

Zusammenfassung

Histologischen Techniken kommt eine Schlüsselrolle für den Erfolg und für die Weiterentwicklung des Sentinel-Node-Gesamtkonzepts zu. Die im „Augsburg Consensus“ international und interdisziplinär verabschiedeten Standards sind hierfür die Basis. Um Malignomzellen im Sentinel-Lymphknoten (SLK) auch in kleiner Zahl mit absoluter Spezifität und hinreichender Sensitivität identifizieren zu können, bedarf es der konventionellen histologischen (HE) und der immunhistochemischen (Markerwahl passend zum Immunphänotyp des Primärtumors) Untersuchung geeigneter Serien von Paraffinschnitten. Bei melanomassoziierten SLKs ist dabei besonders auf die Unterscheidung von ebenfalls S100-positiven kapsulären und trabekulären Nävuszellen, eingewanderten Langerhanszellen, interdigitierenden Retikulumzellen und intranodalen Nerven zu achten. Ein substanzielles Risiko melanompositiver SLKs und damit die Indikation zur SLNE besteht für Patienten mit Primärmelanomen ab einer Tumordicke von 0,76 mm nach Breslow. Die mikromorphometrische S-Klassifikation des SLK-Melanombefalls ist – auch in einer vereinfachten Version analog der Breslowschen Messmethode – ein erstrangiger Prognostikator sowohl für das Risiko noch nachgeschalteter Lymphknotenmetastasen in der jeweiligen Region als auch für die Manifestationswahrscheinlichkeit von Fernmetastasen und damit für das Gesamtüberleben. Ebenso wie die Breslow-assoziierte T-Klassifikation des Primärmelanoms ist die S-Klassifikation somit ein essenzielles Selektions- und Stratifikationskriterium für die Planung und Durchführung prospektiv randomisierter adjuvanter Therapiestudien beim malignen Melanom. Bisher verfügbare RT-PCR-Techniken eignen sich wegen unzureichender Spezifität für Melanomzellen nicht als diagnos-

Abstract

Histological techniques play a keyrole for the success and for the further evolution of the sentinel node (SN) concept. Basic standards published as „The Augsburg Consensus“ have been established by a group of international experts from various disciplines. For the aim to identify even few malignant cells in the SN with absolute specificity and with high sensitivity, it is indispensable to evaluate appropriate series of paraffin sections with conventional histology (H&E) and immunohistochemistry (using markers adapted to the immunophenotype of the primary tumor). In cases of melanoma-related SNs, special attention is required for the distinction of capsular or trabecular nevocytes, immigrated Langerhans cells, interdigitating reticulum cells and nodal nerves which all share S100-positivity with melanoma cells. A substantial risk to find melanoma-positive sentinel nodes, equivalent with the indication to perform sentinel lymphonodectomy, exists for all patients with primaries thicker than 0.75 mm according to Breslow. The micromorphometric S classification of SN involvement by melanoma can be simplified in analogy to Breslow's principle of classifying primary melanomas without losing its relevance as a first-rank predictor both for post-SN metastases in the respective lymph node region and for the patient's risk to develop distant metastases and to die from tumor progression. The S classification, just like the Breslow-related T classification, must be integrated in prospective randomised adjuvant therapy trials as an essential criterion for selection and stratification of patients. With regard to the diagnostic evaluation of melanoma-related SNs, (immuno-)histology cannot be replaced by currently available RT-PCR techniques due to their insufficient specificity for melanoma cells. A fruitful combination

Institutsangaben

¹ Klinik für Dermatologie und Allergologie, Klinikum Augsburg (Direktor: Prof. Dr. med. Prof. h.c. B.-R. Balda)

² Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of California Los Angeles (UCLA), School of Medicine

Korrespondenzadresse

Dr. med. H. Starz · Klinik für Dermatologie und Allergologie · Klinikum Augsburg · Stenglinstraße 2 · 86156 Augsburg · E-mail: hstarz@web.de

Bibliografie

Akt Dermatol 2002; 28: 273–278 © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 0340-2541

tische Alternativen zur Histologie und Immunhistochemie. Eine sinnvolle Kombination von HE-Histologie, Immunhistochemie und RT-PCR-Analysen ohne Gefährdung bereits erreichter diagnostischer Standards gelingt durch Verwendung unmittelbar aufeinanderfolgender Paraffinschnitte. Auf diese Weise lässt sich die Sensitivität für die Identifikation von Melanom- und mehr noch von Nävuszellen in SLKs ohne Spezifitätseinbuße weiter verbessern.

Einleitung

Der Erfolg der Sentinel-Lymphonodektomie (SLNE) hängt entscheidend von der höchstmöglichen Präzision in jeder Phase dieser komplexen Methode ab, beginnend bei der korrekten Indikationsstellung zur SLNE über die lymphabflussszintigraphische Ortung und gezielte operative Entfernung aller Sentinel-Lymphknoten (SLKs) bis – last not least – zur Auswertung der gefundenen Lymphknoten. Hierbei stellt schon die korrekte Unterscheidung zwischen malignomnegativen und malignompositiven SLKs keineswegs ein triviales diagnostisches Problem dar. Denn falls Tumorzellen vorhanden sind, so meist nur in geringer Zahl bezogen auf den sie umgebenden „Mikrokosmos“ SLK. Die konventionelle histologische Untersuchung von ein bis zwei Paraffinschnitten pro Lymphknoten, wie sie bei der Untersuchung tumorassoziierter Lymphknotenpakete üblich ist, würde etwa beim malignen Melanom inakzeptabel niedrige Sensitivitäten von etwa 70% erwarten lassen [8]. Noch höhere Falsch-negativ-Raten sind bei der Routineuntersuchung von Kryostatenschnitten zu befürchten [5, 7]. Umgekehrt erwiesen sich moderne molekularbiologische Alternativen zur Mikromorphologie wie beispielsweise die Tyrosinase-RT-PCR als zwar hochsensitiv [1–3, 23], jedoch als nicht spezifisch für Melanomzellen in SLKs. Falsch positive Ergebnisse resultierten hierbei vor allem aus der Existenz kapsulotrabeulärer Nävuszellen in SLKs [4, 17, 21, 22].

Der international akzeptierte Goldstandard zur SLK-Diagnostik in der Dermatookologie ist daher spätestens seit Verabschiedung des Augsburg Consensus die histologisch-immun-histochemische Befundung geeigneter Serien von Paraffinschnitten [5, 7]. Dieses Procedere bildet zugleich die Voraussetzung für eine prognostisch relevante mikromorphometrische Klassifikation von SLK-Mikrometastasen [14, 15, 18–20].

Bearbeitung und Zuschnitt der SLKs

SLKs werden unmittelbar postoperativ vom umgebenden Fettgewebe isoliert. Nach Messung und Dokumentation der noch enthaltenen Radioaktivität werden sie für etwa 24 h in 4,5-prozentigem phosphatgepufferten Formalin (pH 7,0) fixiert. Im dermatohistologischen Labor folgt sodann die dreidimensionale Vermessung jedes einzelnen SLKs sowie die Dokumentation etwa noch erkennbarer Patentblauanfärbungen.

Theoretisch wäre es nun wünschenswert, den gesamten Lymphknoten in wenige Mikrometer dünnen Paraffinschnitten vollständig aufzuarbeiten und alle diese Schnitte auf Malignomzel-

len hin zu durchsuchen. Je nach Größe des SLKs würden dabei hunderte bis tausende von Schnitten anfallen und den Zeit- und Kostenfaktor der Untersuchung ins nahezu Unermessliche treiben [21, 24].

Als routinegeeignet und dennoch hinreichend sensitiv zur Detektion auch sehr kleiner Mikrometastasen erwiesen sich für das maligne Melanom folgende zwei Techniken [5, 7]:

1. *Die in Los Angeles praktizierte Vorgehensweise* (Abb. 1)

Hierbei wird der SLK in der Ebene des längsten Umfangs, entsprechend der so genannten Äquatorialebene, halbiert. Beide Hälften werden so in Paraffin eingebettet, dass beim späteren Anschneiden mit dem Mikrotom entlang der Äquatorialebene möglichst wenig Gewebe verloren geht. Die ersten zehn Serienschritte pro SLK-Hälfte mit vollständig erhaltenem Lymphknotenprofil werden auf Objektträger gezogen und wie folgt bearbeitet: Die Schnitte 1, 3, 5 und 10 werden konventionell mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt, während Schnitt 2 mit Anti-S100-Protein [8, 13] und Schnitt 4 mit dem monoklonalen Antikörper HMB45 [11, 13] (oder alternativ Melan A [10]) immunhistochemisch markiert werden. Schnitte 6 und 7 dienen als Negativkontrollen, Schnitte 8 und 9 als Reserven für Wiederholungen bei suboptimaler Färbequalität oder für ergänzende immunhistochemische Markierungen. Bei Auffälligkeiten oder Verdachtsmomenten in den ersten zehn Schnitten kann zudem eine weitere Serie von zehn Schnitten untersucht werden.

2. *Die in Augsburg etablierte Methode* (Abb. 2)

Nach Formalinfixierung über etwa 24 h wird der SLK parallel zur Längsachse in etwa 1 mm dünne Gewebsscheiben lamelliert. Makroskopische Auffälligkeiten, z.B. herdförmige Knotenbildungen, Farbunterschiede oder Reste der Patentblau-markierung werden vermerkt. Von jeder Gewebsscheibe werden nach üblicher Paraffineinbettung mindestens drei Semidünnschnitte (etwa 3 µm dick) hergestellt, und zwar für die HE-Färbung sowie für mindestens zwei immunhistochemische Markierungen, im Regelfall mit Anti-S100 und HMB45. Im Zweifelsfall werden weitere Paraffinschnitte immunhistochemisch mit Melan A (MART1-Antikörper) untersucht oder auch der RNA-Extraktion und beispielsweise der Tyrosinase-RT-PCR zugeführt. Diese Methode ist etwas zeit- und kostenintensiver als die erstbeschriebene Technik, eignet sich jedoch für alle, speziell auch für asymmetrisch oder irregulär geformte SLKs und stellt die ideale Basis für routinemorphometrische Auswertungen dar (s. unten). Zudem ist sie mit nur geringen Modifikationen bezüglich der Wahl geeigneter immunhistochemischer Marker auch auf andere Hautmalignome übertragbar [9, 12, 15, 16].

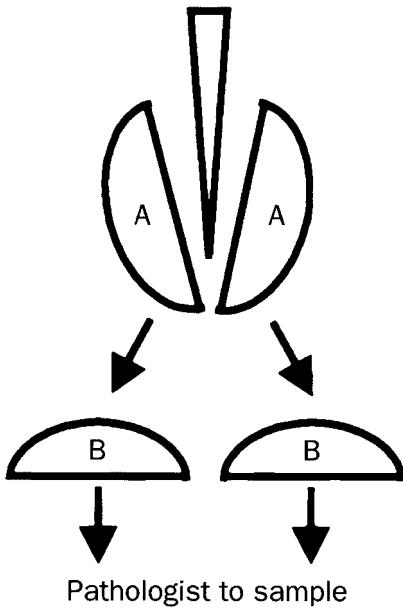


Abb. 1 (entnommen aus [7] mit freundlicher Erlaubnis von Martin Dunitz Ltd.).

- | | | |
|----|-----|--------------|
| 10 | — — | spare or H&E |
| 9 | — — | spare |
| 8 | — — | spare |
| 7 | — — | control |
| 6 | — — | control |
| 5 | — — | H&E |
| 4 | — — | H&MB-45 |
| 3 | — — | H&E |
| 2 | — — | S-100 |
| 1 | — — | H&E |

Die in Los Angeles praktizierte Methode. Der SLK wird in der Äquatorialebene, d. h. in der Ebene des längsten Profilmumfangs, in exakt zwei Hälften (A) geteilt. Jede SLK-Hälfte wird mit der Schnittfläche nach unten in Paraffin eingebettet, so dass von hier aus jeweils eine Serie von zehn Mikrotomschnitten mit möglichst vollständig erhaltener Profilfläche des SLK angefertigt werden kann. Beim Anschneiden der Paraffinblöcke wird auf möglichst geringen Gewebsverlust geachtet. Die Nutzung der einzelnen Schnitte ist der Abbildung selbst zu entnehmen. Bei verdächtigen oder ungewöhnlichen Befunden können neuerliche Serien von je zehn Schnitten angefertigt und analog gefärbt bzw. immunmarkiert werden.

Immunhistochemie – Basis- oder Reservemethode?

Zur Detektion von Melanomzellen im SLK sollten in der Regel mindestens zwei immunhistochemische Marker eingesetzt werden (Anti-S100 und HMB45, letzterer etwa gleichwertig ersetzbar durch Melan A). Verzichtbar sind sie allenfalls dann, wenn die makroskopische Inspektion des SLKs bereits offensichtliche Metastasen zeigt. Selbst bei dieser seltenen Konstellation ist gelegentlich jedoch die Immunhistochemie an ausgewählten Schnitten indiziert, um die Zuordnung der Metastase zum Melanom zu belegen und andere Malignomtypen als Ausgangstumoren auszuschließen. Zwar lassen sich auch Mikrometastasen noch großteils ohne Immunhistochemie an HE-Schnitten erkennen, jedoch bleibt eine Sensitivitätslücke von etwa 12–30% je



Abb. 2 (entnommen aus [14] mit freundlicher Erlaubnis des Demeter-Verlags).

Die in Augsburg praktizierte Vorgehensweise. Der formalinfixierte SLK wird parallel zur Längsachse in 1 mm dünne Scheiben auflamelliert. Diese werden so in Paraffin eingebettet, dass die später entnommenen Mikrotomschnitte möglichst die gesamte Profilfläche des SLK enthalten. Beim Melanom werden pro Lymphknotenscheibe ein Schnitt HE-gefärbt, mindestens zwei weitere immunhistochemisch markiert (mit Anti-S100 und HMB45, im Zweifel zusätzlich mit Melan A). Bei Nachweis von Tumorzellen wird ihre maximale Distanz d zum Innenrand der SLK-Kapsel dokumentiert, ferner die Zahl n der befallenen SLK-Scheiben. Die Originaldefinition der S-Klassifikation bediente sich bei der Parameter n und d , die vereinfachte Version orientiert sich nur noch an d , analog dem Breslowschen Prinzip bei der T-Klassifikation des Primärmelanoms nach der Tumordicke.

nach Erfahrung des Untersuchers [7,8], und ein zeitlich gestuftes Vorgehen verzögert die definitive Diagnosestellung in oft unzumutbarem Maße.

Analog gilt dies, mit jeweils anderen Antikörpern, auch für die SLK-Diagnostik bei nichtmelanozytären Hautmalignomen [15]: So kommen bei Merkelzellkarzinomen je nach Immunphänotyp des Primärtumors Zytokeratinantikörper wie KL1 oder Anti-Zytokeratin 20 zum Einsatz, ferner Antikörper gegen die sog. neuronenspezifische Enolase (NSE) oder das epitheliale Membranantigen (EMA) [9]. Auch bei anderen Karzinomen eignen sich Breitspektrumantikörper gegen Zytokeratine. Besonders anspruchsvoll ist naturgemäß die Suche nach Lymphomzellen in SLKs. Hier ist eine großzügige Immunphänotypisierung des kutanen Lymphoms absolute Voraussetzung für eine entsprechend optimierte Markerwahl am SLK, die je nach Lymphomtyp so unterschiedliche Antikörper wie CD30 oder Antiseren gegen bestimmte Immunglobulinketten umfassen kann [12,16].

S100-Expression in Melanomzellen und differenzialdiagnostisch relevanten Strukturen

Das S100-Protein ist ein in fast allen Melanomen nachweisbares Antigen. Melanomzellen exprimieren dieses Antigen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. Anti-S100 eignet sich daher hervorragend als Screeningmarker, wobei der Untersucher sein

Hauptaugenmerk auf S100-positive epitheloide, ovaläre oder spindelförmige Zellen vor allem in der Randsinuszone des SLK legen sollte. Der Nachteil von S100 besteht darin, dass es auch in einer Reihe anderer Zellen im Lymphknoten exprimiert wird, so in eingewanderten Langerhanszellen, in interdigitierenden Retikulumzellen des Parakortex, in Schwannschen Zellen kleiner lymphonodaler Nerven und nicht zuletzt in vorwiegend kapsulär oder trabekulär anzutreffenden Nävuszellen. In reaktiv hyperplastischen Parakortex-Regionen können interdigitierende Retikulumzellen sehr zahlreich sein, lassen sich dort jedoch leicht als polydendritische Zellen identifizieren. Schwieriger ist die Differenzialdiagnose zu Melanomzellen in inaktiven Lymphknoten – und SLKs sind nach Untersuchungen der Cochran'schen Arbeitsgruppe häufig immunsupprimiert [6] –, da hierbei interdigitierende Retikulumzellen oft keine oder nur noch spärliche dendritische Ausläufer aufweisen und somit ebenfalls als rundliche Zellen imponieren. Auch quer getroffene Nerven können als kräftig S100-positive Strukturen manchmal auf den ersten Blick Cluster von Melanomzellen vortäuschen, lassen sich meist jedoch spätestens auf Stufenschnitten richtig interpretieren. Gleiches gilt für Nävozyten, deren Vorkommen in SLKs von Melanompatienten der Häufigkeit von Melanommetastasen nicht wesentlich nachsteht [4, 7, 17, 22]. Sie finden sich typischerweise als unterschiedlich große Gruppen relativ monomorpher kleiner Zellen innerhalb des Bindegewebes der Lymphknotenkapsel oder -trabekel, nicht selten in enger Assoziation an die Außenseite afferenter Lymphgefäße (Abb. 3). Initiale Melanomzellcluster sind dagegen entweder im Lumen dieser Lymphgefäße oder in subkapsulären und gelegentlich peritrabekulären Sinus zu erwarten und bestehen meist aus größeren Einzelzellen mit form- und größenvariablen, manchmal erkennbar mitotisch aktiven Kernen (Abb. 4). Andererseits kommen durchaus auch nävusartige Melanommikrometastasen vor, so dass die zytomorphologischen Unterscheidungsmerkmale weniger verlässlich sind als die genannten Kriterien der Mikrolokalisierung.

Markerverhalten von HMB45 und Melan A (MART1)

Die Spezifität dieser beiden Marker für Melanomzellen ist wesentlich höher als die von Anti-S100 [8, 10, 11, 13]. Allerdings bleibt für beide eine Sensitivitätslücke von bis zu 20% bei Melanomen, die nicht mit diesen Markern reagieren, und dies gilt in besonderem Maße für Mikrometastasen [5, 7, 13, 17, 21]. Auch in HMB45- bzw. Melan-A-positiven Melanommetastasen werden die entsprechenden Antigene zudem meist nur in einem Teil der Tumorzellen sowie in erheblich variabler Intensität exprimiert (Abb. 4), so dass weder HMB45 noch Melan A die Screeningfunktion von Anti-S100 ersetzen können. Im Gegensatz zu Anti-S100 markieren HMB45 und Melan A weder Langerhanszellen noch interdigitierende Retikulumzellen, noch Schwannsche Zellen im SLK. Nävuszellen reagieren mit HMB45 meist nicht oder nur sehr diskret. Ausnahmen, analog etwa den kräftig HMB45-positiven Nävi coerulei der Haut, existieren jedoch auch im Lymphknoten. In beiden Dermatopathologielabors, in Los Angeles und in Augsburg, wird HMB45 gegenüber Melan A favorisiert [7], da die Anwendung des ersteren Markers keiner besonderen Vorbehandlung (z. B. Mikrowellen- oder Dampfdruckerhitzung) der Parafinschnitte bedarf, wodurch deren Mikromorphologie besser erhalten bleibt. Vor allem bei der Untersuchung von inguinalen und iliakalen Lymphknoten bleibt noch zu berücksichtigen, dass

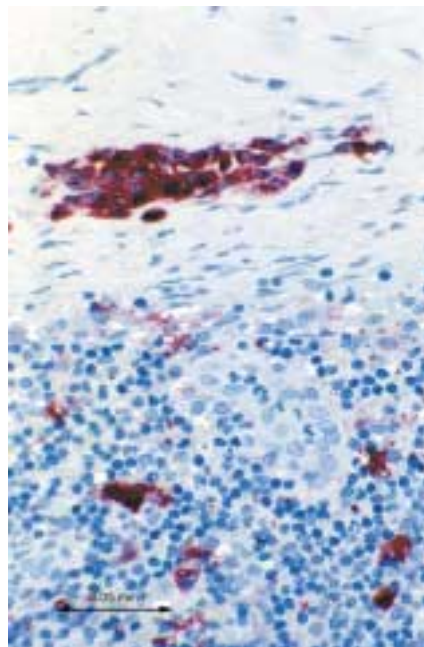


Abb. 3 Beispiele S100-positiver nicht-maligner Zellen im SLK. In typischer Lokalisation innerhalb des Bindegewebes der Lymphknotenkapsel imponiert eine umschriebene Ansammlung von Nävuszellen. Im Parakortex des Lymphknotenparenchyms zeigen sich einige interdigitierende Retikulumzellen in disseminierter Verteilung.

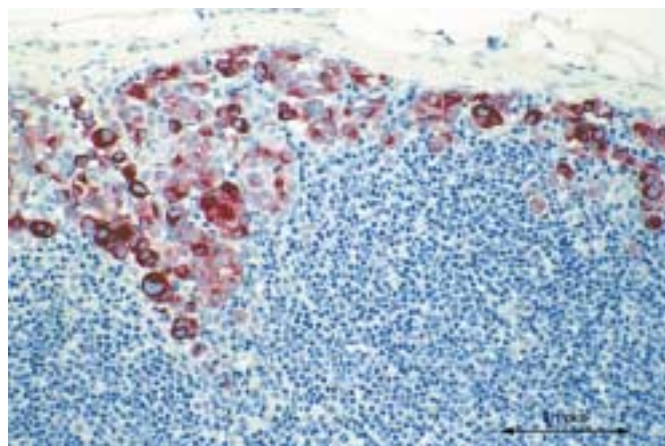


Abb. 4 Partiiell HMB45-positive Melanommikrometastase (Klassifikation SII nach der vereinfachten Definition). Die hier epitheloiden Melanomzellen finden sich subkapsulär im Gegensatz zur meist intrakapsulären oder trabekulären Lokalisation von Nävuszellen. Zu beachten ist die von Melanomzelle zu Melanomzelle sehr variable Expression des von HMB45 erkannten Epitops.

trabekuläre Kalzifikationen nicht selten mit extrazellulärer HMB45-Reaktivität einhergehen [7]. Ansonsten sind S100- und HMB45-positive Zellen bei typischer Lokalisation im SLK (s. o.) selbst dann als Melanomzellen anzusprechen, wenn weitere Malignitätskriterien wie Zell- und Kernpleomorphie, atypische Mitosen oder Stromareaktion fehlen.

Mikromorphometrie und S-Klassifikation [14, 18, 19]

Falls sich Malignomzellen in einem oder mehreren SLKs eines Patienten finden, so lässt sich auf der Basis einfach zu bestimmender mikromorphometrischer Parameter eine exakt definierte S-Klassifikation vornehmen (Abb. 2). Dies erfordert einen zusätzlichen Zeitaufwand von nur wenigen Minuten, ferner ein Okularmikrometer, das zur Standardausrüstung jedes Dermatohistologielabors gehört. Wesentlich zeitaufwändiger wären dagegen klassische volumetrische Messungen nach dem Cavalieri-

schen Prinzip. Zudem scheitert deren Routineeignung an der Abhängigkeit von speziellen mikroskopassoziierten Zusatzausstattungen oder Hilfsmitteln, die nicht regelhaft vorausgesetzt werden können.

Als Determinanten für die originale S-Klassifikation [14, 18] werden folgende zwei Parameter dokumentiert: 1. die Zahl n derjenigen 1 mm dünnen SLK-Scheiben, in denen sich Tumorzellen eindeutig nachweisen lassen, 2. die maximale Invasionstiefe d , gemessen in Millimetern zwischen dem Innenrand der SLK-Kapsel und der am tiefsten in Richtung SLK-Zentrum vorgedrunnenen Tumorzelle, soweit an den zweidimensionalen Lymphknotenschnitten möglich. Bei Vorliegen mehrerer SLKs in einer Lymphknotenstation entspricht n der Summe der für jeden einzelnen SLK bestimmten Einzelzahlen, d dem Maximum der jeweils gemessenen Eindringtiefen. Für SLKs in unterschiedlichen Regionen werden die jeweils zugehörigen Parameter n und d getrennt dokumentiert, zumal sie regionenbezogene Aussagen zum Risiko noch nachgeschalteter Metastasen in Non-Sentinel-Lymphknoten ermöglichen. Auch die S-Klassifikation wird somit separat für jede Lymphknotenstation bestimmt, in denen SLKs gefunden wurden. Sie ist wie folgt definiert:

- S0 entspricht dem Fehlen (immun-)histologisch nachgewiesener Tumorzellen ($n = 0$),
- S1 dem lokalisiert peripheren Befall mit $n \leq 2$ und $d \leq 1$ mm,
- S2 dem ausgedehnt oder multifokal peripheren Befall mit $n > 2$ und $d \leq 1$ mm, und
- S3 der tiefer als 1 mm unter Kapselniveau reichenden Metastasierung ($d > 1$ mm).

Als nahezu gleichwertig hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft (s. unten) erwies sich folgende eindimensional vereinfachte Modifikation der S-Klassifikation, die als Unterscheidungsmerkmal zur originalen S-Klassifikation mit römischen Zahlen gekennzeichnet ist [19]:

- S0 unterscheidet sich nicht von o.g. Definition für S0,
- S1 entspricht dem äußerst peripheren Befall mit $d \leq 0,3$ mm,
- SII dem bereits etwas tiefer reichenden Befall mit $0,3 \text{ mm} < d \leq 1$ mm, und
- SIII, wie bei S3, der tiefer als 1 mm unter Kapselniveau reichenden Metastasierung.

Diese dem Breslow-Prinzip bei der T-Klassifikation des Primärmelanoms entsprechende Definition ist auch dann anwendbar, wenn Zuschnitt und Aufarbeitung der SLKs von den geschilderten, in Augsburg etablierten Standards abweichen. Voraussetzung sind lediglich geeignete Paraffinschnittserien mit jeweils möglichst vollständig erhaltener Profilfläche des SLK, um auch kleine Metastasen in ihrem mikrotopografischen Bezug zur Lymphknotenkapsel repräsentativ erfassen zu können.

Bisherige Erfahrungen mit der vereinfachten S-Klassifikation im Überblick

Wenngleich sich analoge Tendenzen auch für andere Hautmalignome abzeichnen [9, 15], beschränken sich statistisch überprüfbare Erfahrungen naturgemäß bislang auf das maligne Melanom. Bezüglich der Häufigkeitsverteilung und prognostischen Wertigkeit der originalen S-Klassifikation dürfen wir auf unsere Publikationen aus dem Jahr 2001 verweisen [18, 20]. Die folgenden

Angaben beziehen sich auf die oben beschriebene, eindimensional nach dem Parameter d definierte Modifikation der S-Klassifikation [19].

Bei 508 Melanompatienten wurden an unserer Klinik insgesamt 957 SLKs aus 598 Lymphknotenregionen untersucht. Bei 107 dieser 508 Patienten fand sich mindestens ein melanompositiver SLK (21,1%). Für die S-Klassifikation ergab sich folgende Verteilung: $488 \times S0$ (81,6%), $33 \times S1$ (5,5%), $40 \times SII$ (6,7%) und $37 \times SIII$ (6,2%). Alle 126 SLKs von 60 Patienten mit Melanomen bis zu 0,75 mm Tumordicke nach Breslow erwiesen sich als tumorfrei (S0). Dagegen fand sich unter 96 Patienten mit Melanomen zwischen 0,76 und 1 mm Tumordicke in immerhin 13 Fällen (13,5%) jeweils mindestens ein melanompositiver SLK ($8 \times S1$, $4 \times SII$, $1 \times SIII$), so dass die Indikation zur Durchführung der SLNE heute für alle Primärmelanome ab 0,76 mm nach Breslow gestellt werden muss, ausgenommen die seltenen Fälle mit bereits klinisch fassbaren extrakutanen Metastasen. Mit ansteigender Breslow-Tumordicke steigen sowohl der Prozentsatz melanompositiver SLKs insgesamt als auch der Anteil SIII-klassifizierter SLKs. Bei 20 von 50 Patienten mit Melanomen über 4 mm Tumordicke fand sich mindestens ein melanompositiver SLK (40%). Die in dieser Gruppe untersuchten 90 SLKs entstammten 64 Lymphknotenregionen. Für die S-Klassifikation ergab sich folgende Verteilung: $43 \times S0$ (67,2%), $2 \times S1$ (3,1%), $7 \times SII$ (10,9%) und $12 \times SIII$ (18,8%).

Von den 401 Patienten mit ausschließlich S0-klassifizierten SLKs entwickelten bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von 40 Monaten bislang vier Patienten (1%) im weiteren Verlauf dennoch regionäre Lymphknotenmakrometastasen. In den SLKs dieser Patienten ließen sich trotz einer zweiten akribischen Suche unter Einschluss weiterer Stufenschnitte und der Tyrosinase-RT-PCR (s. unten) weiterhin keine Melanomzellen nachweisen, so dass zwei andere Erklärungsmöglichkeiten bleiben: 1. Nicht alle SLKs wurden identifiziert und operativ entfernt. 2. Ausgangspunkt der Metastasierung können Melanomzellen im Bereich der Intransit-Lymphwege gewesen sein, die erst nach SLNE in die Lymphknotenregion gelangten.

Die prognostische Bedeutung der vereinfachten S-Klassifikation wurde an 103 Patienten mit in Los Angeles melanompositiv vordiagnostizierten SLKs durch nachträgliche mikromorphometrische Eingruppierung in die entsprechenden S-Kategorien überprüft. Der Untersucher verfügte vor Bekanntgabe seiner Ergebnisse über keinerlei Zusatzinformation. Die Patientendaten einschließlich der Verläufe über median 61 Monate wurden danach ergänzt und mit der jeweils ermittelten S-Klassifikation korreliert.

Wie schon bei der ursprünglichen, am Augsburger Patientenmaterial vorgenommenen S-Klassifikation [18, 20] erwies sich auch die vereinfachte S-Klassifikation als führender Vorhersageparameter für das Risiko noch nachgeschalteter Metastasen in der jeweiligen Lymphknotenstation. Das sehr geringe Risiko bei S1-klassifizierten SLKs (0 von 22 Patienten dieser Studie) veranlasste uns zur Initiierung einer prospektiv randomisierten Multizenterstudie, in der überprüft werden soll, ob bei SLKs mit S1-Melanombefall ohne Nachteil für die betroffenen Patienten auf die bisherige Praxis der radikalen Komplettierungslymphadenektomie verzichtet werden kann. Ganz anders verhält es sich bei SIII-klassifizierten Patienten, bei denen in über 50% nach Komplettierungslymphadenektomie im Dissektat weitere Non-Sentinel-

Lymphknotenmetastasen gefunden werden. Letztere ist somit außer bei zwingenden Kontraindikationen oder bei strikter Ablehnung von Seiten des Patienten absolut und dringend indiziert, wenn in mindestens einem SLK eine SIII-Metastase diagnostiziert wurde.

Auch für das Gesamtüberleben erwies sich in Multivarianzanalysen die modifizierte S-Klassifikation als hochsignifikanter unabhängiger Prognosefaktor, ebenso wie die Breslow-bezogene T-Klassifikation der Primärmelanome. Die gleichgewichtete additive Kombination aus S- und T-Klassifikation erlaubte unter den Patienten mit melanompositiven SLKs die Differenzierung zwischen einer Niedrigrisikogruppe mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von etwa 90% und einer Hochrisikogruppe mit einer entsprechenden Rate von nur etwa 40%. Dies wird bei der Stratifizierung und Selektion von Melanompatienten in laufenden und zukünftigen adjuvanten Therapiestudien berücksichtigt werden müssen.

Tyrosinase-RT-PCR als Ergänzung zur histologisch/immunhistochemischen Diagnostik

Wie bereits eingangs erwähnt, ist der Nachweis von Tyrosinase-mRNA durch RT-PCR per se kein Beweis für das Vorkommen von Melanomzellen im SLK, sondern kann insbesondere auch durch nodale Nävuszellen bedingt sein [4,17,22]. Die Tyrosinase-RT-PCR z. B. aus einem halben SLK ohne engen Abgleich zu mikromorphologischen Untersuchungen ist somit im Individualfall nicht diagnostisch verwertbar und beeinträchtigt zudem die Sensitivität der histologisch/immunhistochemischen SLK-Auswertung durch irreversiblen Gewebsverbrauch. Von uns wurde deshalb eine Methode entwickelt, um RNA aus Paraffinschnitten zu extrahieren und durch nested RT-PCR auf die Präsenz von Tyrosinase-mRNA hin zu analysieren [22]. Solcherart gewonnene molekularbiologische Ergebnisse lassen sich mit den histologisch/immunhistochemischen Befunden aus angrenzenden Paraffinschnitten direkt korrelieren. Speziell erlaubt die Detektion von Tyrosinase mRNA einen Hinweis auf potenziell falsch negative histologische Diagnosen bezüglich Melanom- wie auch Nävuszellen. Es wäre dann ggf. eine diagnostische Korrektur durch eine nochmalige akribische mikroskopische Befundung der bereits untersuchten oder auch neu angefertigter Schnitte möglich. Die oben beschriebene Mikromorphometrie und die S-Klassifikation werden durch ein solches Procedere in keiner Weise behindert.

Nach unserer Auffassung bilden in der hier skizzierten Weise die Tyrosinase-RT-PCR und vermutlich auch der selektive Nachweis weiterer RNA-Zielmoleküle durchaus eine diagnostisch wertvolle Ergänzung zur Histologie und Immunhistochemie, deren Primat für die definitive Identifikation von Melanomzellen im SLK und damit auch für die S-Klassifikation jedoch nicht infrage gestellt werden sollte.

Literatur

- Bieligk SC, Ghossein R, Bhattacharya S, Coit DG. Detection of tyrosinase mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in melanoma sentinel nodes. *Ann Surg Oncol* 1999; 6: 232–240
- Blaheta HJ, Ellwanger U, Schitteck B, Sotlar K, MacZey E, Breuninger H, Thelen MH, Bültmann B, Rassner G, Garbe C. Examination of regional lymph nodes by sentinel node biopsy and molecular analysis provides new staging facilities in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 637–642
- Bostick PJ, Morton DL, Turner RR, Huynh KT, Wang HJ, Elashoff R, Essner R, Hoon DS. Prognostic significance of occult metastases detected by sentinel lymphadenectomy and reverse transcriptase-polymerase chain reaction in early-stage melanoma patients. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3238–3244
- Carson KF, Wen D-R, Li P-X, Lana AM, Bailly C, Morton DL, Cochran AJ. Nodal nevi and cutaneous melanomas. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 834–840
- Cochran AJ, Balda B-R, Starz H, Bachter D, Krag DN, Cruse CW, Pijpers R, Morton DL. The Augsburg Consensus. Techniques of lymphatic mapping, sentinel lymphadenectomy, and completion lymphadenectomy in cutaneous malignancies. *Cancer* 2000; 89: 236–241
- Cochran AJ, Pihl E, Wen D-R, Hoon DS, Korn EL. Zoned immune suppression of lymph nodes draining malignant melanoma: Histologic and immunohistologic studies. *J Natl Cancer Inst* 1987; 78: 399–405
- Cochran AJ, Starz H. Pathologic aspects. In: Cody HS III (Ed). *Sentinel Lymph Node Biopsy*. Martin Dunitz Ltd, 2002: 79–90
- Cochran AJ, Wen D-R, Herschman HR. Occult melanoma in lymph nodes detected by antiserum to S-100 protein. *Int J Cancer* 1984; 34: 159–163
- Düker I, Starz H, Bachter D, Balda B-R. Prognostic and therapeutic implications of sentinel lymphadenectomy and S-staging in Merkel cell carcinoma. *Dermatology* 2001; 202: 225–229
- Fetsch PA, Cromier J, Hijazi YM. Immunocytochemical detections of MART-1 in fresh and paraffin embedded malignant melanomas. *J Immunother* 1997; 20: 60–64
- Gown AM, Vogel AM, Hoak D, Gough F, McNutt MA. Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am J Pathol* 1986; 123: 195–203
- Krämer K-U, Starz H, Balda B-R. Primary cutaneous CD30-positive large T-cell lymphoma with secondary lymph node involvement detected by sentinel lymphadenectomy. *Acta Dermato-Venereologica*, im Druck.
- Starz H. Suspected diagnosis: malignant melanoma. In: Starz H. *Immunohistochemistry on Paraffin Sections: Technical Principles and Diagnostic Applications in Routine Pathology*. GIT, 1991: 42–43
- Starz H, Bachter D, Balda B-R, Gerstel C, Büchels H. Qualitative und quantitative Auswertung der Sentinel-Lymphknoten bei malignen Hauttumoren. *Nuklearmedizin* 1999; 22: 253–260
- Starz H, Balda B-R. Sentinel lymphadenectomy and micromorphometric S-staging, a successful new strategy in the management of cutaneous malignancies. *G Ital Dermatol Venereol* 2000; 135: 161–169
- Starz H, Balda B-R, Bachter D, Büchels H, Vogt H. Secondary lymph node involvement from primary cutaneous large B-cell lymphoma of the leg. Sentinel lymph node resection as a new strategy for staging circumscribed cutaneous lymphomas. *Cancer* 1999; 85: 199–207
- Starz H, Balda B-R, Büchels H. Sentinel-Lymphadenektomie bei malignen Melanomen. Eine vorläufige Bilanz aus histomorphologischer Sicht. In: Garbe C, Rassner G (Hrsg). *Dermatologie. Leitlinien und Qualitätssicherung für Diagnostik und Therapie*. Springer, 1998: 274–277
- Starz H, Balda B-R, Krämer K-U, Büchels H, Wang H-J. A micromorphometry-based concept for routine classification of sentinel lymph node metastases and its clinical relevance for patients with melanoma. *Cancer* 2001; 91: 2110–2121
- Starz H, Balda B-R, Wen D-R, Cochran AJ. Il microstaging dei melanomi secondo Breslow applicabile anche ai linfonodi sentinella. *G Ital Dermatol Venereol* 2002; 137: 70
- Starz H, de Donno A, Balda B-R. The Augsburg experience: histological aspects and patient outcomes. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 48–51
- Starz H, Flaig MJ, Sander CA. Histopathologie des Sentinel-Lymphknotens. In: Volkenandt M, Plewig G (Hrsg). *Maligne Melanome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Zuckschwerdt, 2000: 32–35
- Starz H, Haas CJ, Schulz G-M, Balda B-R. Sensitive and specific detection of melanoma and nevus cells in paraffin sections of sentinel lymph nodes by tyrosinase RT-PCR in correlation with histology. Zur Veröffentlichung eingereicht.
- Wang X, Heller R, VanVoorhis N, Cruse CW, Glass F, Fenske N, Berman C, Leo-Messina J, Rappaport D, Wells K et al. Detection of submicroscopic lymph node metastases with polymerase chain reaction in patients with malignant melanoma. *Ann Surg* 1994; 220: 768–774
- Wilkinson EJ, Hause L. Probability in lymph node sectioning. *Cancer* 1974; 33: 1269–1274