

Aus der dermatologischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Sergij Goerd)

Histologische Merkmale zur Klassifikation von Sentinel Lymphknoten
Metastasen und ihre Bedeutung für Patienten mit Malignen Melanomen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Cornelia Baum

aus
Heidelberg
2020

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Herr Prof. Dr. med. Cyrill Géraud

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
1 EINLEITUNG	5
1.1 Das Maligne Melanom	5
1.1.1 Klinisch-histologische Typen des Malignen Melanoms	5
1.1.2 Stadieneinteilung	6
1.1.3 Therapiemöglichkeiten.....	9
1.2 Der Sentinel Lymphknoten.....	11
1.2.1 Geschichte der Sentinel Lymphknoten Diagnostik.....	12
1.2.2 Anatomie des Lymphsystems	13
1.2.3 Technik zum Auffinden des Sentinel Lymphknotens.....	13
1.2.4 Klassifikation von Sentinel Lymphknoten Metastasen	15
1.3 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit.....	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Studiendesign und Patientenkollektiv.....	17
2.1.1 Datenerhebung Malignes Melanom und Sentinel Lymphknoten.....	17
2.2 Sentinel Lymphknoten Diagnostik und Gewebeaufarbeitung.....	19
2.3 Histopathologie.....	19
2.3.1 Histologische Klassifikationssysteme des Sentinel Lymphknoten	26
2.4 Follow up.....	28
2.5 Statistische Verfahren.....	29
3 ERGEBNISSE	30
3.1 Klinische Merkmale des Studienkollektivs.....	30
3.2 Histologische Merkmale des Malignen Melanoms	31
3.3 Histologische Merkmale der Sentinel Lymphknoten Metastasen	33
3.3.1 Größtes Tumornest in Größe und Zellzahl (Rotterdam).....	35
3.3.2 Eindringtiefe der Tumorzellen (Augsburg S).....	35
3.3.3 Art der Infiltration (Dewar).....	36
3.3.4 Mitoserate (SLN MR).....	37

3.3.5 Kombinierte Klassifikationssysteme (RDC/Hannover)	37
3.3.6 Neu erhobene Klassifikationssysteme (Rotterdam/Augsburg+Mitose) ..	38
3.3.7 Weitere erhobene Parameter.....	40
3.3.8 Follow up	40
3.4 Korrelation von histologischen Merkmalen des Sentinel Lymphknoten mit dem pT Stadium des Malignen Melanoms	41
3.5 Korrelation der Mitoserate des Sentinel Lymphknoten mit etablierten histologischen Parametern des Sentinel Lymphknoten.....	43
3.5.1 Bildung eines binären Scores für die SLN-MR	44
3.6 Univariable Korrelation von histologischen Merkmalen des Sentinel Lymphknoten mit dem krankheitsfreien Überleben	45
3.6.1 Multivariable Korrelationsanalyse (krankheitsfreies Überleben)	48
3.7 Univariable Korrelation von histologischen Merkmalen des Sentinel Lymphknoten mit dem melanomspezifischen Überleben	49
3.7.1 Multivariable Korrelationsanalyse (melanomspezifischen Überleben) ...	52
3.8 Univariable Korrelation von histologischen Merkmalen des Sentinel Lymphknoten mit dem Gesamtüberleben	53
3.8.1 Multivariable Korrelationsanalyse (Gesamtüberleben)	56
4 DISKUSSION	57
4.1 Eignet sich die Mitoserate des Sentinel Lymphknoten als prognostischer Marker?.....	58
4.2 Limitationen dieser Studie.....	61
4.3 Problemfälle	62
5 ZUSAMMENFASSUNG	63
6 LITERATURVERZEICHNIS	65
7 LEBENS LAUF	75
8 DANKSAGUNG	76

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SLN	=	Sentinel Lymphknoten (engl. sentinel lymph node)
SLND	=	Sentinel Lymphknoten Diagnostik (engl. sentinel lymph node diagnostics)
CLND	=	Komplette Lymphknoten Dissektion (engl. complete lymph node dissection)
MM	=	Malignes Melanom
NM	=	Primär nodulär Malignes Melanom
SSM	=	Superfiziell spreitendes Malignes Melanom
LMM	=	Lentigo-maligna Melanom
ALM	=	Akrolentiginöses Malignes Melanom
AJCC	=	American Joint Committee on Cancer
ICH	=	Immunhistochemie
H.E.	=	Hämatoxylin-Eosin
RDC	=	Rotterdam Dewar kombiniert (engl. Rotterdam Dewar combined)
LDH	=	Laktatdehydrogenase
SLN MR	=	Sentinel Lymphknoten Mitoserate
HPF	=	Gesichtsfeld (engl. high power field)
n.k.	=	nicht klassifizierbar
DDG	=	Deutsche Dermatologische Gesellschaft
ADO	=	Arbeitsgemeinschaft für Dermatologische Onkologie (ADO)
KI	=	Konfidenzintervall
n.s.	=	nicht signifikant

1 EINLEITUNG

1.1 Das Maligne Melanom

Das Maligne Melanom (MM) steht gegenwärtig im Zentrum der Dermato-Onkologie. Seine Inzidenz ist zwar 10-mal niedriger als die von epithelialen malignen Hauttumoren (Bsp. Spinaliom), jedoch kommt es im Verhältnis zur Tumorgroße früh zu einer Metastasierung, sodass die Prognose deutlich ungünstiger ist.¹ In Deutschland erkranken derzeit jährlich 18-22 pro 100.000 Einwohner am MM, womit sich die Inzidenz seit den 1970er Jahren mehr als verfünffacht hat.^{2, 3} Bei Frauen zeigt sich damit eine jährliche Zunahme der Inzidenz um 2,8% und bei Männern um 6,1%.⁴ Dies liegt vor allem in einer Veränderung der Freizeit- und Reisegewohnheiten, sowie einer gesteigerten Lebenserwartung, die zu einer erhöhten Belastung mit ultravioletter (UV) Strahlung führen. Besonders häufig betroffen sind hellhäutige Bevölkerungsgruppen in Ländern mit einer hohen Sonnenexposition, wie beispielsweise Skandinavien oder Australien. Deutlich seltener findet sich das MM hingegen bei Afrikanern oder Asiaten, was sich durch eine UV protektive, dunklere Pigmentierung der Bevölkerung sowie durch unterschiedliche Freizeitgewohnheiten mit geringerer Sonnenexposition erklären lässt. Ausgenommen hiervon sind Schleimhautmelanome oder Melanome der, in der Regel deutlich weniger stark pigmentierten, Leistenhaut.⁵ Zusätzlich scheinen genetische Faktoren neben der UV Exposition eine Rolle zu spielen. Das MM ist ein Malignom mit multifaktorieller Ätiologie, dessen Entwicklung das Ergebnis der Interaktion zwischen verschiedenen Umwelt-, Gen- und Wirtsfaktoren ist. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass aufgrund ihrer genotoxischen Wirkung die Exposition gegenüber UV Strahlen der wichtigste umweltätiologische Faktor für die Entwicklung eines MM ist.⁶⁻⁹ Weitere Risikofaktoren für das Auftreten eines MM sind eine hohe Anzahl gewöhnlicher melanozytärer Nävi, die Anzahl der atypischen melanozytären Nävi, sowie eine familiäre Vorbelastung mit MM.¹⁰⁻¹² Seit in Deutschland 2008 der Rahmen der gesetzlichen Hautkrebsfrüherkennung neu geregelt wurde, konnten deutlich mehr Melanome in einem noch frühen Tumorstadium diagnostiziert werden. Dennoch ist das MM weiterhin für 90% der durch Hauttumor verursachten Todesfälle verantwortlich und ein Rückgang der MM bedingten Mortalität durch Bevölkerungsscreenings konnte bisher nicht abschließend belegt werden.^{3, 4, 13} Gemäss dem Zentrum für Krebsregisterdaten und dem Robert Koch Institut starben im Jahr 2016 insgesamt 1,226 Frauen und 1,700 Männer in Deutschland am MM.¹⁴

1.1.1 Klinisch-histologische Typen des Malignen Melanoms

Beim MM handelt es sich um einen malignen Tumor, der von den Melanin bildenden Zellen der Haut, den Melanozyten, ausgeht. Am häufigsten sind MM an der Felderhaut lokalisiert, aber auch eine Manifestation an der Leistenhaut, der Retina, sowie den Hirn- und Schleimhäuten ist möglich. Gemäss der 2006 publizierten WHO Klassifikation (3. Edition) werden klinisch und histologisch vier verschiedene Subtypen des MM unterschieden, wobei ca. 3-5% der MM histopathologisch nicht näher klassifiziert werden können.^{15, 16} Die beiden häufigsten histologischen Subtypen des MM sind das superfiziell spreitende Maligne Melanom (SSM), das ca. 60% der Fälle ausmacht, und das nodulär Maligne Melanom (NM), das ca. 20% der Fälle ausmacht.^{17, 18} Histologisch gesehen ist das SSM durch eine überwiegend epidermale Komponente mit langsamem, horizontalem Wachstum charakterisiert und kann damit häufig in einem frühen Stadium diagnostiziert werden. Im Gegensatz dazu ist das NM

in der Regel dicker als das SSM und zeichnet sich durch eine fehlende horizontale Wachstumsphase und somit ein schnelles vertikales Wachstum aus, was zu einer ungünstigen Prognose führt.¹⁹ Makroskopisch hat das NM eine relativ einheitliche braune, schwarze oder blauschwarze Farbe und kann als oberflächlicher Knoten, als ulzerierter Polyp oder als erhöhte Plaque mit unregelmäßigen Konturen auftreten. In bis zu 50% der Fälle kann das NM aber auch achromatisch sein.⁹ Das Lentigo-maligna Melanom (LMM) tritt in ca. 5-15% der MM Fälle auf und entsteht üblicherweise auf dem Boden einer Lentigo Maligna (LM), die einem nicht invasiven Frühstadium (Synonym: melanotische Präkanzerose, Melanoma in situ) entspricht. Es tritt bevorzugt auf sonnenexponierter Haut des älteren Menschen auf. Bei der LM handelt es sich klinisch um eine in der Regel schlecht umschriebene Makula mit unregelmäßiger brauner oder schwarzer Pigmentierung, die oft erst nach jahrelangem Bestehen in ein invasives Wachstum und damit in ein LMM übergehen kann. Histologisch liegt ein invasives LMM vor, wenn es zu einer Durchdringung der Basalmembran und somit zur Bildung von dermalen Tumornestern kommt.²⁰ Das akrolentiginöse Maligne Melanom (ALM) ist zwar mit 2-5% der Fälle selten, hat aber die schlechteste Prognose aller MM, da die Rate der klinischen Fehldiagnosen sehr hoch ist und damit die Latenz bis zur histologischen Sicherung und Diagnosestellung häufig lang ist.²¹ Bei 30% der Patienten präsentiert es sich amelanotisch und kann zum Beispiel einer gewöhnlichen Warze, einer Paronychie, oder einem Ulcus ähneln.²² Im Jahr 2018 kam es zu einer Revision der WHO Klassifikation (4. Edition), welche sich grundsätzlich an die klassischen oben beschriebenen Subtypen anlehnt, zusätzlich aber molekulare Veränderungen und den Grad der Lichtschädigung des MM berücksichtigt.²³

Der klinisch-histologische Typ des MM fließt aktuell nicht in die Klassifikation nach TNM und die Stadieneinteilung nach AJCC/UICC mit ein.^{24, 25}

1.1.2 Stadieneinteilung

Die 2009 erschienene siebte Ausgabe der Klassifikation des American Joint Committee on Cancer (AJCC) beschreibt basierend auf der TNM Klassifikation das Ausmaß der anatomischen Ausbreitung des MM.²⁴ Hierbei sind die Tumordicke nach Breslow²⁶ sowie die Ulzeration und bei dünnen Melanomen (≤ 1 mm Tumordicke nach Breslow) auch die Mitoserate des MM die prognostisch wichtigsten Faktoren (Tab. 1-3).²⁷ Das in der Vergangenheit bei dünnen Melanomen berücksichtigte Clark Level fließt nicht mehr in die AJCC Klassifikation mit ein, da gezeigt werden konnte, dass das Clark Level nach multivariater Analyse aller bisher bekannten klinisch-histologischen Risikofaktoren des Primarius bei T1 MM keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Prognose hat.²⁸

In dieser Studie wurden alle Patienten aufgrund des Erstdiagnosedatums nach der siebten Version der AJCC Klassifikation klassifiziert.

T-Stadium	Tumordicke	weitere prognostische Parameter
Tis		Melanoma in situ, keine Infiltration der Basalmembran
Tx	nicht erhebbar	nicht erhebbar
T1	≤1,0 mm	a: ohne Ulzeration und Mitoserate < 1/mm ² b: mit Ulzeration oder Mitoserate ≥ 1/mm ²
T2	1,01-2,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T3	2,01-4,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T4	>4,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration

Tabelle 1: T-Stadium zur Beschreibung der Tumordicke des MM (TNM-Klassifikation).

N-Stadium	Anzahl befallener Lymphknoten	Ausmass des Lymphknotenbefalls
N0	0	
Nx	nicht erhebbar	nicht erhebbar
N1	1	a: Mikrometastase b: Makrometastase
N2	2-3	a: Mikrometastase b: Makrometastase c: Satelliten- oder In-transit Metastasen ohne regionalen Lymphknotenbefall
N3	≥4 oder Satelliten- oder In-transit Metastasen kombiniert mit Lymphknotenbefall	

Tabelle 2: N-Stadium zur Beschreibung der regionalen Lymphabflussbahnen beim MM (TNM-Klassifikation).

Das MM metastasiert sowohl lymphogen als auch hämatogen, wobei in der Mehrzahl der Fälle bei Erstmetastasierung die regionalen Lymphabflussgebiete betroffen sind. Hierbei unterscheidet man zwischen Satellitenmetastasen, die bis zwei Zentimeter um den Primarius lokalisiert sind, In-transit Metastasen, welche im Bereich ab zwei Zentimeter bis zum ersten Lymphknoten im Abflussgebiet liegen und Lymphknoten Metastasen.²⁹ Diese wiederum werden in Mikro- und Makrometastasen unterteilt. Mikrometastasen sind klinisch okkult, werden daher erst in der Mikroskopie diagnostiziert und sind prognostisch günstiger, da sie häufig die einzige Manifestation von

Metastasen sind. Makrometastasen sind bereits klinisch tastbare und/oder radiologisch darstellbare suspekte Lymphknoten und sind im Vergleich prognostisch ungünstiger.³⁰ Die histopathologischen Merkmale des Sentinel Lymphknoten (SLN) werden bei der AJCC Klassifikation nicht berücksichtigt.

M-Stadium	Art der Fernmetastase	Laktatdehydrogenase (LDH)
M0	keine	normal
Mx	nicht erhebbar	normal
M1a	Metastasen der Haut, der Subkutis oder primärtumorferner Lymphknotenstationen	normal
M1b	Lungenmetastasen	normal
M1c	Metastasen anderer Organe und Metastasen jeglicher Art mit erhöhtem LDH Level	normal erhöht

Tabelle 3: M-Stadium zur Beschreibung der Fernmetastasierung beim MM (TNM-Klassifikation).

AJCC Stadium	Primarius	Lymphknoten	Fernmetastase
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
	T2a		
IIA	T2b	N0	M0
	T3a		
IIB	T3b	N0	M0
	T4a		
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-4a	N1a	M0
	T1-4a	N2a	M0
IIIB	T1-4b	N1a	M0
	T1-4b	N2a	M0
	T1-4a	N1b	M0
	T1-4a	N2b	M0
	T1-4a	N2c	M0
IIIC	T1-4b	N1b	M0
	T1-4b	N2b	M0
	T1-4b	N2c	M0
	jedes T	N3	M0
IV	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 4: Zuordnung der TNM-Klassifikation zu prognostisch Stadien gemäß AJCC 2009.

Die 2018 veröffentlichte achte Version der AJCC Klassifikation beinhaltet einige Neuerungen der TNM Klassifikation. In der T-Kategorie wurden prinzipiell alle Tumordickenbereiche beibehalten, bis auf T1, das neu ab einer Tumordicke nach Breslow von 0,8 mm subkategorisiert wird und die Mitoserate nicht mehr berücksichtigt.³¹ Die dermale Mitoserate soll aber weiterhin bei allen MM angegeben werden und soll unter anderem bei der Indikationsstellung zur SLND bei Breslow $\geq 0,8 / < 1,0$ mm berücksichtigt werden. In der N-Kategorie werden Mikrosatelliten, Satelliten und In-transit Metastasen neu als N1c, N2c oder N3c kategorisiert, basierend auf der Anzahl der tumorbefallenen regionalen Lymphknoten. In der M-Kategorie wird neu jede Unterkategorie sowohl durch den anatomischen Ort der Fernmetastasierung als auch durch den Wert der LDH (bezeichnet als "0" für "nicht erhöht" und "1" für "erhöht") definiert. Die histopathologischen Merkmale des SLN stellen zwar weiterhin kein formales Staging-Kriterium dar, werden aber von den Autoren als entscheidend für die Entwicklung zukünftiger prognostischer Modelle für Patienten mit regionaler Metastasierung bezeichnet.³²

1.1.3 Therapiemöglichkeiten

Die wichtigste therapeutische Maßnahme ist und bleibt eine möglichst frühe Diagnosestellung sowie eine schnellstmögliche und komplette chirurgische Entfernung des Primärtumors.^{25, 33} Hierfür sollte die vollständige Exzision des Primarius mit einem

Sicherheitsabstand erfolgen, um das Risiko eines Lokalrezidivs zu minimieren. Die Wahl des jeweils konkreten Sicherheitsabstandes wird immer wieder diskutiert und aktuell für MM bis 2 mm mit einem Sicherheitsabstand von 1 cm empfohlen und für MM > 2 mm mit 2 cm empfohlen.⁵ Die Mortalität und das Auftreten von Fernmetastasen kann hierdurch jedoch nicht nachweislich beeinflusst werden.³⁴ Als wichtigster prognostischer Faktor gilt, ob Metastasen im SLN vorhanden sind oder nicht.³⁵ Die Sentinel Lymphknoten Diagnostik (SLND) ist daher in der aktuellen S3 Leitlinie Melanom ab einer Tumordicke von 1,0 mm und bei Vorliegen von zusätzlichen Risikofaktoren auch schon bei dünneren Melanomen (Breslow $\geq 0,8 / < 1,0$ mm) empfohlen. Im Gegensatz zu den deutschen Leitlinien wurde in der neusten Version der Leitlinien der AJCC die Grenze zur Empfehlung eines SLND von 1 mm auf 0,8 mm herunter korrigiert. Begründet wird dies dadurch, dass insgesamt sehr wenige Patienten (<5%) mit einem nicht ulzerierten MM < 0,8 mm SLN Metastasen entwickeln, diese hingegen bei etwa 5-12% der Patienten mit einem MM welches 0,8-1,0 mm dick ist auftreten.^{24, 32} Bei Patienten mit einem positiven SLN konnte in der erst kürzlich veröffentlichten multizentrischen Studie MSLT-II nach sofortiger kompletter Lymphknotendisektion (CLND) im Vergleich zur sonographischen Lymphknotenüberwachung eine niedrigere Lokalrezidivrate, jedoch kein Vorteil im melanomspezifischen Überleben gezeigt werden.³⁶ Die Empfehlung zur CLND nach positiver SLND ist daher eher zurückhaltend zu stellen, sollte von weiteren Risikofaktoren des Primarius, des Patienten und des SLN abhängig gemacht werden und für jeden Patienten individuell diskutiert werden. Bei bereits makroskopisch detektierten Lymphknotenmetastasen sollte sie hingegen durchgeführt werden.^{37, 38} Falls eine CLND durchgeführt wird, sollte sie zur Vermeidung eines Rezidivs eine abhängig von der Lymphknotenregion variierende und nicht einheitlich festgelegte Mindestanzahl an Lymphknoten beinhalten, was allerdings dazu führt, dass nach CLND eine Komplikationsrate von bis zu 48% beschrieben wird.^{39, 40} Unerwünschte Nebenwirkungen einer CLND stellen chronische Lymphödeme, Wundinfekte, Sensibilitätsausfälle, Bewegungseinschränkungen sowie eine eingeschränkte immunologische Leistungsfähigkeit dar.^{41, 42} Die Indikation zur CLND ist daher auch zum Erhalt der Lebensqualität der Patienten nur nach kritischer Prüfung der Vor- und Nachteile zu stellen.^{43, 44} Falls eine CLND durchgeführt wird und drei oder mehr Lymphknoten befallen sind, die Metastasen die Kapsel penetrieren oder sehr große Lymphknotenmetastasen vorliegen, sollte eine adjuvante Radiotherapie der Lymphabflussregion erfolgen, wobei hierdurch die lokale Tumorkontrolle verbessert werden kann, nicht aber das Gesamtüberleben.^{45, 46}

In der Behandlung von Patienten mit Progress der Erkrankung und Fernmetastasierung des MM gibt es in den letzten 10 Jahren enorme Fortschritte in der systemischen Therapie zu verzeichnen.

Hochdosiertes Interferon alpha nach Resektion eines MM galt lange Zeit als Goldstandard, allerdings konnte als Monotherapie nur ein geringer Einfluss auf das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Intervall nachgewiesen werden, bei einem gleichzeitig hohen Risiko für toxische Effekte.^{47, 48} Eine adjuvante Chemotherapie mit Dacarbazine bei metastasiertem MM zeigte in prospektiven klinischen Studien keinen Vorteil im Gesamtüberleben und wird daher nicht mehr als Monotherapie empfohlen.⁴⁹ Seit 2011 sind neue Behandlungsmöglichkeiten für metastasierte MM, basierend auf einem erweiterten Verständnis der Tumorbilogie, onkogenen Mutationen und der Immunüberwachung auf dem Markt. Die sogenannte zielgerichtete Therapie (BRAF-Inhibitoren, MEK-Inhibitoren) und die Immuntherapie (Anti-CTLA4, Anti-PD1) verbessern nachweislich das Gesamtüberleben und finden bereits Anwendung in der klinischen Routine.^{47, 50}

BRAF-Inhibitoren haben den Vorteil hoher Ansprechraten bei schnellem Wirkeintritt, sind aber durch die unvermeidliche Entwicklung von Resistenzen begrenzt. Etwa 50% der kutanen Melanome weisen eine onkogene BRAF-Mutation auf, die zu einer konstitutiven Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs führt.^{51, 52} Spezifische Inhibitoren von mutiertem BRAF (Bsp. Vemurafenib, Dabrafenib) alleine oder mit höherer Wirksamkeit in Kombination mit nachgeschalteten MEK-Inhibitoren (Bsp. Vemurafenib plus Cobimetinib, Dabrafenib plus Trametinib) haben bei Patienten mit BRAF-mutiertem, inoperablem oder metastasierendem MM einen erheblichen Nutzen gezeigt.

Die Immuntherapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren hingegen hat zumindest bei Monotherapie niedrigere Ansprechraten bei langsamerem Wirkeintritt, hat aber den Vorteil, dass sie potenziell langanhaltende Reaktionen von drei oder mehr Jahren bieten kann.⁵³ CTLA-4 ist ein negativer Regulator der Immunantwort.⁵⁴ Anti-CTLA-4-Antikörper (Bsp. Ipilimumab) hemmen gleichzeitig die Aktivität von regulatorischen T-Zellen und verbessern die Effektor-T-Zellfunktion zur Förderung einer antitumoralen Immunantwort.^{55, 56} Bei Patienten mit inoperablem oder metastasierendem Melanom kann durch die Therapie mit Ipilimumab das Gesamtüberleben verbessert werden. Ipilimumab führt bei etwa 20% der Patienten zu einer langfristigen Krankheitskontrolle.⁵³

Der PD-1-Rezeptor der Zelloberfläche wird von T-Zellen bei Antigen-Exposition exprimiert und reguliert die Effektorphase der T-Zellen negativ, indem er an seinen Liganden PD-L1 auf benachbarten Zellen bindet. PD-L1 wird oft von Melanomzellen überexprimiert, was zur Vermeidung der Immunerkennung und einer eingeschränkten Effektor-T-Zellfunktion führt. So können anti-PD-1-Antikörper (Bsp. Nivolumab, Pembrolizumab) die antitumorale Immunantwort verbessern, indem sie die PD-1/PD-L1-Interaktion blockieren.⁵⁷ Bei Patienten mit inoperablem oder metastasierendem Melanom konnte durch beide Antikörper eine überlegene Wirksamkeit gegenüber Chemotherapie oder Ipilimumab belegt werden.^{58, 59}

Auch in der adjuvanten Therapie des fortgeschrittenen Melanoms sind Immuncheckpoint-Inhibitoren wie Nivolumab und Kombinationen von BRAF-Inhibitoren mit MEK-Inhibitoren wirksame Arzneimittel. Beide Therapien verlängern das rezidivfreie Überleben signifikant und sind seit 2018 zur adjuvanten Therapie bei Lymphknotenbeteiligung bzw. im Stadium III auch nach vollständiger Tumorresektion in Europa zugelassen. Insbesondere im adjuvanten Setting sind jedoch die Nebenwirkungen zu berücksichtigen. So starben in einer adjuvanten Therapiestudie bei der Ipilimumab 10mg/kg KG verabreicht wurden 1,1% der behandelten Patienten an Immun-assoziierten Therapie Nebenwirkungen.⁶⁰

Zusammenfassend sind, mit der sich aktuell schnell verändernden Landschaft der systemischen Behandlungsoptionen, eine möglichst genaue Einschätzung des individuellen Risikoprofils und eine interdisziplinäre Entscheidungsfindung essentiell, um die jeweils beste Therapiestrategie unter Berücksichtigung der potenziellen Wirksamkeit und Nebenwirkungen für den einzelnen Patienten zu finden.

1.2 Der Sentinel Lymphknoten

Der Sentinel Lymphknoten (sentinel; Englisch der Wachtposten) oder synonym Schildwächterlymphknoten ist der erste Lymphknoten im Abflussgebiet eines Tumors und ist ein Indikator dafür, ob eine gesamte Lymphknotenregion mit Metastasen befallen ist oder nicht.^{35, 61-64} Da Melanome mit einer sehr guten Heilungsrate einhergehen, wenn sie lokal begrenzt sind, die 5-Jahresüberlebensrate bei einer

Aussaat in die lokale Lymphknotenregion aber nur noch 29% und bei Fernmetastasen sogar nur noch 7% beträgt, hat eine Kontrolle der Tumorausbreitung beim Staging von Melanomen oberste Priorität.^{41, 42, 65} Erst durch die Einführung der SLND kann bei einem großen Teil der Patienten von einer CLND abgesehen werden und damit eine komplikationsreiche Übertherapie vermieden werden.⁶⁶

Durch die SLND ist nicht nur mit möglichst wenig Invasivität ein genaues Staging und eine genaue prognostische Vorhersage möglich, es gibt zudem Hinweise darauf, dass Patienten, die sich einer SLND unterziehen, eine geringere Rate an MM Rezidiven haben und ein längeres melanomspezifisches Überleben bei MM mit mittlerer Dicke aufweisen.^{36, 67}

Der Stellenwert der SLND wurde in den vergangenen Jahren in multiplen Studien bestätigt und ist heute Standard in der Diagnostik von MM mit einer Tumordicke $\geq 1,0$ mm und bei dünneren MM bei Vorliegen von zusätzlichen Risikofaktoren wie einer Ulzeration oder erhöhten Mitoserate des Primarius.²⁴ Das Ergebnis der SLND wird als wichtigster prognostischer Faktor angesehen, obgleich Patienten mit positivem SLN ein heterogenes Kollektiv darstellen. Die Bedeutung des SLN Status hat zudem in den letzten 2 Jahren stark zugenommen, da die Indikation zu einer adjuvanten Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren oder zielgerichteter Therapie in vielen Fällen durch den Status des SLN bestimmt wird. Eine weitere Subklassifizierung von Patienten mit positivem SLN anhand von histologischen Merkmalen der SLN Metastase ist daher erstrebenswert, um eine verbesserte Selektion der adjuvant zu therapierenden Patienten zu erreichen.

1.2.1 Geschichte der Sentinel Lymphknoten Diagnostik

Schon früh in der Medizingeschichte gibt es Berichte darüber, dass Tumorzellen regionale Lymphknoten befallen können. Wie dies funktioniert, war allerdings lange Zeit ein Rätsel. Ende des neunzehnten Jahrhunderts erklärte der deutsche Pathologe Rudolf Virchow als einer der Ersten, dass Lymphe von egal welchem Gebiet des Körpers über Lymphgefäße in eine Lymphdrüse drainiert und dort gefiltert wird. In seinen Aufzeichnungen beschrieb er, dass immer zuerst eine Lymphdrüse befallen ist, in die die Lymphgefäße eines Tumors zuerst abfließen. Erst danach werden die restlichen Lymphdrüsen der Region befallen.⁶⁸ Seine Annahme basierte auf der Beobachtung, dass Kohlepigmente von einem Tattoo auf dem Arm eines Seemanns bei dessen Autopsie genau einen Lymphknoten im Abflussgebiet gefärbt hatten.⁶⁹ Die Filterfunktion der Lymphknoten zeigte darüber hinaus detailliert Gilchrist am Tiermodell. Er injizierte Hunden und Hasen eine Farbsuspension und konnte dadurch zeigen, dass eine lymphatische Filterung stattfindet.⁷⁰ Selbiges beschrieben Zeidmann und Buss mit Tumorzellen, indem sie diese in popliteale afferente Lymphgefäße eines Kaninchens injizierten.⁷¹ Mit dem dadurch gewonnenen Wissen über Anatomie und Physiologie der Lymphgefäße begannen Kliniker vermehrt eine lokale Tumorbehandlung durch eine chirurgische Exzision regionalen Lymphknoten zu ergänzen, um damit die Möglichkeit einer kompletten Tumoreradikation zu erhöhen. Beispielsweise der britische Chirurg Herbert Snow publizierte 1892 einen Artikel, in dem er eine CLND bei Patienten mit MM ungeachtet des klinischen Lymphknotenbefundes befürwortete.⁷² Die Kombination einer Exzision des Primärtumors mit einer kompletten Lymphknotenexzision fand im Laufe der Zeit in vielen Gebieten Anwendung, u.a. bei Karzinomen der Kopf- und Halsregion, sowie bei Brust- und gastrointestinalen Tumoren.⁷³ Weil allerdings viele Patienten mit negativem Lymphknotenbefund von der Operation nicht profitierten und noch dazu das Risiko von Komplikationen der CLND hoch war, wurde die elektive CLND schon bald kritisch

gesehen.³⁷ Mit Einführung des SLN Konzepts wurde eine Prozedur verfügbar, die mit minimaler Invasivität die Ausbreitung von okkulten Lymphknoten Metastasen darstellen konnte. Die Technik zur Darstellung von Lymphgefäßen wurde bereits 1896 von dem rumänischen Anatomen, Radiologen und Chirurgen Dimitrie Gerota durch Anwendung eines blauen Farbstoffes beschrieben.⁷⁴ 1953 demonstrierte Shermann, dass ein radioaktiver Marker, in die Haut injiziert, zum regionalen Lymphknotenengebiet abfließt und dort wieder aufgefunden werden kann.⁷⁵ Obwohl die Grundbausteine schon lange bekannt waren, veröffentlichten Morton und Kollegen die Methode der SLND, wie sie heute bei Melanomen Anwendung findet, detailliert erst 1992.⁷⁶ In den folgenden Jahren wurden zahlreiche Studien zur SLND durchgeführt, die die Wertigkeit der Methode belegen.^{30-32, 35, 66, 67, 77}

1.2.2 Anatomie des Lymphsystems

Die Anatomie des Lymphsystems ist eng mit der des peripheren Gefäßsystems verknüpft. Es funktioniert, indem es unilateral Lymphflüssigkeit in das Gefäßsystem zurückführt, worüber sie teilweise ausgeschieden wird. Lymphknoten dienen hierbei als Filter der Lymphe und als Lymphozytenspeicher. Sie sind damit ein wichtiger Bestandteil des lympho-retikulären Systems, zu dem beispielsweise auch die Milz, der Thymus und die Tonsillen zählen. Die Lymphflüssigkeit wird aus der Peripherie drainiert, über die afferenten Gefäße zu den Lymphknoten transportiert und dort zuerst über den Randsinus, dann über den Rindensinus und letztendlich über den Marksinus geleitet.⁷⁸ Die Theorie, dass subkapsulär gelegene Metastasen des MM ein besseres Outcome haben können, ist vorstellbar.^{79, 80}

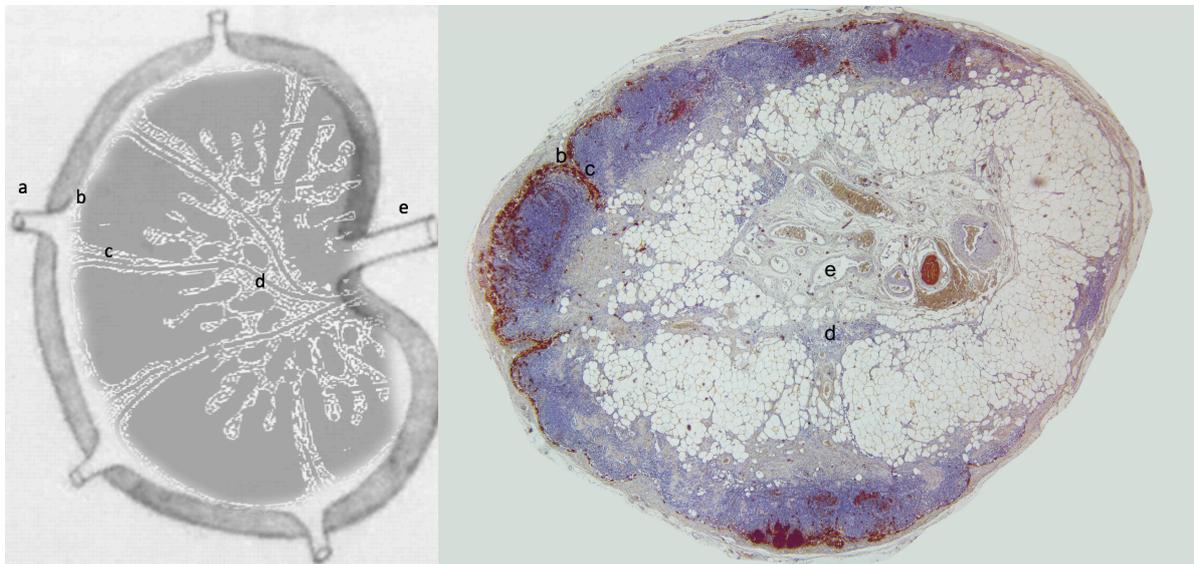


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Anatomie eines Lymphknotens und immunhistochemische Färbung eines SLN mit vorwiegender Metastasierung durch ein Melanom im Bereich des Randsinus. a) Afferentes Lymphgefäß b) Randsinus c) Rindensinus d) Marksinus e) Efferentes Lymphgefäß.

1.2.3 Technik zum Auffinden des Sentinel Lymphknotens

Heutzutage ist die SLND ein Routineverfahren zum Staging von Melanomen in einem frühen Stadium mit einer vertikalen Tumordicke ab 1,0 mm nach Breslow, aber auch bei kleineren Melanomen mit einem erhöhten Risiko zur Tumorausbreitung.^{24, 77, 81, 82}

Außer bei Melanomen findet die Lymphknoten Diagnostik auch beim Mammakarzinomen in der klinischen Routine Anwendung. Für diverse andere Malignome, wie Vulvakarzinomen, Peniskarzinomen, Lungenkarzinomen, sowie teilweise bei kolorektalen und gastrointestinalen Tumoren wurden Sentinel Konzepte in der Vergangenheit erprobt, konnten sich aber nicht durchsetzen.⁸³

Einen Tag vor Entnahme des SLN wird ein radioaktiver Tracer, meist Technitium-99-markiertes Humanalbuminkolloid, aber auch Schwefelkolloid, Nanokolloid oder Zinnsulfid, um den Primärtumor injiziert, welcher entlang der Lymphbahnen zum SLN abfließt. Eine dynamische Lymphabfluss-Szintigraphie zeigt präoperativ auf, in welche Lymphabflussregion der Tumor drainiert wird. Auch ein Drainieren des MM in mehrere Lymphabflussregionen oder das Überspringen einer Lymphknotenstation sind theoretisch möglich. Vor allem bei der Bewertung der Lymphdrainage aus MM der distalen oberen und unteren Extremität müssen alle Abflussstationen bis zum Stamm untersucht werden, da an diesen Stellen häufig eine doppelte Drainage vorliegt. Ca. 25% der Patienten weisen zudem mehr als einen SLN auf.⁸⁴ Zusätzlich kann vor Operationsbeginn ein blauer Farbstoff (Bsp. Lymphazurin) um den Primärtumor injiziert werden, um den SLN intraoperativ einfacher auffinden zu können.⁸³ Durch eine Kombination der Farbstoffmarkierung und der radioaktiven Markierung kann der SLN am präzisesten aufgespürt werden.⁸⁵ Alternativ zur Farbstoffmarkierung stellt auch die fluoreszierende Lymphangiographie mit Indocyanin Grün eine alternative Bildgebung mit hoher Sensitivität dar.⁸⁶ Zudem konnte in großen Patientengruppen gezeigt werden, dass v.a. bei Tumoren mit Lymphabfluss in mehrere Lymphabflussregionen eine SPECT/CT Voruntersuchung nützliche Informationen bringen kann, um alle SLN aufzuspüren.⁸⁷ Intraoperativ kann der SLN mit einer Gammasonde durch die Haut aufgespürt und durch eine kleine Inzision geborgen werden. Per definitionem ist jeder Lymphknoten, der im Vergleich zu seiner Umgebung blau verfärbt oder/und radioaktiv ist, ein SLN. Dies kann zu einer schweren Abgrenzung von SLN und Nicht-SLN und damit bei verschiedenen Operateuren zu einer unterschiedlichen Anzahl von entnommenen SLN führen.⁸⁶ Nach operativer Bergung werden der/die SLN pathologisch aufgearbeitet und mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) und mit verschiedenen immunhistochemischen Markern (Bsp. S100, HMB45, Melan-A/ MART1) gefärbt, um eine Mikrometastasierung nicht zu übersehen. Wenn die immunhistochemische Färbung (IHC) nicht routinemäßig durchgeführt wird, werden etwa 12% der positiven SLN als tumor-negativ eingestuft.⁸⁸ Es wird daher empfohlen, separate Abschnitte IHC zu färben, beispielsweise mit Antikörpern gegen das S100 Protein und HMB 45. HMB 45 ist das spezifischere Epitop, aber etwa 20% der MM exprimieren es nicht.⁸⁹ Für diesen Fall wird HMB 45 mit S100 kombiniert, was den Vorteil hat, dass es mit dem Zytoplasma und den Kernen von 100% der MM reagiert. Der Nachteil von S100 ist, dass es nicht spezifisch für MM Zellen ist. Es färbt auch dendritische Zellen des Paracortex, Schwann-Zellen, Naevocyten in der Kapsel und Trabekel von Lymphknoten. Weitere melanozytäre Antikörper wie MART-1/Melan-A oder SOX10 können zusätzlich eingesetzt werden weisen jedoch ebenfalls mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Zelltypen auf und können in einem geringen Anteil von MM auch nicht exprimiert sein.⁹⁰ Es ist daher immer ratsam mehrere der genannten Antikörper einzusetzen, um eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Eine intraoperative Schnellschnittuntersuchung, wie sie bei anderen Karzinomen durchgeführt wird, hat sich wegen einer hohen Rate an kryostatischen Artefakten, sowie einer Unsicherheit über die Rate an falsch-negativen Befunden, in der Diagnostik von Mikrometastasen beim MM nicht durchgesetzt.^{42, 91-93}

1.2.4 Klassifikation von Sentinel Lymphknoten Metastasen

In den aktuell gültigen AJCC Leitlinien konnten erstmals Langzeituntersuchungen zu Patienten, die mit der SLND kategorisiert wurden, eingeschlossen werden. Neben der Tumordicke nach Breslow, der Ulzeration sowie der Anzahl der mit Metastasen befallenen Lymphknoten, zeigte sich eine Unterteilung in klinisch okkulte Mikrometastasen versus klinisch auffällige Makrometastasen als unabhängiger prädiktiver Faktor für das Gesamtüberleben von Patienten in Stadium III.²⁴ Obwohl Patienten mit positivem SLN eine heterogene Gruppe in Hinblick auf die Prognose darstellen und einige Studienresultate darauf hinweisen, dass sich die Tumorlast, das Befallsmuster und andere histologische Merkmale auf die Prognose der Patienten auswirken, werden sie in den AJCC Leitlinien nicht weiter unterteilt.⁹⁴⁻⁹⁶ Ob und welche Merkmale von SLN Metastasen bei der histologischen Begutachtung der Präparate erhoben werden sollen, ist bisher nicht einheitlich geregelt. Ein mögliches Klassifikationssystem stellt die Rotterdam Klassifikation dar. Hier wird die SLN Metastase nach ihrem größten Durchmesser in drei Stufen eingeteilt.^{97, 98}

Eine andere Möglichkeit ist die Tumorlastmessung anhand der Zellzahl des größten Tumornestes, welche von einer einzigen Zelle bis zu Clustern von Millionen von Zellen reichen kann, zu bestimmen.^{99, 100} Ein weiteres vierstufiges Konzept (S 0-S 3) stellt die Augsburg S-Klassifikation dar, die 2001 publiziert wurde und die Anzahl der befallenen SLN, sowie die Eindringtiefe der Tumorzellen ab der Lymphknotenkapsel in Millimetern einschließt.¹⁰¹ Die vereinfachte S-Klassifikation (S 0-S III), in die nur noch die Eindringtiefe der Tumorzellen inbegriffen ist, wurde 2004 publiziert und zeigt eine signifikante Korrelation mit der Ausbildung von Fernmetastasen, sowie mit dem Gesamtüberleben der untersuchten Kohorte.¹⁰² Dewar und Kollegen beschrieben ebenfalls 2004, dass das Befallsmuster der SLN eine Auswirkung auf den Befall nachfolgender Lymphknoten haben kann. In der untersuchten Kohorte, in der alle Patienten eine SLND und nachfolgend eine CLND erhielten, zeigten sich bei keinem der Patienten mit subkapsulär gelegener Metastase des SLN zusätzliche Lymphknotenmetastasen.⁸⁰ In Anlehnung an die Erkenntnisse der Dewar Klassifikation und daran, dass in vielen Studien gezeigt werden konnte, dass kleine SLN Metastasen eine potentiell bessere Prognose haben, folgte 2011 die „Rotterdam Dewar Combined“ (RDC) Klassifikation. Die RDC Klassifikation enthält die Rotterdam Kriterien mit denselben Cut-off Werten und unterteilt diese wiederum in eine subkapsuläre versus nicht-subkapsuläre Lage.⁷⁹ Die Hannover Klassifikation identifiziert Patienten mit einer schlechten Prognose anhand eines vierstufigen Punktesystems, welches die Kapselinfiltration, das größte Tumornest in Zellzahl und die Eindringtiefe der Tumorzellen einschließt.¹⁰³ Eine weitere Modifizierung der Hannover Klassifikation besteht in der 2010 publizierten Hannover II Klassifikation, welche ebenso die Eindringtiefe der Tumorzellen, den Durchmesser des größten Tumornestes und die Kapselinfiltration beinhaltet, die Patienten aber nur in drei Gruppen einteilt und einen anderen Cut-off Wert für das größte Tumornest festlegt.¹⁰⁴ (s. detailliert Kapitel 2.3) In den aktuellen deutschen S3 Leitlinien zum MM wird die routinemässige Erhebung von Nävus- oder Melanomzellen, der grösste Durchmesser der Mikrometastase und im Falle eine Nachweises von Melanomzellen die Angabe von prognostisch wichtigen Markern im histologischen Befundbericht empfohlen. Aktuell werden folgende prognostisch wichtige Marker zur Erhebung empfohlen:

1. Maximale Eindringtiefe der Tumorzellen
2. Infiltration von Tumorzellen in die Lymphknotenkapsel
3. Ansammlung von Melanomzellen in Lymphgefäßen ausserhalb des Lymphknotens (Lymphangiosis)¹⁰⁵

1.3 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Alleine in den USA wurden für 2019 über 7.000 Todesfälle aufgrund eines MM erwartet.¹⁰⁶ Verbesserte Behandlungsmöglichkeiten des MM sowie ein besseres Verständnis der beteiligten Mechanismen und Risikofaktoren, die zur Metastasierung führen, sind daher von hoher Relevanz und Gegenstand der aktuellen Forschung. Da kürzlich mehrere neue systemische Therapien zur adjuvanten Behandlung zugelassen wurden und diese Therapien relevante, teils tödliche Nebenwirkungen aufweisen können, ist eine möglichst genaue, patientenspezifische Risikoeinschätzung dieser Patientengruppe besonders wichtig. Die SLND hat sich bewährt, um die 10-30% der Patienten mit klinisch unauffälligem Lymphabflussgebiet (cN0 Stadium), jedoch positivem SLN, zu identifizieren.¹⁰⁷ Bei Patienten, die eine SLND erhalten haben, gilt das Vorhandensein oder Fehlen von Metastasen im SLN als wichtigster prognostischer Faktor. Dass nicht alle Patienten mit positivem SLN von einer CLND profitieren, konnte erst kürzlich in einer groß angelegten multizentrischen Studie gezeigt werden.³⁵ Dies unterstreicht die Annahme, dass Patienten mit positivem SLN prognostisch gesehen ein sehr heterogenes Patientengut darstellen. Es wurden daher bereits in der Vergangenheit multiple Versuche unternommen, Patienten mit positivem SLN durch histopathologische Merkmale zu subklassifizieren und damit Hochrisikopatienten, die von einer weiteren operativen und/oder systemischen Therapie profitieren, zu identifizieren.^{88,95-96} Es ist jedoch weiterhin unklar, welche histopathologischen Parameter des SLN in der klinischen Routine erfasst werden sollten und die größte prognostische Aussagekraft haben.

Die Fragestellung dieser Arbeit ist daher, ob bestimmte histopathologische Merkmale und/oder die verschiedenen bisher publizierten Klassifikationssysteme bei SLN Metastasen des MM miteinander und mit etablierten, prognostisch-relevanten klinischen und histologischen Parametern sowie der Prognose der Patienten korrelieren.

Hierfür erfolgte die mikroskopische Auswertung und histopathologische Klassifikation aller SLN Präparate aller aufeinanderfolgenden Patienten, die am Universitätsklinikum Mannheim in den Jahren 2002 bis 2012 die Diagnose einer Metastase eines MM in der SLND erhalten haben. Zur Gewährleistung einer einheitlichen Klassifikation wurden die histologischen Schnittpräparate sowie die immunhistochemischen (IHC) Färbungen aller Patienten retrospektiv neu bewertet und hinsichtlich vorgängig definierter histopathologischer Merkmale und verschiedener bereits bestehender Klassifikationssysteme eingeteilt. Zudem haben wir als neuen, einfach zu erhebenden Parameter die Mitoserate der Metastase des SLN bestimmt. Die an den SLN Präparaten erhobenen Parameter wurden mit den erhobenen Parametern des Primarius und dem Gesamt-, dem melanomspezifischen- und dem krankheitsfreien Überleben der Patienten korreliert.

Insgesamt soll so der Stellenwert histopathologischer Parameter und Klassifikationssysteme positiver SLN für die Prognose und ggf. Therapieentscheidungen beim MM geprüft werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign und Patientenkollektiv

Diese Studie wurde als retrospektive, monozentrische Studie konzipiert. Eingeschlossen wurden alle aufeinanderfolgenden Patienten, die zwischen dem 1. September 2002 und dem 31. Januar 2012 in der Klinik für Dermatologie und Venerologie am Universitätsklinikum Mannheim mindestens ein MM der Haut diagnostiziert bekamen und bei denen die SLND einen oder ggf. mehrere befallene SLN ergab. Dokumentiert wurden anhand von vorgängig erstellten Checklisten (Abb. 2) die epidemiologischen, diagnostischen und therapeutischen Daten der Patienten sowie eine mögliche Progression der Erkrankung. Hierfür wurden die Patientenakten aus dem dermatologischen Ambulatorium und dem dermatologischen Archiv herangezogen und die Patientendaten retrospektiv erhoben. Bei unvollständiger Datenerfassung wurden die Hausärzte der Patienten oder die Patienten selbst zur Vervollständigung der Daten kontaktiert.

Nach vollständiger Datenerfassung wurden die histologischen Schnitte aller SLN der eingeschlossenen Patienten erneut mikroskopisch und makroskopisch begutachtet. Hierfür wurde zur Vereinheitlichung der Befunderhebung vorgängig ebenfalls eine Checkliste erstellt (Abb. 5). Diese Checkliste wurde anhand einer zuvor durchgeführten ausgiebigen Literaturrecherche via pubmed erstellt. Bereits bestehende histologische Klassifikationssysteme für SLN Metastasen wurden in die Checkliste aufgenommen, zusätzlich wurden eigens erarbeitete Merkmale erfasst. Im Anschluss erfolgten die statistische Auswertung und Korrelation der Daten.

Aus der Studie ausgeschlossen wurden Patienten, bei denen bei Diagnosestellung oder vor der SLND bereits ein klinischer oder sonographischer Verdacht auf eine Lymphknotenmetastasierung oder bereits eine Fernmetastasierung bestand. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Patienten, wenn die histologischen Präparate aufgrund Ausbleichung, Verschmutzung oder unvollständiger Präparate nicht zuverlässig ausgewertet werden konnten.

2.1.1 Datenerhebung Malignes Melanom und Sentinel Lymphknoten

Anhand der Patientenakten aus der dermatoonkologischen Ambulanz und der Operationsberichte wurde das Geburtsdatum der Patienten, sowie das Datum der SLND erfasst und somit das Alter der Patienten zum Operationszeitpunkt bestimmt. Die Lokalisation des Melanoms (mit Unterscheidung zwischen oberer und unterer Extremität, Kopf- und Halsregion, sowie Stamm), die vertikale Tumordicke nach Breslow mit dem daraus resultierenden pT Stadium gemäß der siebten Auflage der AJCC Klassifikation (T1 $\leq 1,00$ mm, T2 1,01-2,00 mm, T3 2,01-4,00 mm, T4 $> 4,00$ mm), der histologische Subtyp (SSM, NM, LMM, ALM und MM nicht näherer Klassifikation) sowie der Ulzerationsstatus und die Regression wurden ebenfalls anhand der Pathologieberichte dokumentiert. Darüber hinaus wurden die Infiltrationstiefe nach Clark, die Mitoserate des Primärmelanoms sowie der Mutationsstatus und eine allenfalls angeschlossene Immuntherapie mittels beispielsweise Ipilimumab oder Vemurafenib erhoben. Zudem wurde das Erstdiagnosedatum mit initialem AJCC Stadium sowie der Zeitpunkt des Eintretens ins Stadium IV mit Lokalisation der Metastase, Art der Metastase und der Zeitpunkt des Versterbens dokumentiert. Für

die SLN wurde die Anzahl der entnommenen SLN und die Region der SLND erfasst. Es wurde dokumentiert, ob nachgängig eine CLND erfolgte oder nicht und ob diese weitere positive Lymphknoten zeigte. Bei Patienten mit mehreren MM wurde entweder das MM in die Studie eingeschlossen, welches den positiven SLN zeigte oder, wenn beide MM einen positiven SLN zeigten, das MM mit dem höheren pT Stadium.

Patient		
MM:		
Daten		
Geburt		
Erstdiagnose		
Resektion		
Eintritt in Stadium III		
Eintritt in Stadium IV		
Tod		
Stadien bei ED		
Breslow (in mm)		
Clark		
Typ	SSM	
	NM	
	LMM	
	ALM	
	MM nicht näherer Klassifikation	
Mitoserate (pro mm ²)	<1	≥1
Ulzeration	ja	nein
Regression	ja	nein
Lage		
AJCC (2009)		
SLND:		
Datum OP		
Lokalisation		
Ergebnis (x/y positiv)		
CLND:		
Datum OP		
Lokalisation		
Ergebnis		
Metastase:		
Datum Diagnose		
Nummer Histologie		
Lokalisation		
Therapie		
Bemerkungen:		

Abbildung 2: Checkliste MM zur einheitlichen Datenerhebung.

2.2 Sentinel Lymphknoten Diagnostik und Gewebearbeitung

Die SLN Exzision erfolgte nach der triple Technik.¹⁰⁸ Grundsätzlich wurden Patienten zunächst in der nuklearmedizinischen Abteilung anhand einer präoperativen Lymphszintigraphie untersucht. Diese Untersuchung fand innerhalb von 24 Stunden vor der Operation statt. Das Scannen erfolgte unmittelbar nach der intradermalen Injektion von radioaktivem Technetium⁹⁹ um den Primärtumor oder die Narbe der Primärtumorexzision für ca. 10-15 Minuten und erneut nach 2 Stunden. Zweitens wurde intraoperativ eine tragbare Gamma-Detektionssonde verwendet, um die Position der SLN zu überprüfen. Drittens wurde Patentblau präoperativ im Operationssaal um den Primärtumor oder die Narbe der Primärtumorexzision injiziert, um die Identität der Lymphknoten zu überprüfen. Ein Lymphknoten wurde als SLN identifiziert, wenn er blau gefärbt war und/oder wenn er eine in situ Radioaktivitätszahl von mindestens dem Dreifachen der Hintergrundmenge aufwies.¹⁰⁹ In unserer Kohorte wurden so zwischen einem und vier SLN exzidiert. Nach der SLN Exzision wurden die Gewebelöcke jeweils in 4%-igem Formalin fixiert, anschließend aus dem umliegenden Fettgewebe freipräpariert und in 1-2 mm dicke Scheiben parallel zur Längsachse des Lymphknotens lamelliert (Abb. 3). Alle Gewebeschnitte wurden dann getrocknet und in Paraffinwachs eingebettet. Von dem in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden 1-2 µm dicke Schnitte jeweils für die Hämatoxylin-Eosin (H.E.) und die immunhistochemischen (ICH) Färbungen (anti-MART1, anti-HMB45 und in einigen Fällen auch für die anti-S 100) angefertigt. Das heißt je nach Größe des Sentinel Lymphknoten wurden pro Lymphknoten zwischen 3 und 33 Schnitte mikroskopiert.

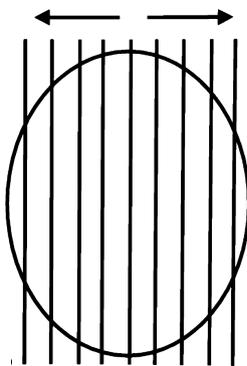


Abbildung 3: Postoperative Lamellierung eines SLN.

2.3 Histopathologie

Um eine optimale Vergleichbarkeit der histologischen Schnitte aller Patienten erreichen zu können, wurden von Schnitten, welche nicht eindeutig beurteilt werden konnten, entweder aufgrund von Färbeartefakten, aufgrund von ausgebleichten Färbungen oder weil aufgrund des Alters der Schnitte eine andere Färbung verwendet wurde, neue Paraffinschnitte angefertigt und in H.E., anti-Mart1, anti-HMB45 und bei Bedarf anti-S100 gefärbt. Die Schnittpräparate aller Patienten wurden von zwei Untersuchern unabhängig mit einem Olympus BX51-Mikroskop begutachtet und Problemfälle wurden mit Standardfällen kombiniert von einem dritten unabhängigen Untersucher beurteilt und im Anschluss besprochen. Bei Patienten mit mehreren positiven SLN wurden alle Lymphknoten ausgewertet und jeweils der SLN mit dem

stärksten Tumorzellbefall in die Studie eingeschlossen. Erst nach Begutachtung der Schnittpräparate wurden die erhobenen Daten jeweils mit den bereits vorhandenen Pathologiebefunden verglichen und Diskrepanzen zum Vorbefund dokumentiert, aber die erhobenen Daten nicht angepasst. Es wurden alle Paraffinschnitte eines SLN erst makroskopisch, dann mikroskopisch in verschiedenen Vergrößerungen begutachtet. Zuerst wurde die Anzahl positiver SLN erhoben. Anschließend wurden die positiven Lymphknoten auf allen Schnitten in zwei Ebenen (a und b) ausgemessen (Abb. 4). Der maximal gemessene Durchmesser in zwei Ebenen des Lymphknotens wurde in die Statistik mit aufgenommen. (Aus den erhobenen Parametern wurde anhand der Annahme, dass ein Lymphknoten annähernd die Form einer Ellipse aufweist, gemäß der Formel $A=a \cdot b \cdot \pi$, das Gesamtvolumen des Lymphknotens berechnet.) Zudem wurde der Anteil der Schnitte mit Tumorzellbefall an allen Schnitten pro Lymphknoten erhoben, um so das Ausmaß des Lymphknotenbefalls in 3 Ebenen beurteilen zu können.

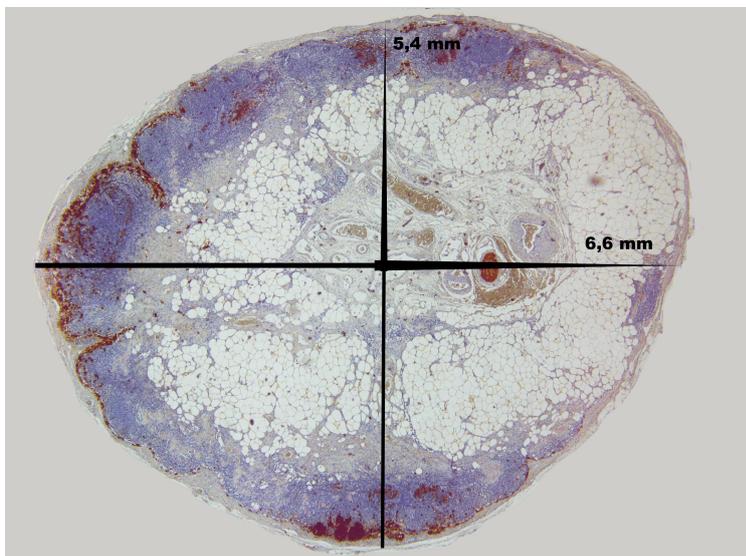


Abbildung 4: Makroskopische Ausmessung eines SLN in 2 Ebenen. (Ebene a = 5,4 mm, Ebene b = 6,6 mm)

Im nächsten Schritt wurde das Befallsmuster der Lymphknotenmetastasen gemäß der Einteilung nach Dewar et al. bestimmt.⁸⁰ Ein subkapsuläres Befallsmuster wurde definiert als eine oder mehrere Metastase, die sich auf den subkapsulären Sinus beschränken. Zeigten sich zu den vorwiegend im subkapsulären Sinus lokalisierten Metastasen auch parenchymale Tumornester, so wurde die Ausbreitung als kombiniertes Befallsmuster klassifiziert. Zeigten sich multiple diskrete Tumornester unterschiedlicher Lokalisation, so wurden diese als multifokales Befallsmuster klassifiziert. Ein parenchymales Befallsmuster wurde definiert als eine Metastasierung, die vollständig im parakortikalen Bereich des Parenchyms liegt. Alle Metastasen mit einem Durchmesser >5 mm wurden als extensives Befallsmuster klassifiziert (Abb. 5, 6).

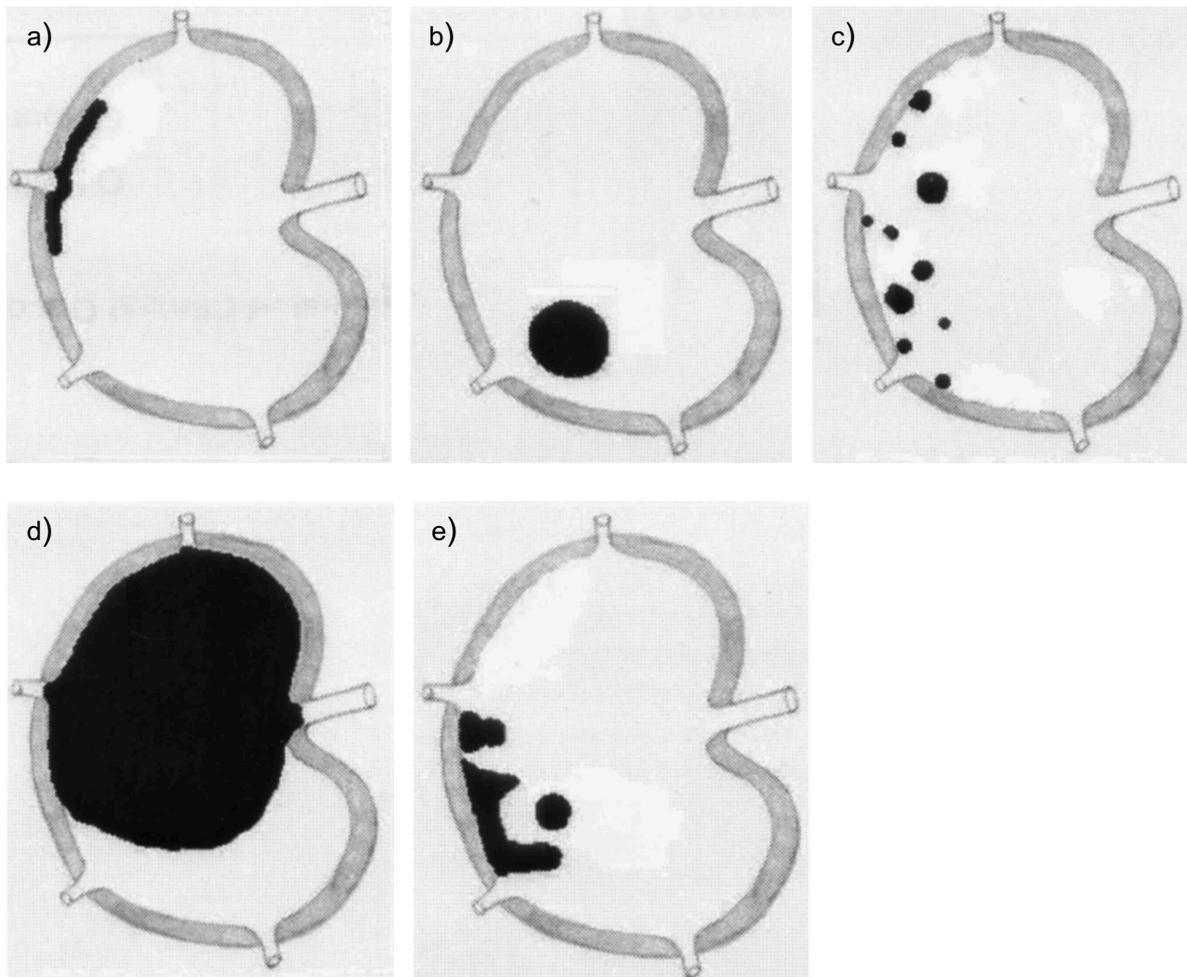
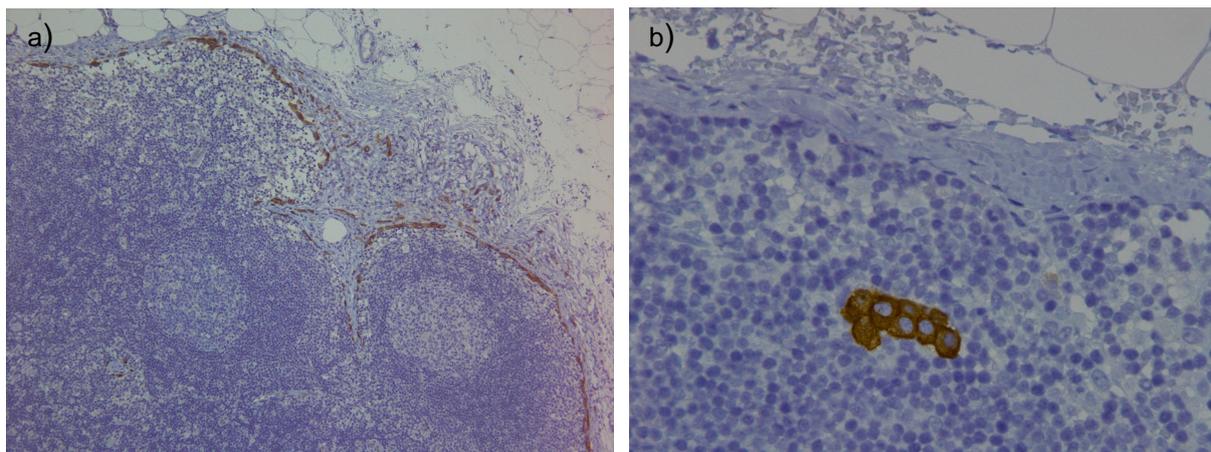


Abbildung 5: Schematische Darstellung des mikroskopischen Befallsmusters der Lymphknotenmetastase. Originalabbildung aus der Erstpublikation von Dewar et al.⁸⁰ a) Subkapsuläres Befallsmuster b) Parenchymales Befallsmuster c) Multifokales Befallsmuster d) Extensives Befallsmuster e) Kombiniertes Befallsmuster.



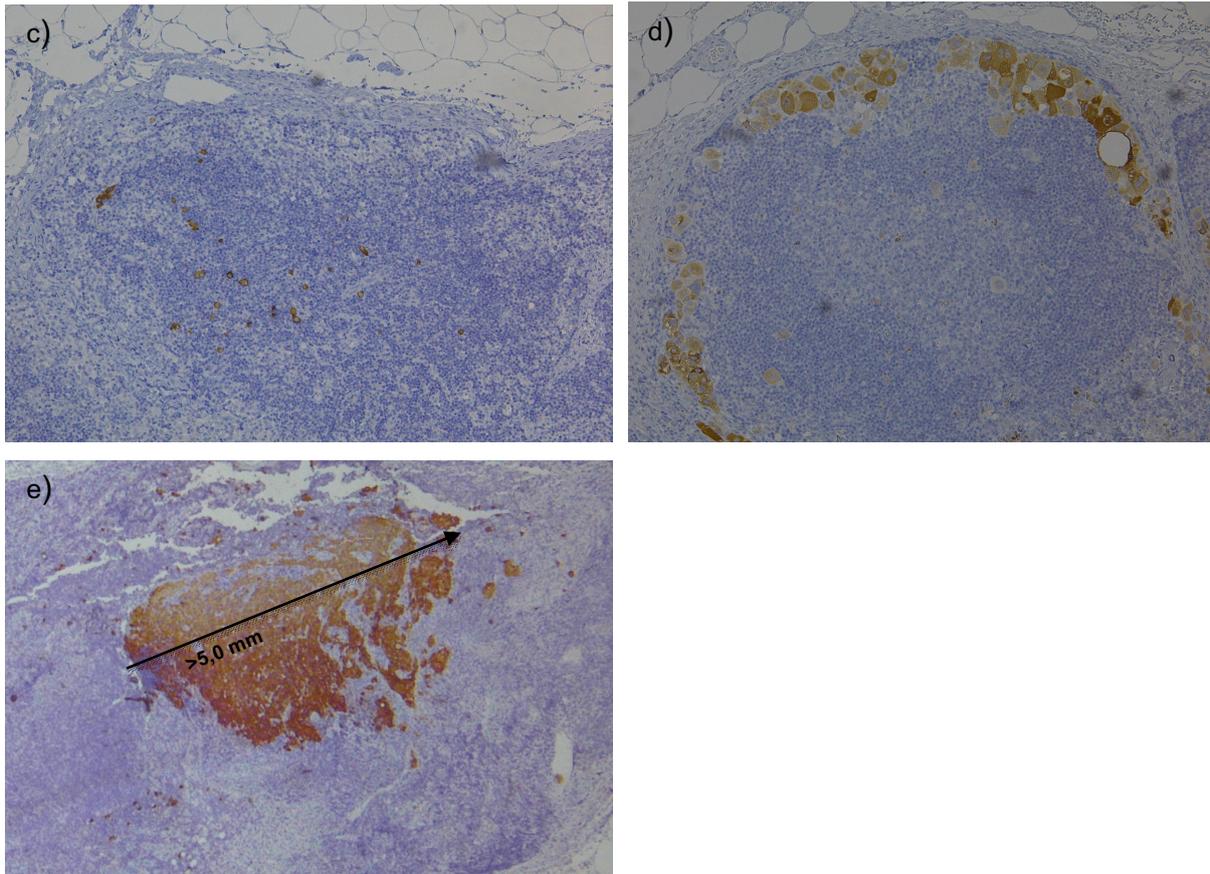


Abbildung 6: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von SLN mit a) subkapsulärem Befallsmuster b) parenchymalem Befallsmuster c) multifokalem Befallsmuster d) kombiniertem Befallsmuster e) extensivem Befallsmuster.

Als nächstes wurde der maximale Durchmesser der größten metastatischen Ablagerung erfasst. Dieser wurde absolut erfasst und später in verschiedene Gruppen mit verschiedenen Grenzwerten eingeteilt. Hierbei wurden größere Zellverbände mit einem Abstand zwischen den Zellen bis 0,1 mm als zusammenhängend betrachtet. Zudem wurde die Zellzahl des größten Tumornestes abgeschätzt und unterteilt in Einzelzellen und <30 versus >30 Zellen (Abb. 7).

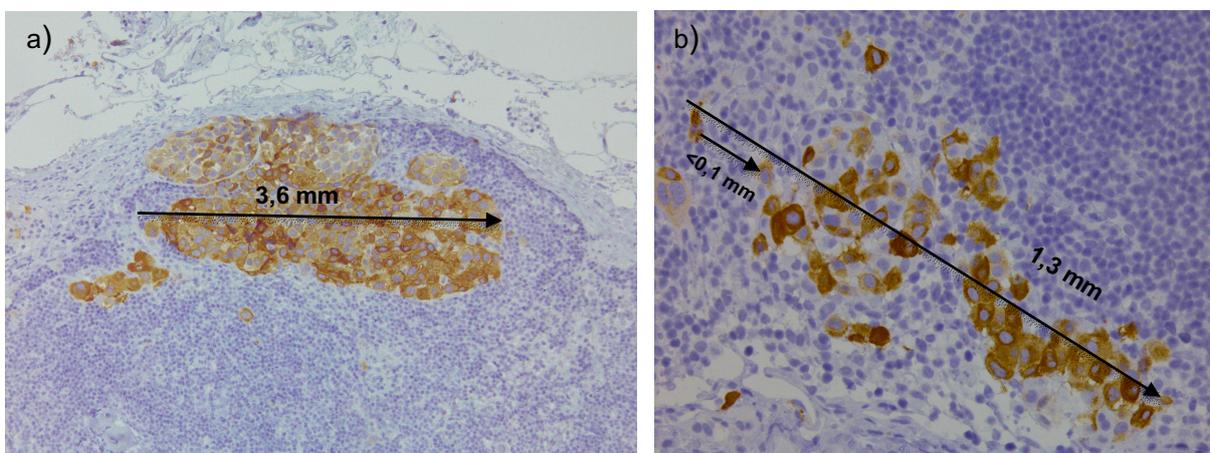


Abbildung 7: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von SLN mit a) größtem Tumornest 3,6 mm, Zellzahl >30 Zellen b) größtem Tumornest 1,3 mm, Zellzahl >30 Zellen (Zellen mit einem Abstand <0,1 mm werden als zusammenhängendes Nest betrachtet).

Die maximale Eindringtiefe der MM Metastase wurde von der Lymphknoten Kapsel bis zur am tiefsten im SLN liegenden Tumorzelle erfasst (Abb. 8). Falls Zellen näher an einem Trabekel als an der Kapsel lagen wurde beide Abstände gemessen und erfasst, da dieser Fall in der Originalpublikation der S-Klassifikation nicht beschrieben wird.¹⁰¹

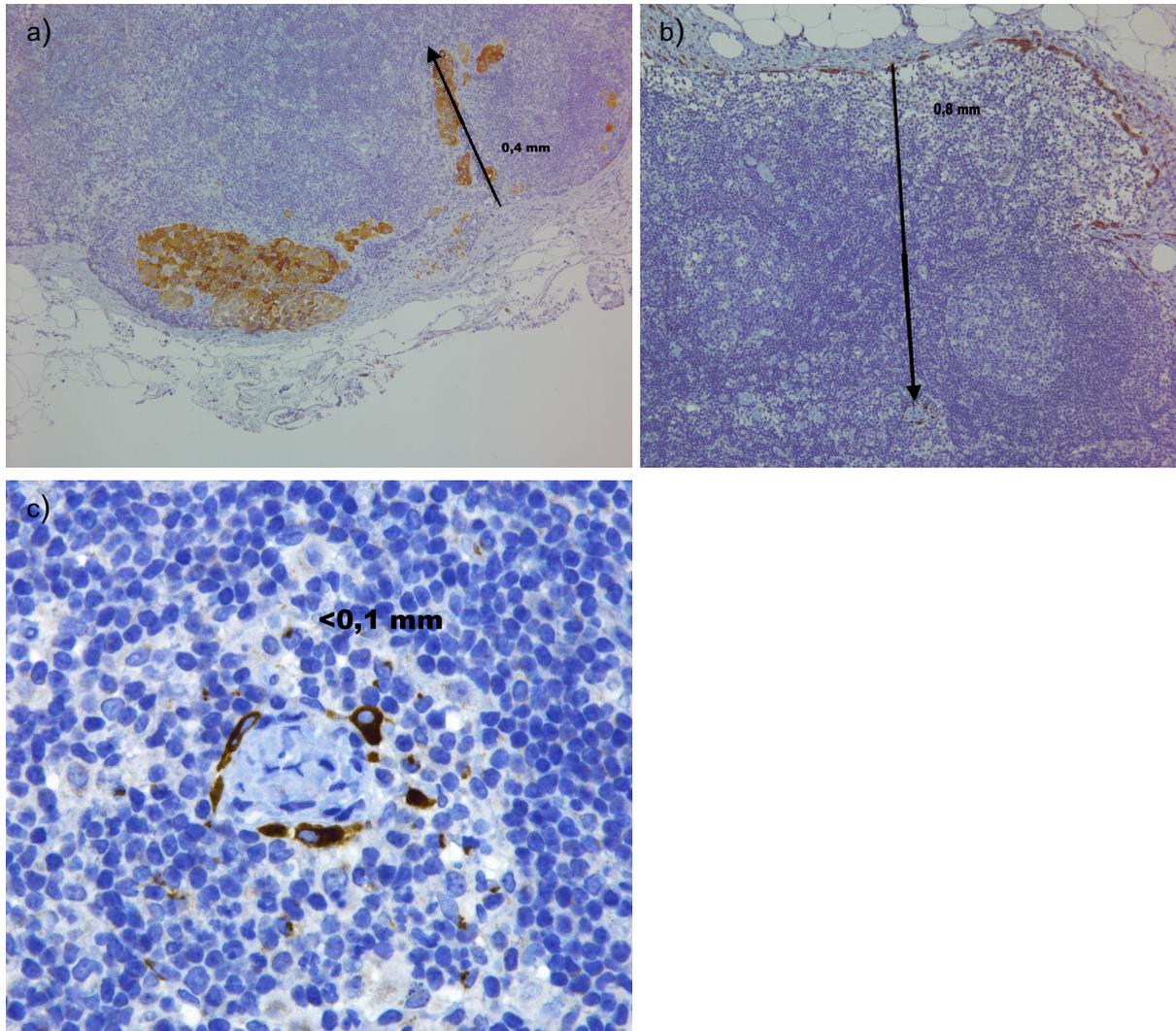


Abbildung 8: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von SLN mit a) maximaler Eindringtiefe von 0,4 mm. b)/c) maximaler Eindringtiefe von 0,8 mm versus <0,1 mm je nach Messung ab der Kapsel oder ab einem Trabekel.

Zudem wurde das Vorhandensein einer Infiltration von Tumorzellen in die Lymphknoten Kapsel dokumentiert (Abb. 9).

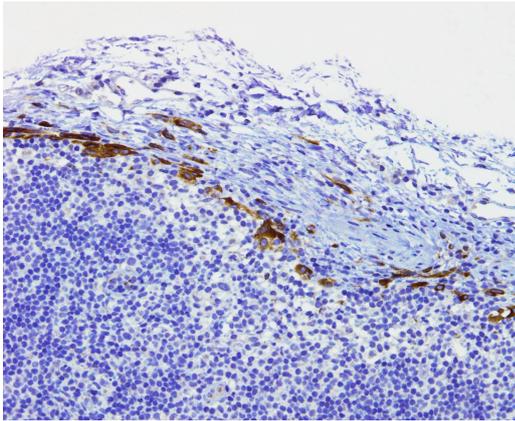
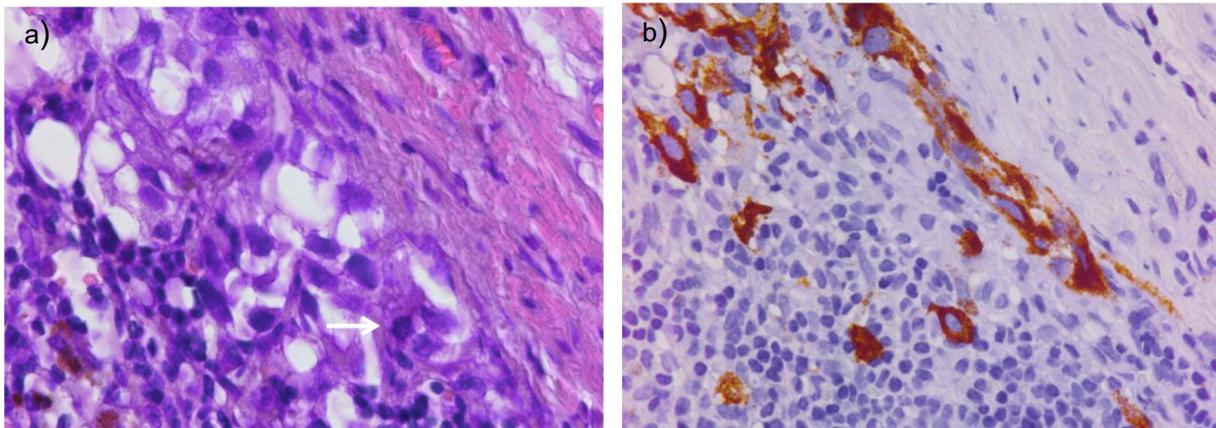


Abbildung 9: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen eines SLN mit Kapselinfiltration.

Die erstmals durch uns untersuchte SLN-Mitoserate (SLN-MR) in Mitosen pro mm^2 wurde mit der Hot-Spot-Methode, die auch für die Bestimmung der Mitoserate beim MM empfohlen wird, untersucht.²⁴ Hierfür wurden zunächst in der HE-Färbung alle Lymphknotenmetastasen auf mitotische Aktivität untersucht und wenn Mitosen gefunden wurden, wurde deren Anzahl pro mm^2 im Bereich der höchsten mitotischen Aktivität durch Zählen von Mitosen in fünf benachbarten Hauptgesichtsfeldern (HPF, *engl. high-power field*) bei 400-facher Vergrößerung bestimmt. Der Durchmesser eines HPF beträgt 0,5 mm. Die Gesamtfläche von 5 HPF kann somit nach folgender Formel berechnet werden:

$$A = (\pi \times r^2) \times 5 = (\pi \times (0,25 \text{ mm})^2) \times 5 = 1,0 \text{ mm}^2$$

Um zu unterscheiden, ob Mitosen auf Entzündungszellen oder Melanomzellen zurückzuführen sind, wurde eine Korrelation mit den entsprechenden IHC (anti-Mart1/anti-HMB45) gefärbten Abschnitten durchgeführt (Abb. 10). Es wurden nur Mitosen gezählt, die hierdurch als Melanomzellen bestätigt wurden.



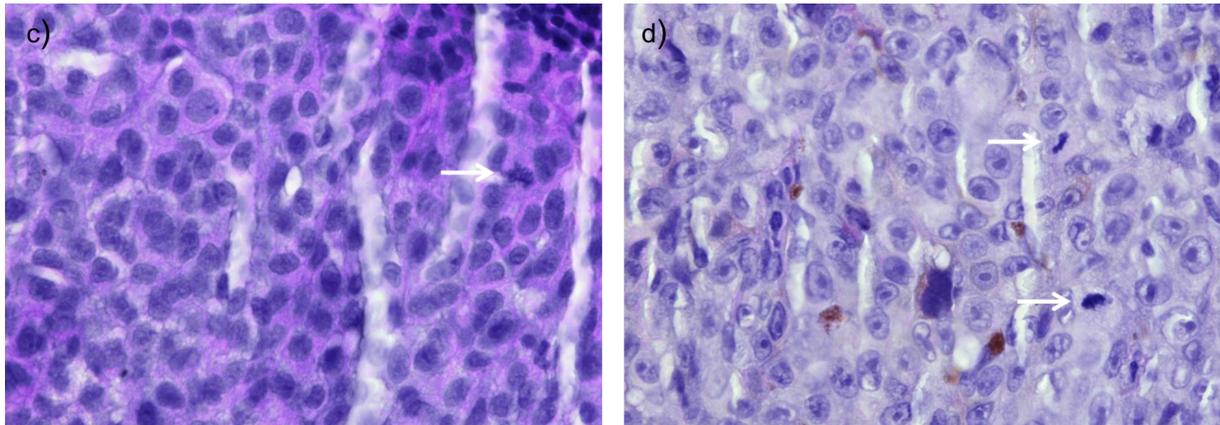


Abbildung 10: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von drei SLN mit einer SLN-MR ≥ 1 Mitose/mm². a) Schnitt in H.E. Färbung. Metastase klassifiziert als Rotterdam II, Augsburg II, SLN-MR = 1/mm². b) IHC Färbung des in a) dargestellten Abschnittes mit Mart1. c) Schnitt in H.E. Färbung. Metastase klassifiziert als Rotterdam II, Augsburg II, SLN-MR = 1/mm². d) Schnitt in H.E. Färbung. Metastase klassifiziert als Rotterdam II, Augsburg II, SLN-MR = 6/mm².

Jeder SLN wurde in der gleichen Reihenfolge und nach dem gleichen Schema, gemäß der vorgängig erstellten Checkliste SLN erfasst (Abb. 11). Mikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Nikon Eclipse-Ci Mikroskop und einer Nikon DS-Fi2 Kamera aufgenommen.

Patient		Histonummer		
Art der Infiltration			Dewar:	
Subkapsulär	ja	nein		
Parenchymal	ja	nein		
Multifokal	ja	nein		
Extensive	ja	nein		
Kombiniert	ja	nein		
Mitoserate (pro mm²)				
<1 pro mm ²	ja	nein		
≥ 1 pro mm ²	ja	nein		
Größtes Tumornest (mm)	Subkapsulär: Parenchymal:		Rotterdam:	
<0,1	ja	nein	Rotterdam/Dewar combined:	
	+ subkapsulär			
	+ nicht subkapsulär			
	+ unbekannte Lage			
0,1-1,0	ja	nein		
>1,0	ja	nein		
Größtes Tumornest in Zellzahl			Hannover (0-3 Punkte):	Hannover II:

<30 Zellen	ja	nein		Größtes Tumornest (mm):
≥30 Zellen	ja (1P)	nein		<0,1
Kapselinfiltration	ja (1P)	nein		≥0,1 und 0-1 Punkt
Eindringtiefe der Tumorzellen (mm)				≥0,1 und 2 Punkte
≤2	ja	nein		
>2	ja (1P)	nein		
<0,3	ja	nein	Augsburg S:	
0,3-1,0	ja	nein		
>1,0	ja	nein		
Mart1	Pos %	Neg		
HMB 45	Pos %	Neg		
S100	Pos %	Neg		
LK makroskopisch:			Bemerkungen:	

Abbildung 11: Checkliste SLN zur einheitlichen Erfassung histologischer Merkmale der MM Metastase.

2.3.1 Histologische Klassifikationssysteme des Sentinel Lymphknoten

Anhand der vorgängig erhobenen histologischen Parameter erfolgte die Einteilung in folgende Klassifikationssysteme:

Rotterdam Klassifikation (basierend auf dem Durchmesser des größten Tumorzellkonglomerates, mit verschiedenen Cut-off Werten):

Rotterdam I:

R I: <0,1 mm

R II: 0,1-1,0 mm

R III: >1,0 mm

Rotterdam II:

R I: <0,2 mm

R II: 0,2-1,0 mm

R III: >1,0 mm

Rotterdam III:

R I: <0,3 mm

R II: 0,3-1,0 mm

R III: >1,0 mm

Rotterdam IV:

R I: <0,4 mm

R II: 0,4-1,0 mm

R III: >1,0 mm

Augsburg S Klassifikation (basierend auf der maximalen Eindringtiefe der Tumorzellen):

- S I: <0,3 mm
- S II: 0,3-1,0 mm
- S III: >1,0 mm

Hannover/Hannover II Klassifikation (basierend auf der Kombination der Tumorlast in Zellzahl oder Durchmesser, der Eindringtiefe und der Kapselinfiltration):

Hannover Klassifikation (0-3 Punkte, jeweils ein Punkt für):

- Kapselinfiltration
- Eindringtiefe >2 mm
- Tumorlast >30 Zellen

Hannover II Klassifikation (ein Punkt jeweils für Kapselinfiltration und Eindringtiefe >2 mm):

- Gruppe 1: größtes Tumornest <0,1 mm, unabhängig von der Anzahl Punkte
- Gruppe 2: größtes Tumornest \geq 0,1 mm und 0-1 Punkte
- Gruppe 3: größtes Tumornest \geq 0,1 mm und 2 Punkte

Dewar Klassifikation (basierend auf dem Befallsmuster des Lymphknotens, s. Kapitel 2.3):

- Extensiv
- Subkapsulär
- Kombiniert
- Multifokal
- Parenchymal

Modifizierte Dewar Klassifikationen (Dewar1):

- Extensiv
- Nicht extensiv

Modifizierte Dewar Klassifikationen (Dewar2):

- Subkapsulär
- Nicht subkapsulär

Rotterdam-Dewar kombiniert (RDC, engl. *Rotterdam Dewar combined*) Klassifikation (basierend auf dem Durchmesser des größten Tumornestes und der Lage der größten Metastase des SLN):

- Größtes Tumornest <0,1 mm + subkapsulär
- Größtes Tumornest <0,1 mm + nicht-subkapsulär
- Größtes Tumornest 0,1-1,0 mm + subkapsulär
- Größtes Tumornest 0,1-1,0 mm + nicht-subkapsulär
- Größtes Tumornest >1,0 mm + subkapsulär oder nicht-subkapsulär

Für die SLN-MR wurde zunächst statistisch der optimale Grenzwert ermittelt (s. Kapitel 3.4.2). Anschließend wurde die SLN-MR jeweils mit der Rotterdam und der Augsburg S Klassifikation kombiniert.

Binäre SLN-MR Klassifikation (basierend auf der Anzahl der Mitosen in fünf angrenzenden HPF, s. Kapitel 2.3):

SLN-MR1:

$<1/\text{mm}^2$

$\geq 1/\text{mm}^2$

SLN-MR und Rotterdam kombiniert Klassifikation:

R IA: $<0,1 \text{ mm} + <1 \text{ Mitosen}/\text{mm}^2$

R IB: $<0,1 \text{ mm} + \geq 1 \text{ Mitosen}/\text{mm}^2$

R IIA: $0,1-1,0 \text{ mm} + <1 \text{ Mitosen}/\text{mm}^2$

R IIB: $0,1-1,0 \text{ mm} + \geq 1 \text{ Mitosen}/\text{mm}^2$

R IIIB: $>1,0 \text{ mm} + <1 \text{ Mitosen}/\text{mm}^2$

R IIIB: $>1,0 \text{ mm} + \geq 1 \text{ Mitosen}/\text{mm}^2$

SLN-MR und Augsburg S kombiniert Klassifikation:

S IA: $<0,3 \text{ mm} + <1 \text{ Mitosen}/\text{mm}^2$

S IB: $<0,3 \text{ mm} + \geq 1 \text{ Mitosen}/\text{mm}^2$

S IIA: $0,3-1,0 \text{ mm} + <1 \text{ Mitosen}/\text{mm}^2$

S IIB: $0,3-1,0 \text{ mm} + \geq 1 \text{ Mitosen}/\text{mm}^2$

S IIIA: $>1,0 \text{ mm} + <1 \text{ Mitosen}/\text{mm}^2$

S IIIB: $>1,0 \text{ mm} + \geq 1 \text{ Mitosen}/\text{mm}^2$

2.4 Follow up

Alle Patienten erhielten eine routinemäßige Nachsorge gemäß den Empfehlungen der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) und der Arbeitsgemeinschaft für Dermatologische Onkologie (ADO) nach Möglichkeit alle 3-6 Monate. Dokumentiert wurde bei allen Terminen das Erstdiagnosedatum, die Lokalisation des Primarius, die Tumordicke nach Breslow, das pT Stadium, stattgefundenen chirurgische Eingriffe oder medikamentöse Therapien. Zudem wurden B-Symptome erfragt und ein klinischer Untersuchungsbefund inklusive Lokalstatus und Lymphknotenstatus erhoben. Je nach Empfehlung erfolgte zudem ein Röntgenbild des Thorax, eine Sonographie des Abdomens, Laborkontrollen inklusive S100 und ggf. eine weiterführende Diagnostik mittels CT, MRT, Knochenszintigraphie oder FDG-PET. Der letzte erhobene Nachsorge Termin war im März 2015.

Als Endpunkte wurden folgende Ereignisse definiert:

1. Krankheitsfreies Überleben
2. Melanomspezifisches Überleben
3. Gesamtüberleben

Als krankheitsfreies Überleben wurde die Zeit bis zum ersten Auftreten eines lokoregionalen Rezidivs oder des Auftretens zusätzlicher Lymphknoten- oder Fernmetastasen nach der SLND definiert. Alle Ereignisse wurden auf den Tag genau dokumentiert, um später die Dauer bis zum Eintreffen des jeweiligen Endpunktes exakt definieren zu können.

2.5 Statistische Verfahren

Für qualitative Parameter wurden absolute und relative Häufigkeiten dargestellt. Für quantitative Parameter wurden der Mittelwert und die Standardabweichung oder der Median zusammen mit der Spannweite berechnet. Korrelationen histologischer Parameter und Klassifikationen des SLN mit Merkmalen des Primärtumors wurden mit dem Spearman's Korrelationstest bewertet. Für jede Korrelation wurden der Spearman-Korrelationskoeffizient und der p-Wert errechnet. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient wurde dabei jeweils als sehr schwach (0,0-0,19), schwach (0,2-0,39), mäßig (0,4-0,59), stark (0,6-0,79) oder sehr stark (0,8-1,0) eingestuft. SLN Klassifikationen und histologische Parameter wurden mit dem Gesamt-, melanomspezifischen und krankheitsfreien Überleben durch den Logrank-Test und durch univariable Cox-Regressionsanalysen korreliert. Darüber hinaus wurden mehrere multivariable Cox-Regressionsmodelle verwendet, um den gleichzeitigen, unabhängigen Einfluss mehrerer Parameter auf den jeweiligen Endpunkt zu testen. Das Ergebnis eines statistischen Tests wurde als signifikant für $p < 0,05$ angesehen. Für p-Werte zwischen 0,05 und 0,10 wurde ein Trend zur Signifikanz festgestellt. Alle statistischen Berechnungen wurden mit einer SAS-Software, Release 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Klinische Merkmale des Studienkollektivs

Insgesamt wurden zwischen September 2002 und Januar 2012 bei 419 Patienten in der Klinik für Dermatologie und Venerologie am Universitätsklinikum Mannheim ein MM erstdiagnostiziert, wovon 107 (25,5%) Patienten einen positiven Befund in der SLND aufwiesen. Elf Patienten mit positivem SLN konnten nicht in die Studie eingeschlossen werden. Bei sechs dieser Patienten erwiesen sich die Befunde in der erneuten Begutachtung der histologischen Schnitte als negativ. Dabei handelte es sich bei vier der Fälle um Färbeartefakte oder exogene Pigmentablagerungen im SLN. In zwei der Fälle handelte es sich retrospektiv um einen Kapselnävus. In drei Fällen waren die Schnitte aufgrund von ausgebleichten Färbungen nicht mehr auswertbar, oder sie waren zum Untersuchungszeitpunkt nicht auffindbar. Die befallenen Lymphknoten von zwei Patienten erwiesen sich bei erneutem Aktenstudium als Makrometastasen, sie wurden daher aus der Studie ausgeschlossen. Von den ursprünglich 107 SLN positiven Patienten konnten folglich 96 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Von den 96 in die Studie eingeschlossenen Patienten waren 41 (42,71%) weiblich und 55 (57,29%) männlich. Das Alter der Patienten lag zwischen 24 und 84 Jahren, mit einem Durchschnittsalter von $56,6 \pm 12,6$ Jahren und einem Median von 59 Jahren (Tab. 5).

Klinische Parameter		n	%
Geschlecht	Männlich	55	57,29
	Weiblich	41	42,71
Alter	Mittelwert	56,6	
	Median	59,0	
	Minimum-Maximum	24,0-84,0	
	Standardabweichung	12,6	

Tabelle 5: Alters- und Geschlechtsverteilung des Patientenkollektivs.

Das MM war am häufigsten an der unteren Extremität lokalisiert (38 Patienten/39,58%), gefolgt von der Lokalisation am Stamm bei 37 Patienten (38,54%), an der oberen Extremität bei 16 Patienten (16,67%) und an der Kopf-Hals Region bei lediglich fünf Patienten (5,21%) (Abb. 12).

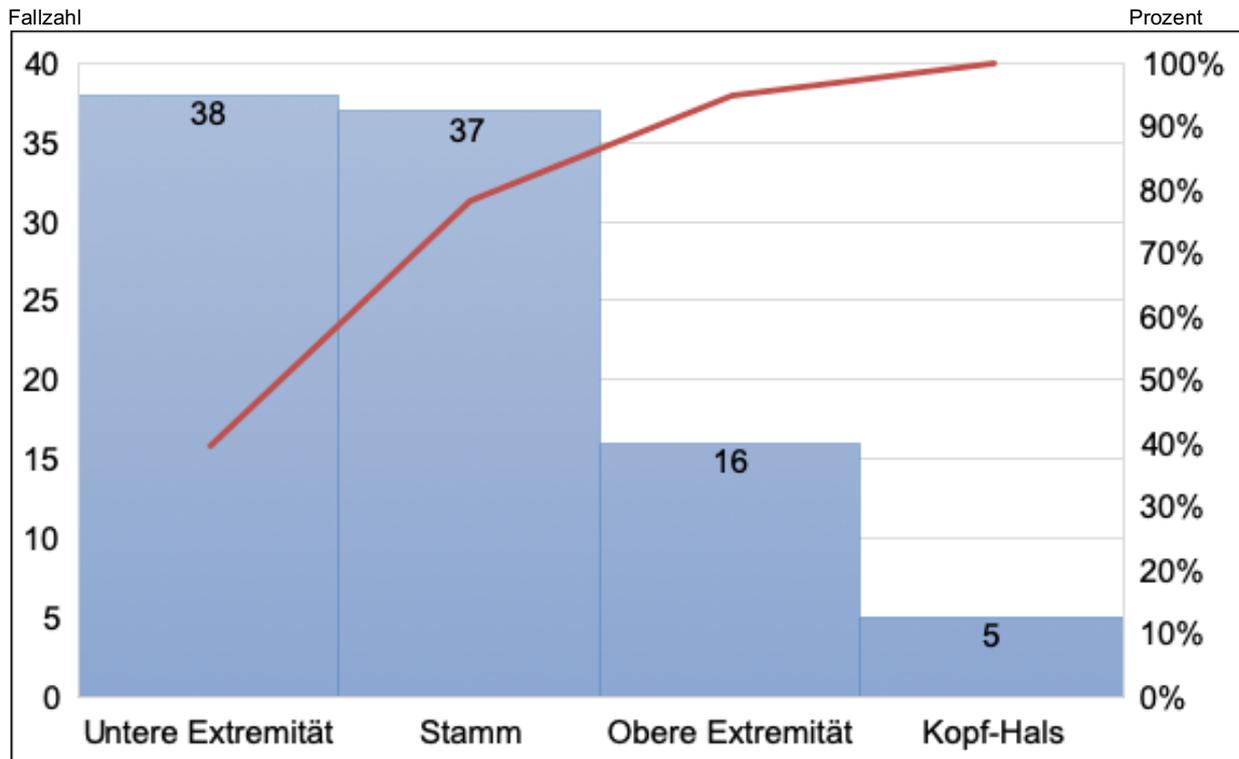


Abbildung 12: Verteilung der MM nach Körperregion. (- kumulative Verteilung in Bezug auf alle Tumoren. - Fallzahl der jeweiligen Körperregion.)

3.2 Histologische Merkmale des Malignen Melanoms

Nach sorgfältigem Studium der Patientenakten und der histologischen Befunde zeigte sich bei unserer Kohorte ein durchschnittliches pT Stadium 3a nach AJCC 2009. Es waren alle pT Stadien von 1a-4b im Patientenkollektiv vertreten (genaue Verteilung s. Tab. 6). Die durchschnittliche Tumordicke nach Breslow betrug $2,85 \pm 2,36$ mm, mit einem Median von 2,20 mm. Dabei variierten die Tumordicken zwischen 0,7 mm und 9,0 mm.

Primärmelanom		n	%
pT-Stadium	1a	5	5,21
	1b	7	7,29
	2a	24	25,00
	2b	7	7,29
	3a	17	17,71
	3b	15	15,63
	4a	8	8,33
	4b	13	13,54
pT-Stadium	Mittelwert	3a	
	Median	3a	
	Minimum - Maximum	1a-4b	
	Standardabweichung	eine Stufe	
Breslow	Mittelwert	2,85	

Median	2,20
Minimum-Maximum	0,70-9,00
Standardabweichung	2,36
Variationskoeffizient	196,94

Tabelle 6: pT Stadium nach AJCC 2009 und Tumordicke nach Breslow des Patientenkollektivs.

Die histologische Subklassifikation des Primarius ergab bei 39 Patienten ein NM (40,63%), bei 34 Patienten ein SSM (35,42%), bei 12 Patienten ein ALM (12,50%) und bei 2 Patienten ein LMM (2,08%). Bei 9 Patienten (9,37%) konnte das MM nicht genauer histologisch klassifiziert werden (Abb. 13).

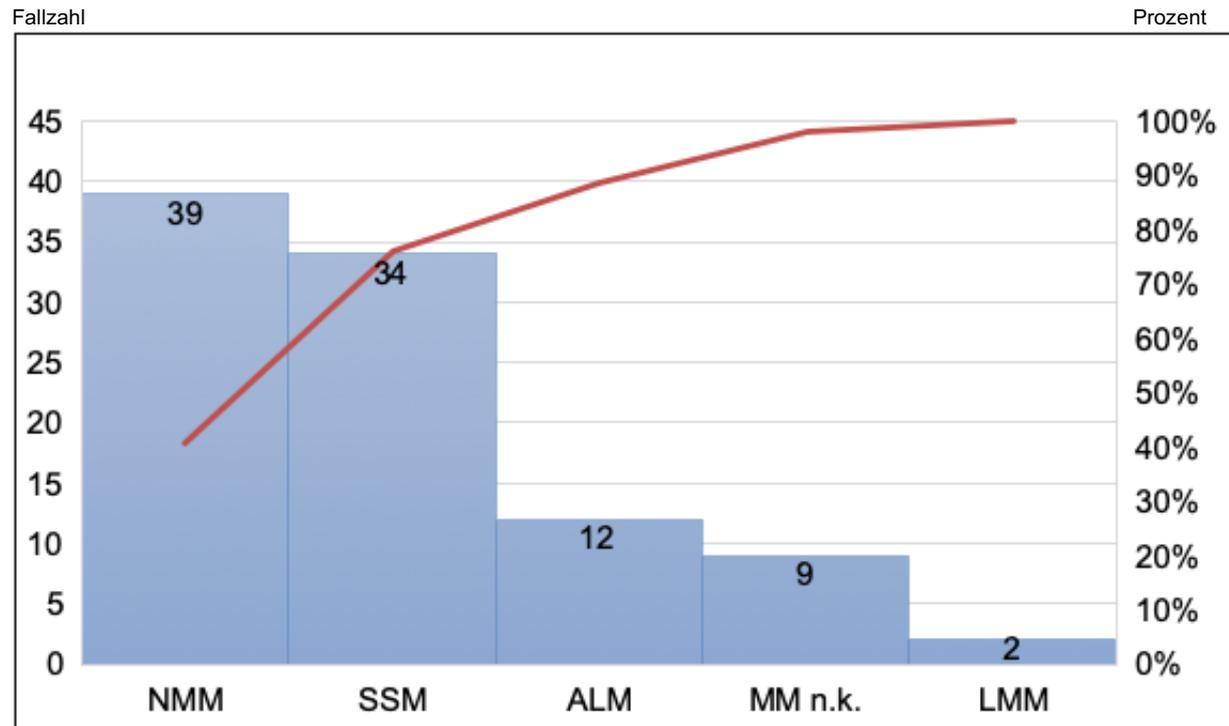


Abbildung 13: Verteilung der histologischen Subklassifikationen des Primarius. (MM n.k. = nicht klassifizierbares Melanom). (- kumulative Verteilung in Bezug auf alle Tumoren. - Fallzahl der jeweiligen Subklassifikation.)

Die Eindringtiefe des Primärtumors nach Clark betrug bei 72 Patienten (75,00%) das Stadium IV, das bedeutet, es zeigte sich bereits eine Invasion in das Stratum reticulare der Dermis. Bei 8 Patienten (8,33%) hatte das MM bei Diagnosestellung eine Eindringtiefe bis in die Subkutis und damit das Clark Level V erreicht. Da sich beim Clark Level I alle Tumorzellen oberhalb der Basalmembran befinden und damit ein Melanoma in situ vorliegt, ist es nicht verwunderlich, dass kein Patient unserer Kohorte das Clark Level I zeigte. Das Clark Level II und damit ein Überschreiten der Basalmembran mit Eindringen der Tumorzellen in das Stratum papillare zeigte sich bei zwei Patienten (2,08%). Bei einem Patienten (1,04%) wurde das Clark Level nicht dokumentiert. Die Mitoserate des Primarius, die bei kleinen Melanomen <0,75 mm als zusätzlicher Risikofaktor für ein Fortschreiten der Erkrankung nach AJCC 2009 gilt, zeigte sich bei 19 Patienten (19,79%) ≥ 1 , bei sechs Patienten (6,25%) war keine Mitose vorhanden. Bei 71 Patienten (73,96%) wurde die Mitoserate bei der Mikroskopie nicht erhoben. Eine Ulzeration des MM trat bei 39 Patienten (40,63%) auf. Die MM von 50 Patienten (52,08%) zeigten keine Ulzeration und bei sieben Patienten (7,29%) wurde dies im Histologiebefund nicht dokumentiert. Eine Regression zeigte sich in der histologischen Untersuchung von sieben Patienten (7,29%). 34 Patienten

(25,42%) hatten keine Regressionszonen und bei 55 Patienten (57,29%) wurde dies im Histologiebefund nicht dokumentiert (Tab. 7).

Primärmelanom		n	%
Clark	I	0	0,00
	II	2	2,08
	III	13	13,54
	IV	72	75,00
	V	8	8,33
	unbekannt	1	1,04
Mitoserate	<1	6	6,25
	≥1	19	19,79
	unbekannt	71	73,96
Ulzeration	ja	39	40,63
	nein	50	52,08
	unbekannt	7	7,29
Regression	ja	7	7,29
	nein	34	35,42
	unbekannt	55	57,29

Tabelle 7: Klinisch-histologische Merkmale der MM.

3.3 Histologische Merkmale der Sentinel Lymphknoten Metastasen

Am häufigsten zeigte sich bei der SLND nur ein positiver SLN (73 Patienten/76,04%). Zwei positive SLN konnten bei 21 Patienten (21,88%) gefunden werden und jeweils ein Patient hatte 3 bzw. 4 positive SLN (je 1,04%) in der SLND, was mit anderen Studien konkordant ist, die über 20-24% der Patienten mit mehr als einem SLN berichten.^{103, 110, 111} Bei 10 der Patienten mit mehr als einem SLN zeigte sich eine Lymphdrainage in mehrere Lymphabflussregionen, z.B. bei einem Melanom des Stammes nach cervical und nach axillär. Bei 66 Patienten (68,75%) erfolgte nach der SLND eine CLND, welche bei 8 Patienten (12,12%) einen weiteren Lymphknotenbefall nachwies (Tab. 8).

Sentinel Lymphknoten	Einteilung	n	%
Anzahl positiver SLN	1	73	76,04
	2	21	21,88
	3	1	1,04
	4	1	1,04
Anzahl positiver SLN	Mittelwert	1,3	
	Median	1,0	
	Standardabweichung	0,5	
Lymphdrainage in mehrere Lymphabflussregionen	ja	10	10,42
	nein	86	89,58
CLND	ja	66	68,75
	nein	23	23,96
	unbekannt	7	7,29
Ergebnis CLND	positiv	8	12,12
	negativ	52	78,79
	unbekannt	6	9,09

Tabelle 8: Klinisch-histologische Merkmale des SLN.

Die befallenen SLN waren bei 45 Patienten (46,88%) axillär lokalisiert, bei 41 Patienten (42,71%) inguinal lokalisiert und bei jeweils 1-3 Patienten (1,04-3,13%) cervical, cubital, popliteal, subskapulär oder buccal lokalisiert (s. Abb. 14).

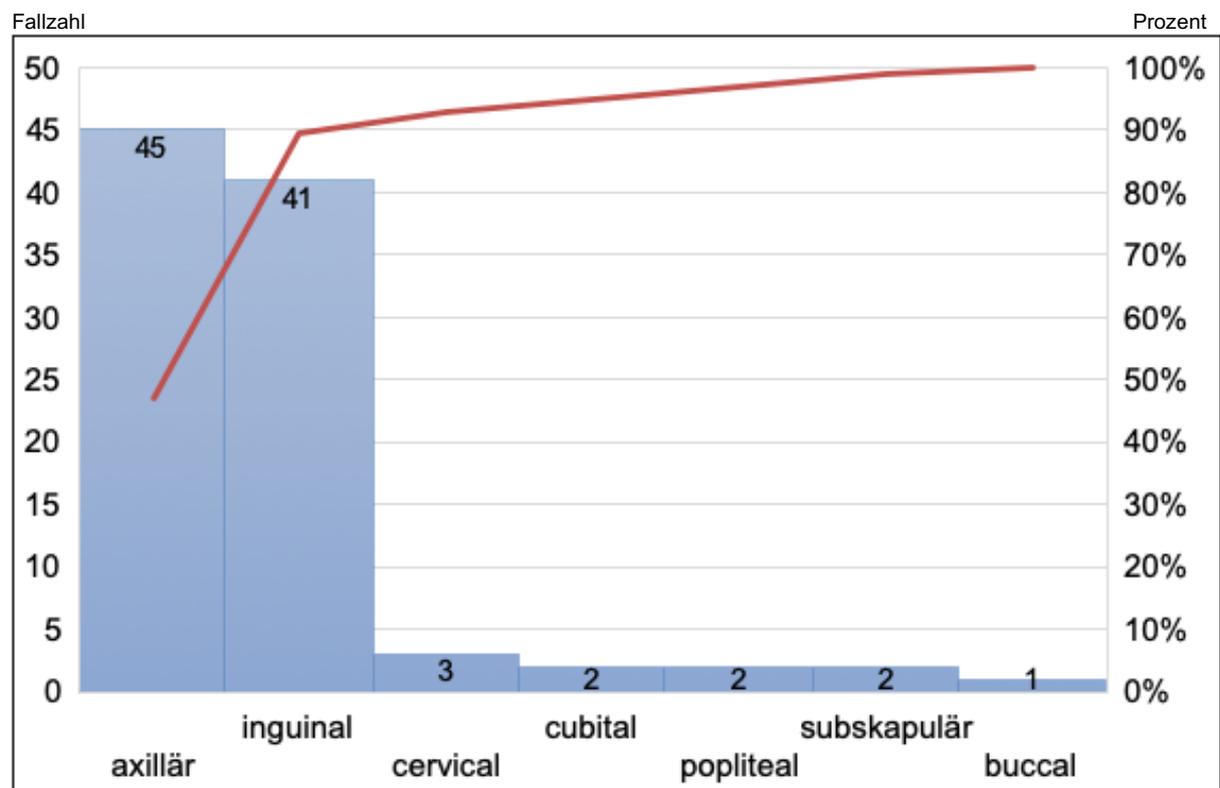


Abbildung 14: Verteilung der SLN nach Lokalisation. (- kumulative Verteilung in Bezug auf alle Tumoren. - Fallzahl der jeweiligen SLN Lokalisation.)

3.3.1 Größtes Tumornest in Größe und Zellzahl (Rotterdam)

Das größte Tumornest des SLN betrug im Durchschnitt $1,20 \text{ mm} \pm 1,36 \text{ mm}$ und variierte von $0,03\text{-}17,00 \text{ mm}$. Wurde die Größe der größten Metastase des SLN anhand der Zellzahl gemessen, so betrug sie bei 44 Patienten (45,83%) weniger als 30 Zellen und bei 52 Patienten (54,17%) 30 oder mehr Zellen. Gemäß der Rotterdam Klassifikation, welche hier als Rotterdam I bezeichnet wird, waren die größten Tumornester bei 24 Patienten (25,00%) $<0,1 \text{ mm}$ und wurden somit als R I klassifiziert. Bei 46 Patienten (47,92%) zeigte sich das Stadium R II und bei 26 Patienten (27,08%) zeigte sich das Stadium R III. Zum Überprüfen der Grenzwerte für die Rotterdam Klassifikation erfolgte zudem die Einteilung mit verschiedenen Grenzwerten für R I und R II (Tab. 9).

Klassifikationen	Einteilung	n	%
Rotterdam I (Original Klassifikation)	R I ($<0,1 \text{ mm}$)	24	25,00
	R II ($0,1\text{-}1,0 \text{ mm}$)	46	47,92
	R III ($>1,0 \text{ mm}$)	26	27,08
Rotterdam II	R I ($<0,2 \text{ mm}$)	34	35,42
	R II ($0,2\text{-}1,0 \text{ mm}$)	36	37,50
	R III ($>1,0 \text{ mm}$)	26	27,08
Rotterdam III	R I ($<0,3 \text{ mm}$)	40	41,67
	R II ($0,3\text{-}1,0 \text{ mm}$)	30	31,25
	R III ($>1,0 \text{ mm}$)	26	27,08
Rotterdam IV	R I ($<0,4 \text{ mm}$)	47	48,96
	R II ($0,4\text{-}1,0 \text{ mm}$)	23	23,96
	R III ($>1,0 \text{ mm}$)	26	27,08

Tabelle 9: Einteilung der SLN anhand des Durchmessers des größten Tumornestes in die Rotterdam Klassifikation I-IV mit verschiedenen Grenzwerten.

3.3.2 Eindringtiefe der Tumorzellen (Augsburg S)

Die durchschnittliche Eindringtiefe der Metastase des SLN betrug bei einer konsequenten Messung ab der Lymphknotenkapsel $1,11 \text{ mm} \pm 1,52 \text{ mm}$ und variierte von $0,0$ bis $8,0 \text{ mm}$. Für Metastasen mit subtrabekulärer Lage wurde jeweils die Eindringtiefe ab der Kapsel und ab dem Trabekel erfasst und mit beiden Werten die Einteilung in die Augsburg S bzw. Augsburg S II Klassifikation vorgenommen. Bei beiden Einteilungen ergab sich am häufigsten eine Einteilung in das Stadium S III mit 36,46% bei der Augsburg S Klassifikation und 35,42% bei der Augsburg S II Klassifikation (Tab. 10).

Klassifikationen	Einteilung	n	%
Augsburg S (Messung ab der Kapsel oder dem Trabekel)	S I	32	33,33
	S II	29	30,21
	S III	35	36,46
Augsburg S II (Messung immer ab der Kapsel)	S I	33	34,38
	S II	29	30,21
	S III	34	35,42

Tabelle 10: Einteilung anhand der Eindringtiefe der Metastase in den SLN. (Augsburg S/S II).

3.3.3 Art der Infiltration (Dewar)

Das Befallsmuster der SLN Metastase zeigte sich gemäß der Klassifikation nach Dewar bei 44 Patienten (45,83%) subkapsulär, bei 25 Patienten (26,04%) kombiniert, bei 23 Patienten multifokal (23,96%) und bei vier Patienten (4,17%) extensiv. Eine rein parenchymale Lage zeigte sich bei keinem der 96 Patienten. Bei der Unterteilung in die Dewar1 Klassifikation zeigten somit 92 Patienten (95,83%) kein extensives Wachstum und bei der Unterteilung in die Dewar2 Klassifikation zeigten somit 52 Patienten (54,17%) kein subkapsuläres Wachstum (Abb. 15).

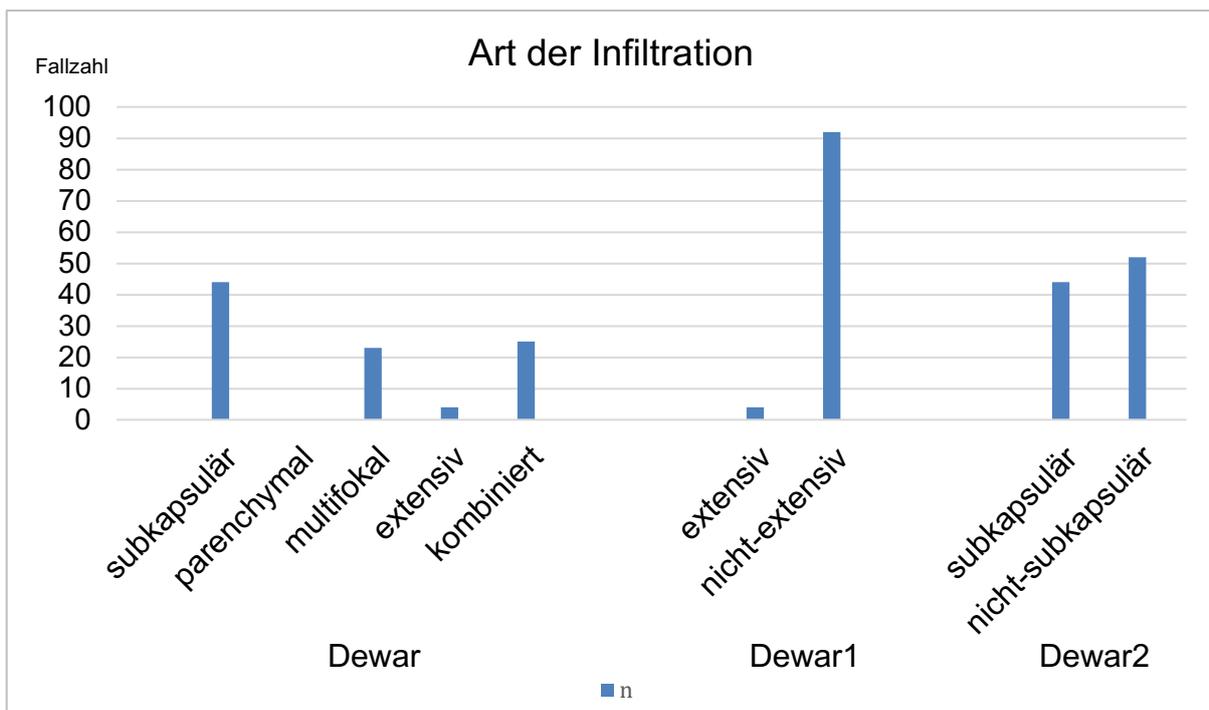


Abbildung 15: Einteilung der SLN Metastasen anhand des Befallsmusters gemäß Dewar, Dewar1 und Dewar2 Klassifikation.

3.3.4 Mitoserate

In der Mehrzahl der Fälle (69 Patienten/71,88%) konnte bei der mikroskopischen Untersuchung der SLN Metastasen keine Mitose gefunden werden. Hingegen bei 27 Patienten (28,13%) konnte eine oder mehr Mitosen pro mm² nachgewiesen werden. Die Anzahl der Mitosen pro mm² variierte dabei zwischen einer und 15 Mitosen (Tab. 11). Die Grenzwerte für eine Einteilung der SLN-MR wurden zum einen identisch mit den Grenzwerten bei der Begutachtung des Primärtumors gewählt, nämlich <1/mm² vs. ≥1/mm², zum anderen wurden weitere Grenzwerte bestimmt und mit den verschiedenen Endpunkten korreliert. Hierbei zeigte sich ein Grenzwert von eins (<1/mm² vs. ≥1/mm²) vorteilhaft gegenüber den anderen Grenzwerten. (s. Kapitel 3.4.2)

Mitoserate	Einteilung	n	%
	0	69	71,88
	1	5	5,21
	2	5	5,21
	3	4	4,17
	4	1	1,04
	5	5	5,21
	6	3	3,13
	8	1	1,04
	9	1	1,04
	13	1	1,04
	15	1	1,04
	Mittelwert	1,2	
	Median	0,0	
	Minimum-Maximum	0-15	
	Standardabweichung	2,7	
SLN-MR1	<1	69	71,88
	≥1	27	28,13

Tabelle 11: Einteilung der SLN Metastasen anhand der Mitoserate.

3.3.5 Kombinierte Klassifikationssysteme (RDC/Hannover)

Nach Einteilung der SLN Metastasen anhand der RDC Klassifikation (Rotterdam + Dewar kombiniert) zeigte sich am häufigsten (26 Patienten/27,08%) eine Metastase >1,0 mm. Am zweithäufigsten waren die Metastasen 0,1-1,0 mm groß und lagen bei 23 Patienten (23,96%) subkapsulär und bei 24 Patienten (25,00%) nicht subkapsulär. Somit zeigt sich die Lageverteilung bei dieser Metastasengröße ausgeglichen. Kleine SLN Metastasen, <0,1 mm Durchmesser, zeigten sich bei 17 Patienten (17,71%) subkapsulär, bei 6 Patienten (6,25%) nicht subkapsulär und somit deutlich häufiger subkapsulär gelegen (Tab. 12).

Klassifikationen	Einteilung	n	%
RDC	<0,1 mm & subkapsulär	17	17,71
	<0,1 mm & nicht-subkapsulär	6	6,25
	0,1-1,0 mm & subkapsulär	23	23,96
	0,1-1,0 mm & nicht-subkapsulär	24	25,00
	>1,0 mm & subkapsulär oder nicht-subkapsulär	26	27,08

Tabelle 12: RDC Klassifikation anhand der Lage und der Größe der Metastase.

Wurden die SLN Metastasen mit dem Punktesystem der Hannover Klassifikation bewertet, so zeigten sich bei der originalen Hannover Klassifikation 25 Patienten (26,04%) der Kategorie 0, 32 Patienten (33,33%) mit der Kategorie 1, 28 Patienten (29,17%) mit der Kategorie 2 und nur 11 Patienten (11,46%) mit der Kategorie 3. Bei der Hannover II Klassifikation ergab sich bei den meisten Patienten die Kategorie 2 (60 Patienten/62,50%) und die Kategorie 3 zeigte sich mit 11 Patienten (11,46%) gleich häufig wie bei der Hannover Klassifikation. Bei 25 Patienten (26,04%) ergab die histologische Klassifikation die Kategorie 1 (Tab. 13).

Klassifikationen	Einteilung	n	%
Hannover	0	25	26,04
	1	32	33,33
	2	28	29,17
	3	11	11,46
Hannover II	1	25	26,04
	2	60	62,50
	3	11	11,46

Tabelle 13: Hannover und Hannover II Klassifikation anhand der Tumorlast, der Eindringtiefe und der Kapselinfiltration.

3.3.6 Neu erhobene Klassifikationssysteme (Rotterdam+Mitose/Augsburg+Mitose)

Neu kombinierten wir die Größe der größten SLN Metastase (analog der Rotterdam Klassifikation) mit der durch uns erstbeschriebenen SLN-MR. Rotterdam II hatte zwar bei der univariaten Analyse beim Gesamtüberleben und beim MM spezifischen Überleben einen etwas niedrigeren p-Wert gegenüber Rotterdam, bei der multivariablen Cox-Regression wurde allerdings immer Rotterdam eingeschlossen und nicht Rotterdam II-IV, weshalb wir uns entschieden, Rotterdam in unser neues kombiniertes Klassifikationssystem mit aufzunehmen (s. Kapitel 3.6.1). Diese Klassifikation wurde Rotterdam+Mitose genannt. Hierfür wurde jede Kategorie der Rotterdam Klassifikation in A und B unterteilt. Dabei steht A für keine Mitose und B für ≥ 1 Mitose/mm². Selbiges Vorgehen erfolgte mit der Augsburg S Klassifikation, welche auf der Eindringtiefe der Tumorzellen basiert. Diese Klassifikation wurde Augsburg+Mitose bezeichnet.

Für die Rotterdam+Mitose Klassifikation zeigte sich bei 25 Patienten (26,04%) das Stadium IA, wohingegen kein Patient dem Stadium IB zugeordnet werden konnte. Bei

den SLN Metastasen mit einem Durchmesser von 0,1-1,0 mm zeigte sich bei 38 Patienten (39,58%) keine Mitose, bei 6 Patienten (6,25%) konnte eine Mitose nachgewiesen werden. Bei großen Metastasen, >1,0 mm konnte bei 21 Patienten (21,88%) eine Mitose gefunden werden und 6 Patienten (6,25%) wiesen keine Mitose im Präparat auf (Abb. 16). Die Anzahl der Patienten mit Mitosen in der histologischen Aufarbeitung des SLN nimmt also mit dem Durchmesser des maximalen Tumornestes zu.

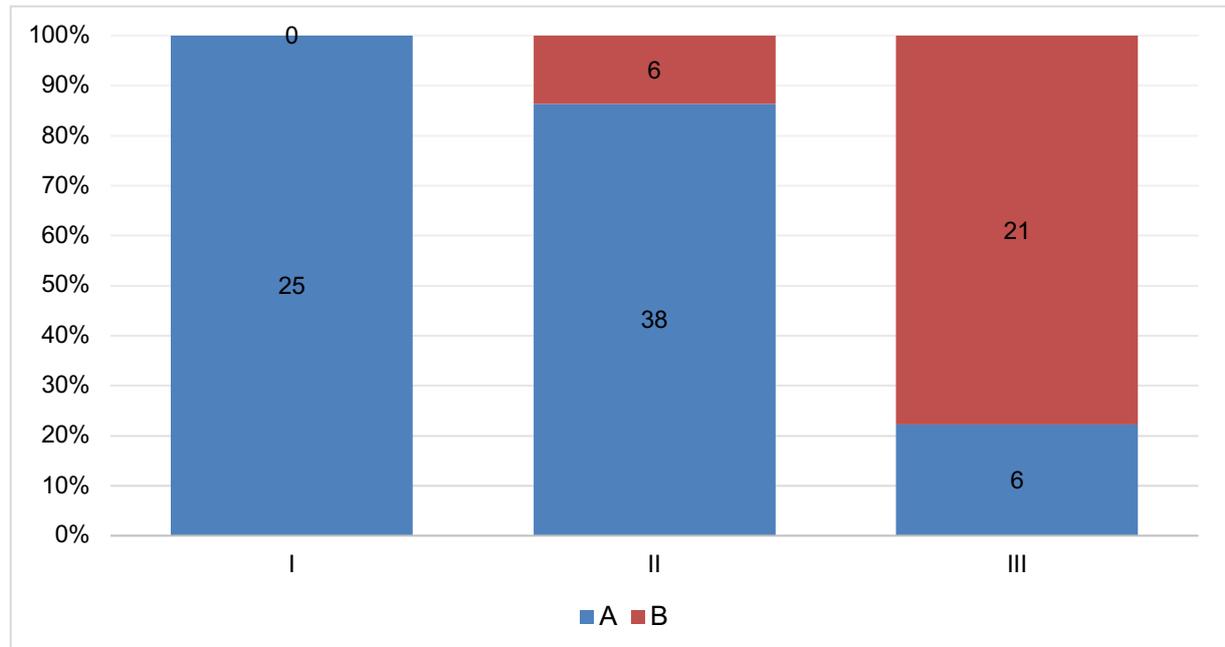


Abbildung 16: SLN Klassifikation anhand des modifiziertes Rotterdam Klassifikationssystems (Rotterdam+Mitose).

Auch bei der kombinierten Klassifikation mit Mitoserate und Eindringtiefe nach der Augsburg Klassifikation zeigte sich, dass Metastasen mit einer kleinen Eindringtiefe <0,3 mm keine Mitosen aufweisen. 32 Patienten (33,33%) wurden als Kategorie IA klassifiziert und 0 Patienten als Kategorie IB. Bei Eindringtiefen von 0,3-1,0 mm zeigte sich bei 22 Patienten (22,92%) keine Mitose und somit ein Stadium IIA, wohingegen bei 8 Patienten (8,33%) eine Mitose nachgewiesen werden konnte. Bei Eindringtiefen >1,0 mm und damit Stadium III, zeigen sich bei 19 Patienten (19,79%) eine Mitose (IIIB) und bei 15 Patienten (15,63%) keine Mitose (IIIA). Die Anzahl der Patienten mit Mitosen in der histologischen Aufarbeitung des SLN nimmt also ebenfalls mit der maximalen Eindringtiefe der Metastase zu. (Abb. 17)

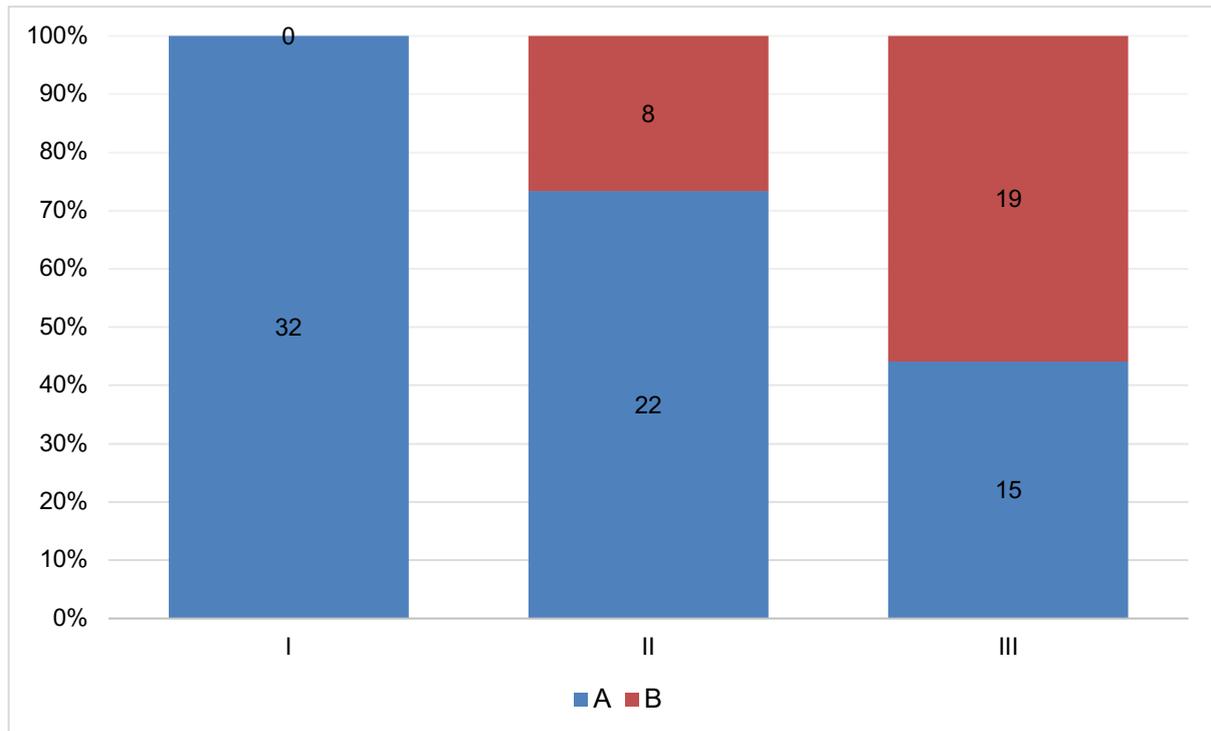


Abbildung 17: Prozentualer Anteil der Patienten mit Mitosen bei den jeweiligen Eindringtiefen anhand des modifiziertes Augsburg Klassifikationssystems (Augsburg+Mitose).

3.3.7 Weitere erhobene Parameter

Eine Infiltration der Lymphknotenkapsel zeigte sich bei 54 Patienten (56,25%). Das Färbungsmuster von anti-Mart1 und anti-HMB45 sowie die errechnete Lymphknotenfläche waren im Verlauf der statistischen Aufarbeitung wegen der geringen Verteilungsbreite nicht sinnvoll mit den Endpunkten zu korrelieren und wurden somit aus der weiteren Statistik ausgeschlossen.

Von den 11 Patienten (11,56%), bei denen sich ein positiver Mutationsstatus des MM zeigte, zeigten 9 Patienten eine BRAF Mutation, ein Patient wies eine c-kit Mutation auf und ein Patient zeigte eine NRAS Mutation. Alle 11 Patienten erhielten eine Systemtherapie mit Immun-Checkpoint Inhibitor oder zielgerichteter Therapie, wobei 6 Patienten eine Therapie mittels Vemurafenib, 4 Patienten eine Therapie mittels Ipilimumab und ein Patient eine Therapie mit beiden Immunmodulatoren erhielten.

3.3.8 Follow up

Der Nachbeobachtungszeitraum der Patienten betrug zwischen einem Monat und 145,9 Monaten und im Durchschnitt 53,0 Monate nach der SLN Exzision, wobei der letzte Follow up Termin im März 2015 war. Bei 40 Patienten (41,67%) kam es zu einem Fortschreiten der Erkrankung, wobei das Rezidiv bei 6 Patienten (15%) lokoregionär kutan im Sinne von Satelliten- oder In-transit Metastasen auftrat. Bei 12 Patienten (30,00%) zeigten sich im Verlauf Lymphknotenmetastasen, bei 20 Patienten (50,00%) kam es zu einer Fernmetastasierung und bei 2 Patienten (5,00%) war nicht dokumentiert, wo die Metastasen zuerst auftraten.

Im Zeitraum der Nachuntersuchung verstarben 26 Patienten (27,08%) der Kohorte, davon verstarben 23 Patienten (88,46%) am MM. Drei Patienten (11,54%) verstarben an einer anderen Ursache. Davon verstarb jeweils ein Patient an einem Prostatakarzinom, einem Blasenkarzinom und einem Kolonkarzinom. (Tab. 14)

Follow up	Einteilung	Tage	Monate
Beobachtungszeitraum alle 96 Patienten	Mittelwert	1701,3	55,9
	Median	1614,0	53,0
	Minimum - Maximum	31-4442	1,0-145,9
Dauer bis Rekurrenz	Mittelwert	577,7	19,0
	Median	365,0	12,0
	Minimum - Maximum	0-3080	0,0-101,3
Dauer bis Versterben	Mittelwert	1132	37,2
	Median	900	29,6
	Minimum - Maximum	162-4246	5,3-139,5
Follow up	Einteilung	n	%
Rekurrenz	ja	40	41,67
	nein	56	58,33
Erstbefall bei Rekurrenz	lokoregionär cutan	6	15,00
	regionale Lymphknoten	12	30,00
	Fernmetastasen	20	50,00
	unbekannt	2	5,00
Verstorben	ja	70	72,92
	nein	26	27,08
	am MM	23/26	88,46
	andere Ursache	3/26	11,54

Tabelle 14: Follow up Daten aller Patienten nach SLND.

3.4 Korrelation von histologischen Merkmalen des Sentinel Lymphknoten mit dem pT Stadium des Malignen Melanom

Zur Methodvalidierung erfolgte eine Positivkontrolle einiger histologischer Parameter des SLN mit dem pT Stadium des MM. Hierbei zeigte sich sowohl für die Rotterdam Klassifikation ($p = 0,0081$) als auch für die Augsburg Klassifikation ($p = 0,042$) eine signifikante Korrelation mit dem pT Stadium des MM (Tab. 15).

Rotterdam I	n	Median pT	Mittelwert pT	<i>p</i>
R I	24	2a	2b	
R II	46	3a	3a	
R III	26	3b	3b	0,0081

Augsburg S	n	Median pT	Mittelwert pT	<i>p</i>
S I	33	2a	2a	
S II	29	3a	3a	
S III	34	3a	3a	0,041

Tabelle 15: Korrelation der Rotterdam Klassifikation und der Augsburg Klassifikation des SLN mit dem pT Stadium des MM.

Auch für die neu erhobene Mitoserate des SLN konnte eine signifikante Korrelation mit dem pT Stadium des MM nachgewiesen werden. Dieser signifikante Zusammenhang zeigte sich sowohl für die absoluten Werte der Mitoserate ($p = 0,0021$, Tab. 16), als auch für die binäre Klassifikation SLN-MR1 ($p = 0,0078$, Tab. 17).

pT-Stadium	n	Median Mitoserate	Mittelwert Mitoserate	<i>p</i>
1a	5	0,00	0,40	
1b	7	0,00	1,00	
2a	24	0,00	0,13	
2b	7	0,00	0,14	
3a	17	0,00	1,82	
3b	15	0,00	0,87	
4a	8	3,00	2,88	
4b	13	0,00	3,00	0,0021

Tabelle 16: Korrelation der Mitoserate des SLN mit dem pT Stadium des MM.

Mitoserate1	n	Median pT	<i>p</i>
<1	69	2b	
≥1	27	3b	0,0078

Tabelle 17: Korrelation der binären SLN-MR1 Klassifikation des SLN mit dem pT Stadium des MM.

Für die neu erhobenen kombinierten Klassifikationssysteme Rotterdam+Mitose ($p = 0,0021$) und Augsburg+Mitose ($p = 0,0081$) konnte ebenfalls eine signifikante Korrelation mit dem pT Stadium des MM gezeigt werden (Tab. 18). Die kombinierte Klassifikation Rotterdam+Mitose zeigt dabei einen tieferen p -Wert als die Rotterdam Klassifikation alleine ($p = 0,0081$), nicht aber als die Mitoserate alleine ($p = 0,0021$).

Rotterdam + Mitose	n	Median pT	Min - Max pT	p
IA	25	2a	1a - 4b	
IB	0			
IIA	38	2b	1a - 4b	
IIB	6	3a	1b - 4a	
IIIA	6	3b	2a - 4b	
IIIB	21	3b	1a - 4b	0,0021

Tabelle 18: Korrelation der Rotterdam+Mitose Klassifikation des SLN mit dem pT Stadium des MM.

Die kombinierte Klassifikation Augsburg+Mitose zeigt ebenfalls einen tieferen p -Wert ($p = 0,0081$) und somit eine stärker signifikante Korrelation mit dem pT Stadium des MM als die Augsburg Klassifikation alleine ($p = 0,041$), nicht aber als die Mitoserate alleine ($p = 0,0021$, Tab. 19).

Augsburg + Mitose	n	Median pT	Min - Max pT	p
IA	32	2a	1a - 4b	
IB	0			
IIA	22	3a	1a - 4b	
IIB	8	3a	1a - 4b	
IIIA	15	2b	1b - 4b	
IIIB	19	3b	1b - 4b	0,0081

Tabelle 19: Korrelation der Augsburg+Mitose Klassifikation des SLN mit dem pT Stadium des MM.

3.5 Korrelation der Mitoserate mit etablierten histologischen Parametern des Sentinel Lymphknoten

Um beurteilen zu können, wie sich die Mitoserate auf die bereits bestehenden Klassifikationssysteme bezieht, erfolgte eine univariable Korrelationsanalyse mit der Augsburg S Klassifikation und der Rotterdam Klassifikation. Die SLN-MR korrelierte signifikant sowohl mit der Rotterdam, als auch mit der Augsburg S Klassifikation. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient lag bei 0,51 und 0,66 ($p < 0,0001$ für beide Klassifikationen), was auf eine moderate bis starke Korrelation hinweist (Tab. 20).

Parameter	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient	p	Interpretation
Augsburg S	0,51	<0,0001	moderate Korrelation
Rotterdam	0,66	<0,0001	starke Korrelation

Tabelle 20: Univariable Korrelation der Mitoserate mit der Rotterdam und der Augsburg S Klassifikation.

Die meisten aktuellen Arzneimittelstudien zur adjuvanten Therapie von Melanom Patienten im Stadium 3 betrachten einen Durchmesser des größten Tumornestes des SLN größer ein Millimeter als Einschlusskriterium. Daher wurden anschließend die

binären Klassifikationen für den Durchmesser des größten Tumornestes im SLN ($\leq 1\text{mm}$ vs. $>1\text{mm}$) und für die Eindringtiefe der Metastase in den SLN ($\leq 1\text{mm}$ vs. $>1\text{mm}$) ebenfalls mit der Mitoserate korreliert (Tab. 21). Die gewählten Grenzwerte sind identisch mit den Grenzwerten der fortgeschrittenen Stadien der etablierten Augsburg S Klassifikation (SIII) und der Rotterdam Klassifikation (RIII). Auch hier zeigt sich eine moderate bis starke Korrelation zwischen der SLN-MR, der Eindringtiefe der Metastase und dem Durchmesser des größten Tumornestes.

Parameter	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient	<i>p</i>	Interpretation
Eindringtiefe (binär)	0,55	$<0,0001$	moderate Korrelation
Größtes Tumornest (binär)	0,70	$<0,0001$	starke Korrelation

Tabelle 21: Univariable Korrelation der SLN-MR mit der Eindringtiefe der Metastase in den SLN ($\leq 1\text{mm}$ vs. $>1\text{mm}$) und dem Durchmesser des größten Tumornestes im SLN ($\leq 1\text{mm}$ vs. $>1\text{mm}$).

Beim direkten Vergleich der Klassifikationssysteme zeigten sich bei 80,8% der Patienten mit einem maximalen Durchmesser des größten Tumornestes $>1\text{mm}$ (d.h. RIII nach der Rotterdamer Klassifikation) und 55,9% der Patienten mit einer maximalen Eindringtiefe $>1\text{mm}$ (d.h. SIII nach der Augsburg S Klassifikation) eine SLN-MR ≥ 1 Mitosen/ mm^2 . Bei 8,6% der Patienten mit einem maximalen Durchmesser des größten Tumornestes $<1\text{mm}$ und 12,9% der Patienten mit einer maximalen Eindringtiefe $<1\text{mm}$ zeigte sich jedoch ebenfalls eine SLN-MR ≥ 1 Mitose/ mm^2 . Diese Verschiebung der Patienten zwischen den Gruppen mit hohem und niedrigem Risiko deutet darauf hin, dass sich auch der prognostische Wert der verschiedenen Klassifikationssysteme unterscheiden kann.

3.5.1 Bildung eines binären Scores für die SLN-MR

Für einen vereinfachte klinische Anwendung wurden für die SLN-MR ebenfalls verschiedene binäre Grenzwerte gebildet und anschließend mit dem Gesamtüberleben der Patienten korreliert. Im direkten Vergleich der verschiedenen Grenzwerte der SLN-MR (d.h. <1 vs. ≥ 1 ; <2 vs. ≥ 2 ; <3 vs. ≥ 3 ; <4 vs. ≥ 4 Mitosen/ mm^2) zeigte sich, dass die Trennung beider Gruppen in Bezug auf das Gesamtüberleben für die binäre Klassifikation <1 Mitose/ mm^2 vs. ≥ 1 Mitose/ mm^2 die höchste Signifikanz aufweist ($p < 0,0001$). Für die Grenzwerte <2 vs. ≥ 2 Mitosen/ mm^2 ($p = 0,0002$), <3 vs. ≥ 3 Mitosen/ mm^2 ($p = 0,0148$) und <4 vs. ≥ 4 Mitosen/ mm^2 ($p = 0,1765$) zeigte sich eine schwächere bis keine signifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben (Tab. 22, Abb. 18).

Parameter	Grenzwert	<i>p</i>
SLN-MR1	<1 vs. ≥ 1	$<0,0001$
SLN-MR2	<2 vs. ≥ 2	0,0002
SLN-MR3	<3 vs. ≥ 3	0,0148
SLN-MR4	<4 vs. ≥ 4	0,1765

Tabelle 22: Vergleich verschiedener Grenzwerte der Mitoserate des SLN (SLN-MR) in Bezug auf das Gesamtüberleben.

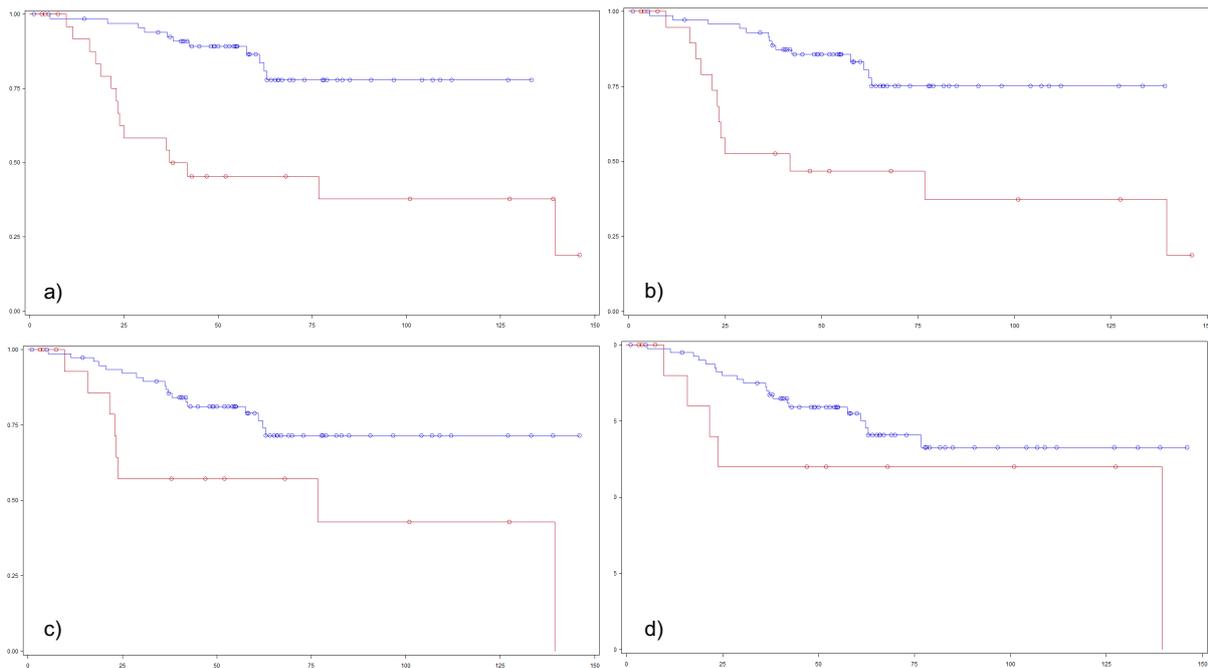


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurven für die Korrelation der verschiedenen Cut-off Werte der SLN-MR a) < 1 vs. ≥ 1 Mitosen/mm² b) < 2 vs. ≥ 2 Mitosen/mm² c) < 3 vs. ≥ 3 Mitosen/mm² d) < 4 vs. ≥ 4 Mitosen/mm² mit dem Gesamtüberleben der Studienkohorte.

3.6 Univariable Korrelation von histologischen Merkmalen des Sentinel Lymphknoten mit dem krankheitsfreien Überleben

Bei der univariablen Korrelation der absoluten Werte für die Tumordicke des MM, die Eindringtiefe in den SLN, den Durchmesser des größten Tumornestes des SLN sowie die Mitoserate des SLN und die Anzahl positiver SLN mit dem krankheitsfreien Überleben zeigte sich eine stark signifikante Korrelation mit der Tumordicke des MM nach Breslow ($p < 0,0001$), der Eindringtiefe der Tumorzellen in den SLN ($p < 0,0001$) und dem Durchmesser der größten Metastase im SLN ($p < 0,0001$). Auch die Anzahl der Mitosen im SLN zeigte eine signifikante Korrelation mit dem krankheitsfreien Überleben ($p = 0,0410$). Die Anzahl positiver Lymphknoten bei der SLND korrelierte nicht signifikant mit dem krankheitsfreien Überleben ($p = 0,1706$, Tab. 23).

Parameter	Hazard ratio	95% KI	p
Breslow (mm)	1,304	1,154-1,474	$< 0,0001$
Eindringtiefe (mm)	1,419	1,191-1,691	$< 0,0001$
Durchmesser größtes Tumornest (mm)	1,244	1,132-1,367	$< 0,0001$
Mitoserate (Mitosen/mm ²)	1,089	1,004-1,183	0,0410
Anzahl positiver SLN	1,529	0,833-2,809	0,1706

Tabelle 23: Univariable Cox Regressionsanalyse mit verschiedenen Parametern des Primarius und des SLN mit dem krankheitsfreien Überleben. (KI = Konfidenzintervall)

Erfolgt die Einteilung in die verschiedenen histologischen Klassifikationssysteme, verändern sich die p-Werte, was statistisch nachvollziehbar ist. Einfachere Cut-off Werte haben den Vorteil, dass sie praktisch besser anwendbar sind. Sie haben andererseits den Nachteil, dass sie bezüglich der verschiedenen Endpunkte nicht optimal trennen. Da die Anwendbarkeit in der klinischen Praxis für uns Grundvoraussetzung ist, wurden die weiteren Auswertungen mit den jeweiligen Klassifikationen durchgeführt.

Alle durch uns erhobenen Klassifikationssysteme zeigten eine signifikante Korrelation mit dem krankheitsfreien Überleben. Bemerkenswerterweise zeigte die binäre Klassifikation auf Basis der SLN-MR1 (<1 vs. ≥ 1 Mitosen/mm²) eine hochsignifikante Korrelation mit dem krankheitsfreien Überleben ($p < 0,0001$, Tab. 24). Die Hazard Ratios beziehen sich jeweils auf die kleinste Ausprägung des Merkmales als Referenzgruppe (Bsp. pT Stadium = T1, Hannover = 0 Punkte).

Parameter	n	Hazard ratio	95% KI	p
pT				
T1	12	1		
T2	31	3,083	0,390-24,350	0,2856
T3	33	8,191	1,090-61,580	0,0410
T4	20	14,823	1,940-113,272	0,0094
Augsburg S				
S I	34	1		
S II	26	1,574	0,650-3,345	0,3534
S III	33	2,171	1,023-4,607	0,0434
Rotterdam				
R I	23	1		
R II	45	1,397	0,582-3,352	-
R III	25	3,028	1,239-7,399	0,0151
SLN-MR1				
<1/mm ²	67	1		
≥ 1 /mm ²	26	3,529	1,893-6,578	<0,0001
Eindringtiefe				
≤ 1 mm	60	1		
>1 mm	33	1,807	0,973-3,356	0,0610
Durchmesser größtes Tumornest				
≤ 1 mm	68	1		
>1 mm	25	2,405	1,279-4,522	0,0064
Dewar				
subkapsulär	42	1		
multifokal	23	1,549	0,732 -3,279	0,2525
kombiniert	24	0,930	0,410 -2,105	0,8609
extensiv	4	12,892	4,014	<0,0001
parenchymal	0	-	-	-
RDC				
<0,1 mm & subkapsulär	17	1		
<0,1 mm & nicht-subkapsulär	6	1,349	0,261 -6,963	0,7211
0,1-1,0 mm & subkapsulär	21	1,482	0,484 -4,539	0,4908
0,1-1,0 mm & nicht-subkapsulär	24	1,529	0,522 -4,479	0,4384
>1,0 mm & subkapsulär oder nicht-subkapsulär	25	3,267	1,192 -8,953	0,0213
Hannover				
0	23	1		
1	31	1,126	0,443 -2,862	0,8035
2	28	1,658	0,651 -4,222	0,2890
3	11	4,722	1,785 -12,492	0,0018

Hannover II					
1		25	1		
2		57	1,816	0,784 -4,205	0,1636
3		11	5,349	1,978 -14,465	0,0010

Tabelle 24: Univariable Cox Regressionsanalyse verschiedener Klassifikationssysteme des SLN und des pT Stadium des MM mit dem krankheitsfreien Überleben.

Auch die durch uns neu erhobenen Klassifikationssysteme Rotterdam+Mitose ($p < 0,0001$) und Augsburg+Mitose ($p = 0,0003$) zeigen eine deutlich signifikante Korrelation mit dem krankheitsfreien Überleben (Tab. 25, 26).

Rotterdam + Mitose					
	n	Rezidiv	Tage	Monate	p
IA	25	Mittelwert	1480	48,7	
		Median	1476	48,5	
		Minimum-Maximum	28-3256	0,9-107,1	
IB	0	-	-	-	
IIA	38	Mittelwert	1540	51,1	
		Median	1614	53,1	
		Minimum-Maximum	0-3409	0-113,0	
IIB	6	Mittelwert	436	14,3	
		Median	349	11,5	
		Minimum-Maximum	245-974	8,1-32,0	
IIIA	6	Mittelwert	1018	33,5	
		Median	563	18,5	
		Minimum-Maximum	61-2760	2,0-90,7	
IIIB	21	Mittelwert	1021	33,6	<0,0001
		Median	396	12,1	
		Minimum-Maximum	0-4442	0-146,0	

Tabelle 25: Korrelation der Rotterdam+Mitose Klassifikation des SLN mit dem krankheitsfreien Überleben.

Augsburg + Mitose	n	Rezidiv	Tage	Monate	<i>p</i>
I	32	Mittelwert	1546	50,8	
		Median	1461	48,0	
		Minimum-Maximum	61-3409	2,0-112,1	
IB	0	-	-	-	
IIA	22	Mittelwert	1485	0,5	
		Median	1522	50,1	
		Minimum-Maximum	0-3080	0-101,1	
IIB	8	Mittelwert	1237	40,4	
		Median	381	12,5	
		Minimum-Maximum	97-4442	3,2-146,0	
IIIA	15	Mittelwert	1291	42,4	
		Median	1489	49,0	
		Minimum-Maximum	28-2760	0,9-90,7	
IIIB	19	Mittelwert	713	23,4	
		Median	339	11,1	
		Minimum-Maximum	0-3877	0-127,5	0,0003

Tabelle 26: Korrelation der Augsburg+Mitose Klassifikation des SLN mit dem krankheitsfreien Überleben.

Eine signifikante Korrelation der SLN-MR mit einem weiteren Lymphknotenbefall bei einer nachfolgenden CLND konnte nicht gezeigt werden ($p = 0,7883$, Tab. 27).

Mitoserate	<1	≥1	Total
CLND negativ	35	17	52
CLND positiv	5	3	8
Total	40	20	60

Tabelle 27: Vierfeldertafel zur Korrelation der Mitoserate und dem Ergebnis der CLND.

3.6.1 Multivariable Korrelationsanalyse (krankheitsfreies Überleben)

Bei der multivariablen oder multiplen Cox Regressionsanalyse wurden mehrere Merkmale simultan analysiert. Alle histologischen Parameter und Klassifikationssysteme die bei der univariablen Analyse signifikant waren, wurden in das statistische Modell mit aufgenommen. So kann die prognostisch wertvollste Merkmalskombination gefunden werden. Es wurde die „wichtigste Klassifikation“ mit dem kleinsten p -Wert zuerst in das Modell aufgenommen. Anschließend wurden Klassifikationen nur dann in das Modell mit aufgenommen, wenn sie, zusätzlich zu den bereits im Modell befindlichen Klassifikationssystemen, signifikant waren.

Zum besseren Vergleich der Klassifikationssysteme wurde eine multivariable Cox-Regressionsanalyse mit und eine ohne die SLN-MR bzw. SLN-MR1 durchgeführt. Hierbei zeigt sich, dass bei Ausschluss der SLN-MR/SLN-MR1 aus dem Modell, der Durchmesser des größten Tumornestes im SLN den einzigen signifikanten

Einflussfaktor auf das krankheitsfreie Überleben darstellt. Hingegen bei Einschluss der SLN-MR/SLN-MR1 zeigen sich die SLN-MR1 und die Klassifikation nach Dewar als signifikante Einflussfaktoren auf das krankheitsfreie Überleben (Tab. 28).

Es wurden Faktoren bis zu einem Signifikanzniveau von $p = 0,10$ ins multivariable Modell aufgenommen.

Krankheitsfreies Überleben	Mit SLN-MR	Ohne SLN-MR
Parameter	p -Wert	p -Wert
SLN-MR	n.s.	-
SLN-MR1 (< vs. ≥ 1)	0,0006	-
Durchmesser größtes Tumornest	n.s.	<0,0001
Durchmesser größtes Tumornest (< vs. ≥ 1)	n.s.	n.s.
Rotterdam	n.s.	n.s.
Eindringtiefe	n.s.	n.s.
Eindringtiefe (< vs. ≥ 1)	n.s.	n.s.
Augsburg S	n.s.	n.s.
Hannover II	n.s.	n.s.
Dewar	0,0105	n.s.
Anzahl positiver SLN	n.s.	n.s.

Tabelle 28: Multivariable Cox Regressionsanalyse verschiedener Klassifikationssysteme des SLN mit dem krankheitsfreien Überleben.

3.7 Univariable Korrelation von histologischen Merkmalen des Sentinel Lymphknoten mit dem melanomspezifischen Überleben

Bei der univariablen Korrelation der absoluten Werte für die Tumordicke des MM, die Eindringtiefe der MM Metastase in den SLN, den größten Durchmesser des größten Tumornestes des SLN, sowie die Mitoserate des SLN und die Anzahl positiver SLN mit dem melanomspezifischen Überleben, zeigte sich eine stark signifikante Korrelation mit der Tumordicke des MM nach Breslow ($p < 0,0001$), der Eindringtiefe der Tumorzellen in den SLN ($p = 0,0046$) und des Durchmessers der größten Metastase im SLN ($p < 0,0020$). Auch die Anzahl der Mitosen im SLN zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit dem melanomspezifischen Überleben ($p = 0,0410$). Die Anzahl der positiven Lymphknoten bei der SLND korrelierte nicht signifikant mit dem melanomspezifischen Überleben ($p = 0,0083$, Tab. 29).

Parameter	Hazard ratio	95% KI	p
Breslow (mm)	1,369	1,176-1,593	<0,0001
Eindringtiefe (mm)	1,337	1,094-1,636	0,0046
Durchmesser größtes Tumornest (mm)	1,176	1,061-1,303	0,0020
Mitoserate (Mitosen/mm ²)	1,142	1,035-1,260	0,0083
Anzahl positiver SLN	2,442	1,296-4,602	0,0057

Tabelle 29: Univariable Cox Regressionsanalyse mit verschiedenen Parametern des Primarius und des SLN mit dem melanomspezifischen Überleben.

Die jeweiligen Klassifikationssysteme der SLN Metastasen zeigten häufig eine Korrelation mit dem melanomspezifischen Überleben, welche jedoch in der Mehrzahl der Fälle nicht signifikant war. Aber auch bei der Korrelation mit dem

melanomspezifischen Überleben zeigte die binäre Klassifikation auf Basis des SLN-MR1 (<1 vs. ≥ 1 Mitosen/mm²) eine hochsignifikante Korrelation ($p < 0,0001$, Tab. 30).

Parameter	n	Hazard ratio	95% KI	p
pT				
T1	12	1		
T2	31	0,701	0,063-7,827	0,7733
T3	32	3,051	0,377-24,708	0,2958
T4	21	8,053	1,044-62,085	0,0453
Augsburg S				
S I	35	1		
S II	27	2,951	0,883-9,862	0,0788
S III	34	3,249	1,030-10,251	0,0444
Rotterdam				
R I	23	1		
R II	47	5,910	0,768-45,485	0,0879
R III	26	9,964	1,260-78,773	0,0293
SLN-MR1				
$<1/\text{mm}^2$	69	1		
$\geq 1/\text{mm}^2$	27	5,599	2,383-13,158	$<0,0001$
Eindringtiefe				
≤ 1 mm	62	1		
>1 mm	34	1,806	0,795-4,104	0,1580
Durchmesser größtes Tumornest				
≤ 1 mm	70	1		
>1 mm	26	2,319	0,989-5,436	0,0530
Dewar				
subkapsulär	44	1		
multifokal	23	1,589	0,551-4,583	0,3914
kombiniert	25	1,078	0,352-3,299	0,8952
extensiv	4	8,009	2,092-30,668	0,0024
parenchymal	0	-	-	-
RDC				
$< 0,1$ mm & subkapsulär	17	1		
$< 0,1$ mm & nicht-subkapsulär	6	-	-	-
$0,1 - 1,0$ mm & subkapsulär	23	4,944	0,595-41,073	0,1390
$0,1 - 1,0$ mm & nicht-subkapsulär	24	4,038	0,486 -33,566	0,1964

nicht-subkapsulär > 1,0 mm & subkapsulär oder nicht-subkapsulär	26	7,495	0,949-59,214	0,0561
Hannover				
0	25	1		
1	32	1,397	0,358-5,443	0,63
2	28	1,828	0,467-7,152	0,3863
3	11	5,483	1,363-22,057	0,0166
Hannover II				
1	25	1		
2	60	7,037	0,933-53,100	0,0584
3	11	16,838	1,960-144,640	0,0101

Tabelle 30: Univariable Cox Regressionsanalyse verschiedener Klassifikationssysteme mit dem melanomspezifischen Überleben.

Von den Patienten, bei denen eine oder mehr Mitosen in der SLN Metastase nachgewiesen wurde, verstarben 14 von 27 (52%) Patienten am MM. Bei den Patienten, bei denen keine Mitose im SLN nachgewiesen wurde, verstarben 9 von 60 (15%) Patienten am MM (Tab. 31).

Mitoserate	<1	≥1	Total
Am MM verstorben	9	14	23
Nicht am MM verstorben	60	13	73
Total	69	27	96

Tabelle 31: Vierfeldertafel zur Korrelation der Mitoserate und dem melanomspezifischen Überleben.

Auch die durch uns neu erhobenen Klassifikationssysteme Rotterdam+Mitose ($p = 0,0004$) und Augsburg+Mitose ($p = 0,0026$) zeigen eine signifikante Korrelation mit dem melanomspezifischen Überleben (Tab. 32, 33).

Rotterdam + Mitose	n	Melanomspezifisches Überleben	Tage	Monate	p
IA	25	Mittelwert	1665	54,7	
		Median	1522	50,0	
		Minimum - Maximum	440 - 3256	14,5 - 107,0	
IB	0	-	-	-	
IIA	38	Mittelwert	1885	61,9	
		Median	1874	61,6	
		Minimum - Maximum	31 - 4053	1,0 - 133,2	
IIB	6	Mittelwert	927	30,5	
		Median	908	29,8	
		Minimum - Maximum	347 - 1430	11,4 - 47,0	

IIIA	6	Mittelwert	1767	58,1	
		Median	1811	59,5	
		Minimum - Maximum	626 - 2760	20,6 - 90,7	
IIIB	21	Mittelwert	1615	53,1	0,0004
		Median	1128	37,1	
		Minimum - Maximum	97 - 4442	3,2 - 145,9	

Tabelle 32: Korrelation der Rotterdam+Mitose Klassifikation des SLN mit dem MM spezifischen Überleben.

Augsburg + Mitose	n	Melanomspezifisches Überleben	Tage	Monate	<i>p</i>
I	32	Mittelwert	1851	60,8	
		Median	1721	56,5	
		Minimum - Maximum	440 - 3409	14,5 - 112,0	
IB	0	-	-	-	
IIA	22	Mittelwert	1746	57,4	
		Median	1661	54,6	
		Minimum - Maximum	153 - 4053	5,0 - 133,2	
IIB	8	Mittelwert	1468	48,2	
		Median	908	29,8	
		Minimum - Maximum	97 - 4442	3,2 - 145,9	
IIIA	15	Mittelwert	1747	57,4	
		Median	1826	60,0	
		Minimum - Maximum	31 - 2760	1,0 - 90,7	
IIIB	19	Mittelwert	1460	48,0	0,0026
		Median	1128	37,1	
		Minimum - Maximum	122 - 4246	4,0 - 139,5	

Tabelle 33: Korrelation der Augsburg+Mitose Klassifikation des SLN mit dem MM spezifischen Überleben.

3.7.1 Multivariable Korrelationsanalyse (melanomspezifisches Überleben)

Die binäre Klassifikation SLN-MR1 (<1 vs. ≥1 Mitosen/mm²) zeigte eine signifikante Korrelation mit dem melanomspezifischen Überleben ($p = 0,0001$). Wird die Mitoserate nicht in die multivariable Analyse mit aufgenommen, so wird die Hannover II Klassifikation aufgrund der am stärksten signifikanten Korrelation mit dem melanomspezifischen Überleben ($p = 0,0034$) in das statistische Modell aufgenommen. In beiden Fällen zeigte auch die Anzahl positiver SLN in der SLND eine zusätzliche signifikante Korrelation mit dem melanomspezifischen Überleben (Tab. 34).

Melanomspezifisches Überleben	Mit SLN-MR	Ohne SLN-MR
Parameter	<i>p</i> -Wert	<i>p</i> -Wert
SLN-MR	n.s.	-
SLN-MR1 (< vs. ≥1)	0,0001	-
Durchmesser größtes Tumornest	n.s.	n.s.
Durchmesser größtes Tumornest (< vs. ≥1)	n.s.	n.s.
Rotterdam	n.s.	n.s.
Eindringtiefe	n.s.	n.s.
Eindringtiefe (< vs. ≥1)	n.s.	n.s.
Augsburg S	n.s.	n.s.
Hannover II	n.s.	0,0034
Dewar	n.s.	n.s.
Anzahl positiver SLN	0,009	0,013

Tabelle 34: Multivariable Cox Regressionsanalyse verschiedener Klassifikationssysteme des SLN mit dem melanomspezifischen Überleben.

3.8 Univariable Korrelation von histologischen Merkmalen des Sentinel Lymphknoten mit dem Gesamtüberleben

Bei der univariablen Korrelation der absoluten Werte für die Tumordicke des MM, die Eindringtiefe in den SLN, den größten Durchmesser des größten Tumornestes des SLN sowie die Mitoserate des SLN und die Anzahl positiver SLN mit dem Gesamtüberleben, zeigte sich ein stark signifikanter Zusammenhang mit der Tumordicke des MM nach Breslow ($p = 0,0002$), der Eindringtiefe der Tumorzellen in den SLN ($p = 0,0029$) und dem Durchmesser der größten Metastase im SLN ($p = 0,0007$). Auch die Anzahl der Mitosen im SLN ($p = 0,0108$) und die Anzahl der positiven Lymphknoten bei der SLND ($p = 0,02$) zeigten einen signifikanten Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben (Tab. 35).

Parameter	Hazard ratio	95% KI	<i>p</i>
Breslow (mm)	1,311	1,135-1,515	0,0002
Eindringtiefe (mm)	1,341	1,105-1,627	0,0029
Durchmesser größtes Tumornest (mm)	1,183	1,073-1,304	0,0007
Mitoserate (Mitosen/mm ²)	1,135	1,030-1,250	0,0108
Anzahl positiver SLN	2,147	1,128-4,086	0,02

Tabelle 35: Univariable Cox Regressionsanalyse verschiedener Parameter des Primarius und des SLN mit dem Gesamtüberleben.

Die jeweiligen Klassifikationssysteme der SLN Metastasen zeigten ähnlich wie bei der Korrelation mit dem melanomspezifischen Überleben häufig eine Korrelation mit dem Gesamtüberleben, welche jedoch in der Mehrzahl der Fälle nicht signifikant war. Die binäre Klassifikation auf Basis des SLN-MR1 (<1 vs. ≥1 Mitosen/mm²) zeigt auch mit dem Gesamtüberleben eine hochsignifikante Korrelation ($p = <0,0001$, Tab. 36).

Parameter	n	Hazard ratio	95% KI	<i>p</i>
pT				
T1	12	1		
T2	31	1,014	0,104-9,881	0,9903

T3	32	3,698	0,467-29,292	0,2156
T4	21	7,878	1,021-60,759	0,0477
Augsburg S				
S I	35	1		
S II	27	2,637	0,879-7,917	0,0838
S III	34	2,803	0,983-7,993	0,0539
Rotterdam				
R I	23	1		
R II	47	3,100	0,698-13,763	0,1368
R III	26	5,232	1,141-24,0	0,0332
SLN-MR1				
<1/mm ²	69	1		
≥1/mm ²	27	4,884	2,207-10,811	<0,0001
Eindringtiefe				
≤1 mm	62	1		
>1 mm	34	1,675	0,773-3,630	0,1914
Durchmesser größtes Tumornest				
≤1 mm	70	1		
>1 mm	26	2,153	0,963-4,813	0,0618
Dewar				
subkapsulär	44	1		
multifokal	23	1,904	0,734-4,940	0,1853
kombiniert	25	0,919	0,307-2,750	0,8792
extensiv	4	7,469	1,989-28,049	0,0029
parenchymal	0	-		
RDC				
<0,1 mm & subkapsulär	17	1		
<0,1 mm & nicht-subkapsulär	6	3,190	0,199-51,189	0,4127
0,1-1,0 mm & subkapsulär	23	5,663	0,697-46,046	0,1049
0,1-1,0 mm & nicht-subkapsulär	24	3,937	0,474-32,728	0,2047
>1,0 mm & subkapsulär oder nicht-subkapsulär	26	7,945	1,015-62,212	0,0484
Hannover				
0	25	1		
1	32	0,805	0,253-2,562	0,7132
2	28	1,056	0,330-3,376	0,9274
3	11	3,642	1,144-11,596	0,0287
Hannover II				
1	25	1		
2	60	3,628	0,837-15,728	0,0851
3	11	9,600	1,925-47,885	0,0058

Tabelle 36: Univariable Cox Regressionsanalyse verschiedener Klassifikationssysteme mit dem Gesamtüberleben.

Auch in Bezug auf das Gesamtüberleben zeigen die Klassifikationssysteme Rotterdam+Mitose ($p = 0,0007$) und Augsburg+Mitose ($p = 0,0038$) eine signifikante Korrelation. (Tab. 37, 38).

Rotterdam + Mitose		n	Gesamtüberleben	Tage	Monate	p
IA	25	Mittelwert		1665	54,7	
		Median		1522	50,0	
		Minimum - Maximum		440-3256	14,5-107,0	
IB	0	-		-	-	
IIA	38	Mittelwert		1885	61,9	
		Median		1874	61,6	
		Minimum - Maximum		31-4053	1,0-133,2	
IIB	6	Mittelwert		927	30,5	
		Median		907	29,8	
		Minimum - Maximum		347-1430	11,4-47,0	
IIIA	6	Mittelwert		1767	58,1	
		Median		1810	59,5	
		Minimum - Maximum		626-2760	20,6-90,7	
IIIB	21	Mittelwert		1615	53,1	0,0007
		Median		1128	37,1	
		Minimum - Maximum		97-4442	3,2-145,9	

Tabelle 37: Korrelation der Rotterdam+Mitose Klassifikation des SLN mit dem Gesamtüberleben.

Augsburg + Mitose		n	Gesamtüberleben	Tage	Monate	p
I	32	Mittelwert		1851	60,8	
		Median		1721	56,5	
		Minimum - Maximum		440-3409	14,5-112,0	
IB	0	-		-	-	
IIA	22	Mittelwert		1746	57,4	
		Median		1661	54,6	
		Minimum - Maximum		153-4053	5,0-133,2	
IIB	8	Mittelwert		1468	48,2	
		Median		907	29,8	
		Minimum - Maximum		97-4442	3,2-145,9	
IIIA	15	Mittelwert		1747	57,4	
		Median		1826	60,0	
		Minimum - Maximum		31-2760	1,0-90,7	
IIIB	19		Mittelwert	1460	48,0	

Median	1128	37,1	
Minimum - Maximum	122-4246	4,0-139,5	0,0038

Tabelle 38: Korrelation der Augsburg+Mitose Klassifikation des SLN mit dem Gesamtüberleben.

3.8.1 Multivariable Korrelationsanalyse (Gesamtüberleben)

Die binäre SLN-MR1 (<1 vs. ≥1 Mitosen/mm²) zeigt eine hochsignifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben ($p < 0,0001$) und ermöglicht somit eine verbesserte Diskriminierung von Patienten mit langsam und schnell fortschreitender Erkrankung im Vergleich zu den bisher bestehenden Klassifikationssystemen und der binären Klassifikation des größten Tumornestes und der Eindringtiefe (Tab. 39). Wird die Mitoserate nicht in die multivariable Analyse mit aufgenommen zeigt die Hannover II Klassifikation die höchste Signifikanz ($p = 0,003$). Wird die SLN-MR1 mit in das multivariable Modell aufgenommen zeigt sich, dass nur die SLN-MR1 und die Anzahl positiver SLN bei der SLND im Modell verbleiben.

Gesamtüberleben	Mit SLN-MR	Ohne SLN-MR
Parameter	p -Wert	p -Wert
SLN-MR	n.s.	-
SLN-MR1 (< vs. ≥1)	<0,0001	-
Durchmesser größtes Tumornest	n.s.	n.s.
Durchmesser größtes Tumornest (< vs. ≥1)	n.s.	n.s.
Rotterdam	n.s.	n.s.
Eindringtiefe	n.s.	n.s.
Eindringtiefe (< vs. ≥1)	n.s.	n.s.
Augsburg S	n.s.	n.s.
Hannover II	n.s.	0,003
Dewar	n.s.	n.s.
Anzahl positiver SLN	0,0204	0,0260

Tabelle 39: Multivariable Cox Regressionsanalyse verschiedener Klassifikationssysteme des SLN mit dem Gesamtüberleben.

4 DISKUSSION

Die Positivität des Sentinel Lymphknoten gilt nach wie vor als einer der wichtigsten prognostischen Faktoren bei Patienten mit einem Malignen Melanom. Dennoch stellen SLN-positive Patienten in Bezug auf den Krankheitsverlauf, das melanomspezifische Überleben und das Gesamtüberleben ein enorm heterogenes Patientengut dar. Angesichts der steigenden Zahl neuer medikamentöser Therapien erscheint es daher zwingend erforderlich, SLN-positive Patienten mit langsam und schnell fortschreitender Erkrankung bestmöglich unterscheiden zu können, um diejenigen zu identifizieren, die von einer frühen adjuvanten Therapie besonders profitieren. Hierfür wurden in dieser Studie alle gängigen in der Literatur beschriebenen histopathologischen Parameter und Klassifikationssysteme sowie die Sentinel-Mitoserate (SLN-MR) als neuer prognostischer Marker bei SLN-positiven Patienten untersucht und mit dem Überleben und dem Krankheitsverlauf korreliert.

Trotz der Tatsache, dass alle bisher veröffentlichten SLN Klassifikationssysteme zumindest in einigen ihrer Untergruppen eine signifikante Korrelation mit der Prognose aufwiesen, unterschied sich ihre Trennschärfe bei Patienten mit langsam und schnell fortschreitender Erkrankung deutlich. Bei der Auswertung der Korrelation mit dem krankheitsfreien Überleben zeigte sich beispielsweise ein signifikanter Unterschied in der Augsburg S Klassifikation für die Trennung zwischen SI und SIII ($p = 0,0434$), nicht aber bezüglich der Trennung von SI und SII ($p = 0,3534$). Für die einfachere binäre Unterscheidung der Eindringtiefe zeigte sich ebenfalls eine signifikante Korrelation mit dem krankheitsfreien Überleben ($p = 0,0610$), allerdings mit einem weniger deutlichen p-Wert als bei der binären Klassifikation der Mitoserate, der SLN-MR1 ($p < 0,0001$). Es ist somit nicht verwunderlich, dass keine der beiden Klassifikationen für die Eindringtiefe nach Einschluss der SLN-MR1 in die multivariable Cox-Regressionsanalyse einen zusätzlichen prognostischen Wert aufzeigen.

Ähnliche Werte zeigten sich bei der Korrelation der histologischen Parameter des SLN mit dem Gesamt- und dem MM spezifischen Überleben. Beim MM spezifischen Überleben zeigte sich für den Durchmesser des größten Tumornestes in der Rotterdam Klassifikation eine signifikante Korrelation mit dem MM spezifischen Überleben zwischen dem RI und RIII Stadium ($p = 0,0293$), jedoch nur ein Trend zur Signifikanz zwischen dem RI und RII Stadium ($p = 0,0879$). Wurde die binäre Klassifikation des Durchmessers des größten Tumornestes mit dem MM spezifischen Überleben korreliert, konnte ebenso lediglich ein Trend zur Signifikanz gezeigt werden ($p = 0,0530$). Die absoluten Werte für die Mitoserate ($p = 0,0083$) und auch die binäre SLN-MR1 ($<0,0001$) korrelierten signifikant mit dem MM spezifischen Überleben. Auch für das MM spezifische Überleben zeigte sich somit in logischer Folge bei Einschluss der SLN-MR1 in die multivariable Cox-Regressionsanalyse kein zusätzlicher Einschluss des Durchmessers des größten Tumornestes, respektive der Rotterdam Klassifikation in das Modell.

In den multivariablen Cox-Regressionsanalysen aller drei Endpunkte (krankheitsfreies Überleben, MM spezifisches Überleben und Gesamtüberleben) zeigte sich die SLN-MR1 als Klassifikationssystem mit der am stärksten signifikanten Korrelation mit dem jeweiligen Endpunkt. Dass in unserer statistischen Auswertung in jedem multivariablen Cox Regressions Modell zusätzlich zur SLN-MR1 jeweils ein anderer Parameter mit in die Auswertung einfließt (nämlich die Dewar Klassifikation für das krankheitsfreie

Überleben und die Anzahl positiver SLN für das MM spezifische und Gesamtüberleben) zeigt, dass kein anderes Klassifikationssystem zu einer ähnlichen Trennschärfe wie die SLN-MR1 führt.

4.1 Eignet sich die Mitoserate des Sentinel Lymphknoten als prognostischer Marker?

Unsere Daten zeigen, dass die einfache binäre Klassifikation basierend auf der Mitoserate des SLN, mit ähnlichen Grenzwerten wie bei der Mitoserate für das MM in der AJCC 2009 Klassifikation, die höchste Trennschärfe zur Trennung von Patienten mit langsam und schnell fortschreitender Erkrankung aufweist.

Die Mitoserate wurde erstmals 1978 von Schmöckel et al. als prognostischer Parameter für primäre Melanome beschrieben.¹¹² In der Folge wurde bereits in den 1980-er Jahren die einfach durchführbare und gut reproduzierbare Hot-Spot-Methode zur Bestimmung der Mitoserate für die histologische Diagnostik beim MM beschrieben.¹¹³ Dennoch erfolgte die routinemässige Erhebung der Mitoserate beim MM erst mit der Veröffentlichung der AJCC Klassifikation 2009, in der dünne Melanome erstmals anhand der Mitoserate subklassifiziert wurden.²⁴

In dieser Studie wurde die Mitoserate erstmals auch bei SLN Metastasen erhoben. Zur einfachen klinischen Anwendung und Reproduzierbarkeit wurde die binäre SLN-MR1 mit einem Cut-off Wert von 1 in gleicher Weise wie die Mitoserate beim MM, nämlich mit der Hot-Spot-Methode, erhoben. Bei der Mikroskopie ist besonders darauf zu achten, nur Mitosen in Melanomzellen und nicht Mitosen in Entzündungszellen zu zählen. Daher ist es ratsam für die Erhebung der SLN-MR1 mit den H.E. gefärbten Schnitten zu beginnen und diese anschließend sorgfältig mit den immunhistochemisch gefärbten Abschnitten für melanozytäre Marker (z.B. anti-HMB45, anti-Mart1) abzugleichen. So kann sichergestellt werden, dass sich die in der H.E. Färbung gezählten Mitosen auch sicher in Melanomzellen befinden.

Trotz der Aufnahme der Mitoserate für MM in die AJCC Klassifikation 2009 wird weiterhin über die Reproduzierbarkeit der Mitoserate bei dünnen MM kontrovers diskutiert. In mehreren Studien konnte eine gute bis sehr gute Interobserver-Variabilität bei der Analyse von pT1 MM und auch bei MM aller Stadien (pT1 - pT4) gezeigt werden.^{114, 115} Im Gegensatz hierzu zeigten Garbe et al. eine unbefriedigende Inter- und Intraobserver-Reproduzierbarkeit bei pT1 und pT2 Melanomen. In ihrer Studie wurden die Mitoseraten von 17 erfahrenen Dermatologen jeweils anhand von H.E.-, sowie Anti-Phospho-Histon H3-gefärbten seriellen Schnitten begutachtet.¹¹⁶

Auch der allgemeine prognostische Wert des Mitoserate beim MM wurde in mehreren Studien nachgewiesen, während andere Studien keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen einer Mitoserate >0 bei einem dünnen MM und einem erhöhten Risiko eines positiven SLN zeigen konnten.^{28, 117-119} Wat et al. analysierten beispielsweise retrospektiv die Tumordicken, die Mitoserate des MM und die SLN-Positivität bei 1072 Patienten in mehreren Zentren. Hierbei zeigte sich die Mitoserate, unabhängig von der Tumordicke, als guter Indikator für die SLN-Positivität. Wurde die Tumordicke jedoch mitberücksichtigt, zeigte sich in der untersuchten Kohorte für Melanome mit einem Durchmesser von einem Millimeter oder weniger, keine signifikante Korrelation der Mitoserate mit dem SLN-Status. Darüber hinaus konnte eine statistisch signifikante Interaktion zwischen der Tumordicke nach Breslow und der Mitoserate identifiziert werden, sodass bei abnehmender Breslow-Tiefe der Effekt der Mitoserate auf den SLN-Status abnahm ($p = 0,028$). Sie kommen daher zu der

Schlussfolgerung, dass die Mitoserate keinen eindeutigen Nutzen bei der Vorhersage der SLND bei dünnen Melanomen besitzt. Vielmehr zeigte sich eine signifikante Interaktion zwischen der Mitoserate des MM und Tumordicke nach Breslow, sodass der prädiktive Wert der Mitoserate auf die SLN-Positivität auch von der Breslow-Dicke abhängig sein könnte.¹¹⁹

Nichtsdestotrotz sollten der Nutzen der Mitoserate und die Auswirkung auf eine allfällige Behandlungsentscheidungen in jedem Setting unabhängig voneinander beurteilt werden, da der allgemeine prognostische Wert der Mitoserate bei MM aller Stadien und auch ihr Wert bei der Beurteilung von atypischen melanozytären Tumoren in mehreren Studien nachgewiesen wurde.^{120, 121}

Unserer Meinung nach ist die Beurteilung des SLN-MR1 nicht vergleichbar mit der Beurteilung der Mitoserate bei dünnen MM. Wir haben einen standardisierten Ansatz zur Messung von SLN-MR1 verwendet, der ohne große Zeitverzögerung in die routinemässige histologische Aufarbeitung von SLN integriert werden kann.

In unserer Kohorte reichte die SLN-MR von 0-15 Mitosen/mm². Obwohl die absolute Anzahl der Mitosen pro mm² signifikant mit dem Gesamtüberleben, dem melanomspezifischen und dem krankheitsfreien Überleben korrelierte, konnte auch eine einfache binäre Klassifikation von <1 vs. ≥1 Mitosen/mm² effizient zwischen Patienten mit langsam und schnell fortschreitender Erkrankung unterscheiden. Diese binäre Klassifikation hat zwei Vorteile. Erstens ist sie identisch mit der Klassifikation für das MM und kann daher leicht angewendet und schnell in die histopathologische Auswertung jeder Klinik aufgenommen werden. Zweitens gehen wir von einer guten Reproduzierbarkeit unter verschiedenen Untersuchern aus, da die korrekte Identifizierung einer einzelnen Mitose für die Klassifizierung ausreicht, während der genaue absolute Wert der SLN-MR (Mitosen/mm²) aufgrund unterschiedlicher Mikroskopeinstellungen zu mehr Variabilität führen könnte. Nichtsdestotrotz sollte die Reproduzierbarkeit der SLN-MR1 unserer Meinung nach in zukünftigen Studien noch weiter untersucht werden.

An unserer Klinik werden die immunhistochemischen Färbungen der SLN derzeit routinemässig mit melanozytären Markern wie anti-HMB45 und anti-Mart1 durchgeführt. Zukünftig könnte zur verbesserten Detektion von Mitosen im SLN die IHC Färbung mit einer Kombination von Antikörpern die Mitosen und Melanozyten markieren (z.B. Anti-Phospho-Histon H3 (anti-pHH3) erfolgen, um die Genauigkeit und Geschwindigkeit der Erhebung der SLN-MR zu verbessern. Casper et al. verglichen in einer doppelblinden Studie bei MM Patienten mit dünnen Läsionen von 0,45 bis 1,2 mm Tiefe die Ergebnisse der detektierten Mitoseraten bei der routinemässigen H.E. Färbung und einer anti-Phospho-Histon H3 Färbung. Hierbei zeigten sich im Durchschnitt 1,63 Mitosen/mm² in der anti-pHH3 Färbung und 0,67 Mitosen/mm² in der H.E. Färbung, was einem durchschnittlichen Anstieg der detektierten Mitosen von 243% entspricht. Es gab in der Untersuchung keine dünnen MM, die mitotisch inaktiv in der anti-pHH3 Färbung, aber mitotisch aktiv in der H.E. Färbung waren.¹²² Eine andere Studie konnte hingegen zeigen, dass die Bewertung der Mitoserate anhand der IHC Färbung die Bewertung anhand der H.E. Färbung nicht ersetzen konnte und somit eine Kombination beider Färbungen die effizienteste Untersuchungsmethode scheint.¹¹⁴ Es sind daher unserer Meinung nach zusätzliche Studien notwendig, um die Praktikabilität und den prognostischen Wert einer anhand von IHC Färbungen bewerteten SLN-MR1-Klassifikation im Vergleich zur H.E.-Färbung zu prüfen.

Obwohl es eine signifikante Korrelation zwischen der SLN-MR und den restlichen histologischen Parametern des SLN gab (z.B. Durchmesser größtes Tumornest, Eindringtiefe), war diese nicht sonderlich stark, was der Spearmans Korrelationskoeffizient von 0,5-0,7 belegt. Das bedeutet, Mitosen fanden sich bei größeren MM Metastasen im SLN und bei einer größeren Eindringtiefe deutlich häufiger. Allerdings wurden auch große Metastasen ohne Mitosen, sowie kleinere Metastasen mit Mitosen gefunden, was zeigt, dass die SLN-MR nicht nur ein Surrogatmarker für die Tumorgöße im SLN ist. Binäre Klassifikationen auf Basis des Durchmessers des größten Tumornestes, der Eindringtiefe und der SLN-MR1 führten daher zu deutlich unterschiedlichen Unterteilungen von Hoch- und Niedrigrisikogruppen. In Bezug auf das MM spezifische Überleben zeigte sich beispielsweise bei 34 Patienten eine maximale Eindringtiefe von > 1 mm ($p = 0,1580$), jedoch zeigten nur 27 Patienten ≥ 1 Mitose/mm² ($p = <0,0001$).

Insgesamt ist es einfach und schnell die SLN-MR1 zu bestimmen und die Umsetzung in die Praxis erfordert keine zusätzlichen technischen Anforderungen oder Kosten. Daher schlagen wir vor, die SLN-MR1 ab sofort in alle Pathologieberichte von SLN von MM Patienten aufzunehmen, um ihren prognostischen Wert in Zukunft in größeren Kohorten von SLN-positiven MM Patienten weiter zu untersuchen.

In unserer Kohorte zeigten sich bei Patienten mit einer SLN-MR1 ≥ 1 Mitosen/mm² kürzere krankheitsfreie, melanomspezifische sowie Gesamtüberlebensdauern als bei den fortgeschrittensten Stadien der meisten anderen SLN Klassifikationssysteme. Nur umfangreiche Erkrankungen nach der Dewar Klassifikation und das Stadium 3 nach der Hannover I und II Klassifikation zeigten ähnliche Krankheitsverläufe. In den fortgeschrittenen Stadien der anderen Klassifikationssysteme waren die Patientenzahlen im Vergleich zur Gruppe der Patienten mit SLN-MR1 ≥ 1 Mitosen/mm² jedoch deutlich niedriger. Diese letztgenannte Gruppe umfasste fast ein Drittel aller Patienten, was darauf hindeutet, dass die Sensitivität und Spezifität zum Nachweis von Patienten mit schnell fortschreitender Erkrankung für die Klassifizierung nach der SLN-MR1 am höchsten ist.

Es erscheint nachvollziehbar, dass die Einbeziehung eines Surrogatparameters für die proliferative Aktivität zusätzliche prognostische Informationen im Vergleich zu reinen Größen- oder Ausdehnungsmessungen liefern kann, da diese Parameter durch die unterschiedlichen Zeitintervalle zwischen der Erstaussaat des MM und der Diagnosestellung beeinflusst werden können. Eine erhöhte Mitoserate im SLN kann zwei Dinge bedeuten, entweder eine große Tumorbelastung (durch eine hohe proliferative Aktivität oder eine lange Zeit des Tumorwachstums) oder eine geringe Tumorbelastung mit hoher proliferativer Aktivität. Andererseits kann ein SLN-MR <1 entweder auf einen großen Tumor mit sehr geringer proliferativer Aktivität hinweisen (in diesem Fall kann die reine Messung der Tumorbelastung die Aggressivität des Tumors überschätzen) oder auf eine kleine Tumorbelastung (aufgrund geringer proliferativer Aktivität oder kurzer Tumorwachstumsdauer). Ob eine Kombination der Größenmessung mit der Mitoserate (Rotterdam+Mitose) oder der Ausdehnungsmessung mit der Mitoserate (Augsburg+Mitose) zu einer weiteren Präzisierung hinsichtlich der Prognoseabschätzung führt, muss in künftigen Untersuchungen überprüft werden.

Trotz der Tatsache, dass weitere multizentrische Analysen notwendig sind um die verschiedenen Klassifikationssysteme und Parameter noch genauer zu untersuchen

und schließlich abzugrenzen, welche Parameter, Cut-Off-Werte oder Kombinationen am besten geeignet sind, positive SLN von MM Patienten zu klassifizieren, glauben wir, dass unsere Ergebnisse unmittelbare praktische Auswirkungen haben sollten.

Da die Beurteilung der SLN-MR1 einfach und kostengünstig ist, sollte sie in die routinemäßigen Pathologieberichte der SLN von MM Patienten aufgenommen werden. Zweitens betrachten die meisten aktuellen Arzneimittelstudien zur adjuvanten Therapie von MM Patienten im Stadium 3 den Durchmesser des größten Tumornestes im SLN >1mm als Einschlusskriterium. Unsere Daten zeigen jedoch deutlich, dass diese binäre Klassifikation der durch uns neu erhobenen SLN-MR1 unterlegen ist. Die SLN-MR1 sollte daher an weiteren Patientenkollektiven erhoben werden, um weiter beurteilen zu können ob Patienten, die von einer adjuvanten Therapie profitieren, mit dieser binären Klassifikation am zuverlässigsten identifiziert werden können. Obwohl die meisten adjuvanten Therapiestudien einen Durchmesser des größten Tumornestes im SLN >1mm als Einschlusskriterium enthielten, erfolgten die Zulassungen im adjuvanten Setting für Nivolumab und Dabrafenib/Trametinib für alle Patienten mit Lymphknotenbefall bzw. im Stadium III unabhängig von der Größenausdehnung im SLN. Grundsätzlich besteht also bei jedem Patienten mit positivem SLN die Möglichkeit einer adjuvanten Therapie. Die Wahl der Therapie muss hier unter Berücksichtigung der potenziellen Wirkungen und Nebenwirkungen, Vorerkrankungen, Begleitmedikation, Mutationsstatus, Durchführbarkeit der Therapiemodalitäten und den Präferenzen des Patienten erfolgen. Parameter, die wie die SLN-MR1 einen rasch progredienten Verlauf indizieren, können hier bei der Therapiewahl zusätzliche Unterstützung bieten. Ziel von zukünftigen Studien sollte es sein klinische, histologische und ggf. molekulare Kriterien zu definieren, um nebenwirkungsträchtige Therapien den Patienten vorzubehalten, die hierdurch den größten Nutzen erfahren.

4.2 Limitationen dieser Studie

Eine Limitation dieser Studie ist ihr monozentrisches Design und die begrenzte Anzahl an Patienten, die in diese Studie eingeschlossen werden konnten. Die Verteilung der Patienten auf die verschiedenen Stadien der verschiedenen Klassifikationssysteme und ihre jeweilige Prognose in unserer Kohorte war jedoch den in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen sehr ähnlich. Eine hohe Kongruenz zeigte sich insbesondere bei der Augsburg S Klassifikation, der Rotterdam und Hannover I und II Klassifikation.^{79, 104} Unsere Daten bestätigen daher die prognostische Bedeutung und Reproduzierbarkeit dieser Klassifikationssysteme und zeigen, dass sich die analysierte Kohorte von Natur aus nicht von den publizierten Kohorten SLN-positiver MM Patienten unterscheidet. Daher erscheint es glaubhaft, dass unsere Ergebnisse in ähnlicher Weise auch auf andere Kohorten von SLN-positiven Patienten anwendbar sind.

Eine weitere Einschränkung dieser Arbeit stellt das unterschiedliche Alter der mikroskopierten Schnitte dar. Somit ist es denkbar, dass Mitosen, welche generell schwierig zu detektieren sind, unter Umständen nicht auf allen Schnitten gleich gut beurteilt werden konnten. Um diesen Unterschied zu minimieren wurden alte Präparate neu geschnitten und gefärbt.

4.3 Problemfälle

Ein Problem in der Augsburg S Klassifikation und in der Dewar Klassifikation stellten subtrabekulär gelegene MM Metastasen im SLN dar. Es wurde in den Originalarbeiten nicht beschrieben, ob bei diesen Fällen die Eindringtiefe von der Kapsel der Lymphknoten oder von dem Trabekel selbst gemessen werden sollte. Da der Trabekel anatomisch gesehen einen Ausläufer der Kapsel darstellt, stellen wir die These auf, dass letzteres die korrekte Messmethode darstellt. Wir haben daher für die betroffenen Fälle Messungen von der Kapsel und von dem Trabekel aus vorgenommen und korrelierten diese mit dem pT Wert der Patienten. Hierbei zeigte sich eine signifikante Korrelation mit der Messmethode ab dem Trabekel. Wir sehen diese Messmethode daher als richtig an und haben diese Methode mit in die Klassifikationssysteme aufgenommen.

Eine weitere Herausforderung stellte die Unterscheidung zwischen benignen Nävi und MM Metastasen im SLN dar. In einem unserer Präparate konnte sogar bei einem Fall im selben SLN ein Kapselnävus und eine MM Metastase gefunden werden. Zur Unterscheidung wurden die Lage und Morphologie des Melanozyten bewertet. Zusätzlich wurde die Immunhistochemische Färbung mit berücksichtigt, wobei Kapselnävi MART1 positiv und HMB 45 negativ waren.¹²³ De Beer et al. zeigten in einer Metaanalyse, dass MM Patienten mit einem Kapselnävus im SLN in Bezug auf das Gesamtüberleben keinen Unterschied zu SLN-negativen Patienten aufweisen.¹²⁴ Patienten bei denen ein Kapselnävus ohne zusätzliche MM Metastase, nachgewiesen wurde, wurden daher als nodal negativ betrachtet und somit aus dieser Studie ausgeschlossen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Anhand der zahlreichen, teils sehr komplexen und wenig standardisierten bisher beschriebenen histologischen Klassifikationssysteme für Sentinel Lymphknoten Metastasen ist eine adäquate Risikostratifizierung von Sentinel Lymphknoten positiven Patienten nur eingeschränkt möglich. Um Patienten mit schnell fortschreitender Erkrankung und somit Patienten, die von neuen zielgerichteten Therapie oder Immuntherapien profitieren, in Zukunft besser unterscheiden zu können, führten wir eine retrospektive monozentrische Studie durch. In diese Studie wurden alle Patienten, bei denen am Universitätsklinikum Mannheim in einem Zeitraum von zehn Jahren (2002 - 2012) ein positiver Sentinel Lymphknoten diagnostiziert wurde eingeschlossen (96 von 419 Patienten). Die Mitoserate der Sentinel Lymphknoten Metastasen (SLN-MR) und weitere histologische Parameter wurden verblindet neu bestimmt und mit dem klinischen Follow-up korreliert (krankheitsfreies, melanomspezifisches und Gesamtüberleben). Die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit betrug in unserer Kohorte 53 Monate.

In univariaten Analysen wurde der Durchmesser des größten Tumornestes, die maximale Eindringtiefe der Tumorzellen, die Anzahl positiver Sentinel Lymphknoten, die SLN-MR und die Klassifikationssysteme Augsburg S, Rotterdam, Rotterdam-Dewar-Combined, Hannover I und II mit dem krankheitsfreien, dem melanomspezifischen und dem Gesamtüberleben korreliert. Hierbei konnte die allgemeine prognostische Validität der veröffentlichten Klassifikationssysteme für Sentinel Lymphknoten Metastasen bestätigt werden. Ausserdem zeigte die erstmals erhobene Mitoserate der Sentinel Lymphknoten Metastase eine hochsignifikante Korrelation mit dem krankheitsfreien, dem melanomspezifischen und dem Gesamtüberleben. Zur Vereinfachung der Anwendbarkeit in der klinischen Praxis wurde eine binäre Klassifikation der SLN-MR mit einem Grenzwert von <1 vs. ≥ 1 Mitosen/mm² erhoben (SLN-MR1). Dieser korrelierte ebenfalls signifikant mit den prognostischen Endpunkten.

Multivariable Cox-Regressionsanalysen, in die alle untersuchten histologischen Parameter einbezogen wurden, zeigten, dass dieses einfache binäre Klassifikationssystem der stärkste unabhängige prognostische Indikator für alle analysierten Endpunkte war.

Wir schlussfolgern daher, dass die SLN-MR1, unter allen bisher bekannten histologischen Parametern und Klassifikationssystemen für Sentinel Lymphknoten Metastasen, Patienten mit schnell fortschreitenden Erkrankungen und damit höchstem Therapiebedarf am genauesten detektieren kann. Die SLN-MR1 ist darüber hinaus der einzige Parameter der eine Aussage über die proliferative Aktivität der Sentinel Lymphknoten Metastase im Vergleich zu den reinen Größen- oder Ausdehnungsmessungen liefern kann.

Eine Anpassung der histologischen Protokolle mit ergänzender Erhebung der SLN-MR1 sehen wir daher als sinnvoll an. Zumal die Erhebung der SLN-MR1 in routinemäßigen Pathologieberichten einfach und zuverlässig möglich ist. Aufgrund der Erhebung der SLN-MR1 mit derselben Methode wie bei der Mitoserate beim Malignen Melanom (Hot-Spot Methode) sind hierfür keine zusätzlichen Personalschulungen oder technischen Anpassungen notwendig.

Trotz der in unserer Studienkohorte nachgewiesenen prognostischen Aussagekraft der SLN-MR1 bei Patienten mit Malignen Melanomen sind weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven notwendig um den Nutzen der SLN-MR1 weiter zu belegen und ihre Bedeutung für das therapeutische Ansprechen auf zielgerichtete Therapien und Immuntherapien zu untersuchen. Darüber hinaus sollte in größer angelegten Studien gezielt untersucht werden ob Größen- oder/und Ausdehnungsmessungen an Sentinel Lymphknoten Metastasen einen prognostischen Mehrwert zur SLN-MR1 bieten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Erickson, C, Driscoll, MS: Melanoma epidemic: Facts and controversies. *Clin Dermatol*, 28: 281-286, 2010.
2. Tronnier, M, Semkova, K, Wollina, U, Tchernev, G: Malignant melanoma: epidemiologic aspects, diagnostic and therapeutic approach. *Wien Med Wochenschr*, 163: 354-358, 2013.
3. Boniol, M, Autier, P, Gandini, S: Melanoma mortality following skin cancer screening in Germany. *BMJ Open*, 5: e008158, 2015.
4. Institut, RK: Malignes Melanom der Haut. 2014.
5. Pflugfelder, A, Kochs, C, Blum, A, Capellaro, M, Czeschik, C, Dettenborn, T, Dill, D, Dippel, E, Eigentler, T, Feyer, P, Follmann, M, Frerich, B, Ganten, MK, Gartner, J, Gutzmer, R, Hassel, J, Hauschild, A, Hohenberger, P, Hubner, J, Kaatz, M, Kleeberg, UR, Kolbl, O, Kortmann, RD, Krause-Bergmann, A, Kurschat, P, Leiter, U, Link, H, Loquai, C, Loser, C, Mackensen, A, Meier, F, Mohr, P, Mohrle, M, Nashan, D, Reske, S, Rose, C, Sander, C, Satzger, I, Schiller, M, Schlemmer, HP, Strittmatter, G, Sunderkotter, C, Swoboda, L, Trefzer, U, Voltz, R, Vordermark, D, Weichenthal, M, Werner, A, Wesselmann, S, Weyergraf, AJ, Wick, W, Garbe, C, Schadendorf, D, German Dermatological, S, DermatologicCooperative Oncology, G: Malignant melanoma S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma". *J Dtsch Dermatol Ges*, 11 Suppl 6: 1-116, 111-126, 2013.
6. Lens, MB, Dawes, M: Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol*, 150: 179-185, 2004.
7. Marks, R: Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol*, 25: 459-463, 2000.
8. Gandini, S, Sera, F, Cattaruzza, MS, Pasquini, P, Picconi, O, Boyle, P, Melchi, CF: Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer*, 41: 45-60, 2005.
9. Rastrelli, M, Tropea, S, Rossi, CR, Alaibac, M: Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*, 28: 1005-1011, 2014.
10. Reddy, KK, Farber, MJ, Bhawan, J, Geronemus, RG, Rogers, GS: Atypical (dysplastic) nevi: outcomes of surgical excision and association with melanoma. *JAMA Dermatol*, 149: 928-934, 2013.
11. Gandini, S, Sera, F, Cattaruzza, MS, Pasquini, P, Abeni, D, Boyle, P, Melchi, CF: Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*, 41: 28-44, 2005.
12. Gandini, S, Sera, F, Cattaruzza, MS, Pasquini, P, Zanetti, R, Masini, C, Boyle, P, Melchi, CF: Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer*, 41: 2040-2059, 2005.
13. Collins, MK, Secrest, AM, Ferris, LK: Screening for melanoma. *Melanoma Res*, 24: 428-436, 2014.
14. Krebsregisterdaten, <https://www.krebsdaten.de>
15. Situm, M, Buljan, M, Kolic, M, Vucic, M: Melanoma--clinical, dermatoscopic, and histopathological morphological characteristics. *Acta Dermatovenerol Croat*, 22: 1-12, 2014.
16. Schoenewolf, NL, Belloni, B, Simcock, M, Tonolla, S, Vogt, P, Scherrer, E, Holzmann, D, Dummer, R: Clinical implications of distinct metastasizing

- preferences of different melanoma subtypes. *Eur J Dermatol*, 24: 236-241, 2014.
17. Ossio, R, Roldan-Marin, R, Martinez-Said, H, Adams, DJ, Robles-Espinoza, CD: Melanoma: a global perspective. *Nat Rev Cancer*, 17: 393-394, 2017.
 18. Lattanzi, M, Lee, Y, Simpson, D, Moran, U, Darvishian, F, Kim, RH, Hernando, E, Polsky, D, Hanniford, D, Shapiro, R, Berman, R, Pavlick, AC, Wilson, MA, Kirchhoff, T, Weber, JS, Zhong, J, Osman, I: Primary Melanoma Histologic Subtype: Impact on Survival and Response to Therapy. *J Natl Cancer Inst*, 2018.
 19. Liu, W, Dowling, JP, Murray, WK, McArthur, GA, Thompson, JF, Wolfe, R, Kelly, JW: Rate of growth in melanomas: characteristics and associations of rapidly growing melanomas. *Arch Dermatol*, 142: 1551-1558, 2006.
 20. Connolly, KL, Hibler, BP, Lee, EH, Rossi, AM, Busam, KJ, Nehal, KS: Locally Recurrent Lentigo Maligna and Lentigo Maligna Melanoma: Characteristics and Time to Recurrence After Surgery. *Dermatol Surg*, 43: 792-797, 2017.
 21. Bradford, PT, Goldstein, AM, McMaster, ML, Tucker, MA: Acral lentiginous melanoma: incidence and survival patterns in the United States, 1986-2005. *Arch Dermatol*, 145: 427-434, 2009.
 22. Wouters, LT, Thissen, MR: [The acrolentiginous melanoma: how to recognise and when to refer?]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 156: A4927, 2012.
 23. Elder, DE, Bastian, BC, Cree, IA, Massi, D, Scolyer, RA: The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway. *Arch Pathol Lab Med*, 144: 500-522, 2020.
 24. Balch, CM, Gershenwald, JE, Soong, SJ, Thompson, JF, Atkins, MB, Byrd, DR, Buzaid, AC, Cochran, AJ, Coit, DG, Ding, S, Eggermont, AM, Flaherty, KT, Gimotty, PA, Kirkwood, JM, McMasters, KM, Mihm, MC, Jr., Morton, DL, Ross, MI, Sober, AJ, Sondak, VK: Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 27: 6199-6206, 2009.
 25. Amin, MB, Greene, FL, Edge, SB, Compton, CC, Gershenwald, JE, Brookland, RK, Meyer, L, Gress, DM, Byrd, DR, Winchester, DP: 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*, 67: 93-99, 2017.
 26. Breslow, A: Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*, 172: 902-908, 1970.
 27. Azzola, MF, Shaw, HM, Thompson, JF, Soong, SJ, Scolyer, RA, Watson, GF, Colman, MH, Zhang, Y: Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer*, 97: 1488-1498, 2003.
 28. Thompson, JF, Soong, SJ, Balch, CM, Gershenwald, JE, Ding, S, Coit, DG, Flaherty, KT, Gimotty, PA, Johnson, T, Johnson, MM, Leong, SP, Ross, MI, Byrd, DR, Cascinelli, N, Cochran, AJ, Eggermont, AM, McMasters, KM, Mihm, MC, Jr., Morton, DL, Sondak, VK: Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol*, 29: 2199-2205, 2011.
 29. Weide, B, Faller, C, Buttner, P, Pflugfelder, A, Leiter, U, Eigentler, TK, Bauer, J, Forschner, A, Meier, F, Garbe, C: Prognostic factors of melanoma patients with satellite or in-transit metastasis at the time of stage III diagnosis. *PLoS One*, 8: e63137, 2013.

30. Balch, CM, Gershenwald, JE, Soong, SJ, Thompson, JF, Ding, S, Byrd, DR, Cascinelli, N, Cochran, AJ, Coit, DG, Eggermont, AM, Johnson, T, Kirkwood, JM, Leong, SP, McMasters, KM, Mihm, MC, Jr., Morton, DL, Ross, MI, Sondak, VK: Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: comparison of nodal micrometastases versus macrometastases. *J Clin Oncol*, 28: 2452-2459, 2010.
31. Gershenwald, JE, Scolyer, RA, Hess, KR, Sondak, VK, Long, GV, Ross, MI, Lazar, AJ, Faries, MB, Kirkwood, JM, McArthur, GA, Haydu, LE, Eggermont, AMM, Flaherty, KT, Balch, CM, Thompson, JF, for members of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Expert, P, the International Melanoma, D, Discovery, P: Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*, 67: 472-492, 2017.
32. Gershenwald, JE, Scolyer, RA: Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond. *Ann Surg Oncol*, 25: 2105-2110, 2018.
33. van Akkooi, AC, Atkins, MB, Agarwala, SS, Lorigan, P: Surgical Management and Adjuvant Therapy for High-Risk and Metastatic Melanoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 35: e505-514, 2016.
34. Veronesi, U, Cascinelli, N: Narrow excision (1-cm margin). A safe procedure for thin cutaneous melanoma. *Arch Surg*, 126: 438-441, 1991.
35. Morton, DL, Thompson, JF, Cochran, AJ, Mozzillo, N, Elashoff, R, Essner, R, Nieweg, OE, Roses, DF, Hoekstra, HJ, Karakousis, CP, Reintgen, DS, Coventry, BJ, Glass, EC, Wang, HJ, Group, M: Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med*, 355: 1307-1317, 2006.
36. Faries, MB, Thompson, JF, Cochran, AJ, Andtbacka, RH, Mozzillo, N, Zager, JS, Jahkola, T, Bowles, TL, Testori, A, Beitsch, PD, Hoekstra, HJ, Moncrieff, M, Ingvar, C, Wouters, M, Sabel, MS, Levine, EA, Agnese, D, Henderson, M, Dummer, R, Rossi, CR, Neves, RI, Trocha, SD, Wright, F, Byrd, DR, Matter, M, Hsueh, E, MacKenzie-Ross, A, Johnson, DB, Terheyden, P, Berger, AC, Huston, TL, Wayne, JD, Smithers, BM, Neuman, HB, Schneebaum, S, Gershenwald, JE, Ariyan, CE, Desai, DC, Jacobs, L, McMasters, KM, Gesierich, A, Hersey, P, Bines, SD, Kane, JM, Barth, RJ, McKinnon, G, Farma, JM, Schultz, E, Vidal-Sicart, S, Hoefler, RA, Lewis, JM, Scheri, R, Kelley, MC, Nieweg, OE, Noyes, RD, Hoon, DSB, Wang, HJ, Elashoff, DA, Elashoff, RM: Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med*, 376: 2211-2222, 2017.
37. Lens, MB, Dawes, M, Goodacre, T, Newton-Bishop, JA: Elective lymph node dissection in patients with melanoma: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Surg*, 137: 458-461, 2002.
38. Morton, DL, Wanek, L, Nizze, JA, Elashoff, RM, Wong, JH: Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes. Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic. *Ann Surg*, 214: 491-499; discussion 499-501, 1991.
39. Spillane, AJ, Cheung, BL, Stretch, JR, Scolyer, RA, Shannon, KF, Quinn, MJ, Saw, RP, McCarthy, WH, Thompson, JF: Proposed quality standards for regional lymph node dissections in patients with melanoma. *Ann Surg*, 249: 473-480, 2009.
40. Ul-Mulk, J, Holmich, LR: Lymph node dissection in patients with malignant melanoma is associated with high risk of morbidity. *Dan Med J*, 59: A4441, 2012.

41. Essner, R: Experimental frontiers for clinical applications: novel approaches to understanding mechanisms of lymph node metastases in melanoma. *Cancer Metastasis Rev*, 25: 257-267, 2006.
42. Alkhatib, W, Hertzenberg, C, Jewell, W, Al-Kasspooles, MF, Damjanov, I, Cohen, MS: Utility of frozen-section analysis of sentinel lymph node biopsy specimens for melanoma in surgical decision making. *Am J Surg*, 196: 827-832; discussion 832-823, 2008.
43. Sladden, M, Zagarella, S, Popescu, C, Bigby, M: No survival benefit for patients with melanoma undergoing sentinel lymph node biopsy: critical appraisal of the Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial-I final report. *Br J Dermatol*, 172: 566-571, 2015.
44. Glumac, N, Hocevar, M, Zadnik, V, Snoj, M: Sentinel lymph node micrometastasis may predict non-sentinel involvement in cutaneous melanoma patients. *J Surg Oncol*, 98: 46-48, 2008.
45. Agrawal, S, Kane, JM, 3rd, Guadagnolo, BA, Kraybill, WG, Ballo, MT: The benefits of adjuvant radiation therapy after therapeutic lymphadenectomy for clinically advanced, high-risk, lymph node-metastatic melanoma. *Cancer*, 115: 5836-5844, 2009.
46. Burmeister, BH, Henderson, MA, Ainslie, J, Fisher, R, Di Iulio, J, Smithers, BM, Hong, A, Shannon, K, Scolyer, RA, Carruthers, S, Coventry, BJ, Babington, S, Duprat, J, Hoekstra, HJ, Thompson, JF: Adjuvant radiotherapy versus observation alone for patients at risk of lymph-node field relapse after therapeutic lymphadenectomy for melanoma: a randomised trial. *Lancet Oncol*, 13: 589-597, 2012.
47. Achkar, T, Tarhini, AA: The use of immunotherapy in the treatment of melanoma. *J Hematol Oncol*, 10: 88, 2017.
48. Rusciani, L, Petraglia, S, Alotto, M, Calvieri, S, Vezzoni, G: Postsurgical adjuvant therapy for melanoma. Evaluation of a 3-year randomized trial with recombinant interferon-alpha after 3 and 5 years of follow-up. *Cancer*, 79: 2354-2360, 1997.
49. Yang, AS, Chapman, PB: The history and future of chemotherapy for melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 23: 583-597, x, 2009.
50. Vennepureddy, A, Thumallapally, N, Motilal Nehru, V, Atallah, JP, Terjanian, T: Novel Drugs and Combination Therapies for the Treatment of Metastatic Melanoma. *J Clin Med Res*, 8: 63-75, 2016.
51. Long, GV, Menzies, AM, Nagrial, AM, Haydu, LE, Hamilton, AL, Mann, GJ, Hughes, TM, Thompson, JF, Scolyer, RA, Kefford, RF: Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 29: 1239-1246, 2011.
52. Davies, H, Bignell, GR, Cox, C, Stephens, P, Edkins, S, Clegg, S, Teague, J, Woffendin, H, Garnett, MJ, Bottomley, W, Davis, N, Dicks, E, Ewing, R, Floyd, Y, Gray, K, Hall, S, Hawes, R, Hughes, J, Kosmidou, V, Menzies, A, Mould, C, Parker, A, Stevens, C, Watt, S, Hooper, S, Wilson, R, Jayatilake, H, Gusterson, BA, Cooper, C, Shipley, J, Hargrave, D, Pritchard-Jones, K, Maitland, N, Chenevix-Trench, G, Riggins, GJ, Bigner, DD, Palmieri, G, Cossu, A, Flanagan, A, Nicholson, A, Ho, JW, Leung, SY, Yuen, ST, Weber, BL, Seigler, HF, Darrow, TL, Paterson, H, Marais, R, Marshall, CJ, Wooster, R, Stratton, MR, Futreal, PA: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417: 949-954, 2002.
53. Buzaid, AC, Agarwala, SS, Hauschild, A, Atkins, M: Algorithm for the management of metastatic cutaneous melanoma. *Chin Clin Oncol*, 3: 32, 2014.
54. Pardoll, DM: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12: 252-264, 2012.

55. Trinh, VA: Current management of metastatic melanoma. *Am J Health Syst Pharm*, 65: S3-8, 2008.
56. Peggs, KS, Quezada, SA, Chambers, CA, Korman, AJ, Allison, JP: Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med*, 206: 1717-1725, 2009.
57. Zak, KM, Kitel, R, Przetocka, S, Golik, P, Guzik, K, Musielak, B, Domling, A, Dubin, G, Holak, TA: Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. *Structure*, 23: 2341-2348, 2015.
58. Schachter, J, Ribas, A, Long, GV, Arance, A, Grob, JJ, Mortier, L, Daud, A, Carlino, MS, McNeil, C, Lotem, M, Larkin, J, Lorigan, P, Neyns, B, Blank, C, Petrella, TM, Hamid, O, Zhou, H, Ebbinghaus, S, Ibrahim, N, Robert, C: Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet*, 390: 1853-1862, 2017.
59. Robert, C, Long, GV, Brady, B, Dutriaux, C, Maio, M, Mortier, L, Hassel, JC, Rutkowski, P, McNeil, C, Kalinka-Warzocha, E, Savage, KJ, Hernberg, MM, Lebbe, C, Charles, J, Mihalciou, C, Chiarion-Sileni, V, Mauch, C, Cognetti, F, Arance, A, Schmidt, H, Schadendorf, D, Gogas, H, Lundgren-Eriksson, L, Horak, C, Sharkey, B, Waxman, IM, Atkinson, V, Ascierto, PA: Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*, 372: 320-330, 2015.
60. Eggermont, AM, Chiarion-Sileni, V, Grob, JJ, Dummer, R, Wolchok, JD, Schmidt, H, Hamid, O, Robert, C, Ascierto, PA, Richards, JM, Lebbe, C, Ferraresi, V, Smylie, M, Weber, JS, Maio, M, Bastholt, L, Mortier, L, Thomas, L, Tahir, S, Hauschild, A, Hassel, JC, Hodi, FS, Taitt, C, de Pril, V, de Schaetzen, G, Suci, S, Testori, A: Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *N Engl J Med*, 375: 1845-1855, 2016.
61. Wevers, KP, Murali, R, Bastiaannet, E, Scolyer, RA, Suurmeijer, AJ, Thompson, JF, Hoekstra, HJ: Assessment of a new scoring system for predicting non-sentinel node positivity in sentinel node-positive melanoma patients. *Eur J Surg Oncol*, 39: 179-184, 2013.
62. Aarsvold, JN, Alazraki, NP: Update on detection of sentinel lymph nodes in patients with breast cancer. *Semin Nucl Med*, 35: 116-128, 2005.
63. Reintgen, D, Cruse, CW, Wells, K, Berman, C, Fenske, N, Glass, F, Schroer, K, Heller, R, Ross, M, Lyman, G, et al.: The orderly progression of melanoma nodal metastases. *Ann Surg*, 220: 759-767, 1994.
64. Brady, MS, Coit, DG: Sentinel lymph node evaluation in melanoma. *Arch Dermatol*, 133: 1014-1020, 1997.
65. Nathanson, SD: Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer*, 98: 413-423, 2003.
66. Nieweg, OE: Current status of sentinel lymph node biopsy in patients with melanoma. *Rozhl Chir*, 93: 485-490, 2014.
67. Morton, DL, Thompson, JF, Cochran, AJ, Mozzillo, N, Nieweg, OE, Roses, DF, Hoekstra, HJ, Karakousis, CP, Puleo, CA, Coventry, BJ, Kashani-Sabet, M, Smithers, BM, Paul, E, Kraybill, WG, McKinnon, JG, Wang, HJ, Elashoff, R, Faries, MB, Group, M: Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. *N Engl J Med*, 370: 599-609, 2014.
68. Virchow, R: *Die krankhaften Geschwulste.*, Berlin, Germany, August Hirschwald, 1863.
69. Virchow, R: *Cellular Pathology 1859. Special Edition.*, London, John Churchill, 1978.

70. Gilchrist, RK: Fundamental Factors Governing Lymphatic Spread of Carcinoma. *Ann Surg*, 111: 630-639, 1940.
71. Zeidman, I, Buss, JM: Experimental studies on the spread of cancer in the lymphatic system. I. Effectiveness of the lymph node as a barrier to the passage of embolic tumor cells. *Cancer Res*, 14: 403-405, 1954.
72. 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*, 11: 875-878, 2004.
73. Nieweg, OE, Uren, RF, Thompson, JF: The history of sentinel lymph node biopsy. *Cancer J*, 21: 3-6, 2015.
74. Gerota, D: Zur Technik der Lymphgefässinjektion. Eine neue Injektionsmasse der Lymphgefäße. *Anat Anzeiger* 12: 216-224, 1896.
75. Sherman, AI, Ter-Pogossian, M: Lymph-node concentration of radioactive colloidal gold following interstitial injection. *Cancer*, 6: 1238-1240, 1953.
76. Morton, DL, Wen, DR, Wong, JH, Economou, JS, Cagle, LA, Storm, FK, Foshag, LJ, Cochran, AJ: Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*, 127: 392-399, 1992.
77. Balch, CM, Morton, DL, Gershenwald, JE, McMasters, KM, Nieweg, OE, Powell, B, Ross, MI, Sondak, VK, Thompson, JF: Sentinel node biopsy and standard of care for melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 60: 872-875, 2009.
78. Bhimji, SS, Agarwal, M: Anatomy, Lymphatic System. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL), 2018.
79. van der Ploeg, AP, van Akkooi, AC, Rutkowski, P, Nowecki, ZI, Michej, W, Mitra, A, Newton-Bishop, JA, Cook, M, van der Ploeg, IM, Nieweg, OE, van den Hout, MF, van Leeuwen, PA, Voit, CA, Cataldo, F, Testori, A, Robert, C, Hoekstra, HJ, Verhoef, C, Spatz, A, Eggermont, AM: Prognosis in patients with sentinel node-positive melanoma is accurately defined by the combined Rotterdam tumor load and Dewar topography criteria. *J Clin Oncol*, 29: 2206-2214, 2011.
80. 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*, 22: 3345-3349, 2004.
81. Carlson, GW, Murray, DR, Hestley, A, Staley, CA, Lyles, RH, Cohen, C: Sentinel lymph node mapping for thick (≥ 4 -mm) melanoma: should we be doing it? *Ann Surg Oncol*, 10: 408-415, 2003.
82. Tejera-Vaquero, A, Martin-Cuevas, P, Gallego, E, Herrera-Acosta, E, Traves, V, Herrera-Ceballos, E, Nagore, E: Predictors of sentinel lymph node status in cutaneous melanoma: a classification and regression tree analysis. *Actas Dermosifiliogr*, 106: 208-218, 2015.
83. Messina, JL, Rosa, M: Pathologic evaluation of sentinel nodes. *Cancer J*, 21: 33-38, 2015.
84. Cochran, AJ, Binder, S, Morton, DL: The role of lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the management of atypical and anomalous melanocytic lesions. *J Cutan Pathol*, 37 Suppl 1: 54-59, 2010.
85. Kretschmer, L, Peeters, S, Beckmann, I, Thoms, KM, Mitteldorf, C, Emmert, S, Sahlmann, CO, Bertsch, HP, Neumann, C, Meller, J: [Intraoperative detection of sentinel lymph nodes in cutaneous malignant melanoma -- blue dye alone versus blue dye plus gamma detection]. *J Dtsch Dermatol Ges*, 3: 615-622, 2005.

86. Cloyd, JM, Wapnir, IL, Read, BM, Swetter, S, Greco, RS: Indocyanine green and fluorescence lymphangiography for sentinel lymph node identification in cutaneous melanoma. *J Surg Oncol*, 110: 888-892, 2014.
87. Valdes Olmos, RA, Rietbergen, DD, Vidal-Sicart, S, Manca, G, Giammarile, F, Mariani, G: Contribution of SPECT/CT imaging to radioguided sentinel lymph node biopsy in breast cancer, melanoma, and other solid cancers: from "open and see" to "see and open". *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 58: 127-139, 2014.
88. Carson, KF, Wen, DR, Li, PX, Lana, AM, Bailly, C, Morton, DL, Cochran, AJ: Nodal nevi and cutaneous melanomas. *Am J Surg Pathol*, 20: 834-840, 1996.
89. Yu, CH, Chen, HH, Liu, CM, Jeng, YM, Wang, JT, Wang, YP, Liu, BY, Sun, A, Chiang, CP: HMB-45 may be a more sensitive maker than S-100 or Melan-A for immunohistochemical diagnosis of primary oral and nasal mucosal melanomas. *J Oral Pathol Med*, 34: 540-545, 2005.
90. Kucher, C, Zhang, PJ, Acs, G, Roberts, S, Xu, X: Can Melan-A replace S-100 and HMB-45 in the evaluation of sentinel lymph nodes from patients with malignant melanoma? *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 14: 324-327, 2006.
91. Tanis, PJ, Boom, RP, Koops, HS, Faneyte, IF, Peterse, JL, Nieweg, OE, Rutgers, EJ, Tiebosch, AT, Kroon, BB: Frozen section investigation of the sentinel node in malignant melanoma and breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 8: 222-226, 2001.
92. Scolyer, RA, Thompson, JF, McCarthy, SW, Gershenwald, JE, Ross, MI, Cochran, AJ: Intraoperative frozen-section evaluation can reduce accuracy of pathologic assessment of sentinel nodes in melanoma patients. *J Am Coll Surg*, 201: 821-823; author reply 823-824, 2005.
93. Koopal, SA, Tiebosch, AT, Albertus Piers, D, Plukker, JT, Schraffordt Koops, H, Hoekstra, HJ: Frozen section analysis of sentinel lymph nodes in melanoma patients. *Cancer*, 89: 1720-1725, 2000.
94. Spanknebel, K, Coit, DG, Bieligm, 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*, 29: 305-317, 2005.
95. 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*, 45: 2736-2742, 2009.
96. van Akkooi, AC, Verhoef, C, Eggermont, AM: Importance of tumor load in the sentinel node in melanoma: clinical dilemmas. *Nat Rev Clin Oncol*, 7: 446-454, 2010.
97. van Akkooi, AC, de Wilt, JH, Verhoef, C, Schmitz, PI, van Geel, AN, Eggermont, AM, Kliffen, M: Clinical relevance of melanoma micrometastases (<0.1 mm) in sentinel nodes: are these nodes to be considered negative? *Ann Oncol*, 17: 1578-1585, 2006.
98. van Akkooi, AC, Nowecki, ZI, Voit, C, Schafer-Hesterberg, G, Michej, W, de Wilt, JH, Rutkowski, P, Verhoef, C, Eggermont, AM: 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*, 248: 949-955, 2008.
99. Egger, ME, Bower, MR, Czyszczo, IA, Farghaly, H, Noyes, RD, Reintgen, DS, Martin, RC, 2nd, Scoggins, CR, Stromberg, AJ, McMasters, KM: Comparison of sentinel lymph node micrometastatic tumor burden measurements in melanoma. *J Am Coll Surg*, 218: 519-528, 2014.

100. van der Ploeg, AP, van Akkooi, AC, Haydu, LE, Scolyer, RA, Murali, R, Verhoef, C, Thompson, JF, Eggermont, AM: 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*, 50: 111-120, 2014.
101. Starz, H, Balda, BR, Kramer, KU, Buchels, H, Wang, H: A micromorphometry-based concept for routine classification of sentinel lymph node metastases and its clinical relevance for patients with melanoma. *Cancer*, 91: 2110-2121, 2001.
102. Starz, H, Siedlecki, K, Balda, BR: Sentinel lymphonodectomy and s-classification: a successful strategy for better prediction and improvement of outcome of melanoma. *Ann Surg Oncol*, 11: 162S-168S, 2004.
103. Satzger, I, Volker, B, Al Ghazal, M, Meier, A, Kapp, A, Gutzmer, R: Prognostic significance of histopathological parameters in sentinel nodes of melanoma patients. *Histopathology*, 50: 764-772, 2007.
104. Meier, A, Satzger, I, Volker, B, Kapp, A, Gutzmer, R: Comparison of classification systems in melanoma sentinel lymph nodes--an analysis of 697 patients from a single center. *Cancer*, 116: 3178-3188, 2010.
105. Rose, C: [Diagnostics of malignant melanoma of the skin : Recommendations of the current S3 guidelines on histology and molecular pathology]. *Hautarzt*, 68: 749-761, 2017.
106. Society, AC: Key Statistics for Melanoma Skin Cancer. 2019.
107. Lee, C, Collichio, F, Ollila, D, Moschos, S: Historical review of melanoma treatment and outcomes. *Clin Dermatol*, 31: 141-147, 2013.
108. van Akkooi, AC, de Wilt, JH, Verhoef, C, Graveland, WJ, van Geel, AN, Kliffen, M, Eggermont, AM: 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*, 42: 372-380, 2006.
109. 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*, 46: 2414-2421, 2010.
110. Carlson, GW, Murray, DR, Lyles, RH, Staley, CA, Hestley, A, Cohen, C: The amount of metastatic melanoma in a sentinel lymph node: does it have prognostic significance? *Ann Surg Oncol*, 10: 575-581, 2003.
111. Cascinelli, N, Clemente, C, Bifulco, C, Tragni, G, Morabito, A, Santinami, M, Belli, F: Do patients with tumor-positive sentinel nodes constitute a homogeneous group? *Ann Surg Oncol*, 8: 35S-37S, 2001.
112. Schmoeckel, C, Braun-Falco, O: Prognostic index in malignant melanoma. *Arch Dermatol*, 114: 871-873, 1978.
113. McGovern, VJ, Cochran, AJ, Van der Esch, EP, Little, JH, MacLennan, R: The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration: a revision of the 1972 Sydney classification. *Pathology*, 18: 12-21, 1986.
114. Ottmann, K, Tronnier, M, Mitteldorf, C: Detection of mitotic figures in thin melanomas--immunohistochemistry does not replace the careful search for mitotic figures in hematoxylin-eosin stain. *J Am Acad Dermatol*, 73: 637-644, 2015.
115. Scolyer, RA, Shaw, HM, Thompson, JF, Li, LX, Colman, MH, Lo, SK, McCarthy, SW, Palmer, AA, Nicoll, KD, Dutta, B, Slobedman, E, Watson, GF, Stretch, JR: Interobserver reproducibility of histopathologic prognostic variables in primary cutaneous melanomas. *Am J Surg Pathol*, 27: 1571-1576, 2003.

116. Garbe, C, Eigentler, TK, Bauer, J, Blodorn-Schlicht, N, Cerroni, L, Fend, F, Hantschke, M, Kurschat, P, Kutzner, H, Metze, D, Mielke, V, Pressler, H, Reusch, M, Reusch, U, Stadler, R, Tronnier, M, Yazdi, A, Metzler, G: Mitotic rate in primary melanoma: interobserver and intraobserver reliability, analyzed using H&E sections and immunohistochemistry. *J Dtsch Dermatol Ges*, 14: 910-915, 2016.
117. Kibrite, A, Milot, H, Douville, P, Gagne, EJ, Labonte, S, Friede, J, Morin, F, Ouellet, JF, Claveau, J: Predictive factors for sentinel lymph nodes and non-sentinel lymph nodes metastatic involvement: a database study of 1,041 melanoma patients. *Am J Surg*, 211: 89-94, 2016.
118. Speijers, MJ, Bastiaannet, E, Sloot, S, Suurmeijer, AJ, Hoekstra, HJ: Tumor mitotic rate added to the equation: melanoma prognostic factors changed? : a single-institution database study on the prognostic value of tumor mitotic rate for sentinel lymph node status and survival of cutaneous melanoma patients. *Ann Surg Oncol*, 22: 2978-2987, 2015.
119. Wat, H, Senthilselvan, A, Salopek, TG: A retrospective, multicenter analysis of the predictive value of mitotic rate for sentinel lymph node (SLN) positivity in thin melanomas. *J Am Acad Dermatol*, 74: 94-101, 2016.
120. Gerami, P, Busam, K, Cochran, A, Cook, MG, Duncan, LM, Elder, DE, Fullen, DR, Guitart, J, LeBoit, PE, Mihm, MC, Jr., Prieto, VG, Rabkin, MS, Scolyer, RA, Xu, X, Yun, SJ, Obregon, R, Yazdan, P, Cooper, C, Weitner, BB, Rademaker, A, Barnhill, RL: Histomorphologic assessment and interobserver diagnostic reproducibility of atypical spitzoid melanocytic neoplasms with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol*, 38: 934-940, 2014.
121. Cerroni, L, Barnhill, R, Elder, D, Gottlieb, G, Heenan, P, Kutzner, H, LeBoit, PE, Mihm, M, Jr., Rosai, J, Kerl, H: Melanocytic tumors of uncertain malignant potential: results of a tutorial held at the XXIX Symposium of the International Society of Dermatopathology in Graz, October 2008. *Am J Surg Pathol*, 34: 314-326, 2010.
122. Casper, DJ, Ross, KI, Messina, JL, Sondak, VK, Bodden, CN, McCardle, TW, Glass, LF: Use of anti-phosphohistone H3 immunohistochemistry to determine mitotic rate in thin melanoma. *Am J Dermatopathol*, 32: 650-654, 2010.
123. Piana, S, Tagliavini, E, Ragazzi, M, Zanelli, M, Zalaudek, I, Ciarrocchi, A, Valli, R: Lymph node melanocytic nevi: pathogenesis and differential diagnoses, with special reference to p16 reactivity. *Pathol Res Pract*, 211: 381-388, 2015.
124. de Beer, FSA, van Diest, PJ, Sigurdsson, V, El Sharouni, M: Intra-nodal nevi in sentinel node-negative patients with cutaneous melanoma does not influence survival. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2019.

EIGENE PUBLIKATION

Baum C, Weiss C, Gebhardt C, Utikal J, Marx A, Koenen W, Géraud C.
Sentinel node metastasis mitotic rate (SN-MMR) as a prognostic indicator of rapidly progressing disease in patients with sentinel node-positive melanomas.
Int J Cancer. 2017 Apr 15;140(8):1907-1917

7 LEBENSLAUF

Personalien

Name und Vorname: Cornelia Baum
Geburtsdatum: 29.04.1988
Geburtsort: Heidelberg
Familienstand: Ledig
Vater: Bernd Baum
Mutter: Gabriele Baum

Schulischer Werdegang

1994 – 2008 Friedrich-Ebert-Gymnasium Sandhausen
17.06.2008 Abitur

Universitärer / beruflicher Werdegang

WS2008/09 -
WS2013/2014 Studium der Humanmedizin an der Universität
Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim
16.09.2010 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
21.11.2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
01.07.2015 -
01.07.2016 Assistenzärztin Stadtspital Triemli Zürich
Klinik für Viszeral-, Gefäss- und Thoraxchirurgie
Leitung: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Markus Weber
01.07.2017 -
01.10.2017 Assistenzärztin Stadtspital Triemli Zürich
Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Leitung: KD Dr. med. Patricia Fodor
01.07.2016 -
31.12.2018 Assistenzärztin Stadtspital Triemli Zürich
Klinik für Allgemein-, Hand- und Unfallchirurgie
Leitung: Prof. Dr. med. Andreas Platz
01.01.2019 - dato Assistenzärztin Universitätsspital Basel
Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des
Bewegungsapparates
Leitung: Prof. Dr. med. Daniel Rikli

8 DANKSAGUNG

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Cyrill Géraud, meinem Betreuer und letztendlich auch Doktorvater. Er stand mir in freundschaftlicher Weise mit seinem Wissen zur Seite und ist in seinem freundlichen und ruhigen Umgang, sowie in seinem medizinischen Werdegang ein Vorbild für mich.

Frau Prof. Dr. sc. hum. habil. Christel Weiß, Leiterin der Abteilung für Medizinische Statistik, Biomathematik und Informationsverarbeitung des Universitätsklinikum Mannheim, verdanke ich die statistische Auswertung meiner Forschungsergebnisse. Sie verhalf mir zum Verständnis vieler statistischer Zusammenhänge und stand mir bei meiner Ergebnisauswertung viele Stunden mit Geduld zur Seite.

Ebenso danke ich meinen Freundinnen Julia Pelikan und Sarah Krieg für die Durchsicht meiner Arbeit.

Nicht Zuletzt danke ich meiner ganzen Familie und insbesondere meinem Freund David für ihre Unterstützung in ausnahmslos allen Belangen, auch für ihren Ansporn zur Vollendung dieser Arbeit.