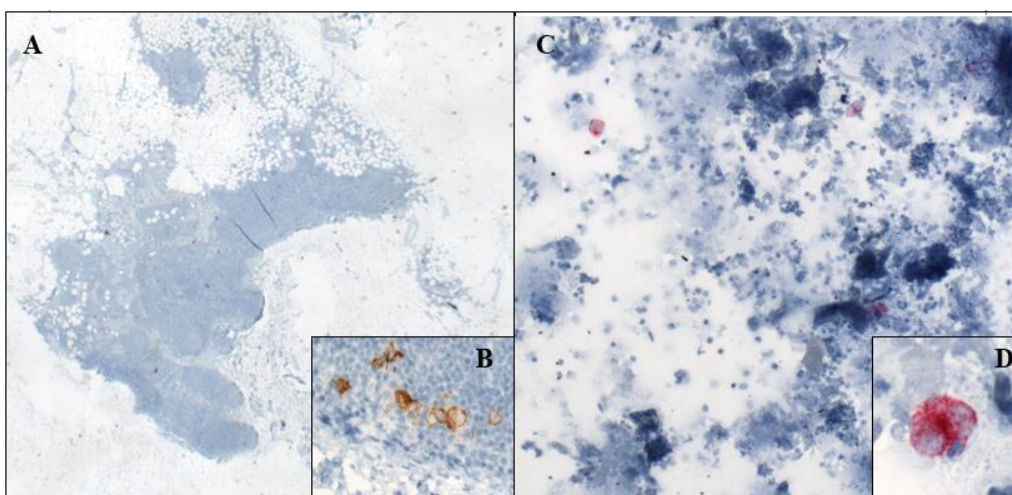


Abbildung 16: Histopathologisches und immunzytologisches Präparat des LK 4552/17. Geringe Tumorerfüllung in beide Lymphknoten-Hälften. **A:** HMB45, 1,25-fache Vergrößerung, 14 ITZ. **B:** Ausschnitt. HMB45, 20-fache Vergrößerung. **C:** HMB45, 10-fache Vergrößerung, DCCD=142,5. **D:** Ausschnitt. HMB45, 40-fache Vergrößerung.

Ergebnisse

Für das gesamte Kollektiv der 1205 WLKs ergab sich, ohne Berücksichtigung der in der Studie angefertigten Nachschnitte, dabei eine Korrelation der Stärke $r_s=0,553$, die mit einem p-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant zu werten ist ($\alpha=0,05$). In Abbildung 17 wurden die Messungen graphisch dargestellt und wie in den folgenden Graphen auch wegen der großen Spannweite der Daten sowohl für den DCCD als auch die Metastasengröße eine logarithmische Achsenskalierung (\log_{10}) gewählt.

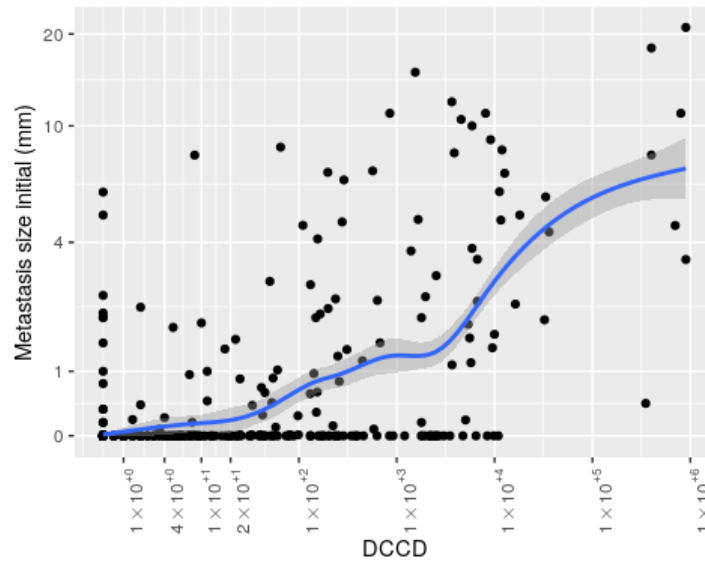


Abbildung 17: Korrelation DCCD - Metastasengröße aller 1205 WLK zu Studienbeginn, d.h. vor Anfertigung der Nachschnitte. DCCD in Tumorzellen/ 1 Million untersuchter Zellen.

Wurden nur WLKs mit positivem DCCD und histopathologischer Metastase berücksichtigt, ergibt sich eine Subgruppe von 100 WLKs mit einem noch stärkeren Effekt von $r_s=0,639$ ($p<0,05$, Abbildung 18). Zur Veranschaulichung wurde zudem die best-fitting-line generiert.

Ergebnisse

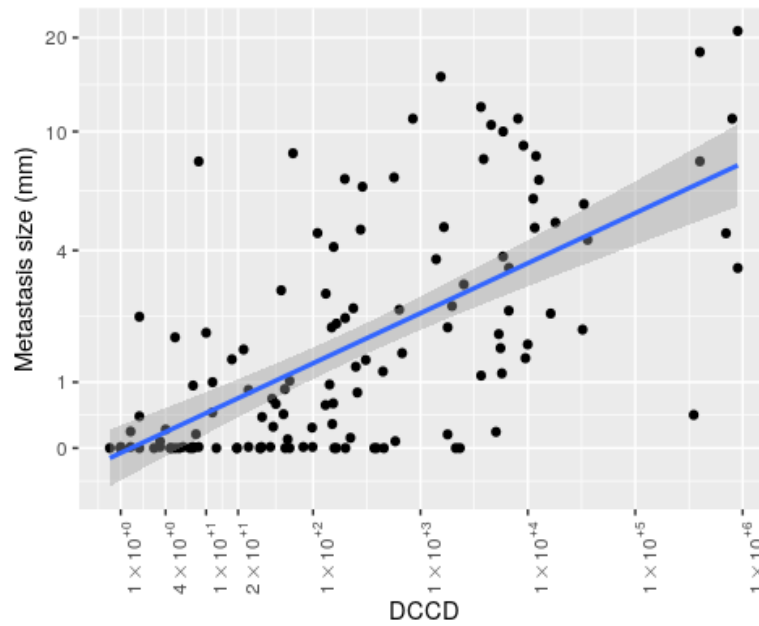


Abbildung 18: Korrelation DCCD - Metastasengröße der 100 zu Studienbeginn doppelt positiven WLKs, vor Anfertigung der Nachschnitte. Veranschaulichung durch die best-fitting-line. DCCD in Tumorzellen/ 1 Million untersuchte Zellen.

Selbige Analysen wurden nach Anfertigung der Nachschnitte gemacht, wodurch sich wie bereits beschrieben 27 zusätzliche histopathologisch bestätigte Metastasen ergaben. Der Korrelationseffizient r_s der 1205 WLKs betrug darunter 0,628 und ist mit einem p-Wert von $<0,05$ ebenfalls statistisch signifikant (Abb.19).

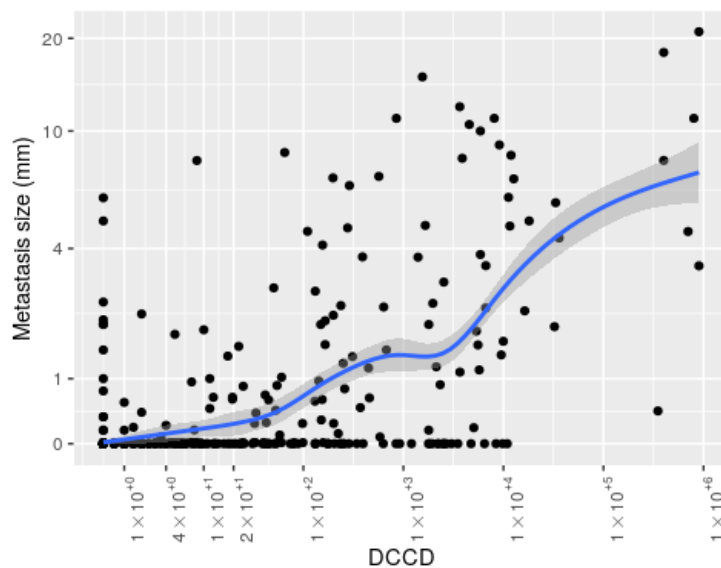


Abbildung 19: Korrelation DCCD - Metastasengröße aller 1205 WLK zu Studienende, d.h. inklusive der Messungen der Nachschnitte. DCCD in Tumorzellen/ 1 Million untersuchte Zellen.

Nur unter Einschluss der in beiden Methoden final positiven WLKs in die Analyse (n=127) änderte sich Spearmans Korrelationskoeffizient wie folgt: $r_s=0,692$, $p<0,05$ (Abbildung 20, inkl. best-fitting-line).

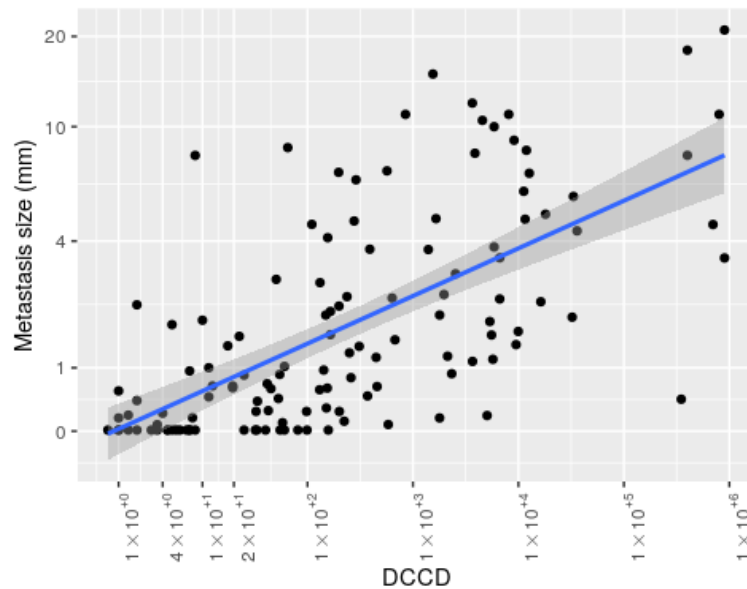


Abbildung 20: Korrelation DCCD - Metastasengröße der 127 zu Studienende doppelt positiven WLKs, d.h. inklusive der Nachschnitte. Veranschaulichung durch die best-fitting-line. DCCD in Tumorzellen/ 1 Million untersuchte Zellen.

Wie Tabelle 26 zusammenfassend darstellt, ist der Zusammenhang zwischen dem DCCD und dem maximalen Metastasendurchmesser am stärksten unter Einbezug der Messungen der Nachschnitte und unter Berücksichtigung nur der in beiden Untersuchungen positiv befundenen WLKs.

3.9 Korrelation des DCCD bzw. der Metastasengröße mit der Tumordicke nach Breslow

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Studie war es herauszufinden, ob die beiden Untersuchungsmethoden nicht nur in Hinblick auf Diagnostik und Staging, sondern möglicherweise auch prognostische Relevanz haben. Da zum Studienzeitpunkt keine bzw. nur unvollständige Überlebensdaten vorlagen, wurde die Dicke des Primärtumors, der wichtigste prognostische Faktor des melanomspezifischen Überlebens, für diese Analysen herangezogen. Bei einer starken Korrelation des DCCD bzw. der

Ergebnisse

Metastasengröße mit dieser Tumordicke wurde daher ein möglicher Zusammenhang zum Überleben vermutet. In die Auswertungen flossen die Messungen von 903 der 907 Patienten ein, da vier Angaben zur Tumordicke nicht verfügbar waren. Spearmans Korrelationsanalysen zeigte sich einen statistisch signifikanten, moderat positiven Zusammenhang zwischen dem DCCD und der Tumordicke des gesamten Kollektivs (n=903) von $r_s=0,299$ ($p<0,05$), sowie der 218 Patienten mit einem positiven DCCD ($r_s=0,324$, $p<0,05$), Abbildung 21.

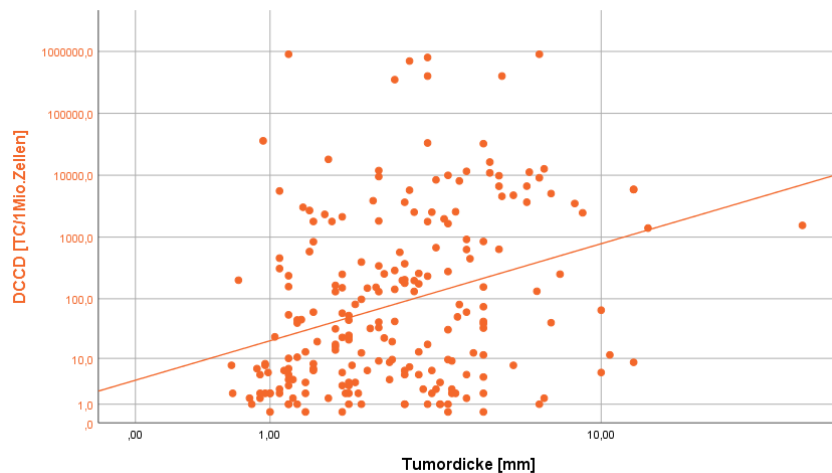


Abbildung 21: Korrelation positiver DCCD und Tumordicke zu Studienende, n=218. Veranschaulicht durch eine logarithmische Achsenskalierung und die best-fitting-line.

Auch zwischen der histopathologisch ausgemessenen maximalen Metastasengröße und der Primärtumordicke konnte ein moderater, aber signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Für das gesamte Kollektiv aus 903 Patienten betrug $r_s=0,267$ ($p<0,05$), unter den 134 Patienten mit histopathologisch bestätigter Metastase lag r_s etwas höher mit $r_s=0,355$ ($p<0,05$, Abb. 23).

Ergebnisse

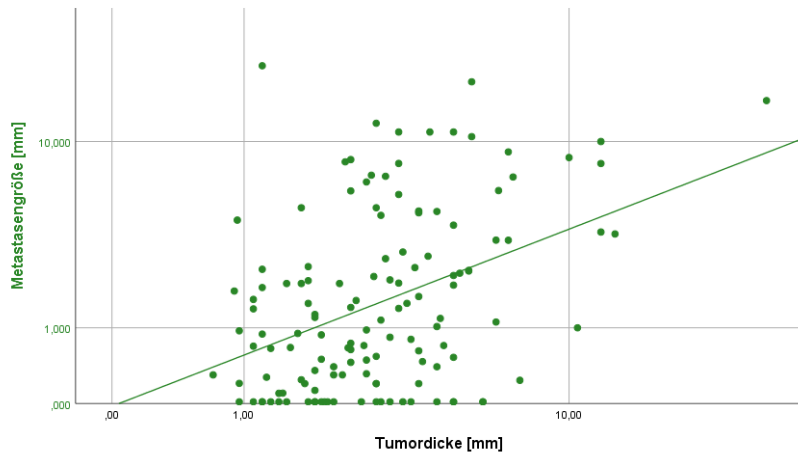


Abbildung 22: Korrelation positive Metastasengröße und Tumordicke zu Studienende, $n=134$. Veranschaulicht durch eine logarithmische Achsenskalierung und die best-fitting-line.

Der stärkste Zusammenhang mit einem Koeffizienten von $r_s=0,388$ konnte zwischen der Metastasengröße und der Tumordicke derjenigen Patienten detektiert werden, deren Metastasen sich sowohl in der QIZ als auch in der HP bestätigten ($n=118$, $p<0,05$, Abb. 23). Der Zusammenhang zwischen dem DCCD und der Tumordicke dieser Subgruppe war dagegen etwas weniger stark ($r_s=0,246$, $p<0,05$, Abb. 23).

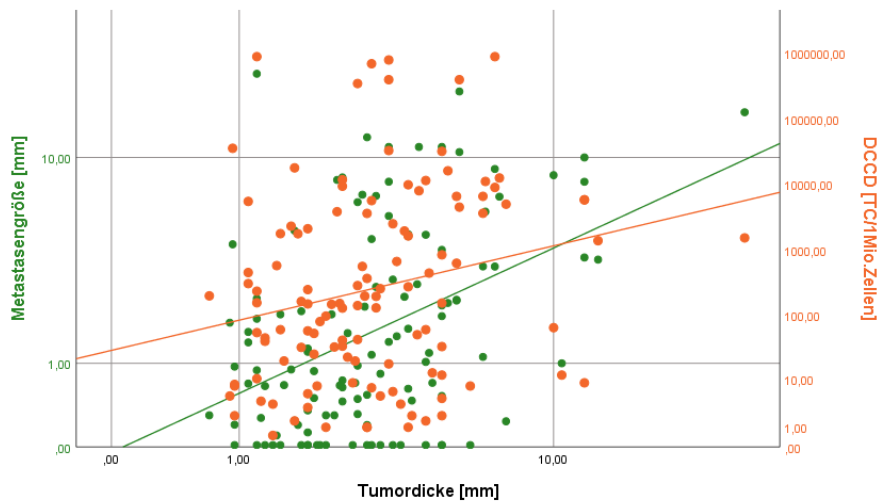


Abbildung 23: Korrelation Tumordicke und DCCD bzw. Metastasengröße nur der doppelt positiven Patienten zu Studienende, $n=118$. Orange: R_s der Analyse DCCD – Tumordicke = $0,246$ ($p>0,05$). Grün: R_s der Analyse Metastasengröße – Tumordicke = $0,388$ ($p<0,05$). Veranschaulicht durch eine logarithmische Achsenskalierung und die best-fitting-line.

Die Ergebnisse aller berechneten Korrelationsanalysen nach Spearman zum Zusammenhang des Tumorbefalls des WLK (erhoben als DCCD bzw. Metastasengröße) und der Primärtumordicke sind in Tabelle 27 gemeinsam dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 26: Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen DCCD und Metastasengröße. DCCD in Tumorzellen/ 1 Million untersuchte Zellen, Metastasengröße in mm. HP=Histopathologie, QIZ=quantitative Immunzytologie.

	Spearmanns-Korrelationskoeffizient r_s	DCCD (Median, Min.-Max.)	Metastasengröße in mm (Median, Min.-Max.)	Tumordicke in mm (Median, Min.-Max.)
Studienbeginn, ohne Nachschnitte				
alle WLK, n=1205	0,553 (p<0,05)	0 (0 - 900.000)	0 (0 - 21)	1,7 (0,35 - 30) ¹
QIZ und HP positive WLK, n=100	0,639 (p<0,05)	243,5 (1 - 900.000)	1,7 (0,016 - 21)	3,1 (0,9 - 30) ²
Studienende, inklusive Nachschnitte				
alle WLK, n=1205	0,628 (p<0,05)	0 (0 - 900.000)	0 (0 - 21)	1,7 (0,35 - 30) ¹
QIZ und HP positive WLK, n=127	0,692 (p<0,05)	155,5 (0,5 - 900.000)	1,1 (0,016 - 21)	3,0 (0,7 - 30) ³

¹n=907, ²n=95, ³n=118

Tabelle 27: Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen der Tumordicke des Primärtumors und dem DCCD bzw. der Metastasengröße. Tumordicke in mm, DCCD in Tumorzellen/ 1 Million untersuchte Zellen, Metastasengröße in mm. HP=Histopathologie, QIZ=quantitative Immunzytologie.

Tumordicke und...	Spearmanns-Korrelationskoeffizient r_s	DCCD (Median, Min.-Max.)	Metastasengröße in mm (Median, Min.-Max.)	Tumordicke in mm (Median, Min.-Max.)
...DCCD				
alle Patienten, n=903 ¹	0,299 (p<0,05)	0 (0 - 900.000)	0 (0 - 21)	1,7 (0,35 - 30)
positiver DCCD, n=218	0,324 (p<0,05)	40,5 (0,5 - 900.000)	0,016 (0 - 21)	2,7 (0,6 - 30)
positiver DCCD und Histopatho, n=118	0,246 (p<0,05)	156,5 (0,5 - 900.000)	1,1 (0,016 - 21)	3,0 (0,7 - 30)
...Metastasengröße (mm)				
alle Patienten, n=903 ¹	0,267 (p<0,05)	0 (0 - 900.000)	0 (0 - 21)	1,7 (0,35 - 30)
positive Histopatho, n=134	0,355 (p<0,05)	89,5 (0 - 900.000)	1,1 (0,016 - 21)	3,0 (0,7 - 30)
positiver DCCD und Histopatho, n=118	0,388 (p<0,05)	156,5 (0,5 - 900.000)	1,1 (0,016 - 21)	3,0 (0,7 - 30)

¹keine Angabe zur Tumordicke bei vier der 907 Patienten

4 Diskussion

4.1 Die Studie und eine Übersicht der wichtigsten Ergebnisse

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Kooperation des Instituts für Pathologie und Neuropathologie und der Universitäts-Hautklinik Tübingen. Seit dem Jahr 2013 werden in Tübingen die WLKs von Melanompatienten nicht nur histopathologisch sondern auch durch die QIZ untersucht. Während die Histopathologie weltweit als Standardmethode zur Detektion von Melanomzellen im WLK gilt, wurde die QIZ beim MM von Ulmer et. al (2005) erstmals in Tübingen publiziert und routinemäßig angewandt^{35,71}. Der große Unterschied zur HP besteht darin, dass in der QIZ das Lymphknotengewebe zunächst in eine Einzelzellsuspension überführt wird, bevor die dadurch separiert liegenden Zellen gefärbt und mikroskopiert werden. Die Tumorzelldichte (sogenannter DCCD = disseminated cancer cell density) kann durch das direkte Abzählen aller Tumorzellen in einer Million betrachteter Zellen erhoben werden, und steht der Ausmessung des maximalen Metastasendurchmessers im histopathologischen Gewebeschnitt, der aktuell verbreitetsten und bevorzugten Methode zu Quantifizierung der Tumorlast, gegenüber¹¹³.

Das Ziel dieser Studie war es, erstmals in größerem Umfang zu analysieren, ob die Ergebnisse der QIZ durch die Messungen der HP als Goldstandard bestätigt werden können. Im Expliziten sollten die beiden Methoden dahingehend untersucht werden, ob sich ein positiver Zusammenhang zwischen der histopathologischen Metastasengröße und dem immunzytologischen DCCD bestätigen lässt. Zudem erfolgte eine Auswertung der Methoden im Allgemeinen, sowie deren zeitlichen und finanziellen Aufwandes. Auch der Frage einer möglichen prognostischen Aussagekraft der Messungen sollte nachgegangen werden. Eine abschließende gemeinsame Betrachtung aller Ergebnisse sollte es ermöglichen, eine Aussage darüber treffen zu können, ob die QIZ geeignet ist auch über Tübingen hinaus in die Routineuntersuchung von WLKs beim MM aufgenommen zu werden oder ob sie gar das Potential hat, die histopathologische Aufarbeitung teilweise oder vollständig zu ersetzen.

Zu diesem Zweck wurden 1205 WLKs von 907 am MM erkrankten Patienten untersucht und ausgewertet. Die Entnahme der LKs erfolgte nach Indikationsstellung gemäß den

aktuellen S3 Leitlinien im Rahmen einer Wächterlymphknotenbiopsie zwischen Januar 2013 und August 2017 in der Universitäts-Hautklinik Tübingen^{2,26}.

Detektionsraten und Nachschnitte:

Durch die QIZ konnte bei 24 % aller Patienten (22 % der WLKs) eine Metastasierung nachgewiesen werden, wohingegen die HP nur bei 12 % der Patienten (10 % der LKs) Tumorzellen detektierte. Durch Nachuntersuchung initial histopathologisch negativen WLK-Gewebes wurden bei 23 Patienten nachträglich Tumorzellen detektiert und die Positivitätsrate der HP auf 15 % der Patienten (12 % der LKs) gehoben.

Zusammenhang zwischen der Histopathologie und Immunzytologie:

Es konnte nachgewiesen werden, dass zwischen den Ausmessungen der HP und den Ergebnissen der QIZ ein stark positiver Zusammenhang besteht ($r_s=0,692$, $p<0,05$). Ein großer maximaler Metastasendurchmesser im Gewebeschnitt der einen LK-Hälfte korrelierte signifikant mit einem hohen DCCD in der anderen Hälfte. LKs mit kleineren Metastasen zeigten insgesamt weniger Melanomzellen in der Zytologie.

Zusammenhang zwischen der Tumordicke und der Metastasengröße bzw. dem DCCD:

Unsere Analysen konnten bestätigen, dass eine große Tumordicke nach Breslow signifikant mit einer größeren Tumorlast im WLK, im Sinne einer Metastase mit größerem Durchmesser, assoziiert ist als dünnere Primärtumoren ($r_s=0,355$, $p<0,05$). Zudem zeigten unsere Untersuchungen auch einen signifikant positiven Zusammenhang zwischen der Tumordicke und dem DCCD ($r_s=0,324$, $p<0,05$).

4.2 Diskussion der einzelnen Ergebnisse

4.2.1 Positivitätsrate der Wächterlymphknoten-Biopsie in Tübingen

Die aktuelle histopathologische Untersuchung von WLKs beim MM in Tübingen ist mit einer Positivitätsrate von 12 % der 907 Patienten – dies macht einen Anteil von 10 % der 1205 WLK aus – vergleichbar mit den von Ulmer et al. (2005 und 2014) ebenfalls aus Tübingen publizierten Daten von 12 % und 13,5 %. Auch in der Literatur werden Positivitätsraten der HP zwischen 10 und 30 % genannt, insbesondere in Abhängigkeit von der Aufarbeitung der LKs in den unterschiedlichen Instituten^{51,52,64,96,102,114-119}. Ein

häufig angewandtes Protokoll von Cochran et al. (2004) aus zehn zentralen Schnitten pro LK-Hälfte und der Färbung mit HE sowie immunhistochemischen Markern detektierte Melanommetastasen beispielsweise in circa 20 % der Fälle^{107,120}. Mit der routinemäßigen HE-Färbung eines zentralen Schnittes des halbierten LK und, bei dessen Negativität, der zusätzlichen Untersuchung von regelhaft drei direkt anschließenden immunhistochemischen Schnitten (HMB45, MelanA und S100), liegt der Aufwand des Tübinger Routineprotokolls deutlich unter dem der Genannten und erklärt die geringeren Positivitätsrate. Rechnet man zu den 12 % histopathologisch positiven Fällen jedoch die 14 % hinzu, die in Tübingen zusätzlich allein durch die QIZ als metastatisch befallen erkannt wurden, so kommt man auf eine Gesamt-Positivitätsrate von vergleichbaren 26 % der Patienten.

4.2.2 Mehr Metastasen durch ein genaueres Untersuchungs-Protokoll

Wie in der Literatur bereits vielfach beschrieben, konnten auch in dieser Arbeit bestätigt werden, dass durch die Anfertigung von zusätzlichen Gewebsschnitten sowie den Einsatz immunhistochemischer AKs die Detektionsraten um etwa 10 % angehoben werden können – es kommt zum so genannten „unidirektionalen Upstaging“^{64,80,97,98,107,110,121}. Unidirektional, da es durch neu detektierte Tumorzellen nur zum Übergang in ein höheres Tumorstadium kommen kann, eine bereits bestätigte Metastasierung dadurch jedoch nicht revidiert wird¹¹⁰. In vorliegender Arbeit kam es insgesamt in 20 % der nachuntersuchten WLKs zu positiven Befunden, während Spanknebel et al. (2005) durch eine nochmals deutlich genauere Aufarbeitung des LK-Gewebes in 22 % der zuvor negativ befundenen LKs Metastasen des MM detektierten⁶⁹. Da von einem Patienten häufig mehr als ein WLK entnommen wird, entsprach dies bei uns 23 % der Patienten, bei Spanknebel 36 % - dort fallen also mehr LKs auf einen Patienten als in dem hier vorliegenden Kollektiv. Bei unseren Auswertungen ist allerdings zu berücksichtigen, dass drei verschiedene Nacharbeitungsprotokolle verwendet wurden und deren Patienten- und Lymphknotenkollektiv so differierend war, dass ein direkter Vergleich und eine exakte Aussage darüber, welches nun zur Detektion von Melanommetastasen am besten geeignet ist, nahezu unmöglich ist. So bestanden bereits Unterschiede in der Anzahl der nachgeschnittenen LKs (67 in Protokoll 1, vs. 34 bzw. 32 in den Protokollen 2 und 3). Zudem war auch der mediane DCCD der LKs in Protokoll 2 deutlich größer als der in den anderen beiden Protokollen (27,5 (P2) vs. 7,5 (P1) und 7,75 (P3)). Dahingegen

unterschieden sich die medianen Tumordicken der drei Gruppen mit 2,0 mm, 2,3 mm und 2,2 mm nicht signifikant. Dieses Problem der mangelnden Vergleichbarkeit hätte durch eine gleichmäßigere Randomisierung bezüglich der Anzahl der LKs und der wichtigsten Charakteristika (beispielsweise Tumordicke, DCCD, Ulzerationsstatus) zu den drei Protokollen bereits zu Studienbeginn vermieden werden können. Bestünden gleiche Voraussetzungen, so könnte man bei der beobachteten Detektionsrate von nur 25 % der LKs in Protokoll 3 gegenüber 35 % in Protokoll 2, die zusätzliche dritte Stufe im ansonsten identischen, zweiten Protokoll als Erklärung für den Zugewinn an LK-Metastasen sehen. Dem widerspricht jedoch, dass alle 12 positiven LKs in unserem Protokoll 2 bereits in den ersten beiden Stufen identifiziert wurden und die dritte keine zusätzlichen positiven LKs erbrachte. Interessanterweise wurde in den Publikationen von Spanknebel et al. (2005) und Gietema et al. (2004) durch jeden das Gewebe tiefer repräsentierenden Schnitt weitere Metastasen hervorgebracht, wobei in diesen Studien bis zu 1.250 μm zusätzliches Gewebe aufgearbeitet wurde^{69,121}. Im Vergleich dazu macht unser nachuntersuchtes Gewebe mit circa 55 und 115 μm somit immer noch einen sehr geringen Anteil des LK-Gewebes aus und noch tiefer reichende Schnitte würden möglicherweise die beschriebenen weiteren Metastasen ebenfalls zeigen. Dass durch die vollständigere Untersuchung eines WLK nicht nur dessen Status, sondern auch die Größe der Metastase beeinflusst wird, publizierten Riber-Hansen et al. im Jahr 2009: Auch der maximale Durchmesser einer detektierten Metastase kann durch weitere Schnitte ausschließlich zum Größeren hin korrigiert werden und sich so der tatsächlichen maximalen Metastasengröße immer weiter annähern¹¹⁰. Eine solche Untersuchung wurde in dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt. Unser Protokoll 1 beinhaltete zwar Schnitte in 300 und 600 μm Tiefe von der Schnittfläche des halbierten WLK, allerdings wurden fast ausschließlich HE Färbungen angefertigt und so konnte nur in 10 % der LKs eine Metastase nachgewiesen werden. Dies bestätigt wiederum die Relevanz melanomspezifischer Färbungen, insbesondere bei einer Tumorzellaussaat, die nur aus Mikrometastasen oder gar ITZ besteht^{69,121}.

4.2.3 Relevanz isolierter Tumorzellen

In unserer Arbeit konnten wir zum Ende in 29 WLKs ausschließlich ITZ ausmachen. Zwar bildete diese minimale Tumorlast mit 19 % einen beträchtlichen Anteil unserer positiven Patienten, ob sie jedoch auch prognostische Relevanz hat, ist Thema aktueller

Kontroversen: Autoren wie van Akkooi et al. (2006) konnten zeigen, dass Patienten mit minimaler Tumoraussaat in den WLK vergleichbare Rezidiv-Raten und Non-Sentinel-node-Positivität, sowie ein identisches 5-Jahres-Überleben hatten, wie Patienten mit negativen WLKs^{59,69,85,86,88}. Andere Studien legen jedoch nahe, dass zwischen diesen beiden Gruppen signifikante Unterschiede bestehen und somit selbst ein geringster Befall des WLK auf einen aggressiveren Tumor mit einer schlechteren Prognose hinweist^{90,122}. Scheri et al. (2007) beschrieb neben höheren Rezidivraten und einem schlechteren overall survival von Patienten mit WLK-Metastasen von <0,1 mm gegenüber negativen WLKs, auch positive nachgeschaltete LNs in der anschließenden CLND bei 12 % der Patienten¹²³. Dies liegt im Bereich der beschriebenen Non-Sentinel-node Positivitätsrate von 15 – 20 %, die bei größeren WLK-Metastasen erhoben wurde^{37,62,85,89,124,125}. Daher wird aktuell diskutiert, ob es wie beim Brustkrebs einen Cut-off Wert geben sollte, ab welchem Patienten mit sehr geringem Befall des WLK die CLND erspart bleiben kann, und wo dieser liegt ($\leq 0,2$ mm beim WLK des Mamma-Karzinoms)^{126,127}. Auch in unserer Arbeit wäre es interessant den Verlauf der 25 Patienten mit nur ITZ im WLK im Hinblick darauf weiter zu verfolgen, ob sich in der Langzeitbeobachtung regionale oder Fernmetastasen entwickeln oder die Patienten gar ein schlechteres Überleben zeigen als solche mit negativen WLKs. Tatsächlich konnten wir bereits eine größere mediane Tumordicke nach Breslow von 2,1 mm bei Patienten mit ITZ beobachten, als bei WLK-negativen Patienten (Median 1,5 mm), sowie eine geringere mediane Tumordicke als die der Patienten mit größeren Metastasen (Median 3,0 mm).

4.2.4 Quantifizierung der Tumorlast im Wächterlymphknoten

Sowohl der Status des WLK als auch die Anzahl der metastatisch befallenen LNs haben größte prognostische Relevanz bei Melanompatienten im Stadium III^{52,55,89,107,110,128}. Dass zudem auch das Ausmaß des Tumorbefalls im WLK ein wichtiger Faktor ist, wurde ebenfalls bereits von einigen Autoren beschrieben^{30,59,63,129-133}. Balch et al. (2010) detektierten beispielsweise ein signifikant schlechteres Überleben bei Vorliegen klinisch detektierbarer Makrometastasen gegenüber histologischen Mikrometastasen⁶³. In weiteren Studien konnte zudem ein differierendes Überleben von Patienten mit Mikro- gegenüber Submikrometastasen – in dieser Arbeit die ITZ - beobachtet werden^{59,122,130,131}. Neben der Ausmessung des maximalen Metastasendurchmessers wurden weitere Parameter untersucht, um die Tumorlast im WLK zu quantifizieren⁸⁴. So beschrieben

Starz et al. (2004) mit zunehmender Invasionstiefe der Metastase von der Lymphknotenkapsel aus (sogenannte vereinfachte S-Klassifikation) eine signifikant höhere Zahl an Fernmetastasen und ein schlechteres overall survival⁶⁸. Dagegen unterteilt die Deware-Klassifikation die mikroanatomische Lokalisation in subkapsulär, kombiniert, parenchymal, multifokal und extensive (>5mm, extrakapsulär), welche ebenfalls mit der Non-SLN Positivität assoziiert ist⁸³. Weitere Studien zur Tumorausbreitung im WLK untersuchten die extrakapsuläre Ausbreitung, die (relative) Fläche und das Volumen der Metastasierung, sowie die Anzahl der Foki und der positiven WLKs und bestätigten deren prognostische Relevanz, welche teilweise jedoch in Folgeuntersuchungen nicht bestätigt werden konnte^{87,113,134-136}. Eine solche klar definierte Größe ist aber besonders aus zwei Gründen wichtig: Zum einen als Grundlage dafür, welchen Patienten mit geringer Tumorlast die CLND möglicherweise erspart bleiben kann. Zum anderen könnte aufgrund der großen Heterogenität der Patienten im Stadium III in einer neueren Version des AJCC Melanoma Staging Systems ein Sub-Staging positiver WLKs erfolgen und so Einfluss auf Therapie und Einschluss in wissenschaftliche Studien genommen werden. Obwohl noch kein einheitlicher Konsens über die beste Art der Quantifizierung besteht, scheint sich doch der maximale Metastasendurchmesser als ein in der gängigen Praxis einfach zu erhebender und sehr gut reproduzierbarer Parameter zu beweisen⁸⁴. Aus diesem Grund empfehlen verschiedenen Autoren zwar die anderen histologischen Charakteristika ebenfalls zu beschreiben, jedoch den maximalen Durchmesser der größten Metastase (sogenannte Rotterdam-Kriterien) auf bis zu 0,1 mm genau als primäre Größe zu verwenden^{113,132,137}. Daher wurde auch in der vorliegenden Arbeit das Ausmaß des Lymphknotenbefalls anhand dieses Parameters erhoben und analysiert. Der bei uns zudem bestimmte DCCD als weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der Tumorlast fand bislang über Tübingen hinaus kaum Erwähnung in größeren Publikationen zum MM. Ulmer et al. (2014) konnten jedoch zeigen, dass die Höhe des DCCD direkt mit der Wahrscheinlichkeit am MM zu versterben korrelierte und schon drei Tumorzellen in einer Millionen Lymphozyten mit einem signifikant schlechteren Überleben einhergingen. Daher sollten zukünftige Studien zur Quantifizierung der Tumorlast den DCCD ebenfalls als einen vielversprechenden Parameter erheben und dessen prognostischen Wert weiter untersuchen.

4.2.5 Die 4-Felder-Tafeln

Die aus den initialen Befunden der HP und QIZ erstellten 4-Felder-Tafeln veranschaulichen, dass bei insgesamt 84 % der Patienten (85 % der WLKs) eine übereinstimmende Beurteilung beider Methoden vorlag. Ebenso konnten diskrepante Ergebnisse der Untersuchungen der LK-Hälften bei 16 % der Patienten (15 % der WLKs) beobachtet werden. Eine Promotionsschrift aus Tübingen von 2017 zu einer ähnlichen Thematik und einem Kollektiv aus 345 Patienten von M. Möller zeigte vergleichbare Ergebnisse mit knapp 82 % Übereinstimmung und 18 % diskrepanten Patienten-Fällen¹³⁸. Der größte Unterschied besteht dabei in der Gruppe, in welcher histopathologisch keine Metastasierung nachgewiesen wurden, die von der QIZ jedoch positiv bewertet wurde (14 % unserer Patienten vs. 17 % bei M. Möller).

4.2.5.1 Detektionsraten der Immunzytologie

Wie erwähnt, ist der Anteil der histopathologisch negativ und immunzytologisch positiv befundenen Patienten bei uns etwa 3 % geringer als bei Möller (2017), dessen Daten ebenfalls aus Tübingen stammten¹³⁸. Bei gleichen Negativraten der HP von knapp 88 % ist die Differenz auf die etwas höhere Positivrate der Immunzytologie mit 28 % (n=345) gegenüber 24 % in unserer Studie (n=907) zurückzuführen. Nochmals höhere Detektionsraten von 44 % und 51 % wurden von Ulmer et al bereits 2005 und 2014 ebenfalls an einem Tübinger Kollektiv von 358 und 1207 Patienten beschrieben^{35,71}. Eine mögliche Erklärung dafür könnte darin liegen, dass sich das Untersuchungsprotokoll der QIZ seit diesen früheren Studien leicht änderte: Wurden die LKs zunächst nur mit HMB45 gefärbt, so erfolgte nun zusätzlich eine Gegenfärbung des Kerns mit Hämatoxylin, wodurch sich das rote Zytoplasma und der nun blaue Kern noch besser und morphologisch differenzierter darstellen lassen. Dies ermöglicht eine einfachere Identifizierung suspekter Zellen und deren Unterteilung in „sichere Tumorzellen“ (TCs) und „potentielle Tumorzellen“ (PTCs). Zu letzteren zählen malignitätsverdächtige Zellen, die jedoch nicht alle Kriterien einer klassischen Tumorzelle erfüllen und bei deren alleinigem Vorkommen ein WLK nicht als positiv befundet wurde. Diese Differenzierung wurde bei den genannten 44 % positiven Patienten von Ulmer et al. noch nicht berücksichtigt, sodass man bei Addition unserer Patienten mit ausschließlich PTCs (17 %) zu den 24 % sicher positiven Patienten auf einen vergleichbaren Wert von 41 %

Positivität der QIZ kommt. Auch bei Möller hatten 23 % der Patienten ausschließlich PTCs.

4.2.5.2 *Histopathologisch positive, immunzytologisch nicht nachweisbare Metastasen – Falsch negative Befunde der Immunzytologie?*

Es ist anzunehmen, dass unsere 17 nur histopathologisch positiven WLKs als immunzytologisch falsch-negativ zu betrachten sind, da falsch-positive Befunde der HP bei Anwendung mehrerer spezifischer AKs sehr selten vorkommen¹⁰⁷. Mögliche Gründe könnten zum einen HMB45 negative Metastasen sein, die laut Literatur zwischen 10 und 30 % der Lymphknotenmetastasen des MM ausmachen^{64,69,80,139}. Insbesondere desmoplastische und spindelzellige Melanome zeigen häufig keine positive Reaktion des AK HMB45 mit gp100 – durch die Färbung mit S100 oder MelanA, wie sie in der HP erfolgte, können Zellen dieser Tumorsubtypen dagegen nachgewiesen werden¹⁴⁰⁻¹⁴². Eine Möglichkeit diesen Fehler in der QIZ recht einfach zu umgehen, läge in der Verwendung zusätzlicher immunhistochemischer Marker. Eine weitere Erklärung der falsch-negativen Befunde der QIZ könnte im „sampling error“ liegen: Nach Exstirpation des WLKs wurde dieser entlang seiner Längsachse halbiert und je zur Hälfte in die Dermatologie und die Pathologie gegeben. Kam es bei einer ungleichen Verteilung der Metastasierung im LK nun dazu, dass diese ausschließlich in der Gewebehälfte der Pathologie lag, so erklärt dies den negativen Befund der Immunzytologie. Aktuell herrscht jedoch Uneinigkeit darüber, wie sich die Metastasen im WLK tatsächlich verteilen: Einige Autoren beschreiben eine breite Streuung der Tumorzellen im gesamten LK^{69,107,122,133}, wohingegen andere Studien nahelegen, dass sich Melanomzellen zunächst in den subkapsulären Sinus entlang der Längsachse des LK ansiedeln, weshalb die Halbierung entlang dieser für die Untersuchung generell empfohlen und auch in Tübingen angewendet wird^{139,143,144}. In der vorliegenden Arbeit sammelten wir keine Informationen darüber, wo die in der Pathologie detektierten Metastasen innerhalb der Schnitte und des LK lokalisiert waren, und können daher keine Position zu diesen beiden Ansichten einnehmen. Eine Möglichkeit zur Reduktion des beschriebenen sampling errors bestünde darin, einen größeren Teil des lymphatischen Gewebes in die immunzytologische Untersuchung einzubringen, da diese das gesamte Material durch das Überführen in die Einzelzellsuspension repräsentativer abbildet und nicht das Problem der begrenzten Schnittebenen birgt. Allerdings sollte weiterhin ein Anteil histopathologisch untersucht

werden. Zum einen um die Lokalisation der Metastase innerhalb des LK wiedergeben zu können, was nach der immunzytologischen Disaggregation nicht mehr möglich ist, zum anderen, weil die HP als Einschluss- und Vergleichskriterium verschiedener (Therapie-)Studien verwendet wird und als Grundlage des pathologischen Stagings des MM unabdingbar ist³⁰. Nicht zuletzt scheint es sinnvoll weiterhin eine Referenz in der Beurteilung der einzelnen WLKs zu haben, bis sich die Methodik der QIZ breiter etabliert und bewährt hat.

Eine nennenswerte Beobachtung in unserer Subgruppe der immunzytologisch falsch-negativen Fälle sind fünf der 17 LKs (29 %), in welchen PTCs gefunden wurden, und bei denen es sich also möglicherweise doch um Tumorzellen handelte. Des Weiteren lag die mediane Metastasengröße dieser 17 LKs mit 0,8 mm etwas unter dem Median der in beiden Untersuchungen positiv befundeten WLKs (1,109 mm), bei einem höheren Anteil an ITZ (24 % vs. 20 %). Diese LKs scheinen also auch in der in die Pathologie gegangenen Hälfte etwas kleinere Metastasen zu bergen, was einen sampling error oder das Übersehen von Tumorzellen in der Dermatologie nochmals naheliegender macht. Die Überlegung die vorhandenen immunzytologischen Präparate nochmals zu mikroskopieren, um schlichtweg übersehene Tumorzellen zu suchen, musste wegen der über die Zeit stark verblasste Färbung aufgegeben werden

4.2.5.3 Histopathologisch negative, immunzytologisch positive Lymphknoten - Ist die Histopathologie falsch-negativ?

Die Ursachen der diskrepanten Ergebnisse der negativen HP bei positiver QIZ in 14 % unserer Fälle scheinen komplexer zu sein. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass es sich um immunzytologisch falsch-positive Befunde handelte. Da in der QIZ ausschließlich eine Färbung der Zellen mit dem AK HMB45 und eine Hämatoxylin-Kerngegenfärbung zum Einsatz kam, ist es durchaus möglich, dass nicht nur Melanomzellen, sondern auch benigne Zellen markiert wurden. Bei solchen HMB45 positiven Zellen kann es sich beispielsweise um junctionale Nävuszellen oder auch Melanophagen handeln - Histiocyten, die durch Phagozytose Prämelanosomen aufgenommen haben, welche wiederum mit dem AK reagieren^{70,145,146}. Es werden nicht nur in 0,12 % - 4 % der LKs des Melanoms benigne Nävuszellen beschrieben, Abrahamsen et al. (2004) konnten bei 16 % von diesen zudem eine HMB45-Positivität nachweisen^{64,147-150}.

Da durch zusätzliche Schnitte und Färbungen des archivierten LK-Gewebes jedoch bei 20 % unserer nachuntersuchten WLKs die immunzytologisch bereits detektierten Metastasen doch noch gefunden wurden, scheint bewiesen, dass es sich zumindest bei einem Teil der Fälle um histopathologisch falsch-negative Befunde handelte. Auch dies kann durch den sampling error erklärt werden: Bei einer schon sehr weit fortgeschritten Metastasierung in den WLK verteilen sich die Tumorzellen vermutlich über den gesamten LK, sodass bei einer Halbierung in beiden Hälften zumindest Anteile – wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß – der Metastasen zu finden sind. Wurden diese genau in den initialen zentralen Schnitten nicht getroffen, so höchstwahrscheinlich in den zusätzlichen tieferen Schnitten. Handelt es sich jedoch um ein früheres Stadium der Dissemination oder einen weniger aggressiven Tumor, so birgt der WLK mutmaßlich insgesamt nur wenige oder kleine Metastasen und umso schwieriger ist es, diese selbst mit einem sehr gründlichen Untersuchungsprotokoll zu detektieren. Von einem normal großen LK von circa 10 mm wurde nach unserem Protokoll 2 bis zu 200 µm Gewebe aufgearbeitet – das bedeutet wiederum, dass weitere 9.800 µm (9,8 mm) ununtersucht blieben. Bei einer medianen Metastasengröße von 1,0 mm all unserer 144 positiven WLKs bzw. in Studien beschriebenen 0,5 bis 1,4 mm, kann das verbliebene Gewebe also deutlich mehr als eine zusätzliche Metastase bergen^{50,80,93,96,107,109}. Dass es sich bei unseren bestätigt falsch-negativen LKs vor allem um solche sehr kleinen Metastasen handelte, zeigt sich anhand ihrer sehr geringen Größe (Median 0,016 mm, d.h. überwiegend ITZ) im Vergleich zu den bereits initial positiven LKs mit medianen 1,6 mm maximalem Durchmesser. Auch im DCCD spiegeln sich diese Zahlen wider: Während der mediane DCCD der initial histopathologisch positiven WLKs 149 betrug, so lag er mit 19,5 bei den positiven Nachschnitten deutlich darunter. Die LKs, welche durch unsere zusätzliche Aufarbeitung dennoch keine Tumoraussaat zeigten, hatten sogar einen noch geringeren medianen DCCD von 8, was die These weiter stützt. Eine falsche Negativität der HP aufgrund mangelhafter immunhistochemischer Färbung ist nahezu ausgeschlossen, da zum einen die gp100-Bindungsstelle des AK HMB45 bereits immunzytologisch bestätigt wurde, und zum anderen mindestens eine weitere immunhistochemische Färbung mit S100 und/oder MelanA zum Einsatz kam. Manche Autoren berichten bei geringer Metastasenlast von einer schwachen und oft nur fokalen positiven Reaktion der Tumorzellen mit dem AK HMB45, sodass es dennoch möglich

erscheint, diese kaum gefärbten Melanomzellen in der Mikroskopie zu übersehen oder als junktionale Nävuszellen oder Melanophagen verkannt zu haben^{68,70,80,145,146,151}.

4.2.6 Korrelation des DCCD mit der histopathologischen Metastasengröße

Anhand einer logistischen Korrelationsanalyse nach Spearman konnte gezeigt werden, dass ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem DCCD und dem maximalen Metastasendurchmesser besteht. Der errechnete Korrelationskoeffizient von $r_s=0,628$ für alle 1207 WLKs bzw. von $r_s=0,692$ für die Fälle mit positivem DCCD und histopathologischer Metastasierung, weist auf einen stark positiven Effekt ($p<0,05$) hin. Dies bedeutet, dass mit zunehmendem maximalem Durchmesser der Metastase in der HP auch der in der QIZ erhobene DCCD steigt und reziprok. In bisher keiner veröffentlichten Studie wurden diese beiden Möglichkeiten zur Quantifizierung der Tumorlast in WLKs des MM so direkt zueinander in Relation gesetzt. Bisherige Untersuchungen von Ulmer et al. (2005 und 2014) sowie von Möller (2017) beschrieben ausschließlich einen Zusammenhang zwischen dem DCCD und der Wahrscheinlichkeit für ein histopathologisch positives Ergebnis^{35,71,138}.

Die korrelierenden Messungen trotz der Halbierung der WLKs und getrennter Untersuchung beider Hälften sprechen für die Hypothese, dass sich die Metastasen des malignen Melanoms entweder in der zentralen Ebene nach Längshalbierung des LK befanden, wie von Cochran et al. (1999) beschrieben^{64,139,143}, oder aber für eine recht gleichmäßige statt unifokale Verteilung im LK^{69,121,133,152}. Ein an dieser Stelle anzumerkender Kritikpunkt der vorliegenden Arbeit ist, dass es möglicherweise nicht immer gelungen ist, kleine und von Fettgewebe umgebene LKs korrekt entlang der Längsachse zu halbieren und auch die histopathologischen Schnitte nicht immer zweifelsohne exakt in der Ebene dieser Schnittfläche angefertigt wurden.

Es ist bemerkenswert, dass es sich bei der beschriebenen Korrelation von $r_s=0,628$ (bzw. $r_s=0,692$) um einen starken Effekt nach Cohen (1992) handelt, dennoch kann die Stärke des Zusammenhangs durch einige potentielle Fehlerquellen in beide Richtungen beeinflusst worden sein¹⁵³: So können bei der Betrachtung von zwei Millionen Zellen in der QIZ einzelne Melanomzellen leicht übersehen worden sein bzw. bei vielen Tumorzellen das Hochrechnen weniger tatsächlich ausgezählter Gesichtsfelder auf das gesamte Präparat zu verfälschten Werten geführt haben. Auch Messfehler in der

histopathologischen Untersuchung können nicht vollständig ausgeschlossen werden, beispielsweise in der Verwendung des Messtools, dem Verkennen eines noch größeren maximalen Durchmessers oder das Übersehen von Zellen beim Abzählen der ITZ. Allein eine unregelmäßige Verteilung der Metastasen im WLK begründet den nicht perfekten Zusammenhang von $r_s=+1$. Für die Messung der HP ist zudem nicht nur die Ungleichmäßigkeit der Metastasen im gesamten LK, sondern auch innerhalb der einen Hälfte relevant: Da die meisten Metastasen eine unregelmäßige Form und Ausläufer besitzen, anstatt homogen rund zu sein, ist es bei begrenzter Schnitzzahl gut möglich, dass diese Schnitte nicht genau die Ebene des maximalen Durchmessers oder längsten Ausläufers trafen^{122,137,154}. Zumal die Histopathologie generell noch anhand einer zweidimensionalen Darstellung ein dreidimensionales Gewebe möglichst korrekt abzubilden versucht¹³⁷.

Dennoch zeigen unsere Ergebnisse der nachgewiesenen starken Korrelation des Goldstandards Histopathologie (maximaler Metastasendurchmesser in mm) mit der QIZ (DCCD) erstmalig, dass die Immunzytologie und die Überführung des lymphatischen Gewebes in eine Einzelzellsuspension dazu geeignet sind, den Status des WLKs beim MM korrekt zu bestimmen und es zudem sogar ermöglichen eine verlässliche Quantifizierung der Tumorlast mithilfe des DCCD zu erheben. Welche Bedeutung dies für die klinische Praxis haben könnte, wird im Kapitel 4.3 unter Berücksichtigung weiterer Faktoren diskutiert.

4.2.7 Korrelation des DCCD bzw. des maximalen Metastasendurchmessers mit der Primärtumordicke nach Breslow

Unsere Analysen konnten des Weiteren einen Zusammenhang der Tumordicke nach Breslow sowohl mit dem DCCD als auch mit dem maximalen Metastasendurchmesser im WLK bestätigen. Dieser Zusammenhang ist in allen unseren Auswertungen von statistischer Signifikanz ($p<0,05$) und kann nach Cohen als mittelstarker Effekt gewertet werden¹⁵³. Insbesondere bei der Auswertung nur der Patienten mit einem positiven DCCD ($n=218$) oder gesicherter histopathologischer Metastasierung ($n=134$) konnten etwas größere Korrelationskoeffizienten r_s von 0,324 (DCCD) und 0,355 (Metastasengröße in mm) erhoben werden im Vergleich zum gesamten Kollektiv ($n=903$, $r_s(\text{DCCD})=0,299$, $r_s(\text{Metastasengröße in mm})=0,267$). Wurden gar nur die Messungen

derjenigen Patienten in die Analysen eingeschlossen, deren WLKs in beiden Untersuchungen positiv befundet wurden (n=118), so beobachten wir für die Metastasengröße (mm) eine weitere Zunahme der Effektstärke ($r_s=0,388$). Bei diesen Zahlen könnte man mutmaßen, dass die schwächeren Korrelationen des gesamten Kollektivs möglicherweise auf die falsch-negative Befunde der QIZ oder HP zurückzuführen sind und sich durch Ausschluss dieser, also bei Betrachtung nur der positiven Fälle, der tatsächliche Zusammenhang demaskiert. Dafür spräche auch, dass die Zunahme des r_s in der Immunzytologie mit weniger falsch-Negativen schwächer ausfiel als in der Histopathologie.

Die Intention der Analysen zu einem Bezug zur Tumordicke lag darin, die beiden Methoden auch auf ihre prognostische Relevanz hin zu prüfen. Da wir zum Zeitpunkt der Studie jedoch keine oder nur unvollständige Informationen über den aktuellen Gesundheitsstatus oder gar ein Versterben der Patienten unseres Kollektivs hatten, konnten wir keine tatsächlichen Überlebensanalysen erstellen. Daher machten wir uns die Breslow Tumordicke zunutze, welche neben dem Ulzerationsstatus und dem Status des WLK als wichtigster prognostischer Faktor beim MM bekannt ist^{29,35,51,55,63,129}. Wir nahmen an, so indirekt aus einem stark positiven Zusammenhang des DCCDs bzw. des maximalen Metastasendurchmessers mit der Primärtumordicke Rückschlüsse auf die prognostische Aussagekraft der Messungen ziehen zu können. Allerdings sind solche über eine dritte Größe geschlossene Aussagen unter Vorbehalt zu treffen, da keine Einsicht und Kontrolle der das Überleben beeinflussenden (Stör-) Faktoren erfolgen konnte. Die Analysen dienten daher primär dem Vergleich der beiden Untersuchungsmethoden miteinander, als dazu ihre Bedeutung als tatsächliche praxisrelevante Prognosefaktoren zu erheben.

Die Zunahme der Metastahäufigkeit im WLK und besonders auch des maximalen Durchmessers mit ansteigender Tumordicke wurde in der Literatur bereits beschrieben und weist auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium hin^{130,131}. Bezüglich der Korrelation mit dem DCCD gibt es dagegen deutlich weniger Daten. Allerdings konnten auch Ulmer et al. (2005) und Möller (2017) eine Korrelation des DCCD mit der Breslow-Tumordicke der Stärke $r_s=0,34$ und $r_s=0,37$ durch eine Rangkorrelation nach Spearman nachweisen^{71,138}.

Die Korrelation der beiden Messungen zueinander ist mit einem Koeffizienten von 0,692 ($p < 0,05$) deutlich stärker, als die zur Tumordicke ($r_s(\text{DCCD}) = 0,324$, $r_s(\text{Metastasengröße}) = 0,355$). Dies ist jedoch nicht weiter verwunderlich in Anbetracht der Tatsache, dass in erster Analyse die Befunde ein und desselben LK zueinander in Relation gesetzt wurden, wohingegen diese in den zweiten Analysen mit einer „übergeordneten“ Struktur, dem Primärtumor, verglichen wurden¹⁵⁵.

4.2.8 Vergleich der beiden Untersuchungsmethoden bezüglich Zeit- und Kostenaufwand

Beim Vergleich der beiden Methoden (HP und QIZ) in Hinblick auf ihren finanziellen und zeitlichen Aufwand kann man generell sagen, dass es durch die Einführung der Wächterlymphknotenbiopsie zu einer Einsparung beider Ressourcen kam: Mussten zuvor alle bei der Lymphadenektomie entnommenen LKs einzeln auf Melanomzellen hin geprüft werden, so hat sich diese Arbeit nun auf einen oder zwei LKs reduziert, die dafür jedoch umso präziser untersucht werden sollten. In welchem Ausmaß solch eine kosten- und arbeitsintensive Aufarbeitung allerdings zu verwirklichen ist, hängt wiederum von den Gegebenheiten und Kapazitäten der zuständigen Institute ab. So ist das Lamellieren des gesamten LK-Gewebes in Stufenschnitten in kleinen Pathologien oder bei einer sehr großen Anzahl an WLK-Operationen nicht überall umsetzbar. Die Protokolle unserer Arbeit konnten zeigen, dass durch die ergänzenden immunhistochemischen Färbungen die Kosten für einen WLK deutlich ansteigen (Protokoll 1 ca. 16 €/WLK vs. Protokoll 3 ca. 55 €/WLK vs. Protokoll 2 ca. 83 €/WLK), wohingegen der zusätzliche Zeitaufwand für den befundenden Pathologen überschaubar blieb, auch da die Mikroskopie eines immunhistochemischen Schnittes in der Regel etwas schneller erfolgt als die einer HE-Färbung. Die Aufarbeitung durch die QIZ erwies sich durch weniger OTs und Färbungen mit knapp 19 € pro WLK als deutlich kostengünstiger und würde vermutlich auch bei der Herstellung eines zweiten immunhistochemischen Markers wie MelanA die Kosten der HP nicht erreichen. Anzumerken ist, dass die Mehrkosten in der HP ausschließlich auf höheren Ausgaben für das Färbekit, die Verdünnungsmedien und die OTs beruhen. Da zudem die Herstellung der gefärbten Schnitte nicht für jeden LK einzeln, sondern im Rahmen größerer Färbeläufe mit mehreren OTs erfolgte, konnten der Materialverbrauch und die davon abhängigen Kosten teilweise nur von dem damit betrauten Personal geschätzt und vom Gesamten auf den einzelnen OT zurückgerechnet werden. Daher ist

es schwer mit Sicherheit zu sagen, ob der Verbrauch dieser Medien pro Schnitt in der HP tatsächlich höher war oder sich einfach die Einkaufspreise für diese in der HP und QIZ stark unterschieden. Zudem wurden keine Kosten für den Betrieb und die Wartung der Geräte sowie das beschäftigte Personal veranschlagt, die jedoch unter dem Aspekt des zeitlichen Aufwandes nicht vernachlässigt werden sollten.

Dem Kostenvorteil der Immunzytologie steht ihr deutlich größerer Zeitaufwand gegenüber. Nicht nur die händische Anfertigung der Einzelzellsuspension und Präparate beansprucht dort allein bis zu 60 min (vs. 3 min in der HP), auch die Mikroskopie dauert deutlich länger: Zunächst werden die Präparate von geschulten MTAs mikroskopiert und die Tumorzellen ausgezählt, und anschließend von ärztlicher Seite nochmals kontrolliert. So stehen den circa 21 Minuten für die vollständige histopathologische Untersuchung einer WLK-Hälfte, mindestens 90 Minuten immunzytologische Bearbeitungszeit für die andere Hälfte gegenüber. Anders als die HP ist die Immunzytologie als eine noch relativ neue Methode in ihrem gesamten Arbeitsablauf noch deutlich weniger automatisiert, was einen direkten Vergleich erschwert. Ein andauernder und breiterer Einsatz der QIZ in der Untersuchung von WLKs würde mit der Zeit jedoch vermutlich auch zu einer weiteren Automatisierung der Arbeitsabläufe und somit zu einer Zeitersparnis führen. Weitere Faktoren, die eine genau reproduzierbare Zeitangabe pro WLK zusätzlich beeinflussen, sind neben der Erfahrung des Untersuchenden auch die LKs selbst: So ist die Bestätigung einer Metastasierung und Ausmessung bzw. Auszählung dieser bei einem vollständig tumordurchsetzten LK deutlich schneller zu treffen, als bei einzelnen metastatischen Zellen, die gezielt gesucht werden müssen.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die histopathologische Untersuchung als Goldstandard für WLKs beim MM ist in ihrem klinischen und prognostischen Wert allgemein anerkannt, birgt jedoch das große Problem, dass die Positivitätsrate direkt von der Präzision der LK-Aufarbeitung abhängt. Dagegen besteht in der QIZ die Möglichkeit das gesamte Gewebe repräsentativer abzubilden und dadurch deutlich höhere Detektionsraten zu erzielen. Die einfache Quantifizierung der Tumorlast durch den DCCD konnte durch die starke Korrelation zum histopathologischen Metastasendurchmesser zudem bestätigt werden. Es scheint daher sinnvoll der QIZ eine größere Bedeutung bei der Untersuchung von WLKs beim

Melanom zukommen zu lassen, insbesondere in Einrichtungen mit begrenzten Kapazitäten für diese Fälle. Dies könnte beispielsweise im Rahmen einer überwiegend immunzytologischen Aufarbeitung des lymphatischen Gewebes erfolgen, von welchem nur eine zentrale Gewebescheibe zur histopathologische Kontrolle belassen wird. Ein vollständiger Verzicht auf die HP kann auch aufgrund noch fehlender Langzeitdaten und umfassenderer Vergleichsstudien aktuell nicht empfohlen werden. Sollte die Immunzytologie tatsächlich breitere Anwendung finden, so ist eine Optimierung und Automatisierung der noch sehr zeitaufwändigen Arbeitsabläufe, sowie der Einsatz weiterer Melanom-spezifischen AKs, wie MelanA, anzustreben. Auch die noch offene Frage, ob ab einer größeren Anzahl an PTCs der LK nicht doch als metastatisch befallen einzustufen ist, sollte geklärt werden. Abschließend soll darauf hingewiesen werden, dass die Methode der QIZ neben dem MM auch bei vielen weiteren Tumorentitäten zur Untersuchung der WLKs eingesetzt werden kann¹⁵⁶.

Tabelle 28: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile der Histopathologie (HP) und quantitativen Immunzytologie (QIZ).

	Vorteile	Nachteile
HP	<ul style="list-style-type: none"> • Goldstandard → Staging, Studieneinschluss und -Vergleichbarkeit • Klinische und prognostische Relevanz, Korrelation zur Tumordicke ($r_s=0,355$) • Hohe Spezifität: Mehrere spezifische AK-Färbungen, Lokalisationsangabe, morphologische Beurteilung des Gewebes • Automatisierte Arbeitsabläufe → geringer Zeitaufwand • Quantifizierung der Tumorlast über verschiedene Parameter 	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Sensitivität nur bei hohem Kostenaufwand • Geringere Detektionsrate als QIZ, falsch-negative Fälle • Problem der begrenzten Schnittebenen
QIZ	<ul style="list-style-type: none"> • Hohe Sensibilität / Detektionsrate bei relativ geringem Kostenaufwand • Repräsentiert gesamten WLK, keine Schnittebenen • Einfache Quantifizierung über DCCD • Korrelation mit Histopathologie ($r_s=0,692$) und Tumordicke ($r_s=0,324$) • Morphologische Beurteilung einzelner Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Lokalisationsangabe, weitere Charakteristika des LK • Verblasste Präparate, falsch-Negative • Hoher Zeitaufwand • Bisher kaum Langzeitdaten und Vergleichsstudien.

5 Zusammenfassung

Das maligne Melanom (MM) ist der Tumor mit dem weltweit stärksten Inzidenzanstieg in den letzten 50 Jahren und die am häufigsten tödlich verlaufende Hauterkrankung¹⁵⁷. Für ein akkurates Staging wird dabei auch der sogenannte Wächterlymphknoten (WLK), der erste Lymphknoten (LK) in den die aus dem Tumorgebiet drainierte Lymphe und darin enthaltene Melanomzellen gelangen, berücksichtigt. Bei metastatischem Befall des WLK wird der Patient dem Stadium III (5-Jahres-Überleben 77% vs. >90% ohne LK-Metastasen³⁰) zugeordnet und sollte eine Lymphknotendisektion (CLND) sowie adjuvante Therapie erhalten. Die Histopathologie (HP) als Goldstandard für die Untersuchung des WLK steht jedoch vor dem Dilemma, dass durch eine hohe Anzahl an Gewebeschnitten und spezifischen Färbungen zwar die Detektionsrate an Tumorzellen steigt, eine so kosten- und zeitaufwendige Untersuchung sich in vielen Institutionen jedoch nicht praktisch umsetzen lässt. Ulmer et al. (2005) beschrieben daher erstmals die quantitative Immunzytologie (QIZ) als alternative Methode zur vollständigen Aufarbeitung des lymphatischen Gewebes⁷¹. Dazu wird das Lymphknotengewebe in eine Einzelzellsuspension überführt und in zwei Millionen HMB45 gefärbten Zellen die Anzahl an Tumorzellen pro einer Millionen Zellen, der sogenannte DCCD (disseminated cancer cell density) mikroskopisch bestimmt. In Tübingen werden bei WLK-Biopsien entnommene LKs inzwischen routinemäßig halbiert und je zur Hälfte histopathologisch und immunzytologisch befundet, von welchen wiederum 1207 WLKs von 907 Patienten in vorliegender Arbeit weiter untersucht wurden (Entnahmezeitraum Januar 2013 – September 2017). Ziel vorliegender Arbeit war es zu evaluieren, ob (1.) diese neue Methode der Immunzytologie für die Untersuchung von WLKs beim Melanom geeignet ist und (2.) eine Empfehlung für den breiten Einsatz als Ergänzung oder gar Ersatz der Histopathologie ausgesprochen werden kann. Hierfür wurde in allen LK-Schnitten mit histopathologisch nachgewiesener Metastasierung der maximale Durchmesser der größten Metastase mikroskopisch vermessen. Zudem wurden aus archiviertem Gewebe initial nur immunzytologisch positiver LKs neue Stufenschnitte unterschiedlicher Distanz zur initialen Schnittfläche und unter Verwendung verschiedener Färbungen (HE, HMB45, MelanA) hergestellt, auf Tumorzellen reevaluiert und bezüglich Positivitätsrate und Aufwand verglichen. Korrelationsanalysen nach Spearman zu einem Zusammenhang zwischen dem maximalen Metastasendurchmesser und dem DCCD desselben LKs, sowie

Analysen zu einem Zusammenhang dieser beiden Messungen zur Dicke des Primärtumors, dem wichtigsten prognostischen Faktor, wurden durchgeführt. Die Detektionsrate der histopathologischen Untersuchung von Tumorzellen in 12 % unserer Patienten ist konkordant mit Werten der Literatur, liegt jedoch deutlich unter der Rate der QIZ von 24 %⁸⁵. Immunzytologisch fehlinterpretierte HMB45-positive benignen Zellen in LKs sind selten, wahrscheinlicher ist eine ungleichmäßige Verteilung der Tumorzellen im WLK und damit auf die den beiden Untersuchungen zugänglichen LK-Hälften^{64,149}. Ebenfalls möglich sind falsch negative Befunde der Histopathologie, die wir bei 23 % der Patienten durch die Anfertigung zusätzlicher Gewebeschnitte und einer so nachträglich detektierten Tumorzellaussaat in den WLK bestätigen konnten. Die Positivitätsrate stieg dabei mit zunehmender Anzahl der Schnitte und spezifischen Färbungen: Drei zusätzliche HE-Färbungen zeigten in 14 %, 4 Schnitte mit HMB45 und MelanA in 31 % und 6 immunhistochemischen Färbungen in 42 % der nachgeschnittenen Patienten eine Metastasierung - allerdings auch mit einem Kostenzuwachs auf knapp 80 €/WLK. Zurecht kritisiert werden kann die unterschiedliche Fallzahl und medianen DCCDs der drei Nachschnitt-Kollektive, weshalb ein direkter Vergleich mit Vorsicht zu betrachten ist. Unsere Korrelationsanalysen bestätigten erstmals einen signifikanten, starken Zusammenhang zwischen dem Metastasendurchmesser und dem DCCD ($r_s=0,692$, $p<0,05$) und konsolidieren somit letzteren als adäquaten Parameter für die Tumorlast im WLK. Ein signifikanter, allerdings moderater Zusammenhang zur Tumordicke nach Breslow konnte sowohl für den DCCD als auch den maximalen Durchmesser bestätigt werden ($r_s=0,324$ (DCCD) bzw. $0,355$ (Metastasengröße), $p<0,05$). Eine mit zunehmender Tumordicke fortschreitende Dissemination von Tumorzellen ins lymphatische Gewebe spiegelt sich also nicht nur in der bereits beschriebenen Metastasengröße, sondern auch im DCCD wider. Damit kann ein direkter prognostischer Wert für das Überleben zwar nicht bestätigt werden, lässt sich nun jedoch auch für den DCCD vermuten. Zusammenfassend sprechen die hohe Detektionsrate, sowie die Validierung des DCCD durch die starke Korrelation zum maximalen Metastasendurchmesser dafür, dass die QIZ eine geeignete Methode zur Untersuchung von WLKs beim MM ist. Verbesserungsbedarf besteht insbesondere im Einsatz weiterer melanomspezifischer Färbungen und einer Automatisierung der Arbeitsabläufe. Ein breiter Einsatz ist besonders für Einrichtungen zu empfehlen, deren Kapazitäten für eine detaillierte histopathologische Untersuchung

der WLKs begrenzt sind. Ebenso könnte man in Tübingen überlegen, einen größeren Anteil des LK-Gewebes in die immunzytologische Untersuchung zu geben, um damit deren Repräsentativität weiter zu erhöhen. Nicht empfehlen können wir aktuell den vollständigen Ersatz der histopathologischen Untersuchung durch die QIZ, zum einen wegen fehlender Langzeitdaten, insbesondere aber aufgrund der Histologie als Basis für Staging, Studieneinschluss und Therapie.

6 Literaturverzeichnis

1. Neagu M, Constantin C, Manda G, Margaritescu I. Biomarkers of metastatic melanoma. *Biomark Med.* 2009;3(1):71-89.
2. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.2: Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF; 2019 [04.04.2020]. Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leit-linien/melanom/>.
3. Rassner G. *Dermatologie Lehrbuch und Atlas.* 9 ed. Tuebingen: Urban und Fischer; 2009.
4. Altmeyer P, Peach V. *Enzyklopädie der Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin.* 2 ed: Springer; 2011.
5. Krebs in Deutschland für 2015/2016.: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg); 2019.
6. National Cancer Institute. *Cancer Stat Facts: Melanoma of the Skin* n.d. [Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>].
7. Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11 ed: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg); 2017.
8. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo.* 2014;28(6):1005-11.
9. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30.
10. Yamaguchi Y, Hearing VJ. Melanocytes and their diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(5).
11. Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *Faseb j.* 2007;21(4):976-94.
12. *Melanocytic tumors of the skin.* Davod E. Elder MF, George F. Murphy, MD, editor. Washington, DC: American Registry of Pathology (ARP) and Armed Forces Institute of Pathology (AFIP),; 2010.
13. Fritsch P, Schwarz T. *Dermatologie Venerologie: Grundlagen. Klinik. Atlas:* Springer-Verlag; 2018.
14. Regad T. Molecular and cellular pathogenesis of melanoma initiation and progression. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(21):4055-65.

15. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
16. Liu Y, Sheikh MS. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. *Mol Cell Pharmacol*. 2014;6(3):228.
17. Haluska FG, Tsao H, Wu H, Haluska FS, Lazar A, Goel V. Genetic alterations in signaling pathways in melanoma. *Clin Cancer Res*. 2006;12(7 Pt 2):2301s-7s.
18. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med*. 1999;340(17):1341-8.
19. Armstrong BK, Krickler A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B*. 2001;63(1-3):8-18.
20. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer*. 2005;41(14):2040-59.
21. Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol*. 2003;139(12):1620-4; discussion 4.
22. Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 1987;17(3):459-68.
23. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*. 2005;41(1):28-44.
24. Greene MH, Clark WH, Jr., Tucker MA, Kraemer KH, Elder DE, Fraser MC. High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann Intern Med*. 1985;102(4):458-65.
25. Manson JE, Rexrode KM, Garland FC, Garland CF, Weinstock MA. The case for a comprehensive national campaign to prevent melanoma and associated mortality. *Epidemiology*. 2000;11(6):728-34.
26. Leitlinienprogramm Onkologie: Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.1: Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF; 2018 [13.01.2019]. Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/melanom/>
27. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 2005;365(9460):687-701.
28. Batistatou A, Cook MG, Massi D, Group ESPDW. Histopathology report of cutaneous melanoma and sentinel lymph node in Europe: a web-based survey by the Dermatopathology Working Group of the European Society of Pathology. *Virchows Arch*. 2009;454(5):505-11.
29. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6199-206.
30. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(6):472-92.

31. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):93-9.
32. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;373(1):23-34.
33. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 2015;386(9992):444-51.
34. . !!! INVALID CITATION !!! [Morton, 2014 #43].
35. Ulmer A, Dietz K, Hodak I, Polzer B, Scheitler S, Yildiz M, et al. Quantitative measurement of melanoma spread in sentinel lymph nodes and survival. *PLoS Med.* 2014;11(2):e1001604.
36. Krag D, Weaver D, Ashikaga T, Moffat F, Klimberg VS, Shriver C, et al. The sentinel node in breast cancer--a multicenter validation study. *N Engl J Med.* 1998;339(14):941-6.
37. Reintgen D, Cruse CW, Wells K, Berman C, Fenske N, Glass F, et al. The orderly progression of melanoma nodal metastases. *Ann Surg.* 1994;220(6):759-67.
38. Virchow R. *Die krankhaften Geschwü lste* (Berlin: August Hirschwald). 1863.
39. Virchow R. *Cellular pathology*. 1859 special ed., 204-207 John Churchill London. UK, available at Project Gutenberg (co-authored by Virchow with Tomás Comyn, Fedor Jagor, and Chas Wilkes). 1978.
40. Snow H. Melanotic cancerous disease. *Lancet.* 1892;2(872):1892-874.
41. Neuhaus SJ, Clark MA, Thomas JM. Dr. Herbert Lumley Snow, MD, MRCS (1847-1930): the original champion of elective lymph node dissection in melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2004;11(9):875-8.
42. Halsted WS. I. The Results of Operations for the Cure of Cancer of the Breast Performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. *Ann Surg.* 1894;20(5):497-555.
43. Nieweg OE, Uren RF, Thompson JF. The history of sentinel lymph node biopsy. *Cancer J.* 2015;21(1):3-6.
44. 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;127(4):392-9.
45. Tardelli E, Mazzarri S, Rubello D, Gennaro M, Fantechi L, Duce V, et al. Sentinel Lymph Node Biopsy in Cutaneous Melanoma: Standard and New Technical Procedures and Clinical Advances. A Systematic Review of the Literature. *Clin Nucl Med.* 2016;41(12):e498-e507.
46. Morton DL, Thompson JF, Essner R, Elashoff R, Stern SL, Nieweg OE, et al. Validation of the accuracy of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early-stage melanoma: a multicenter trial. Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial Group. *Ann Surg.* 1999;230(4):453-63; discussion 63-5.

47. Niebling MG, Pleijhuis RG, Bastiaannet E, Brouwers AH, van Dam GM, Hoekstra HJ. A systematic review and meta-analyses of sentinel lymph node identification in breast cancer and melanoma, a plea for tracer mapping. *Eur J Surg Oncol*. 2016;42(4):466-73.
48. McMasters KM, Reintgen DS, Ross MI, Wong SL, Gershenwald JE, Krag DN, et al. Sentinel lymph node biopsy for melanoma: how many radioactive nodes should be removed? *Ann Surg Oncol*. 2001;8(3):192-7.
49. Cochran AJ, Huang RR, Lee J, Itakura E, Leong SP, Essner R. Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(9):659-70.
50. Wong SL, Faries MB, Kennedy EB, Agarwala SS, Akhurst TJ, Ariyan C, et al. Sentinel Lymph Node Biopsy and Management of Regional Lymph Nodes in Melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2017;Jco2017757724.
51. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Nieweg OE, Roses DF, et al. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. *N Engl J Med*. 2014;370(7):599-609.
52. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R, Essner R, et al. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med*. 2006;355(13):1307-17.
53. Leiter U, Stadler R, Mauch C, Hohenberger W, Brockmeyer N, Berking C, et al. Complete lymph node dissection versus no dissection in patients with sentinel lymph node biopsy positive melanoma (DeCOG-SLT): a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):757-67.
54. Nagaraja V, Eslick GD. Is complete lymph node dissection after a positive sentinel lymph node biopsy for cutaneous melanoma always necessary? A meta-analysis. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2013;39(7):669-80.
55. Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, Andtbacka RH, Mozzillo N, Zager JS, et al. Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med*. 2017;376(23):2211-22.
56. Urist MM, Maddox WA, Kennedy JE, Balch CM. Patient risk factors and surgical morbidity after regional lymphadenectomy in 204 melanoma patients. *Cancer*. 1983;51(11):2152-6.
57. Moody J, Botham S, Dahill K, Wallace D, Hardwicke J. Complications following completion lymphadenectomy versus therapeutic lymphadenectomy for melanoma—A systematic review of the literature. *European Journal of Surgical Oncology*. 2017;43(9):1760-7.
58. Van der Ploeg A, Van Akkooi A, Rutkowski P, Nowecki ZI, Michej W, Mitra A, et al. Prognosis in patients with sentinel node-positive melanoma is accurately defined by the combined Rotterdam tumor load and Dewar topography criteria. *J Clin Oncol*. 2011;29(16):2206-14.
59. 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;17(10):1578-85.

60. Garbe C, Eigentler TK, Bauer J, Blodorn-Schlicht N, Fend F, Hantschke M, et al. Histopathological diagnostics of malignant melanoma in accordance with the recent AJCC classification 2009: Review of the literature and recommendations for general practice. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2011;9(9):690-9.
61. Coit DG, Andtbacka R, Bichakjian CK, Dilawari RA, Dimaio D, Guild V, et al. Melanoma. *J Natl Compr Canc Netw.* 2009;7(3):250-75.
62. 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;19(16):3635-48.
63. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Ding S, Byrd DR, et al. Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: comparison of nodal micrometastases versus macrometastases. *J Clin Oncol.* 2010;28(14):2452-9.
64. Abrahamsen HN, Hamilton-Dutoit SJ, Larsen J, Steiniche T. Sentinel lymph nodes in malignant melanoma: extended histopathologic evaluation improves diagnostic precision. *Cancer.* 2004;100(8):1683-91.
65. de Vries TJ, Smeets M, de Graaf R, Hou-Jensen K, Brocker EB, Renard N, et al. Expression of gp100, MART-1, tyrosinase, and S100 in paraffin-embedded primary melanomas and locoregional, lymph node, and visceral metastases: implications for diagnosis and immunotherapy. A study conducted by the EORTC Melanoma Cooperative Group. *J Pathol.* 2001;193(1):13-20.
66. Scolyer RA, Murali R, Satzger I, Thompson JF. The detection and significance of melanoma micrometastases in sentinel nodes. *Surg Oncol.* 2008;17(3):165-74.
67. Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol.* 2008;35(5):433-44.
68. Starz H. Pathology of the sentinel lymph node in melanoma. *Semin Oncol.* 2004;31(3):357-62.
69. Spanknebel K, Coit DG, Bieligg SC, Gonen M, Rosai J, Klimstra DS. Characterization of micrometastatic disease in melanoma sentinel lymph nodes by enhanced pathology: recommendations for standardizing pathologic analysis. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(3):305-17.
70. Mahmood MN, Lee MW, Linden MD, Nathanson SD, Hornyak TJ, Zarbo RJ. Diagnostic value of HMB-45 and anti-Melan A staining of sentinel lymph nodes with isolated positive cells. *Mod Pathol.* 2002;15(12):1288-93.
71. Ulmer A, Fischer JR, Schanz S, Sotlar K, Breuninger H, Dietz K, et al. Detection of melanoma cells displaying multiple genomic changes in histopathologically negative sentinel lymph nodes. *Clin Cancer Res.* 2005;11(15):5425-32.
72. Cochran AJ, Ohsie SJ, Binder SW. Pathobiology of the sentinel node. *Curr Opin Oncol.* 2008;20(2):190-5.
73. Mohamed A, Gonzalez RS, Lawson D, Wang J, Cohen C. Tumor stem cells (CD271, c-kit, SOX10) in Melanomas: prognostic and outcome implications. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014;22(2):142-5.

74. Shakhova O, Zingg D, Schaefer SM, Hari L, Civenni G, Blunsch J, et al. Sox10 promotes the formation and maintenance of giant congenital naevi and melanoma. *Nat Cell Biol.* 2012;14(8):882-90.
75. Mohamed A, Gonzalez RS, Lawson D, Wang J, Cohen C. SOX10 expression in malignant melanoma, carcinoma, and normal tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2013;21(6):506-10.
76. Shin J, Vincent JG, Cuda JD, Xu H, Kang S, Kim J, et al. Sox10 is expressed in primary melanocytic neoplasms of various histologies but not in fibrohistiocytic proliferations and histiocytoses. *J Am Acad Dermatol.* 2012;67(4):717-26.
77. Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. Sox10: a pan-schwannian and melanocytic marker. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(9):1291-8.
78. Ramos-Herberth FI, Karamchandani J, Kim J, Dadras SS. SOX10 immunostaining distinguishes desmoplastic melanoma from excision scar. *J Cutan Pathol.* 2010;37(9):944-52.
79. Cochran AJ, Balda BR, Starz H, Bachter D, Krag DN, Cruse CW, et al. The Augsburg Consensus. Techniques of lymphatic mapping, sentinel lymphadenectomy, and completion lymphadenectomy in cutaneous malignancies. *Cancer.* 2000;89(2):236-41.
80. Yu LL, Flotte TJ, Tanabe KK, Gadd MA, Cosimi AB, Sober AJ, et al. Detection of microscopic melanoma metastases in sentinel lymph nodes. *Cancer.* 1999;86(4):617-27.
81. Vuylsteke RJ, Borgstein PJ, van Leeuwen PA, Gietema HA, Molenkamp BG, Stadius Muller MG, et al. Sentinel lymph node tumor load: an independent predictor of additional lymph node involvement and survival in melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2005;12(6):440-8.
82. Lee JH, Essner R, Torisu-Itakura H, Wanek L, Wang H, Morton DL. Factors predictive of tumor-positive nonsentinel lymph nodes after tumor-positive sentinel lymph node dissection for melanoma. *J Clin Oncol.* 2004;22(18):3677-84.
83. 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;22(16):3345-9.
84. Murali R, Cochran AJ, Cook MG, Hillman JD, Karim RZ, Moncrieff M, et al. Interobserver reproducibility of histologic parameters of melanoma deposits in sentinel lymph nodes: implications for management of patients with melanoma. *Cancer.* 2009;115(21):5026-37.
85. van Akkooi AC, de Wilt JH, Verhoef C, Graveland WJ, van Geel AN, Kliffen M, et al. High positive sentinel node identification rate by EORTC melanoma group protocol. Prognostic indicators of metastatic patterns after sentinel node biopsy in melanoma. *Eur J Cancer.* 2006;42(3):372-80.
86. Govindarajan A, Ghazarian DM, McCreedy DR, Leong WL. Histological features of melanoma sentinel lymph node metastases associated with status of the completion lymphadenectomy and rate of subsequent relapse. *Ann Surg Oncol.* 2007;14(2):906-12.

87. Satzger I, Volker B, Meier A, Schenck F, Kapp A, Gutzmer R. Prognostic significance of isolated HMB45 or Melan A positive cells in Melanoma sentinel lymph nodes. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(8):1175-80.
88. de Wilt JH, van Akkooi AC, Verhoef C, Eggermont AM. Detection of melanoma micrometastases in sentinel nodes - the cons. *Surg Oncol.* 2008;17(3):175-81.
89. Scheri RP, Essner R, Turner RR, Ye X, Morton DL. Isolated tumor cells in the sentinel node affect long-term prognosis of patients with melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2007;14(10):2861-6.
90. Ollila DW, Ashburn JH, Amos KD, Yeh JJ, Frank JS, Deal AM, et al. Metastatic melanoma cells in the sentinel node cannot be ignored. *J Am Coll Surg.* 2009;208(5):924-9; discussion 9-30.
91. McMasters KM, Noyes RD, Reintgen DS, Goydos JS, Beitsch PD, Davidson BS, et al. Lessons learned from the Sunbelt Melanoma Trial. *J Surg Oncol.* 2004;86(4):212-23.
92. Murali R, Desilva C, Thompson JF, Scolyer RA. Non-Sentinel Node Risk Score (N-SNORE): a scoring system for accurately stratifying risk of non-sentinel node positivity in patients with cutaneous melanoma with positive sentinel lymph nodes. *J Clin Oncol.* 2010;28(29):4441-9.
93. Satzger I, Volker B, Meier A, Kapp A, Gutzmer R. Criteria in sentinel lymph nodes of melanoma patients that predict involvement of nonsentinel lymph nodes. *Ann Surg Oncol.* 2008;15(6):1723-32.
94. Cook MG, Green MA, Anderson B, Eggermont AM, Ruiter DJ, Spatz A, et al. The development of optimal pathological assessment of sentinel lymph nodes for melanoma. *J Pathol.* 2003;200(3):314-9.
95. Gogel BM, Kuhn JA, Ferry KM, Fisher TL, Preskitt JT, O'Brien JC, et al. Sentinel lymph node biopsy for melanoma. *Am J Surg.* 1998;176(6):544-7.
96. van der Ploeg AP, van Akkooi AC, Schmitz PI, Koljenovic S, Verhoef C, Eggermont AM. EORTC Melanoma Group sentinel node protocol identifies high rate of submicrometastases according to Rotterdam Criteria. *Eur J Cancer.* 2010;46(13):2414-21.
97. van Diest PJ. Histopathological workup of sentinel lymph nodes: how much is enough? *J Clin Pathol.* 1999;52(12):871-3.
98. Messina JL, Glass LF, Cruse CW, Berman C, Ku NK, Reintgen DS. Pathologic examination of the sentinel lymph node in malignant melanoma. *Am J Surg Pathol.* 1999;23(6):686-90.
99. Li W, Stall A, Shivers SC, Lin J, Haddad F, Messina J, et al. Clinical relevance of molecular staging for melanoma: comparison of RT-PCR and immunohistochemistry staining in sentinel lymph nodes of patients with melanoma. *Ann Surg.* 2000;231(6):795-803.
100. Scolyer RA, Thompson JF, McCarthy SW. Sentinel lymph nodes in malignant melanoma: extended histopathologic evaluation improves diagnostic precision. *Cancer.* 2004;101(9):2141-2; author reply 2-3.
101. Cole CM, Ferringer T. Histopathologic evaluation of the sentinel lymph node for malignant melanoma: the unstandardized process. *Am J Dermatopathol.* 2014;36(1):80-7.

102. Bieligm SC, Ghossein R, Bhattacharya S, Coit DG. Detection of tyrosinase mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in melanoma sentinel nodes. *Ann Surg Oncol*. 1999;6(3):232-40.
103. Wang X, Heller R, VanVoorhis N, Cruse CW, Glass F, Fenske N, et al. Detection of submicroscopic lymph node metastases with polymerase chain reaction in patients with malignant melanoma. *Ann Surg*. 1994;220(6):768-74.
104. Abrahamsen HN, Sorensen BS, Nexø E, Hamilton-Dutoit SJ, Larsen J, Steiniche T. Pathologic assessment of melanoma sentinel nodes: a role for molecular analysis using quantitative real-time reverse transcription-PCR for MART-1 and tyrosinase messenger RNA. *Clin Cancer Res*. 2005;11(4):1425-33.
105. Ghossein RA, Rosai J. Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells. *Cancer*. 1996;78(1):10-6.
106. 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;17(10):3238-44.
107. Cook MG, Green MA, Anderson B, Eggermont AM, Ruitter DJ, Spatz A, et al. The development of optimal pathological assessment of sentinel lymph nodes for melanoma. *The Journal of pathology*. 2003;200(3):314-9.
108. Starz H, Haas CJ, Schulz GM, Balda BR. Tyrosinase RT-PCR as a supplement to histology for detecting melanoma and nevus cells in paraffin sections of sentinel lymph nodes. *Mod Pathol*. 2003;16(9):920-9.
109. Riber-Hansen R, Hastrup N, Clemmensen O, Behrendt N, Klausen S, Ramsing M, et al. Treatment influencing down-staging in EORTC Melanoma Group sentinel node histological protocol compared with complete step-sectioning: a national multicentre study. *Eur J Cancer*. 2012;48(3):347-52.
110. Riber-Hansen R, Nyengaard JR, Hamilton-Dutoit SJ, Steiniche T. Stage migration after minor changes in histologic estimation of tumor burden in sentinel lymph nodes: the protocol trap. *Cancer*. 2009;115(10):2177-87.
111. Hellmich L. Durchflusszytometrische Diagnostik von Mikrometastasen im Wächterlymphknoten von Patienten mit malignem Melanom: Eberhard Karls Universität Tübingen; 2016.
112. Bortz J, Schuster C. Statistik für Human-und Sozialwissenschaftler: Limitierte Sonderausgabe: Springer-Verlag; 2011.
113. van Akkooi AC, Voit CA, Verhoef C, Eggermont AM. New developments in sentinel node staging in melanoma: controversies and alternatives. *Curr Opin Oncol*. 2010;22(3):169-77.
114. 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;280(16):1410-5.
115. Messina JL, Glass LF, Cruse CW, Berman C, Ku NK, Reintgen DS. Pathologic Examination of the Sentinel Lymph Node in Malignant Melanoma. *The American Journal of Surgical Pathology*. 1999;23(6):686-90.

116. Blaheta HJ, Ellwanger U, Schittek B, Sotlar K, MacZey E, Breuninger H, et al. Examination of regional lymph nodes by sentinel node biopsy and molecular analysis provides new staging facilities in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2000;114(4):637-42.
117. van der Velde-Zimmermann D, Schipper MEI, Weger RAd, Hennipman A, Rinkes IHMB. Sentinel Node Biopsies in Melanoma Patients: A Protocol for Accurate, Efficient, and Cost-Effective Analysis by Preselection for Immunohistochemistry on the Basis of Tyr-PCR. *Annals of Surgical Oncology.* 2000;7(1):51-4.
118. Staius Muller MG, Van Leeuwen PA, de Lange-de Klerk ESM, Van Diest PJ, Pijpers R, Ferwerda CC, et al. The sentinel lymph node status is an important factor for predicting clinical outcome in patients with stage I or II cutaneous melanoma. *Cancer.* 2001;91(12):2401-8.
119. Morton DL, Wen D-R, Cochran AJ. Management of early-stage melanoma by intraoperative lymphatic mapping and selective lymphadenectomy: an alternative to routine elective lymphadenectomy or "watch and wait". *Surgical Oncology Clinics.* 1992;1(2):247-59.
120. Cochran AJ, Roberts A, Wen DR, Huang RR, Itakura E, Luo F, et al. Update on lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the management of patients with melanocytic tumours. *Pathology.* 2004;36(5):478-84.
121. Gietema HA, Vuylsteke RJ, de Jonge IA, van Leeuwen PA, Molenkamp BG, van der Sijp JR, et al. Sentinel lymph node investigation in melanoma: detailed analysis of the yield from step sectioning and immunohistochemistry. *J Clin Pathol.* 2004;57(6):618-20.
122. Murali R, DeSilva C, McCarthy SW, Thompson JF, Scolyer RA. Sentinel lymph nodes containing very small (<0.1 mm) deposits of metastatic melanoma cannot be safely regarded as tumor-negative. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(4):1089-99.
123. Scheri RP, Essner R, Turner RR, Ye X, Morton DL. Isolated Tumor Cells in the Sentinel Node Affect Long-Term Prognosis of Patients with Melanoma. *Annals of Surgical Oncology.* 2007;14(10):2861-6.
124. Reeves ME, Delgado R, Busam KJ, Brady MS, Coit DG. Prediction of nonsentinel lymph node status in melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2003;10(1):27-31.
125. Gershenwald JE, Thompson W, Mansfield PF, Lee JE, Colome MI, Tseng C-h, et al. Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. *Journal of Clinical Oncology.* 1999;17(3):976-.
126. Fournier K, Schiller A, Perry RR, Laronga C. Micrometastasis in the sentinel lymph node of breast cancer does not mandate completion axillary dissection. *Annals of surgery.* 2004;239(6):859.
127. Rutgers E. Sentinel node micrometastasis in breast cancer. *British journal of surgery.* 2004;91(10):1241-2.
128. Gershenwald JE, Thompson W, Mansfield PF, Lee JE, Colome MI, Tseng CH, et al. Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. *J Clin Oncol.* 1999;17(3):976-83.

129. Balch CM, Soong S-J, 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. *Journal of clinical oncology*. 2001;19(16):3622-34.
130. Ranieri JM, Wagner JD, Azuaje R, Davidson D, Wenck S, Fyffe J, et al. Prognostic importance of lymph node tumor burden in melanoma patients staged by sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol*. 2002;9(10):975-81.
131. van Akkooi AC, Nowecki ZI, Voit C, Schafer-Hesterberg G, Michej W, de Wilt JH, et al. Sentinel node tumor burden according to the Rotterdam criteria is the most important prognostic factor for survival in melanoma patients: a multicenter study in 388 patients with positive sentinel nodes. *Ann Surg*. 2008;248(6):949-55.
132. van der Ploeg AP, van Akkooi AC, Haydu LE, Scolyer RA, Murali R, Verhoef C, et al. The prognostic significance of sentinel node tumour burden in melanoma patients: an international, multicenter study of 1539 sentinel node-positive melanoma patients. *Eur J Cancer*. 2014;50(1):111-20.
133. Riber-Hansen R, Sjoegren P, Hamilton-Dutoit SJ, Steiniche T. Extensive pathological analysis of selected melanoma sentinel lymph nodes: high metastasis detection rates at reduced workload. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(5):1492-501.
134. Cook MG, Massi D, Szumera-Ciećkiewicz A, Van den Oord J, Blokk W, van Kempen LC, et al. An updated European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) protocol for pathological evaluation of sentinel lymph nodes for melanoma. *European Journal of Cancer*. 2019;114:1-7.
135. Prieto VG. Sentinel lymph nodes in cutaneous melanoma: handling, examination, and clinical repercussion. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2010;134(12):1764-9.
136. Scolyer RA, Li L-XL, McCarthy SW, Shaw HM, Stretch JR, Sharma R, et al. Micromorphometric features of positive sentinel lymph nodes predict involvement of nonsentinel nodes in patients with melanoma. *American journal of clinical pathology*. 2004;122(4):532-9.
137. van Akkooi AC, Spatz A, Eggermont AM, Mihm M, Cook MG. Expert opinion in melanoma: the sentinel node; EORTC Melanoma Group recommendations on practical methodology of the measurement of the microanatomic location of metastases and metastatic tumour burden. *Eur J Cancer*. 2009;45(16):2736-42.
138. Möller M. Stellenwert der quantitativen Immunzytologie für das Staging von Melanompatienten: Eberhard Karls Universität zu Tübingen; 2017.
139. Cochran AJ. Surgical pathology remains pivotal in the evaluation of 'sentinel' lymph nodes. *Am J Surg Pathol*. 1999;23(10):1169-72.
140. McCarthy SW, Scolyer RA, Palmer AA. Desmoplastic melanoma: a diagnostic trap for the unwary. *Pathology*. 2004;36(5):445-51.
141. Kucher C, Zhang PJ, Pasha T, Elenitsas R, Wu H, Ming ME, et al. Expression of Melan-A and Ki-67 in desmoplastic melanoma and desmoplastic nevi. *The American journal of dermatopathology*. 2004;26(6):452-7.

142. Bublak R. Desmoplastisches oder Spindelzell-Melanom? Im Focus Onkologie. 2013;16(12):40-.
143. Cochran AJ, Wen DR, Morton DL. Occult tumor cells in the lymph nodes of patients with pathological stage I malignant melanoma. An immunohistological study. *Am J Surg Pathol.* 1988;12(8):612-8.
144. Roberts A, Cochran A. Current management of sentinel lymph nodes: perspectives from pathology. *Current Diagnostic Pathology.* 2003;9(3):199-210.
145. Gown AM, Vogel AM, Hoak D, Gough F, McNutt MA. Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am J Pathol.* 1986;123(2):195-203.
146. Colombari R, Bonetti F, Zamboni G, Scarpa A, Marino F, Tomezzoli A, et al. Distribution of melanoma specific antibody (HMB-45) in benign and malignant melanocytic tumours. An immunohistochemical study on paraffin sections. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1988;413(1):17-24.
147. Lohmann CM, Iversen K, Jungbluth AA, Berwick M, Busam KJ. Expression of Melanocyte Differentiation Antigens and Ki-67 in Nodal Nevi and Comparison of Ki-67 Expression With Metastatic Melanoma. *The American Journal of Surgical Pathology.* 2002;26(10):1351-7.
148. Baisden BL, Askin FB, Lange JR, Westra WH. HMB-45 immunohistochemical staining of sentinel lymph nodes: a specific method for enhancing detection of micrometastases in patients with melanoma. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(8):1140-6.
149. Carson KF, Wen D-R, Li P-X, Lana AM-A, Bailly C, Morton DL, et al. Nodal Nevi and Cutaneous Melanomas. *The American Journal of Surgical Pathology.* 1996;20(7):834-40.
150. Ridolfi RL, Rosen PP, Thaler H. Nevus cell aggregates associated with lymph nodes: estimated frequency and clinical significance. *Cancer.* 1977;39(1):164-71.
151. Karimipour DJ, Lowe L, Su L, Hamilton T, Sondak V, Johnson TM, et al. Standard immunostains for melanoma in sentinel lymph node specimens: which ones are most useful? *J Am Acad Dermatol.* 2004;50(5):759-64.
152. Murali R, DeSilva C, McCarthy SW, Thompson JF, Scolyer RA. Sentinel Lymph Nodes Containing Very Small (<0.1 mm) Deposits of Metastatic Melanoma Cannot Be Safely Regarded as Tumor-Negative. *Annals of Surgical Oncology.* 2012;19(4):1089-99.
153. Cohen J. A power primer. *Psychological bulletin.* 1992;112(1):155.
154. Riber-Hansen R, Nyengaard JR, Hamilton-Dutoit SJ, Steiniche T. The nodal location of metastases in melanoma sentinel lymph nodes. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(10):1522-8.
155. Riker AI, Enkemann SA, Fodstad O, Liu S, Ren S, Morris C, et al. The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis. *BMC medical genomics.* 2008;1(1):13.
156. Schilling D, Hennenlotter J, Sotlar K, Kuehs U, Senger E, Nagele U, et al. Quantification of tumor cell burden by analysis of single cell lymph node

- disaggregates in metastatic prostate cancer. *The Prostate*. 2010;70(10):1110-8.
157. Fritsch P, Schwarz T. Neoplasien (Tumoren) und tumorähnliche Läsionen der Haut. *Dermatologie Venerologie: Grundlagen Klinik Atlas*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 713-871.

7 Verzeichnisse

7.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung des Lymphabflusses. Dieser erfolgt vom Primärtumor der Haut über die afferenten Lymphgefäße zunächst in den WLK und anschließend ins regionäre Lymphabflussgebiet. Entsprechende zeitliche Verteilung des radioaktiven und blauen Markers bei der Lymposzintigraphie (aus Cochran et al. 2006)⁴⁹.</i>	17
<i>Abbildung 2: HMB45-positive Zellen mit typischer Tumorzellmorphologie. Die Zellen sind deutlich größer als die umliegenden Lymphozyten und besitzen einen vergrößerten, hypochromatischen Zellkern. 40-fache Vergrößerung. A: LK-Nr.26235/17, DCCD=1823. B: LK-Nr. 4552/17, DCCD=143.</i>	28
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung der drei Protokolle an einer WLK-Hälfte. Zu sehen ist die Verteilung der verschiedenen Stufen von der zentralen Schnittfläche aus.</i>	33
<i>Abbildung 4: Box-Plot der Altersverteilung der 907 Patienten bei WLK-Entnahme.</i>	38
<i>Abbildung 5: Lokalisation der WLK-Biopsie, n=907.</i>	39
<i>Abbildung 6: Anzahl der entnommenen WLKs pro Patient, n=907.</i>	39
<i>Abbildung 7: T-Klassifikation der 903 Primärtumoren nach AJCC 2017.</i>	41
<i>Abbildung 9: N-Klassifikation nach immunzytologischer Befundung nach AJCC 2017, n=907.</i>	41
<i>Abbildung 8: N-Klassifikation nach histopathologischer Befundung nach AJCC 2017, n=907.</i>	41
<i>Abbildung 10: Stadium nach histopathologischem Befund nach AJCC 2017, n=907.</i>	42
<i>Abbildung 11: Stadium nach immunzytologischem Befund nach AJCC 2017, n=907.</i>	42
<i>Abbildung 12: LK-Nr. 11501/14, 10-fache Vergrößerung, Metastasendurchmesser 1,2 mm, DCCD=2130. A: Hämatoxylin-Eosin, B: HMB45-Färbung.</i>	48
<i>Abbildung 13: LK-Nr. 23758/15, 2,5-fache Vergrößerung, Metastasendurchmesser 4,1 mm, DCCD=10. A: HMB45-Färbung, B: MelanA-Färbung.</i>	48
<i>Abbildung 14: Beispiele für geringen (A) und ausgeprägten Tumorbefall des WLK (B). A: LK-Nr. 21483/17, HMB45-Färbung, 10-fache Vergrößerung, 28 ITZ, DCCD=8,5. B: LK-Nr.34307/16, HE-Färbung, 1,25-fache Vergrößerung, Metastasendurchmesser, 8 mm, DCCD=400.000.</i>	48
<i>Abbildung 15: Histopathologisches und immunzytologisches Präparat des LK 19631/17. Ausgeprägter Tumorbefall in beiden WLK-Hälften. A: HE, 1,25-fache Vergrößerung, 1,1mm. B: Ausschnitt. HE, 40-fache Vergrößerung. C: HMB45, 10-fache Vergrößerung, DCCD: 5728,5. D: Ausschnitt. HMB45, 20-fache Vergrößerung.</i>	57

Abbildung 16: Histopathologisches und immunzytologisches Präparat des LK 4552/17. Geringe Tumorinfiltration in beide Lymphknoten-Hälften. A: HMB45, 1,25-fache Vergrößerung, 14 ITZ. B: Ausschnitt. HMB45, 20-fache Vergrößerung. C: HMB45, 10-fache Vergrößerung, DCCD=142,5. D: Ausschnitt. HMB45, 40-fache Vergrößerung.	57
Abbildung 17: Korrelation DCCD - Metastasengröße aller 1205 WLK zu Studienbeginn, d.h. vor Anfertigung der Nachschnitte. DCCD in Tumorzellen/ 1 Million untersuchter Zellen.	58
Abbildung 18: Korrelation DCCD - Metastasengröße der 100 zu Studienbeginn doppelt positiven WLKs, vor Anfertigung der Nachschnitte. Veranschaulichung durch die best-fitting-line. DCCD in Tumorzellen/ 1 Million untersuchte Zellen.	59
Abbildung 19: Korrelation DCCD - Metastasengröße aller 1205 WLK zu Studienende, d.h. inklusive der Messungen der Nachschnitte. DCCD in Tumorzellen/ 1 Million untersuchte Zellen.	59
Abbildung 20: Korrelation DCCD - Metastasengröße der 127 zu Studienende doppelt positiven WLKs, d.h. inklusive der Nachschnitte. Veranschaulichung durch die best-fitting-line. DCCD in Tumorzellen/ 1 Million untersuchte Zellen.	60
Abbildung 21: Korrelation positiver DCCD und Tumordicke zu Studienende, n=218. Veranschaulicht durch eine logarithmische Achsenskalierung und die best-fitting-line.	61
Abbildung 22: Korrelation positive Metastasengröße und Tumordicke zu Studienende, n=134. Veranschaulicht durch eine logarithmische Achsenskalierung und die best-fitting-line.	62
Abbildung 23: Korrelation Tumordicke und DCCD bzw. Metastasengröße nur der doppelt positiven Patienten zu Studienende, n=118. Orange: R_s der Analyse DCCD – Tumordicke = 0,246 ($p > 0,05$). Grün: R_s der Analyse Metastasengröße – Tumordicke = 0,388 ($p < 0,05$). Veranschaulicht durch eine logarithmische Achsenskalierung und die best-fitting-line.	62
 7.2 Tabellenverzeichnis	
Tabelle 1: TNM-Klassifikation des malignen Melanoms nach der 8. Version des AJCC-Melanoma stagings (2017)³¹, Gershenwald et al. (2017)³⁰.	12
Tabelle 2: Pathologisches Stadium des malignen Melanoms nach der 8. Version des AJCC-Melanoma stagings (2017)³¹, Gershenwald (2017)³⁰.	13
Tabelle 3: In der immunzytologischen Untersuchung verwendete Geräte, Materialien, Reagenzien und Antikörper. Herstellerverzeichnis siehe Anhang.	24
Tabelle 4: In der histopathologischen Untersuchung verwendete Geräte, Materialien, Reagenzien und Antikörper. Herstellerverzeichnis siehe Anhang.	29
Tabelle 5: Protokoll 1. Darstellung der Abstände der drei Schnittebenen/-Stufen und der jeweils verwendeten Färbungen.	31
Tabelle 6: Protokoll 2. Darstellung der Abstände der drei Schnittebenen/-Stufen und der jeweils verwendeten Färbungen.	32
Tabelle 7: Protokoll 3. Darstellung der Abstände der zwei Schnittebenen/-Stufen und der jeweils verwendeten Färbungen.	32

Tabelle 8: Vierfeldertafel zur Verdeutlichung der Sensitivität und Spezifität diagnostischer Tests, sowie richtig- und falsch-Positivität bzw. –Negativität.	36
Tabelle 9: Verwendete Programme der deskriptiven Statistik, Korrelationsanalysen und der schriftlichen Dokumentation.	37
Tabelle 10: Baseline-Charakteristika des Studienkollektivs, n=907 Patienten.	40
Tabelle 11: Übersicht TNM-Klassifikation und Staging des Studienkollektivs (n=907 Patienten), gemäß AJCC 2017, alle Patienten M0.	43
Tabelle 12: 4-Feldertafel der 907 Patienten zu Studienbeginn, anhand histopathologischem und immunzytologischem WLK-Status.	44
Tabelle 13: 4-Feldertafel der 1205 WLKs zu Studienbeginn, anhand histopathologischem und immunzytologischem WLK-Status.	44
Tabelle 14: 4-Feldertafel der 907 Patienten zum Studienende (d.h. inkl. Nachschnitte), anhand histopathologischem und immunzytologischem WLK-Status.	45
Tabelle 15: 4-Feldertafel der 1205 WLK zu Studienende (d.h. inkl. Nachschnitte), anhand histopathologischem und immunzytologischem WLK-Status.	45
Tabelle 16: Ergebnisse der quantitativen Immunzytologie der 1205 Wächterlymphknoten, aktiv= messbare γ-Emission, blau= Blaufärbung des LK bei Entnahme.	46
Tabelle 17: Ergebnisse der histopathologischen Untersuchungen vor Anfertigung der Nachschnitte, n=1205, HE= Hämatoxylin&Eosin, IHC= Immunhistochemie, ITZ= isolierte Tumorzellen.	47
Tabelle 18: Vergleich DCCD, Metastasengröße und Tumordicke verschiedener Subgruppen: Doppelt positiv und negativ befundene LKs, sowie diskrepante Fälle. HP= Histopathologie, QIZ= quantitative Immunzytologie.	49
Tabelle 19: Übersicht DCCD, Metastasengröße und Tumordicke der immunzytologisch positiven, nachgeschnittenen Fälle: 133 WLK von 101 Patienten, HP=Histopathologie, QIZ=quantitative Immunzytologie.	51
Tabelle 20: Protokoll 1 - Positive WLKs. Die positiven Färbungen sind in der Tabelle grau hinterlegt.	52
Tabelle 21: Protokoll 2 - Positive WLK. Die positiven Färbungen sind in der Tabelle grau hinterlegt.	53
Tabelle 22: Protokoll 3 - Positive WLK. Die positiven Färbungen sind in der Tabelle grau hinterlegt.	54
Tabelle 23: Zeitaufwand der Histopathologie und quantitativen Immunzytologie. Zu großen Teilen auf Schätzungen fachkundiger Ärzte und Personals beruhend. HP=Histopathologie, QIZ=quantitative Immunzytologie, LTA= labortechnische*r Assistent*in.	55
Tabelle 24: Kostenaufwand der Histopathologie und der quantitativen Immunzytologie. Zu großen Teilen auf Schätzungen fachkundiger Ärzte und Personals beruhend. HP=Histopathologie, QIZ=quantitative Immunzytologie, OT=Objekträger.	55
Tabelle 25: Vergleich der drei Nachschnitt-Protokolle – Übersicht.	56
Tabelle 26: Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen DCCD und Metastasengröße. DCCD in Tumorzellen/ 1 Million untersuchte Zellen, Metastasengröße in mm. HP=Histopathologie, QIZ=quantitative Immunzytologie.	63

Tabelle 27: Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen der Tumordicke des Primärtumors und dem DCCD bzw. der Metastasengröße. Tumordicke in mm, DCCD in Tumorzellen/ 1 Million untersuchte Zellen, Metastasengröße in mm. HP=Histopathologie, QIZ=quantitative Immunzytologie. _____ 63

Tabelle 28: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile der Histopathologie (HP) und quantitativen Immunzytologie (QIZ). _____ 79

7.3 Hersteller der (Verbrauchs-) Materialien und Geräte

AppliChem	Darmstadt, Deutschland
BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Biochrom	Berlin, Deutschland
Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Dako (Agilent Technologies)	Hamburg, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
GE Healthcare	Chicago, USA
Gilson	Middleton, USA
Jenoptik	Jena, Deutschland
Klinipath	Duiven, Niederlande
Langenbrinck	Emmendingen, Deutschland
Leica	Nußloch, Deutschland
Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland
Matsunami	Bellingham, USA
Merck	Darmstadt, Deutschland
Nikon	Düsseldorf, Deutschland
Sakura	Staufen, Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
SAV LP GmbH	Flinnsbach, Deutschland
Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Thermo Fisher Scientific	Braunschweig, Deutschland
Universalapotheke	Tübingen, Deutschland
Ventana	Tucson, AZ, USA
VWR	Darmstadt, Deutschland
Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Zytomed Systems	Berlin, Deutschland

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Dissertation habe ich selbst verfasst und keine weiteren Hilfsmittel oder Literaturquellen verwendet als die angegebenen und als solche im Text gekennzeichneten.

Die Studie wurde gemeinsam mit Herr PD Dr. med. Hans Bösmüller (Pathologie Tübingen) und Frau Prof. Dr. med. Anja Ulmer (Dermatologie Tübingen) konzipiert und von diesen im gesamten Verlauf supervisiert und unterstützt. Herr Prof. Dr. med. Falko Fend übernahm die Position des Doktorvaters dieser Studie. Die Untersuchungen, welche im Institut für Pathologie und Neuropathologie Tübingen erfolgten, führte ich nach Einweisung der mit den Methoden vertrauten MTAs und Pathologen selbstständig durch. Die Rohdaten der quantitativen Immunzytologie standen mir in Form einer Exceltabelle

Danksagung

zur Verfügung, welche von mir mit den Daten der Pathologie, des Melanomregisters und den neu erhobenen Messungen zusammengeführt und ausgewertet wurden. Unterstützung bei den Korrelationsanalysen erhielt ich von Dr. Dr. med. Mihaly Sulyok (Pathologie Tübingen). Die initiale Untersuchung der WLKs dieses Studienkollektivs war zum Studienzeitpunkt bereits erfolgt.

Diese Arbeit wurde in keinem anderen universitären Promotionsverfahren im In- oder Ausland in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegt.

Tübingen, den 01.12.2020

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die zur Entstehung dieser Promotionsarbeit beigetragen und mich in meiner Arbeit auf verschiedene Weise unterstützt haben.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. Falko Fend, der es mir ermöglichte, meine Doktorarbeit unter ausgezeichneten Bedingungen am Institut für Pathologie der Universität Tübingen durchführen zu können.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herr PD Dr. med. Hans Bösmüller und Frau Prof. Dr. med. Anja Ulmer, für das Hinführen zur Thematik und Betreuen meiner Arbeit, vor allem aber dafür, dass sie stets Zeit für ein persönliches Treffen fanden, um den aktuellen Stand zu besprechen, mich zu beraten und ermuntern.

Einen herzlichen Dank auch an Karen Greif und Dennis Thiele, sowie allen anderen MTAs der Pathologie und Dermatologie, für ihre große Geduld dabei mir die Methoden beizubringen, alle meiner Fragen zu beantworten und dafür, dass ich neben ihnen meinen Platz im Labor finden durfte. Danke auch an Dr. Dr. med. Mihaly Sulyok für die statistische Unterstützung, Frau Keim vom Melanomregister und allen anderen, die nun nicht namentlich genannt wurden.

Zuletzt danke ich Antonio, meinen Schwestern und Eltern, die mich bei all meinen Vorhaben unterstützen, ermutigen und begleiten.