

Neue Strategien und Konzepte in Diagnostik und Nachsorge des malignen Melanoms

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach
Dermatologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt Universität Berlin

von

Frau Dr. Christiane Voit

Geboren am 29.12.1963 in Würzburg

Präsident: Prof. Dr. rer. Nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Frau Prof. Eva-Bettina Bröcker, Würzburg

2. Herr Prof. Helmut Kerl, Graz

Eingereicht am: 23. Oktober 2002

Öffentlich wissenschaftlicher Vortrag: 26. Juni 2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1. Epidemiologie des malignen Melanoms
- 1.2. Metastasierung und Prognose des malignen Melanoms:
 - 1.2.1. Lokalrezidive
 - 1.2.2. Lymphknotenmetastasen
- 1.3. Nachsorgemodelle

2. Ziele der Arbeit

3. Ultraschalldiagnostik in der Melanomnachsorge

- 3.1. Technische Aspekte
- 3.2. Anwendung der Ultraschalldiagnostik in der Melanomnachsorge
- 3.3. Verlauf einer Ultraschalluntersuchung am Melanompatienten
- 3.4. Muster der Ultraschallbilder
 - 3.4.1. Ultraschalldiagnostik der Haut
 - 3.4.2. Ruhender Lymphknoten
 - 3.4.3. Aktivierter Lymphknoten
 - 3.4.4. Metastatisch befallener Lymphknoten
 - 3.4.5. Ultraschalldiagnostik subkutaner Veränderungen
- 3.5. Ultraschalldiagnostik verbessert rezidivfreies und Gesamtüberleben bei Melanompatienten

4. Feinnadelaspirationszytologie (FNAC)

- 4.1. Ultraschallgesteuerte FNAC verbessert die Genauigkeit der Feinnadelpunktion und erlaubt die Punktion sehr kleiner Ziele
- 4.2. Tyrosinase RT-PCR und Expansion von Zellen aus dem Aspirat
- 4.3. Ultraschallgesteuerte Feinnadelpunktion in der Diagnostik des Sentinel Node

5. Drahtmarkierung zur sonographischen Markierung von tiefen Melanommetastasen

6. Tumormarker in der Melanomnachsorge

- 6.1. Tyrosinase als Tumormarker
- 6.2. Ein negatives Aspirat aus einer sonographisch auffälligen Läsion kann eine positive Tyrosinase-PCR liefern

6.3. Tyrosinase FNA-PCR – eine minimal invasive molekularbiologische Diagnostik

6.4. Tyrosinase RT-PCR aus dem peripheren Blut als Metastasierungsmarker

6.5. Serielle Tyrosinase Bestimmungen aus dem peripheren Blut liefern Aussagen über die Rezidivwahrscheinlichkeit

6.6. MIA-Proteinbestimmung im peripheren Blut als Metastasierungsmarker

7. Diskussion

8. Zusammenfassung

9. Als Bestandteil der Habilitationsschrift eingereichte Publikationen

10. Literatur

Dank

Liste der wissenschaftlichen Arbeiten

Abkürzungen

Eidesstattliche Versicherung

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des malignen Melanoms

Die Inzidenz und Mortalität des malignen Melanoms stieg in der kaukasischen Bevölkerung innerhalb der letzten Jahrzehnte deutlich an (1). So hat sich die Inzidenz des Melanoms in den letzten 50 Jahren verzehnfacht, mit bis zu 30 Fällen von Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (2). Die höchste Inzidenzrate findet man in Queensland/Australien, wo sich die Inzidenz des Melanoms innerhalb von 7 Jahren seit 1987 verdoppelte (1). Unter der Annahme von 15 Melanomen pro 100.000 Einwohner im Jahre 2000 sind in der Bundesrepublik Deutschland 12.000 Neuerkrankungen pro Jahr zu erwarten und mehr als 2.000 Menschen werden innerhalb der nächsten 5 Jahre an den Folgen eines Melanoms versterben.

1.2. Metastasierung und Prognose des malignen Melanoms:

Das maligne Melanom kann sowohl auf lymphogenen Wege (80%) als auch auf hämatogenen Wege (20%) metastasieren. Die überwiegende Anzahl aller Patienten in den westlichen Ländern kommt heute mit einem primären Melanom ohne eine klinisch erkennbare Metastasierung zur Diagnostik. Zur Evaluierung von Prognosefaktoren wurde eine Vielzahl von Studien durchgeführt. Die Prognose des einzelnen Patienten im Stadium I (Tabelle I und II) ist in erster Linie abhängig von der vertikalen Tumordicke nach Breslow (3). Daneben existieren weitere Prognosefaktoren wie Invasionslevel nach Clark (4), Geschlecht, anatomische Lokalisation, histologischer Subtyp. Diese spielen bis auf den Invasionslevel bei dünnen Melanomen ($TD < 1,0$ mm) eine untergeordnete Rolle.

Das American Joint Committee on Cancer (AJCC) veröffentlichte 1977 eine erste Klassifikation unter Berücksichtigung des Mikrostagings nach den grundlegenden

Arbeiten von Clark (1969) und Breslow (1970). In Europa wurde das Melanom nach der TNM-Klassifikation des Melanoms der UICC (Union International Contre le Cancer) klassifiziert.

Tabelle I: Stadieneinteilung des malignen Melanoms der UICC (Union international Contre le Cancer)

Stadium I	pT1($\leq 0,75$ mm) pT2 (0,75-1,5 mm)	N0	M0
Stadium II	PT3 (1,51-4,0 mm)	N0	M0
Stadium III	pT4a ($\geq 4,0$ mm) pT4b=Satelliten Jedes pT	N0 N0 N1(Lkmet<3cm) N2(Lkmet>3cm)	M0 M0 M0
Stadium IV	Jedes pT	Jedes N	M1

pT=Primärtumor

N=regionäre Lymphknoten

M=Fernmetastasen

1994 passte die deutsche Dermatologische Gesellschaft (DDG) die Stadieneinteilung weitgehend der UICC an: als wesentliche Änderung beginnt das Stadium III mit dem Auftreten von Satelliten- bzw. In transit Metastasen (5).

Tabelle II: Stadieneinteilung des malignen Melanoms der DDG

Stadieneinteilung der DDG				10-Jahresüberlebensrate
Stadium IA	PT1≤0,75 mm	N0	M0	97%
Stadium IB	PT2(0,75-1,5)	N0	M0	90%
Stadium IIA	PT3(1,51-4,0)	N0	M0	67%
Stadium IIB	PT4(≥4,0 mm)	N0	M0	43%
Stadium IIIA	pTa (Satelliten) pTb (In transit)	N0	M0	28%
Stadium IIIB	Jedes pT	N1, N2	M0	19%
Stadium IV	Jedes pT	Jedes N	M1	3%

Im Gegensatz zu der in Europa verwendeten TNM-Klassifikation wurde vom American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma ein neues Staging System vorgestellt, das ab Mitte 2002 Gültigkeit hat (6-8). Hier sind die validen Prognosefaktoren des Primärtumors die Tumordicke und eine mögliche Ulzeration des Primärtumors. Weiterhin findet vor allem der Sentinel Node Status in unterschiedlichen Schweregraden (Mikro- versus Makrometastasierung) bzw. die Anzahl der Lymphknotenmetastasen Berücksichtigung.

Tabelle III: Stagingssystem des American Joint Committee on Cancer:

Tabelle IIIA TNM - System

Primärtumor [T]

T1	≤ 1,0mm	a – ohne / b – mit Ulzeration oder Clark Level IV/V
T2	1,01 – 2,0mm	a – ohne / b – mit Ulzeration
T3	2,01 - 4,0mm	a – ohne / b – mit Ulzeration
T4	> 4,0mm	a – ohne / b – mit Ulzeration

Lymphknoten [N]

N1a	Befall eines LK mit Mikrometastasierung	
N1b	Befall eines LK mit Makrometastasierung	
N2a	Befall von 2 – 3 LK mit Mikrometastasierung	
N2b	Befall von 2 – 3 LK mit Makrometastasierung	
N2c	Vorhandensein von In-transit/Satellitenfiliae ohne gleichzeitigen Lk-Befall	
N3	4 oder mehr befallene LK oder In-Transit/Satellitenfiliae mit Lk-Befall oder jeder PT mit Ulceration und Lk-Befall	

- a: Mikrometastasierung:** klinisch okkulte LK-Metastasierung, die bei LK-Staging (z.B. via SLND) mit histologischer Untersuchung entdeckt wird. Kein Kapseldurchbruch.
- b: Makrometastasierung:** klinisch nachweisbare LK-Metastasierung mit Kapsel-durchbruch, evident z.B. nach therapeutischer LK-dissektion

Fernmetastasen [M]

M1	Fernmetastasen in Haut oder Subkutis mit normalen LDH
M2	Lungenfiliae mit normalen LDH
M3	Alle anderen Fernmetastasen oder Fernmetastasen mit erhöhtem LDH

Tabelle III B: AJCC-Klassifikation

Stadium				Kriterien
0	Tis	N0	M0	Tis (in-situ-Melanom)
I A	T1a	N0	M0	$T \leq 1,0$ mm ohne Ulzeration
I B	T1b	N0	M0	$T \leq 1,0$ mm mit Ulzeration oder Clark Level IV/V oder
	T2a	N0	M0	$T 1,01-2,00$ mm ohne Ulzeration
II A	T2b	N0	M0	$T 1,01-2,00$ mm mit Ulzeration oder
	T3a	N0	M0	$T 2,01-4,0$ mm ohne Ulzeration
II B	T3b	N0	M0	$T 2,01-4,0$ mm mit Ulzeration oder
	T4a	N0	M0	$T >4,01$ mm ohne Ulzeration
II C	T4b	N0	M0	$T >4,01$ mm mit Ulzeration
III A	T1-4a	N1a	M0	Jeder T1- T4a und 1 Lk befallen als Mikrometastasierung
III B	T1-4a	N1b	M0	Jeder T1-T4a und 1 LK-befallen als Makrometastasierung oder
	T1-4a	N2a	M0	Jeder T1 – T4a und 2-3 LK befallen als Mikrometastasierung
III C	Jd. T	N2b,N2c	M0	Jeder T und 2-3 LK befallen als Makrometastasierung oder Jeder T und In-transit/Satelitenfiliae oder Jeder T und > 4 Lk-Metastasen oder Jeder T mit Ulceration und Lk-Befall
IV	Jd. T	jd.N	jd.M	Auftreten von Fernmetastasen

1.2.1. Lokalrezidive

„Echte Lokalrezidive“ (Satellitenmetastasen) entstehen aus nicht komplett exzidierten Primärtumoren bei Erstdiagnose. Hier ist die 5 Jahresüberlebensrate beinahe unverändert zum Kollektiv Gesunder mit 98% nach Nachexzision (9).

Sogenannte In transit Metastasen entstehen ab einer Entfernung von 5 cm ab Exzisionsnarbe, haben aber die regionäre Lymphknotenstation noch nicht erreicht. Anders als die gerade erwähnten „echten Lokalrezidive“ („Satellitenmetastasen“) mit guter Prognose, ist die Prognose dieser In transit Metastasen mit 33% ähnlich einer Lymphknotenbeteiligung (10), (11) (12-15). Darüber hinaus ist diese Form der Metastasierung (In transit Metastasen) in ca. 86% von systemischer Metastasierung begleitet (16).

1.2.2. Lymphknotenmetastasen

Die vorhandene oder fehlende Lymphknotenbeteiligung ist einer der zuverlässigsten Parameter zur Prognosevorhersage bei Melanompatienten; so nimmt die 5-Jahresüberlebensrate deutlich ab, wenn ein Befall der regionären Lymphknotenstation nachgewiesen wird (17) (Tabelle IV). Aufgrund des hohen prognostischen Einflusses auf den Verlauf der Melanomerkrankung und der therapeutischen Konsequenz, etwaige Lymphknotenmetastasen komplett entfernen zu können, hat sich die Nachsorgeuntersuchung der Lymphknotenstationen im Abflussgebiet des primären Melanoms in regelmäßigen Intervallen als besonders wichtig erwiesen.

Verschiedene invasive Methoden des „Lymphknotenstaging“ wurden eingeführt, um die oft wenig sensitive alleinige klinische Untersuchung mit Palpation der Lymphknoten zu unterstützen.

Tabelle IV: Überleben von Patienten mit Lymphknotenmetastasen:

Überlebensrate von Patienten mit regionärer Lymphknotenmetastasierung

Autoren	No. Pat.	Überlebensrate (%)	
		5-JÜR	10-JÜR
Balch 1981	185	28	15
Bevilaqua 1990	197	38	33
Calabro 1989	1001	33	28
Callery 1982	150	37	34
Cascinelli 1984	566	33	32
Morton 1991	737	46	41
Gesamt	3836	37	32

Buzell et al., JAAD
34:798-803, 1996

1.2.2.1 Elektive Lymphknotendisektion (ELND)

Vor der jetzt bestimmenden Ära der „Sentinel Node Biopsy“, der Entfernung des ersten drainierenden Lymphknotens im Abflussgebiet eines Melanoms wurde in vielen Zentren bei Erstdiagnose bei allen Melanomen mit einer Tumordicke von mehr als 1 mm, d.h. „elektiv“, sämtliche Lymphknoten des Abstromes entfernt als sogenannte „elektive Lymphknotendisektion“ (ELND) (18;19).

Die Rezidivwahrscheinlichkeit, nach der sich auch die Intensität einer Patientennachsorge richtet, ist von mehreren Faktoren abhängig: Bei Erstdiagnosestellung zeigen Patienten, deren Melanom eine Tumordicke unter 1 mm aufweisen, niedrige Raten einer Lymphknotenbeteiligung (2-3%), wohingegen

Patienten mit Tumordicken des Melanoms von 4 mm und darüber hohe Metastasierungsraten aufweisen (>70%)(20). Der mögliche Vorteil einer prophylaktischen Lymphknotendisektion wurde für die Melanompatienten mit einem Primärtumor von intermediärer Tumordicke (1-4 mm) gesehen, die eine 3-Jahreswahrscheinlichkeit für regionäre Lymphknotenmetastasen zwischen 25-30% zeigen, aber nur eine 5-Jahreswahrscheinlichkeit für eine Fernmetastasierung von 8-30% (21). Jedoch gab es hinsichtlich der Wertigkeit der ELND immer wieder kontroverse Ergebnisse auf. So spricht eine 10 Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit von 75% für Melanompatienten mit Primärmelanom und fehlender klinischer Lymphknotenbeteiligung und von 25% bei Lymphknotenbeteiligung für eine ELND. Jedoch haben nur 20% der Patienten mit fehlender klinischer Lymphknotenbeteiligung und Primärmelanomen von intermediärer Dicke einen Nachweis von Lymphknotenmetastasen, der über eine ELND gelingt (22). Zusätzlich wurden mehrere große, randomisierte Studien zur Wertigkeit der ELND durchgeführt worden, die es nicht vermochten, einen deutlichen Überlebensvorteil nachzuweisen (18;23;24). So könnten nur einige Subgruppen (Melanompatienten, die 60 Jahre und jünger waren und ein nichtulzeriertes Melanom mit einer intermediären Tumordicke zwischen 1 und 2 mm Tumordicke aufwiesen) (18) von einer elektiven Lymphknotendisektion profitieren, die jedoch von einer beträchtlichen Morbidität wie Lymphödem, rezidivierenden Wundinfektionen etc. begleitet war. (19). Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse der ELND verzichteten die meisten Melanomzentren in Europa auf eine ELND und führten eine konsequente Nachsorge der Melanompatienten ein, um Lymphknotenmetastasen rasch zu entdecken und nur bei diesen Patienten eine radikale Lymphknotendisektion durchzuführen.

Anders als in den Vereinigten Staaten üblich, verbleibt der Melanompatient in Europa von der Primärdiagnose an über operative Maßnahmen, Nachsorge aber auch im Falle einer disseminierten Metastasierung zur Durchführung von Chemoimmunotherapien kontinuierlich in der Betreuung des Dermatologen.

Ab 1990 wurde vor allem in deutschen Melanomzentren begonnen, in einigen Teilen Europas den Ultraschall der Lymphknoten im Abstromgebiet zusätzlich in der Melanomnachsorge einzuführen, um den befallenen Lymphknoten sicherer als mit reiner Palpation zu entdecken. Zur etwa gleichen Zeit begannen Morton et al in den USA die lymphatischen Abflusswege des Melanoms via Lymphknotenzintigraphie und Sentinel Node Dissektion näher zu charakterisieren (25) (26;27).

1.2.2.2 Sentinel Node - diagnostische und biologische Bedeutung

Diese Form des „Lymphknotenstaging“ entstand aus dem Wunsch, klinisch okkulte Metastasen so früh wie möglich zu entdecken, ohne dabei eine komplette Lymphknotendissektion mit deren Nebenwirkungen durchführen zu müssen. Das Konzept wurde zunächst 1980 von Catalona bei Patienten mit Peniscarcinomen vorgestellt, da diese Erkrankung ebenfalls häufig mit einer Metastasierung der inguinalen und iliakalen Lymphknoten einhergeht (28).

Der „Sentinel Node“, auch als „Wächterlymphknoten“ bezeichnet, ist definiert als der erste Lymphknoten im Abstromgebiet, der die efferenten Bahnen drainiert, die ihren Ursprung am Primärtumor haben (29). Zunächst wurde die Sentinel Node Detektion mit reiner intraoperativer Anfärbung mittels Patentblau durchgeführt. Mit dieser Methode betrug die Rate identifizierter Sentinel Nodes zwischen 74% (30) und 82% (29). Seit dieser Zeit wurde die Sentinel Node Technologie ständig verfeinert. So konnte die Entdeckungsrate durch zusätzliche Durchführung einer präoperativen Lymphszintigraphie mit Technetium 99- Albumin verbessert werden. Mit einer Gammasonde misst man die Radioaktivität entlang des lymphatischen Abflusses

intraoperativ . Bei kombinierter Anwendung der beiden Techniken wird eine Detektionsrate des Sentinel Node zwischen 96 und 98% erreicht (31;32) (6){Balch, Buzaid, et al. 2000 91 /id}. Ein sogenanntes „Bypassing“ des Sentinel Node, wird in der Literatur selten beschrieben (33). Eine größere Studie an 765 Sentinel Node Biopsien zeigte, dass nie ein dritter Lymphknoten befallen war, wenn der erste und ein nachfolgender Lymphknoten unauffällig waren (34). Anstelle der aufwendigen histologischen Aufarbeitung einer gesamten Lymphknotenstation, konnte nun das Augenmerk auf die wenigen Sentinel Nodes gerichtet werden, die mit Serienschnitten und immunhistochemischen Färbemethoden speziell aufgearbeitet werden konnten. Aber auch hier wurde die Zahl der tatsächlich befallenen Lymphknoten noch unterschätzt, was die erhöhte Rezidivneigung der Patienten zeigte, bei denen zusätzlich von histologisch negativen Sentinel Nodes mittels Single oder Multi-Marker-RT-PCR positive Ergebnisse gefunden wurden (35-38). Derzeitig hat sich die Sentinel Node Biopsie für Melanompatienten ab einer Tumordicke von > 1 mm als zuverlässigster prognostischer Standard entwickelt (8).

1.2.2.3 Melanom und Fernmetastasierung

Mehrere Autoren haben über ein verlängertes Überleben bei einer signifikanten Anzahl von Stadium IV Melanompatienten nach Resektion der Fernmetastasen berichtet. Bei diesen Patienten im disseminierten Stadium ist die chirurgische Resektabilität ein prognostisch wichtiger Faktor (39;40){(41); so konnte gezeigt werden, dass die operative Entfernung von Rezidiven das mittlere Überleben in einer Gruppe von Stadium IV Patienten zu verbessern vermochte (39-41) und die 5-Jahresüberlebensrate von Melanompatienten mit systemischer Metastasierung stieg nach kompletter Metastasektomie auf 23% (17). In diesen Fällen ist die Chirurgie keinesfalls nur eine palliative Therapie, sondern vielmehr eine Möglichkeit, solche Patienten durch chirurgische Intervention ein Langzeitüberleben zu sichern. Dabei

haben Patienten mit einer solitären Metastasenlokalisation ein verbessertes mittleres Überleben verglichen zu den Patienten mit drei oder mehr Metastasenlokalisationen (42). In multivariater Analyse konnte kürzlich ein verlängertes Überleben von Stadium IV Patienten nach Resektion aller klinisch evidenter Tumormassen gezeigt werden (43). Ähnlich fand man ein verlängertes Überleben auch bei Melanomen mit Metastasierung im Gastrointestinaltrakt und deren anschließender Resektion (44). Insgesamt beträgt das Langzeitüberleben im Stadium IV <3%, wobei solitäre und viszerale Metastasen eine bessere Prognose zeigen (17).

1.2.2.4 Bisherige therapeutische Möglichkeiten, adjuvante Therapien

Das maligne Melanom hat im Stadium der Fernmetastasierung eine in der Regel infauste Prognose. Zu diesem Zeitpunkt beträgt die mittlere Überlebenszeit weniger als 1 Jahr (20). Trotz zahlreicher Therapiestudien war es sich bislang schwierig, wirksame Therapiestrategien für das metastasierende Melanom zu entwickeln. Die Therapiemaßnahmen sind meist nur palliativ. Dacarbazin ist bislang das einzige zugelassene zytotoxische Agens zur Behandlung des metastasierenden Melanoms. Eine DTIC-Monotherapie induzierte objektive Remissionsrate bis zu 20% . Jedoch konnte ein Überlebensvorteil durch eine DTIC- Therapie bislang nie gezeigt werden (45). Polychemotherapien resultierten in einer Verbesserung der Ansprechrate, aber nicht in einer Verbesserung der Überlebensrate und waren mit einer deutlich höheren Nebenwirkungsrate verbunden (46). Trotz großer Hoffnungen haben im Stadium IV Zytokine, in erster Linie Interferon- α und Interleukin-2, als Mono – oder Kombinationstherapien ebenfalls enttäuscht. Die Zahlen über die unterschiedlichen Ansprechraten bei Gabe von Interferon- α als Monotherapie oder in Kombination schwanken zwischen 10-41%. In Einzelfällen konnten Langzeitremissionen erreicht werden. (47). Ähnliche Ergebnisse erbrachten Studien mit kombinierten Chemo-

/Immuntherapien. Es zeigten sich meist nur sehr gute Ansprechraten bis zu 60%, die allerdings nur in 10 % der Fälle auch eine Langzeitremission ergaben. Aufgrund dieser Situation wurde in Studien der Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) versucht, die Patienten mit den höchsten Rezidivrisiko - Stadium II b und Stadium III (bis 2002 gültiges AJCC Staging System) – einer adjuvanten Therapie mit Interferon- α zuzuführen (48), obwohl bisher alle prospektiven-randomisierten Studien mit unspezifischen Immuntherapien oder adjuvanten Chemotherapien keinen Überlebensvorteil zeigten. In dieser von Kirkwood geleiteten Studie mit hochdosierter Gabe von Interferon- α (ECOG-1684) konnte weltweit erstmals eine signifikante verbesserte 5-Jahres-Überlebensrate mit 46% der Interferongruppe versus 37% der Kontrollgruppe erreicht werden. Dies führte zur Zulassung von Intron®A (Interferon- α -2a) zur adjuvanten Hochdosistherapie. In der Nachfolgestudie (ECOG 1690) ergab sich dann aber wiederum nur einer verbesserte Rate des rezidivfreien Überlebens, nicht aber der 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate(49;50) (51).

1.3. Nachsorgemodelle

Nachsorgemaßnahmen wurden u.a. aufgrund der Erkrankungszunahme, zur Erkennung von Risikogruppen, aber auch von Zweitmelanomen, insbesondere aber zur Früherkennung von Metastasen und zum rechtzeitigen Einsatz von Diagnostik und Therapie entwickelt. Innerhalb Deutschlands hat man mit den Richtlinien der DDG (52) verschiedenen Besonderheiten des Melanoms Rechnung getragen; z.B. eine lange Nachbeobachtungsdauer aufgrund der möglichen Spätrezidive (53) oder eine engmaschigere Kontrolle in den ersten 3 Jahren aufgrund der hier auftretenden größeren Rezidivhäufigkeit.

Tabelle V: Richtlinien der Melanomnachsorge der DDG:

	Klinische Untersuchung	Lymphknoten- sonographie	Thorax Röntgen	Abdomen Sonograph.
Melanoma in situ	1x/pro Jahr	1x/pro Jahr	1x/pro Jahr	1x/pro Jahr
Std.I+IIA (DDG)	3.-5. Jahr: alle 3 Monate; dann alle 6 Monate	1x /pro Jahr	1x/ proJahr	1x/ pro Jahr
Stadium II B + IIIA/ B (DDG)	3.-5. Jahr: alle 3 Monate; dann alle 6 Monate	Alle 6 Monate, ab 5. Jahr: 1x /Jahr		
Fernmetastasierung	Individuelle Intervalle			

Wie engmaschig die Nachsorge in frühen Stadien des Melanoms stattfinden soll, wird nach wie vor kontrovers diskutiert (54;55). Schon recht bald erkannten Studien die relative Nutzlosigkeit von teuren Laboruntersuchungen und speziellen Untersuchungen wie Skelettszintigraphie (56). So zeigte eine französische Kosten-Nutzen Analyse an 912 Stadium I Melanompatienten, dass Untersuchungen wie die Abdomensonographie und RöntgenThorax nur etwa 10% der Rezidive aufzudecken vermochten, so dass nur die klinische Untersuchung eine günstige Kosten-Nutzen Relation aufwies. Hier fand die Lymphknoten-sonographie allerdings noch keine Berücksichtigung (55). Nicht zu unterschätzen ist auch die Rolle der Eigenuntersuchung (55;57;58). Allerdings empfinden die Patienten eine Nachsorge in der Klinik als notwendig, vor allem wegen ihrer erzieherischen Wirkung hinsichtlich der Selbstuntersuchung (57). Eine weitere Studie erachtet die Nachsorge bei dünnen

Melanomen (< 0,75 mm) aufgrund des seltenen Vorkommens von Rezidiven für sinnlos (59). In neueren Studien werden insbesondere die klinische Untersuchung und die Lymphknotenultraschalluntersuchung als zuverlässige und kosteneffiziente Methoden empfohlen (60;61). Bei Hochrisikomelanompatienten, die in einem engmaschigen Nachsorgeprogramm integriert sind, kommen unterschiedliche apparative Techniken wie MRT, CT oder PET zur Anwendung. So sind die drei erstgenannten Varianten möglicherweise zu zeit- und kostenintensiv für die Routinenachsorge. Diese Methoden sind zweifelsohne sehr nützlich für die gezielte Tumorsuche (59) im Falle von ausgedehntem Staging bei bereits nachgewiesenen Metastasen vor Therapiebeginn. Zudem berichten Studien auch von einem Überlebensvorteil für die Patienten, bei denen asymptomatische Metastasen im Rahmen der Nachsorge entdeckt wurden, im Vergleich zu den Patienten, bei denen man die Metastasensuche erst infolge von symptomatischen Metastasen startete (62). Allerdings lieferte bereits ein Vergleich zwischen PET und Ultraschall - bei analogen Sensitivitäten und Spezifitäten zur Detektion von Lymphknotenmetastasen - deutliche Vorteile des Ultraschalls hinsichtlich Kosten- und Zeiteffizienz (63). Durch die alleinige klinische Untersuchung werden nur palpable Metastasen evident, die zu diesem Zeitpunkt möglicherweise bereits groß oder zahlreich sind. Folge ist eine höhere Inzidenz von Lokalrezidiven (64) mit schlechterer Prognose (60), da sich die Prognose mit der Anzahl der metastatisch befallenen Lymphknoten verschlechtert (17;65). In letzter Zeit hat die Anwendung des Ultraschalls zur Diagnostik von Lymphknotenmetastasen und nicht tastbaren in- Transitmetastasen mehr und mehr Eingang in die Routinenachsorge gefunden. So konnten verschiedene Studien die Überlegenheit dieser Methode gegenüber der alleinigen klinischen Untersuchung aufzeigen (66-71). Trotz dieser Datenlage fand der Ultraschall-B-Scan in Deutschland nur zögerlich Eingang in Nachsorgeregimes und wird vor allem in den

USA nicht eingesetzt. Selten wird er präoperativ zur Planung von chirurgischen Interventionen angewendet.

2. Ziele der Arbeit

Mit dem Ziel, die Prognose von Melanompatienten zu verbessern, wurden diverse Nachsorgemethoden entwickelt, um Melanomrezidive so früh wie möglich zu entdecken. Aufgrund des Bestrebens weniger invasive Diagnostik anzuwenden und dem Patienten keine zusätzliche Morbidität aufzubürden, werden hier Methoden vorgestellt, die den Patienten bei höchstmöglicher Sensitivität und ausgezeichneter Spezifität kaum oder gar nicht belasten. Ansatzpunkt ist die Charakterisierung von Veränderungen, die beim metastatischen Befall von Lymphknoten durch ein Melanom auftreten. Im Einzelnen wurden folgende Projekte bearbeitet:

1. Etablierung einer Ultraschalldiagnostik, die in Kombination mit einer besonderen Form der Freihandfeinnadelpunktion (FNAC) zu einer sicheren Diagnostik von Melanomrezidiven führen kann.
2. Ergänzend zur herkömmlichen Zytologie molekulare Charakterisierung des Feinnadelmaterials mittels Tyrosinase-RT-PCR als sogenannte FNA-PCR.
3. Prospektive Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität der alleinigen Ultraschalluntersuchung an einem großen Melanompatientenkollektiv im Vergleich zur klinischen Untersuchung.
4. Erhöhung der operativen Präzision bei kompliziert lokalisierten Metastasen durch sonographisch gesteuerte Drahtmarkierung.
5. Sonographische Charakterisierung des Sentinel Node und deren Kombination mit Feinnadelpunktion und molekularen Untersuchungen (FNA-PCR; Tyrosinase PCR aus dem peripheren Blut) in vivo. Korrelation dieser

Daten mit den in vitro gewonnenen Ergebnissen nach Sentinel Node Exzision. Hämatogen metastasierende Tumorzellen sind durch molekularbiologische Methoden (PCR) nachweisbar. Ist dies der Fall so bezeichnet man dies als „minimal residual disease“. Die Komplexität dieses Befundes ist noch weitgehend ungeklärt und ist nach wie vor Thema vieler Studien. Es werden unterschiedliche Methoden zum Nachweis von Tumorzellen vorgestellt und mit den klinischen Daten korreliert.

Folgende Projekte wurden bearbeitet:

6. Untersuchungen zum Nachweis von Tyrosinase-RT-PCR im peripheren Blut
7. Bedeutung prospektiver serieller Tyrosinaseabnahmen aus dem peripheren Blut für die Prognose des Patienten
8. Klinische Wertigkeit des Melanom assoziierten Proteins MIA aus dem peripheren Blut.

3. Ultraschalldiagnostik in der Melanomnachsorge

3.1. Technische Aspekte

Das physikalische Phänomen der Transmission von Ultraschall durch Gewebe unterscheidet sich nicht substantiell, ob man niedrigere oder höhere Frequenzen (7,5 – 20 MHz) anwendet, wie sie für die Untersuchung von Haut, In transit Strecken und Lymphknotenstationen angemessen sind. Technische Einstellungen der Ultraschallgeräte und bekannte Schallphänomene und – artefakte sind bekannt (72;73). Die Untersuchung von intra- und subcutanen Läsionen wird mit Geräten durchgeführt, die im B-Bild Modus (brightness mode) arbeiten. Je nach Ausstattung verfügen die Ultraschallgeräte über Linear- oder curved array Schallköpfe, die mit einer Sequenz von 30 Bildern pro Sekunde (real time), die entsprechenden Regionen abscannen und dabei gleichzeitig akustische Wellen senden und empfangen, die anschließend verarbeitet werden. In sehr oberflächlich gelegenen Regionen oder solchen mit anatomisch bedingter inhomogener Oberfläche verwenden wir zusätzlich Gelkissen aus akustisch inertem Material, die die Region besser fokussieren, ohne die Schallwellen beim Passieren des Gels abzuschwächen (Impedanzsprung beim Passieren unterschiedlicher Medien). Die Verstärkung des Ultraschallsignals erfolgt aufgrund der zunehmenden Abschwächung der Intensität beim Passieren biologischer Medien mit Hilfe einer „time gain compensation“ (Tiefenausgleich), wobei Echos aus tieferen Strukturen mit geringerer Intensität höher verstärkt werden. Ein B-Bild in Grauwertstufen kann mit einer Dopplerfunktion kombiniert werden, die Bewegung z.B. von Erythrozyten über eine Frequenzänderung erfasst. Hierbei wird eine elektronische Farbkodierung der Frequenzverschiebung durch den Dopplereffekt erreicht und Blutströme, die sich auf den Schallkopf zu bewegen rot, die sich vom Schallkopf entfernen, blau kodiert. Weiterhin können

Flussgeschwindigkeiten oder berechnete Werte zur Charakterisierung von Gefäßeigenschaften wie Resistance – oder Pulsatilitätsindizes gemessen werden. Besonders geeignet zur Charakterisierung des Flusses innerhalb des Lymphknotens oder intratumoral ist der Powermode als Richtungs- und Geschwindigkeits - unabhängige Farbdopplerspezifizierung.

Die **Bildentstehung** beruht auf Grenzflächenphänomenen, die beim Durchgang von Schallwellen durch unterschiedliche Medien in Form von Streuung, Reflexion oder Absorption in unterschiedlichem Ausmaß geschehen. So werden beim Durchlaufen von homogenen Medien aufgrund der fehlenden Binnenstrukturen kaum Wellen reflektiert und es entstehen echoarme Zonen. Beim Auftreffen auf das nächste anders geartete Medium (akustische Grenzfläche) , erfolgt durch Impedanzsprung eine vermehrte Reflexion, die als Echoreichtum imponiert. Durch Zusammenschau von echten Bildinformationen und **Artefakten** (dorsale Schallverstärkung, Zystenrandschatten, Wiederholungsechos, Schallschattenartefakt etc.), die oft auch in Kenntnis derselben wegweisend sein können, entsteht eine Charakterisierung der interessierenden Struktur in vivo, die auch mit dynamischen Untersuchung kombiniert werden kann (73).

3.2. Anwendung der Ultraschalldiagnostik in der Melanomnachsorge

Im Jahr 1992 publizierte Vasallo Ultraschallparameter, um mit ihrer Hilfe benigne von malignen Lymphknotenvergrößerungen mithilfe der hochauflösenden Sonographie zu differenzieren (74). Im gleichen Jahr wurde die erste retrospektive Studie zur Anwendung von Ultraschall in der Melanomnachsorge von Prayer et al aus Wien veröffentlicht (66) . Sie untersuchten 217 Melanompatienten mittels 7,5 MHz Ultraschall und verglichen die Untersuchungsergebnisse des Ultraschalls mit den Ergebnissen der rein klinischen Untersuchung. Der Ultraschall erreichte eine

Sensitivität von 100% verglichen mit den 52%, die die alleinige klinische Untersuchung zu erreichen vermochte mit jeweils hohen Werten für die Spezifität (97% vs. 91%). Eine weitere retrospektive Studie von Rossi et al aus Padua zur Melanomnachsorge mit Ultraschall an 85 Melanopatienten wurde 1997 veröffentlicht. Die Autoren berichten über eine Sensitivität der Ultraschalluntersuchung von 92% (Spezifität 100%) im Vergleich zu einer deutlich geringeren Sensitivität der klinischen Untersuchung von nur 23% (Spezifität 85%)(69).

Eine erste, zahlenmäßig nur sehr kleine, prospektive Studie an 33 Melanopatienten von Nazarian et al. aus Philadelphia/USA untersuchte, inwieweit die durch Ultraschalldiagnostik zusätzlich gewonnenen Informationen die Metastasenentdeckung, die nähere Charakterisierung der Befunde, die Führung von Punktionen und die sich anschließende Therapie zu verändern imstande waren (68). Die Studie lässt allerdings eine Nachbeobachtung oder Berechnungen zu Sensitivitäten und Spezifitäten auch aufgrund des geringen Beobachtungsumfanges vermissen. Etwas später machte die gleiche Gruppe weiterführende Untersuchungen zur Charakterisierung der intratumoralen Gefäßperfusion in oberflächlichen Melanommetastasen mittels der farbkodierten Dulexsonographie (75). Zusätzlich lieferten sie eine Beschreibung der sonographischen Besonderheiten von superfiziellen Melanommetastasen im B-Bildmodus und in der Farbdopplersonographie (76). Im Jahr 1997 veröffentlichte die bereits erwähnte Forschergruppe aus Wien eine retrospektive Studie an 264 Melanopatienten mittels 7,5 MHz Untersuchungen in 3-monatigen Nachsorgeintervallen und berichteten dieses Mal über eine beeindruckende Sensitivität für die klinische Untersuchung von 82% (67). Wenn man jedoch bedenkt, dass die klinische Untersuchung zwar 41/50 Rezidiven erkannte, gleichzeitig aber auch bei 271/2206 Untersuchungen

fälschlicherweise eine Metastase vermutete, wird offenkundig, dass eine hohe Sensitivität nur durch in Kaufnehmen einer relativ niedrigen Spezifität von 88% erreicht werden konnte, wohingegen der Ultraschall eine Spezifität von 99% aufwies. Die Studie berichtet weder über Rezidivgrößen noch über statistische Berechnungen zum rezidivfreien - oder Gesamtüberleben.

3.3. Verlauf einer Ultraschalluntersuchung am Melanompatienten

Patienten mit einem histologisch gesicherten Melanom finden sich zu Nachsorgeuntersuchungen in regelmäßigen Abständen in unserer dermatologischen Abteilung ein. Die Intervalle variieren zwischen 3,6 und 12 Monaten in Abhängigkeit von der Tumordicke des Primärtumors. Begleitend zur klinischen Untersuchung wird eine Ultraschalluntersuchung der abhängigen, bilateralen Lymphknotenstationen mit unabhängigen Untersuchern durchgeführt. Die Lymphknotenstationen und In transit Strecken werden sowohl vor als auch nach der Entfernung des Primärtumors sowie im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen als jeweils ambulante Untersuchung mit 7,5-14 MHz Scannern im B-Bild Modus und zusätzlich mit farbkodierter Duplexsonographie durchgeführt (77). Falls die Kombination von klinischer Untersuchung und Ultraschall oder bereits der Ultraschall alleine einen verdächtigen Befund liefern, führen wir eine zusätzliche ultraschallgesteuerte Feinnadelaspirationszytologie (FNAC) durch. Zusätzlich gibt der Ultraschall wertvolle Informationen über Lokalisation, benachbarte anatomische Strukturen, exakte Größenausmaße der Raumforderung in drei Ebenen und den Abstand von der Hautoberfläche. Im Falle einer Erstvorstellung mit noch nicht exzidiertem Primärtumor oder klinische eventuell nicht primär als Melanom einzustufendem Tumor kann der Ultraschall zusätzliche Information über Morphologie, Vaskularisation, Gefässanbindung und zu erwartende Tumordicke geben. Ebenso

zeigt sich oft bereits sonographisch der Verdacht auf einen befallenen Sentinel node
(Abb.1)



Abb. 1: Sonographischer Verdacht auf befallenen Sentinel Node; zytologisch und histologisch bestätigt

Die folgenden Kriterien werden auf die Lymphknotenultraschalluntersuchung in der Nachsorgesituation angewendet: Ovale Raumforderungen mit zentralen Binnenechos werden als reaktiv vergrößerte Lymphknoten eingestuft und werden in ihrer aktivierten Form (verbreiteter Parenchymsaum etc.) im Abstand von 4 Wochen sonographisch nachkontrolliert. Größe und Morphologie der abgebildeten Strukturen werden dokumentiert. Bei Größenregredienz oder -konstanz im Verlauf der Kontrollen ohne weitere klinische oder radiologische Hinweise auf Rezidive wird von einer benignen Läsion ausgegangen; andernfalls umgehend eine FNAC zum Ausschluss eines Melanomrezidivs durchgeführt. Alle echoarmen, ballonierten

Strukturen werden als hinweisend auf metastatische Veränderungen angesehen und eine ultraschallgesteuerte FNAC erfolgt (**Abb. 2**).



Abb. 2: Ultraschallgesteuerte Feinnadelaspirationszytologie (FNAC) mit sog. Binder Ventil

3.4. Muster der Ultraschallbilder

3.4.1. Ultraschalldiagnostik der Haut

Die Kenntnis der **Sonoanatomie der Haut** ist wichtig für die Interpretation der erhaltenen Bilder. Die nicht pathologisch veränderte Haut zeigt einen dreischichtigen Aufbau mit lokalisationsabhängigen Variationen der Hautdicke (78).

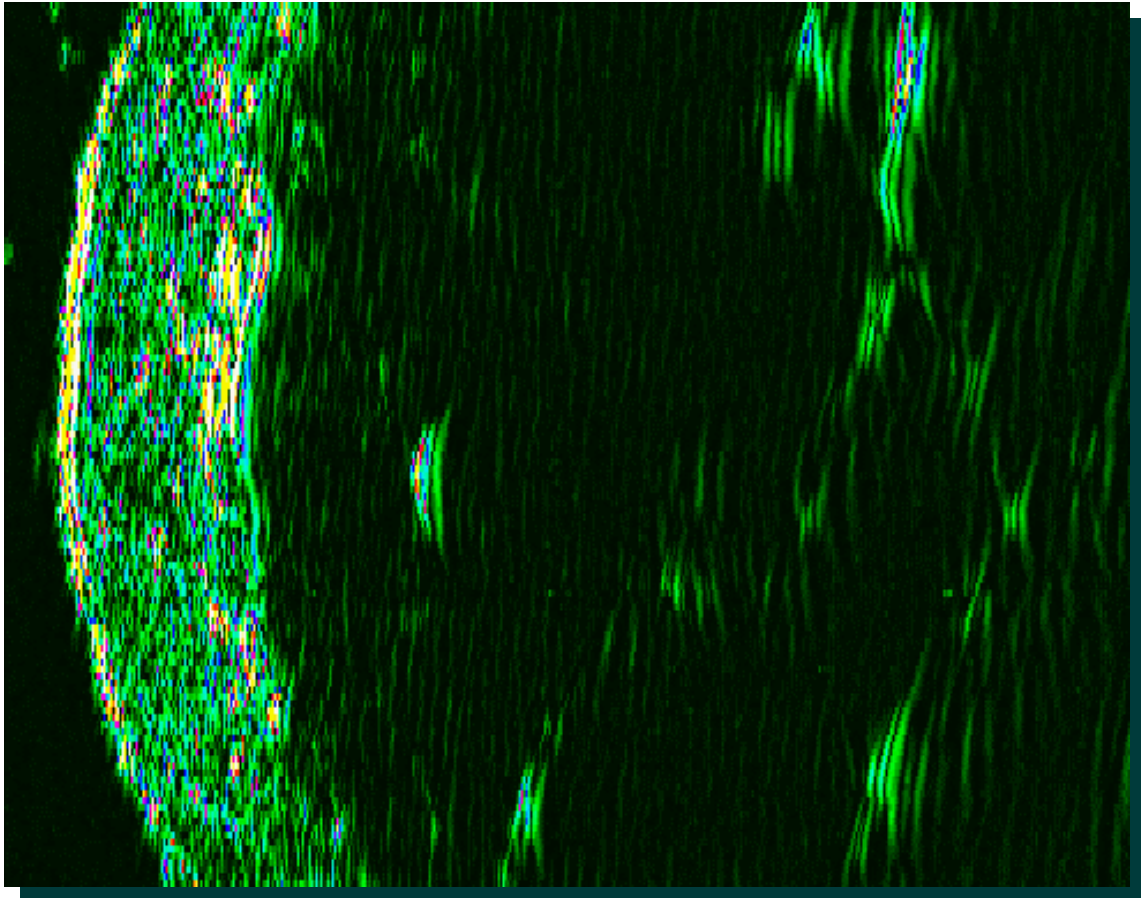


Abb. 3 a: 20 MHz-Sonographie
Normale Haut, Oberarm ventral

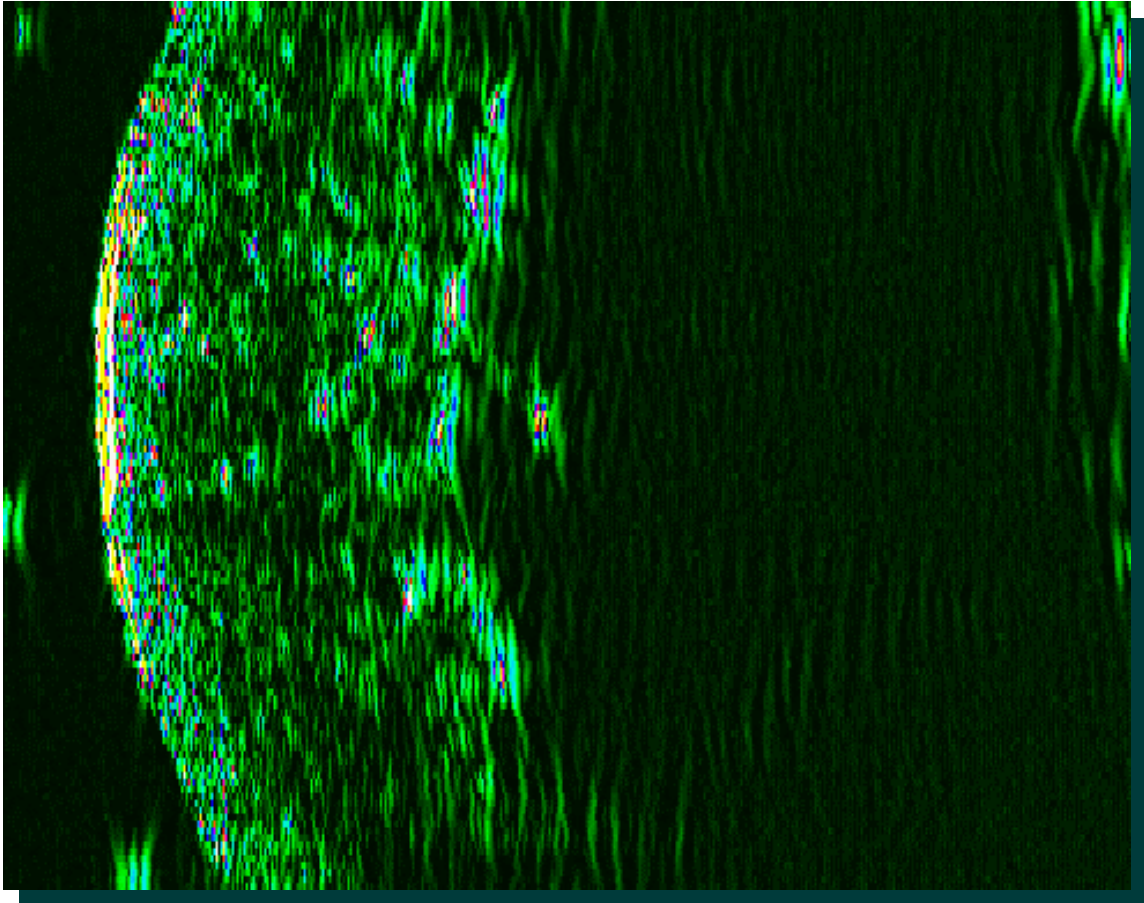


Abb. 3 b 20 MHz-Sonographie
Normale Haut, Oberarm dorsal

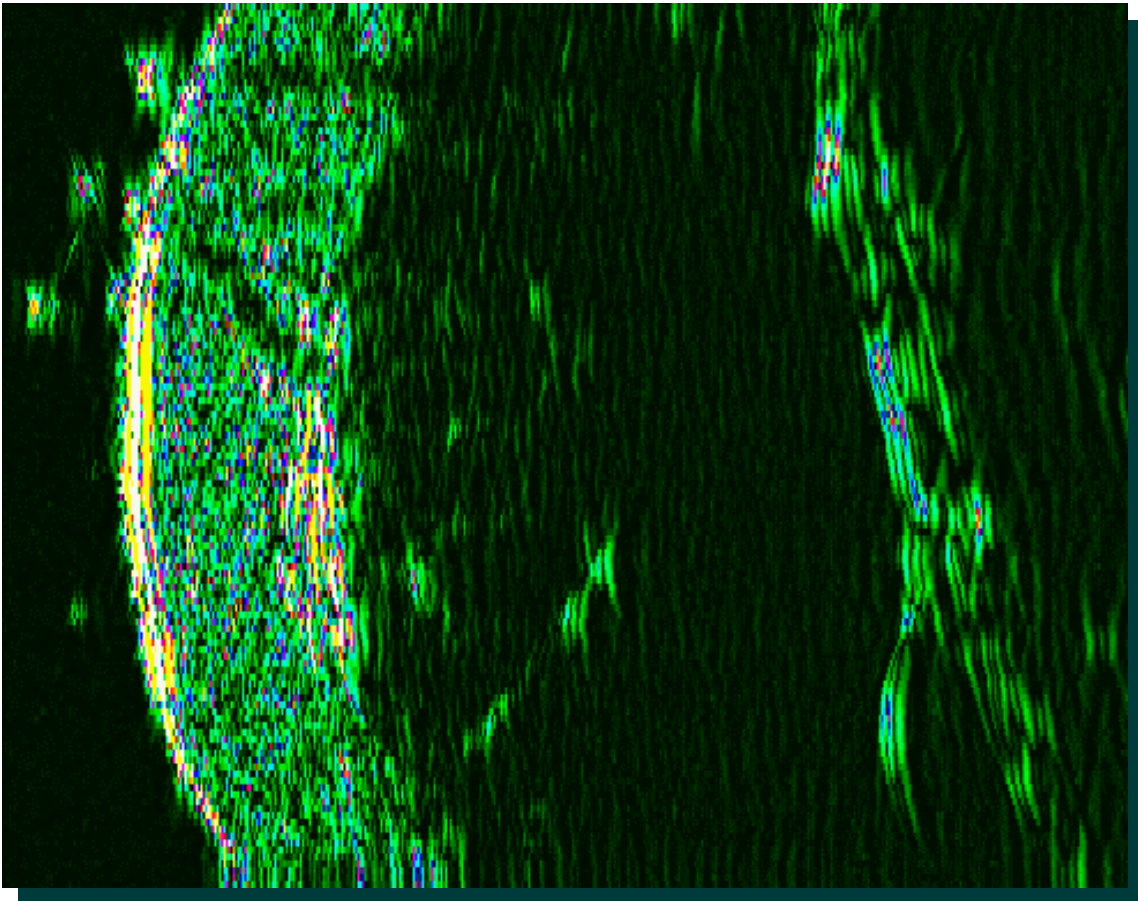


Abb.3 c 20 MHz-Sonographie
Normale Haut, Rücken

Einem reflexreichen Eingangsecho (Impedanzsprung Vorlaufstrecke /Epidermis) folgt ein echoärmerer Saum, der der Cutis entspricht; darauf folgt der Übergang von Cutis zu Subcutis als echoreiches Band. Die Subcutis selbst stellt sich echoarm dar, durchzogen von echoreicheren Strängen, die den bindegewebigen Septen entsprechen (73). Nach caudal folgt das echoreiche Band der Muskelfaszie. Darunter folgt die Muskulatur selbst mit sogenannter gefiederter Struktur und darunter, als echoreichstes Band, die Knochenoberfläche (Impedanzsprung Muskel/Knochen). Die Knochenstruktur selbst ist in der Regel aufgrund der Reflexion des Schalls an der Muskel-Knochen-Knochengrenze und seiner fast vollständigen Absorption im Knochen nicht darstellbar.

3.4.2. Ruhender Lymphknoten

Der **nicht vergrößerte (ruhende) Lymphknoten** lässt sich in der Sonographie aufgrund seines zum umgebenden Fettgewebe echoidentischen Verhaltens in der Regel nicht darstellen. Führen entsprechende Veränderungen, wie z. B. Entzündungen oder malignes Wachstum, zu einer Vergrößerung des LK, entstehen differente Echobilder, die eine Differentialdiagnose ermöglichen. Es handelt sich in der Regel um längsovale Raumforderungen, die einen schmalen echoarmen Randsaum (Lymphknotenkortex) und ein echoreiches Zentrum (Markzone) aufweisen (sog. Kokardenphänomen):



Abb. 4: reaktiver Lymphknoten

Die Abgrenzung zur Umgebung kann unscharf bis scharf sein. Der Quotient aus dem größten Längs- und dem größten Querdurchmesser (Vasallo-Index) misst in der Regel größer als 2 (74;77) Nicht selten lässt sich der Lymphknotenhilus als schmale echoreiche Brücke darstellen. Die genannten Kriterien sind typisch für **regressiv entzündlich veränderte Lymphknoten** und sprechen im Sonogramm gegen Malignität.

3.4.3. Aktivierter Lymphknoten

Der **akut entzündliche Lymphknoten**, z. B. bei akuter Exazerbation einer atopischen Dermatitis, eines Erysipels oder auch bei Patienten unter einer Immuntherapie mit Interferonen, weist im Sonogramm anfangs auch eine längsovale Form auf, die mit zunehmender Vergrößerung des Lymphknotens jedoch in eine Rundform übergehen kann (**Abb. 5**).

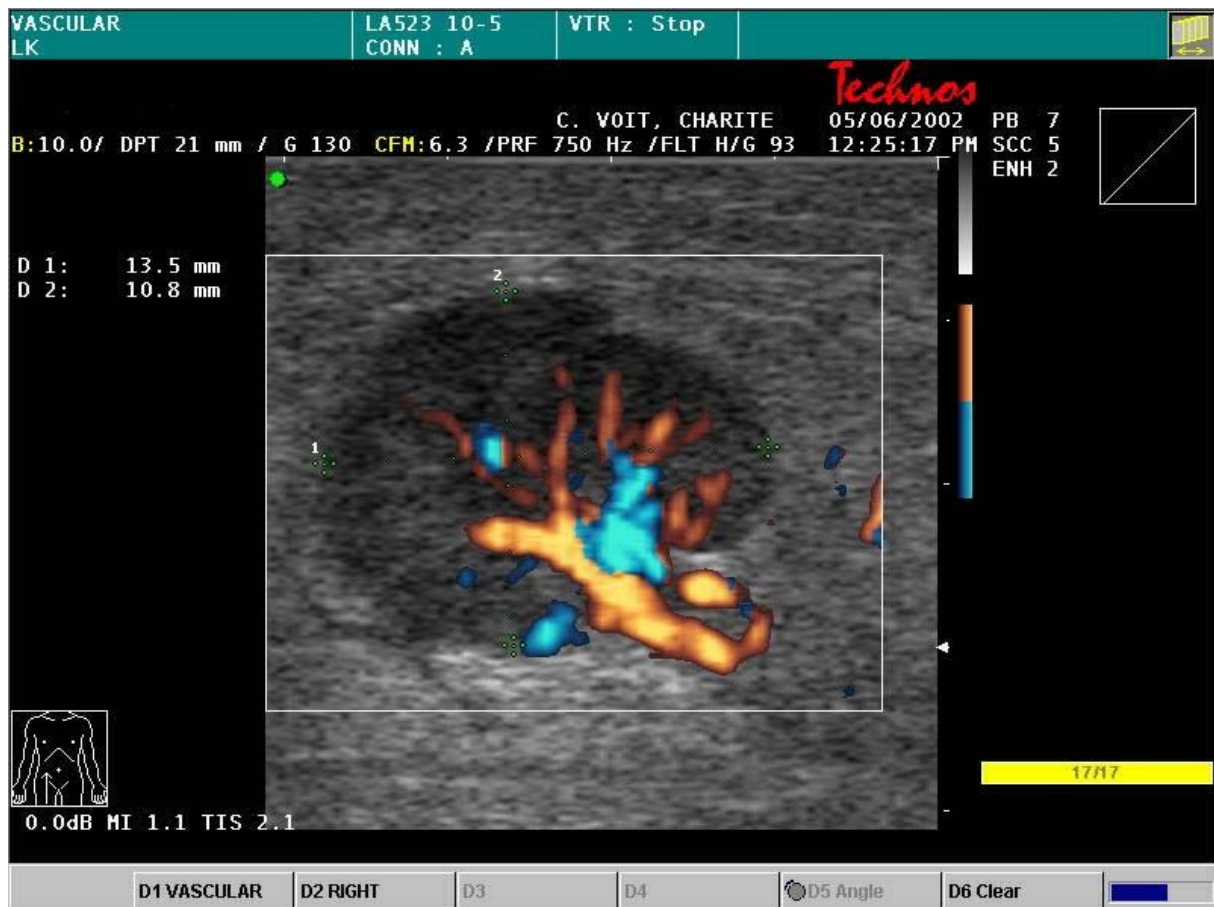


Abb. 5: Aktivierter Lymphknoten nach Sentinel node Dissektion und Sepsis

Im Vergleich zum regressiv veränderten Lymphknoten findet sich als Zeichen der Aktivierung zunächst ein verbreiteter echoarmer Randsaum, mitunter finden sich aber auch fast echoleere Lymphknoten, die dann differentialdiagnostisch Schwierigkeiten bereiten können. Mit Hilfe der farbkodierten Duplexsonographie lassen sich in akut entzündlich veränderten Lymphknoten meist die Hilusgefäße darstellen und gelegentlich auch baumartig verzweigend bis in die Peripherie verfolgen.

3.4.4. Metastatisch befallener Lymphknoten

Lymphknotenmetastasen weisen sonographische Besonderheiten auf, die eine Differenzierung von entzündlich vergrößerten Lymphknoten erlauben (**Abb.6**).



Abb. 6: Lymphknotenmetastase Axilla links, sonographisch vermutet und gesichert durch FNAC

Lymphknotenmetastasen sind fast ausschließlich rund bis rundoval. Der Vasallo-Index ist meist kleiner als 2. Die Abgrenzbarkeit zur Umgebung ist scharf. Die bei den regressiv entzündlichen Lymphknoten zu beobachtende Kokardenstruktur ist meist aufgehoben. Es stellen sich überwiegend echoarme bis echofreie Herde dar, die nicht selten eine dorsale Schallverstärkung auslösen (73). In der farbkodierten Duplexsonographie findet sich meist ein peripheres Perfusionsmuster. Hilusgefäße lassen sich fast nie darstellen (79;80). Schwierigkeiten bereitet die Differenzierung zwischen entzündlich veränderten Lymphknoten und solchen mit einer beginnenden Metastasierung (**Abb.7**).

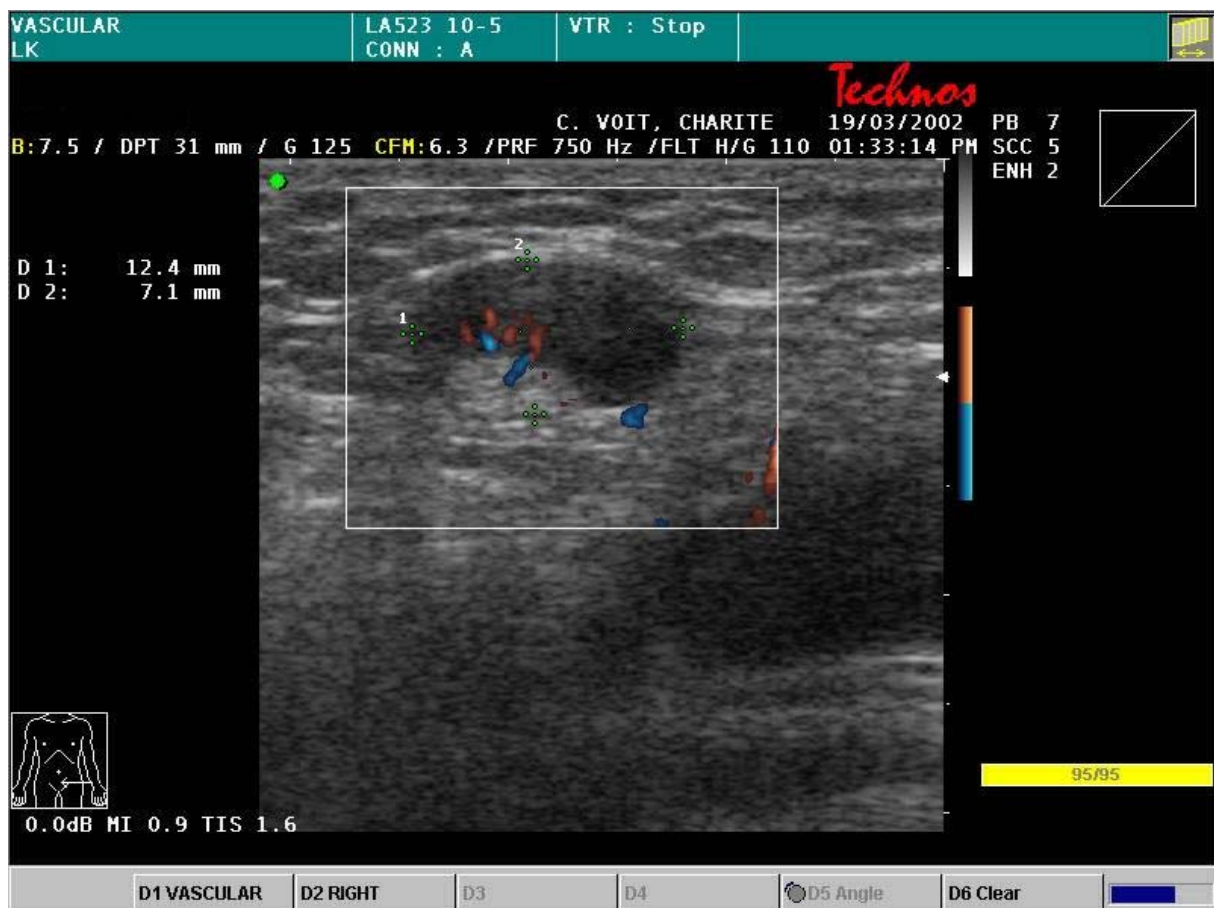


Abb. 7 a: Beginnende Lymphknotenfilia, sonographischer Aspekt des dezentralisierten Binnenechos

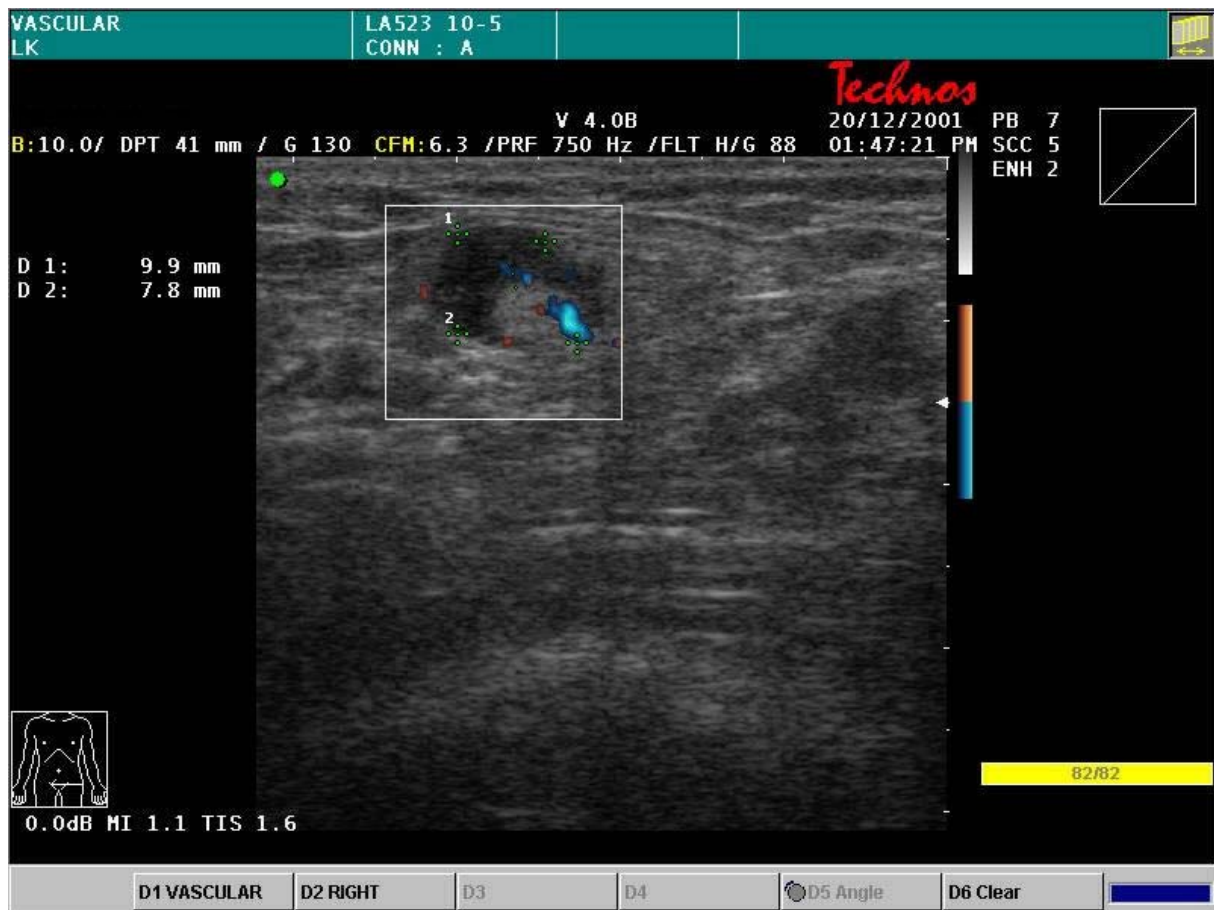


Abb 7 b: Transversalschnitt der FNAC gesicherten beginnenden Lymphknotenfilia

Herde mit einem asymmetrisch verbreitertem Randsaum oder zentral echoarmen Arealen sind metastasenverdächtig. Solche Herde lassen sich ultraschallgestützt sehr gut punktieren und können dann zytologisch oder molekularbiologisch weiter diagnostiziert werden (70;81;82). Die Echoarmut von Lymphknotenmetastasen ist nicht spezifisch für Melanommetastasen. Auch Metastasen von Mammakarzinomen und anderen malignen epidermalen Tumoren (Plattenepithelkarzinome, Merkelzellkarzinome) stellen sich echoarm dar, sind aber oft etwas echoreicher als Melanommetastasen. Eine histologische Diagnose ist sonographisch nicht möglich.

3.4.5. Ultraschall diagnostik subkutaner Veränderungen

Aufgrund ihres sehr heterogenen Echoverhaltens lassen sich subkutane Veränderungen verschiedener Genese in der Regel gut von einander unterscheiden (73;83;84). Wenn auch eine echte Diagnose sich nicht aufgrund der Sonographie stellen lässt, sind aufgrund des differenten Echoverhaltens und der beschriebenen Artefakte bestimmte Differentialdiagnosen auszuschließen oder zu erhärten. In der Synopsis mit Anamnese und klinischer Untersuchung ist die Sonographie ein wichtiges diagnostisches Werkzeug. Wenn trotz der Darstellbarkeit subkutaner Veränderungen im Ultraschallbild eine eindeutige diagnostische Zuordnung nicht gelingt, besteht wiederum die Möglichkeit, diese Veränderungen ultraschallgestützt zu punktieren (73).

3.5. Ultraschall diagnostik verbessert rezidivfreies und Gesamtüberleben bei Melanompatienten

Die erste größere prospektive Studie zur Charakterisierung der Überlegenheit des Ultraschalls gegenüber der klinischen Untersuchung in der Melanomnachsorge wurde von Blum et al. veröffentlicht (85). Sie untersuchten insgesamt 1288 Patienten mit beiden Methoden während Nachsorgekonsultationen. Sie fanden eine Sensitivität und Spezifität, mit denen die insgesamt 239 Metastasen bei 179 Patienten gefunden wurden, von 71,4% und 99,7% für die klinische Untersuchung und von 89,2% und 99,7% für den Ultraschall. So zeigt sich der Ultraschall in seiner Sensitivität der klinischen Untersuchung weit überlegen; die Spezifität belief sich aber für beide Methoden auf 99,7 % (85). Dies scheint eher auf dem Studiendesign zu beruhen als auf einem wirklichen Mangel an falsch positiven Resultaten. Als abschließenden Ausblick fordern die Autoren weitere kontrollierte Ultraschallstudien, die einen möglichen positiven Effekt der Ultraschalluntersuchung auf das Gesamtüberleben

beleuchten sollen.

Wie haben eine solche Studie an 829 konsekutive Patienten in prospektivem Studiendesign durchgeführt, die im Rahmen eines vier Jahre dauernden Nachsorgeintervalles klinisch und sonographisch untersucht wurden. Insgesamt 3011 Ultraschalluntersuchungen wurden durchgeführt. Die Melanompopulation zeigte eine gewöhnliche Verteilung von Melanomlokalisationen und histologischen Subtypen. Der Altersmedian lag bei 56 Jahren; 52% der Patienten waren weiblich und die mittlere Tumordicke lag bei 1,5 mm [0.2 - 10.0 mm]. Keine der genannten Rezidive wurden erstmalig per Röntgen Thorax, Abdomensonographie, Computertomographie, MRT oder auswärtigen Ultraschalluntersuchungen entdeckt. Im Verlauf der Studienperiode wurden bei 242/267 Patienten Rezidive durch klinische oder Ultraschallnachsorge entdeckt. Metastasen wurden in 61/242 Rezidiven durch klinische Untersuchung entdeckt (Sensitivität 25,2%; 95%CI: 19.9-31.2%), wohingegen Ultraschalldiagnostik 240 Rezidive erkannte (99.2%, 95%CI: 97.3-99.6%). Dies stellte einen signifikanten Unterschied ($p=0,001$) dar. Das Überleben von 103 Patienten, die sich im Studienverlauf mit Erstrezidiv präsentierten, wurde nachbeobachtet und mit multipler Cox Regressionsanalyse berechnet. Zusammenfassend scheint die Entdeckung von Rezidiven in einem frühen Stadium sich positiv auf das rezidivfreie sowie Gesamtüberleben auszuwirken (71). Eine Verbesserung des Überlebens, das sich auf eine frühere Metastasenentdeckung beruhend auf immer verfeinerten diagnostische Methoden zurückführen lässt, nennt man „lead time bias“. Dies könnte auf den ersten Blick auch im Rahmen dieser Studie der Grund für das verbesserte Überleben sein. Jedoch wurden in diesem Studiendesign grundsätzlich regelmäßige Intervalle festgelegt. Somit lassen sich die deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Methoden nicht durch einen einfachen „lead time bias“- Effekt erklären. Vielmehr

spiegeln sowohl die Größe als auch die Anzahl der Metastasen bei ihrer Entdeckung eher das unterschiedliche intraindividuelle Tumorwachstum wider. Da die Untersuchungsintervalle für alle Patienten gleich gehalten wurden, kann die Zunahme an Tumormasse von einem unentdeckbaren Level zum Stadium, wenn ein Rezidiv offensichtlich wird, auch - neben anderen Parametern - die unterschiedliche Aggressivität des Tumors reflektieren. Die durch Ultraschall gewonnenen Daten sind also nicht ein reiner lead-time-bias Effekt, sondern vielmehr Folge der unterschiedlichen Tumorbiologie und könnten durch Beschreibung der unterschiedlichen „Tumorload“ auch als Hilfen zur Stratifikation in unterschiedliche Studien dienen.

4. Feinnadelaspirationszytologie (FNAC)

Eine Feinnadelaspirationszytologie ist eine Punktionstechnik, bei der die Gewebeentnahme mit einer Kanüle erfolgt, die ein günstiges Verhältnis zwischen Außen- und Innendurchmesser der Kanüle aufweist, d.h. ein relativ großes Gewebstück wird bei minimaler Läsion entnommen. Dabei ist die Nomenklatur dieser Methode immer wieder ein Grund für Diskussionen. Die meisten skandinavischen und nordamerikanischen Autoren benutzen den Begriff „fine needle aspiration biopsy“ oder „aspiration biopsy cytology“ sowohl für die Methode an sich als auch für die reine operative Entnahme. Orell et al. benutzen den Begriff „fine needle aspiration cytology“ zur Beschreibung der gesamten Methode trotz des Umstandes, dass die Materialgewinnung nicht immer über eine Aspiration erfolgt. Für die Beschreibung der operativen Entnahme wird bei diesen Autoren der Begriff „fine needle biopsy“ benutzt (86).

Um eine definitive Diagnose stellen zu können, wird die Ultraschalluntersuchung mit einer Feinnadeluntersuchung kombiniert, um Material aus der Raumforderung zu

aspirieren. Die zytologische Untersuchung von Feinnadelmaterial zeigt in bisherigen Studien eine hohe Sensitivität und eine noch zuverlässigere Spezifität (87-89)(90;91). Seit 1984, als Perry die erste größere Studie zu Feinnadeluntersuchungen veröffentlichte, beschäftigte sich unsere Arbeitsgruppe mit Melanomzytologie (92;93). Das am häufigsten benutzte Feinnadelaspirationsgerät ist die Cameco-Feinnadelapparatur (Cameco Syringe holder; CAMECO, London, England), die als größten Nachteil einen weiten Abstand zwischen Hand und Nadelspitze hat. Deshalb wurde in unserer Arbeitsgruppe ein neues Feinnadelaspirationsgerät entwickelt (94). Mit Hilfe eines Vakuums, dessen Sogwirkung per leichtem Ventildruck ausgelöst wird, während die Nadelspitze innerhalb der Läsion positioniert ist, um Stichkanalmetastasierungen zu verhindern. Zusätzliche Sicherheit gibt die Sichtbarmachung der Nadelposition im Ultraschall. Die Bestätigung des Zytologieergebnisses erfolgt per Histologie bzw. in benignen Fällen durch verlängerte klinische und sonographische Nachbeobachtung.

4.1. Ultraschallgesteuerte FNAC verbessert die Genauigkeit der Feinnadelpunktion und erlaubt die Punktion sehr kleiner Ziele

In einer kontrollierten größeren Studie konnten wir eine zytologische Diagnose bei 739 konsekutiven Melanompatienten mit einer Sensitivität von 97,9% und einer Spezifität von 100% stellen. Dieses stellte die zahlenmäßig bislang weltweit größte zytologische Studie an Melanompatienten dar (**Abb.8**).

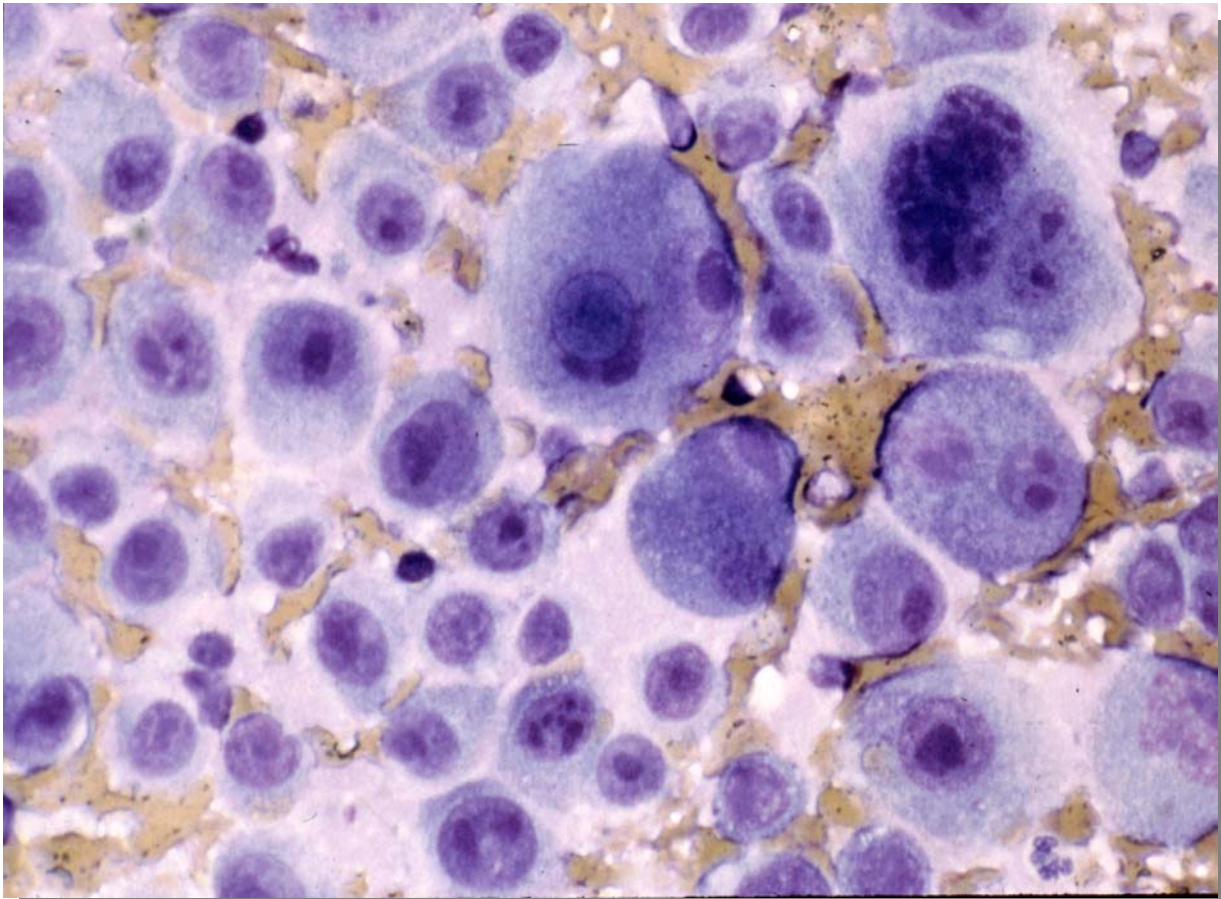


Abb. 8: Zytologie einer Melanommetastase des Lymphknotens, epithelartiger Typ
Vergrößerung x 400

Trotz der stetig ansteigenden Zahl von Feinnadelpunktionen (von ursprünglich ca. 40 Punktionen pro Jahr auf mehr als 100 pro Jahr) zeigten weder Spezifität noch Sensitivität Schwankungen. Dies obwohl wir eine zunehmende Anzahl von sehr kleinen, schlecht definierten Läsionen punktieren mussten, die oft erst im Rahmen der Sonographiediagnostik zu entdecken waren und noch nicht zu palpieren waren. Wir konnten keine ernsthaften Nebenwirkungen beobachten, insbesondere keine Stichkanalmetastasierungen, die vielfach diskutiert wurden (95-98). Durch Kombination mit dem Ultraschall als ultraschallgesteuerte FNAC konnte die Diagnose auch in den kleinen Läsionen mit weniger als einem Zentimeter Durchmesser sicher gestellt werden (70). An einem größeren Kollektiv von 275 Patienten mit sämtlich per Ultraschall entdeckten verdächtigen Raumforderungen fand sich gerade in der Patientengruppe mit den sehr kleinen Läsionen unter 1 cm Durchmesser eine

Sensitivität von 91% sowie eine Spezifität von 100% (82). Zusätzliche molekularbiologische Methoden wie die Tyrosinase-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion aus Feinnadalaspiraten als FNA-PCR könnte die fehlende Verfügbarkeit eines gut ausgebildeten Zytologen ersetzen (99). Bis heute haben wir insgesamt mehr als 1000 Feinnadelaspirationen evaluiert und korrelierten die statistischen Werte basierend auf histologischer Diagnose und fortgesetzter klinischer Nachbeobachtung. Die neuesten Daten für Sensitivität und Spezifität beliefen sich auf 97,7% und 99,9% (100).

4.2. Tyrosinase RT-PCR und Expansion von Zellen aus dem Aspirat

Seit der ersten Beschreibung einer reversen Transkriptase Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von Transskripten des Enzyms Tyrosinase im peripheren Blut durch Smith et al. wurden viele kontroverse Daten hinsichtlich Sensitivität und klinischer Wertigkeit der Methode veröffentlicht (101). Die zusätzliche Anwendung dieser molekularbiologischen Techniken (Tyrosinase RT-PCR) aus dem durch Feinnadelpunktion gewonnenen Material zum Nachweis von Melanomzellen war in unseren Untersuchungen vor allem in den sehr kleinen und nekrotischen Läsionen mit einer erhöhten Sensitivität verbunden (s.u.) (99;102). Zusätzlich kann die in vivo Asservation von Tumormaterial mittels einer Feinnadelpunktion zu weiterführenden Studien genutzt werden. Die FNAC liefert Material, um in vivo Tumor-Wirt Interaktionen zu studieren. Sie stellt aber auch eine Methode dar, um intratumorale T-Zell-Tumorantworten aus ein und derselben Metastase - beispielsweise zur Bewertung einer Therapie - in vivo zu charakterisieren, indem Tumor infiltrierende Lymphozyten (TIL) aus Feinnadelpunktat expandiert werden (103).

4.3. Ultraschallgesteuerte Feinnadelpunktion in der Diagnostik des Sentinel Node

Es gibt erste Arbeiten, die versuchen den Sentinel Node mit Hilfe von bildgebenden Verfahren näher zu charakterisieren. In einer kleinen deutschen Studie an 23 Melanompatienten konnte der Sentinel Node nach Durchführung der Lymphabstromszintigraphie auch sonographisch zugeordnet werden (104;105). Zum einen ist es wichtig, den szintigraphisch entdeckten Lymphknoten einem sonographischen Korrelat zuzuordnen und das exakte Übereinstimmen der Lokalisation zu dokumentieren. Zusätzlich kann man mit Hilfe des Ultraschalls weitere suspekte, z.B. nachgeschaltete Non-Sentinel Nodes identifizieren, oder Sentinel Nodes entdecken, die sich an anderer Stelle als szintigraphisch angegeben befinden. Der mit der Szintigraphie lediglich in Anzahl und Lokalisation geortete Lymphknoten erhält mittels des Ultraschalls „ein Gesicht“: er kann mit Hilfe verschiedener Kriterien in B-Bild Modus und Farbduplexsonographie charakterisiert werden.

Im Rahmen einer von der Deutschen Krebshilfe geförderten Studie (70-2791-Vo I) untersuchen wir die sonographische „Auffindbarkeit“ des Sentinel Node und dessen Korrelation von sonographisch und szintigraphisch bestimmter Lokalisation. Sonographische Kriterien zur Bestimmung, welcher der abgebildeten Lymphknoten der oder die Sentinel Nodes sind, werden an 100 konsekutiven Melanompatienten, die sich einer Sentinelnodebiopsie unterziehen, erarbeitet. Zusätzlich werden am dargestellten Lymphknoten in vivo und nach Exzision in vitro FNAC und FNA-PCR durchgeführt (**Abb 9**).

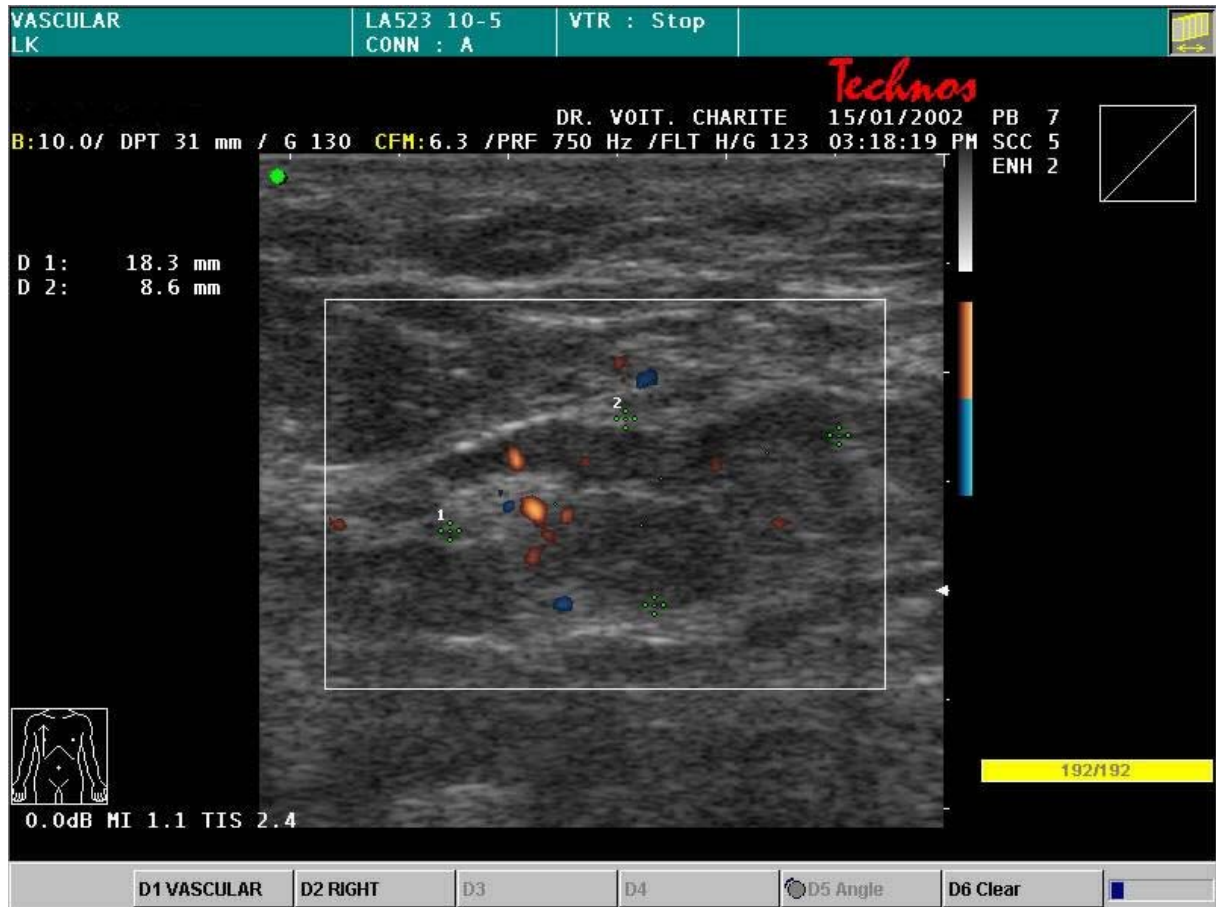


Abb. 9 a: Sentinel Node, in vivo



Abb. 9b Sentinel Node in vitro zwischen Gelkissen

Auf diese Weise kann die vergleichende in vivo und in vitro Bestimmung des Repertoires an lymphatischen Zellen des Sentinel Nodes erfolgen. Zusätzlich wird die sonographische Darstellung in vitro sowie die herkömmliche Aufarbeitung des Sentinel node und seiner afferenten Bahn in Serienschnitten histologisch sowie mittels Immunhistologie durchgeführt. Ziel der Untersuchung ist, möglichst bereits vor der Sentinel Node Dissektion durch Sonographie, in vivo Zytologie und in vivo Molekularbiologie den befallenen Sentinel Node zu charakterisieren.

Bislang wurden 109 Lymphknoten von 74 Patienten auf diese Weise untersucht, wobei 62/109 dieser Lymphknoten sowohl gleichzeitig in vivo als auch in vitro punktiert wurden (in vivo wurden oftmals auch mehrere Lymphknoten punktiert oder auch nachgeschaltete Lymphknoten zusätzlich vom OP entfernt)

Während der präoperativen Ultraschalluntersuchung kann nicht nur das der Markierung der Lymphabstromszintigraphie entsprechende Lymphabstromgebiet per Ultraschall untersucht werden, sondern auch darüber betrachtet werden. Bislang wurden 77 der 109 insgesamt entfernten Lymphknoten schon präoperativ unter dem sonographischen Verdacht eines Sentinel Node punktiert. Von den 32/109 Lymphknoten, die nicht präoperativ punktiert wurden, war nur einer histologisch befallen.

Bei 58/74 Patienten zeigte sich ein Lymphabstrom in nur einen Sentinel Node. Die anderen 16/74 Patienten zeigten einen Lymphabstrom in mehrere Lymphknoten. Bei 13/16 Patienten konnte ein Lymphabstrom in zwei, bei 3/16 in drei Lymphknoten nachgewiesen werden. Bei wiederum zwei dieser 3/16 Patienten waren die Sentinel Nodes außerdem in unterschiedlichen Lymphabstromregionen lokalisiert (rechts und links axillär). Von den 13 Patienten mit zwei Sentinel Nodes lagen 8/13 in zwei Lymphabstromregionen und 5/13 in einer Lymphabstromregion.

Bei 55/74 Patienten stimmte die Lokalisation der im Ultraschall entdeckten Lymphknoten exakt mit der Lokalisation der Markierung der Lymphabstromszintigraphie überein. Bei weiteren 14 Patienten konnten zusätzlich auffällige Lymphknoten entdeckt werden, die sonographisch weiter nachbeobachtet werden. Bei 4 Patienten konnte im Ultraschall kein Lymphknoten entdeckt werden, was sich aber auch intraoperativ in 3 der Fälle bestätigte, wo ebenfalls kein Lymphknoten darstellbar war. Sämtliche Ergebnisse der Ultraschalluntersuchungen wurden schriftlich und mündlich vor OP an den Operateur übermittelt.

Die Sentinel Nodes erfuhren generell eine sonographische Validierung, wobei diese in benigne, eher benigne, eher maligne und maligne eingeteilt wurden. Insgesamt wurden 28 der Lymphknoten als maligne/eher maligne eingestuft und 60 als eher benigne /benigne. Von den histologisch tatsächlich befallenen 10 Sentinel Nodes von 10 Patienten waren 8 bereits in der präoperativen Sonographie als maligne /eher maligne, also als suspekt eingestuft worden. Weitere 5 Patienten wiesen einen histologischen Befall des Sentinel Nodes in Form eines Nachweises von Einzelzellen (1- max. 5 Zellen) auf; ein weiterer Patient nur Einzelzellen in seiner afferenten Lymphabstrombahn. Dementsprechend zeigte sich die in vivo Sonographie dieser Sentinel Nodes nur in 2/5 dieser Patienten auffällig.

Ein weiterer praktischer Vorteil ergibt sich für die Patienten, bei denen die Lymphabstromszintigraphie keinen Sentinel Node darstellen kann. Ein sonographisch deutlich imponierender Lymphknoten kann beschrieben, abgemessen und in 2 Ebenen auf die Haut oder mittels einer kleinen Drahtmarkierung (anchor wire set; Fa. Somatex, Berlin) markiert werden und so mit einer intraoperativen Markierung mit Patentblau verglichen werden.

Wie schon im methodischen Teil geschildert, ist die Punktion eines Sentinel Node, der anders als eine Melanommetastase kein echoarmes Ziel darstellt, technisch schwieriger. Oft lassen sich auch nur verbreiterte echoarme Parenchymsäume darstellen, die zudem mit einer Mehrperfusion im Powermode imponieren können, so dass die Feinnadel dann zielsicher in die einzelnen Regionen innerhalb des Sentinel Node gelenkt werden kann. Ein solcher Parenchymsaum ist dann nur wenige Millimeter breit und bedarf der exakten und ultraschallgesteuerten Nadelpositionierung.

Bei 4/10 histologisch positiven Patienten konnte bereits die in vivo Zytologie Melanomzellen nachweisen. Einschränkend ist aber erforderlich, dass zum Erhalt

eines ausreichend aussagekräftigen Präparates ein Teilbefall des Lymphknotens vorhanden sein muss.

FNA-PCR aus in vivo Aspiraten

Die in vivo Aspiration benötigt ein komplettes Aspirat aus einer Punktion, das umgehend in flüssigen Stickstoff verbracht wird, um den Erhalt der RNA zu gewährleisten. Um die Intaktheit der RNA zu garantieren, wurden interne und externe Standards etabliert. Die RNA – Isolierung der FNA-probe erfolgte mit dem Invisorb RNA kit (Invitex). Als Housekeeping Gene wird in Abwandlung zum ursprünglichen Protokoll PBGD (Porphobilinogendesaminase) benutzt, da GAPDH wie auch β -Actin aufgrund von Pseudogenen und Retropseudogenen zu falsch positiven Ergebnissen bei DNA Kontamination führen kann (106). Zusätzliche Kontrollen wie das Mitführen einer Superscript-freien c-DNA Synthese und die Durchführung einer Dnase Behandlung vor cDNA Synthese wurden noch neben den üblichen bekannten Maßnahmen zur Verhinderung einer Kontamination in das Protokoll mitaufgenommen.

Bislang wurden 60 FNA-PCR Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden positive Ergebnisse stets als Duplikate wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu zeigen. In 2 Fällen war das Aspirat bereits in der PCR aus dem in vivo Aspirat positiv und korrelierte dabei in beiden Fällen mit dem histologischen Ergebnis. In 11 Fällen zeigte sich das Aspirat positiv, ohne dass eine histologische Entsprechung bestanden hätte. In wie weit es sich hier um falsch positive Befunde handelt oder ob der Befund eine Minimal Residual Disease im Lymphknoten darstellt und mit einer schlechteren Prognose einhergeht, muss anhand des krankheitsfreien und Gesamtüberlebens geklärt werden.

In vitro Sonographie

Der/die frisch entnommene/n Lymphknoten werden mit vorhandener afferenter

Lymphabstrombahn umgehend zur sonographischen Untersuchung gebracht. Dabei wird auch stets vermerkt, an welcher Region der entnommene Lymphknoten lokalisiert war und ob intraoperativ eine deutliche Differenz zu den Ergebnissen des präoperativen Sonographiebefundes bestanden hat. Die sonomorphologischen Besonderheiten des *in vitro* Lymphknotens werden ebenso registriert wie die Korrelation von Größe und Morphologie in Vergleich zum *in vivo* Befund.

In 63/109 Lymphknoten entsprach der entnommene Lymphknoten den in der *in vivo* Untersuchung gefundenen Lymphknoten. In 37/109 Lymphknoten schien der Lymphknoten nicht den vorher markierten Lymphknoten zu entsprechen oder wurde präoperativ nicht gesehen, da er in Größe oder Morphologie keine Übereinstimmung zeigte, da es sich um nachgeschaltete Lymphknoten handelte (9 Ergebnisse noch ausstehend). 12/60 der Lymphknoten, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* punktiert wurden, zeigten keine Übereinstimmung.

***In vitro* FNAC**

Die *in vitro* FNAC ist insofern schwierig, da man bei Durchführung eines Aspirates an sehr schmalen Objekten leicht Luft ansaugt und das Aspirat verloren geht.

Ausreichende Aspirationen lassen sich hier durch wiederholte Punktionen erreichen. Die Durchführung der Punktionen zeigte keine negativen Auswirkungen auf die histologische Auswertung.

Übereinstimmend zeigte sowohl die *in vivo* als auch die *in vitro* Punktion lymphatisches Zellmaterial mit einem ähnlichen Repertoire an morphologischen Zellen zum Ausschluß einer *in vivo* Fehlpunktion. Bei 79 Punktionen konnte ein so ausreichendes Aspirat erreicht werden, dass ein reaktiver Lymphknoten diagnostiziert werden konnte. In nur 3 Fällen war das Aspirat nicht signifikant oder nicht diagnostisch.

In den preliminären Daten zeigt sich bereits, dass eine relativ sichere

sonographische Diagnostik des Sentinel-Node möglich ist. Die FNAC erbringt natürlich im Vergleich mit der zytologischen Diagnostik einer bestehenden Melanommetastase eine niedrigere Sensitivität, jedoch bleibt im Verlauf der Studie abzuwarten, ob eine Verbesserung mittels Tyrosinase PCR zu erreichen ist.

5. Drahtmarkierung zur sonographischen Markierung von tiefen Melanommetastasen

Eine präoperative Markierung von Metastasen kann sehr vorteilhaft bei Stadium III und IV Melanompatienten sein, die solitäre Metastasen ohne weitere Krankheitshinweise zeigen. Zunächst wurde das Vorgehen in einer kleinen Studie an 6 Melanompatienten beschrieben, wobei allerdings in 5/6 Fällen die Steuerung der Drahtimplantation CT-gesteuert erfolgte (107).

Wir führten eine Pilotstudie an konsekutiven Melanompatienten mit solitären Metastasen, in anatomisch ungünstiger Position durch. Teilweise war bereits eine Operation vorausgegangen, bei der es nicht gelang, die Metastase erfolgreich zu entfernen. Die Steuerung erfolgt ausschließlich durch Ultraschall. In die per Ultraschall entdeckten Metastasen implantierten wir sonographisch über einen Mandrin einen flexiblen Draht mit Anker-förmigen Enden, die sich beim leichten Zurückziehen des Drahtes außerhalb des Schaftes entfalten (Anchor-wire-localization-set, FA Somatex, Berlin, Germany) (**Abb 10**).

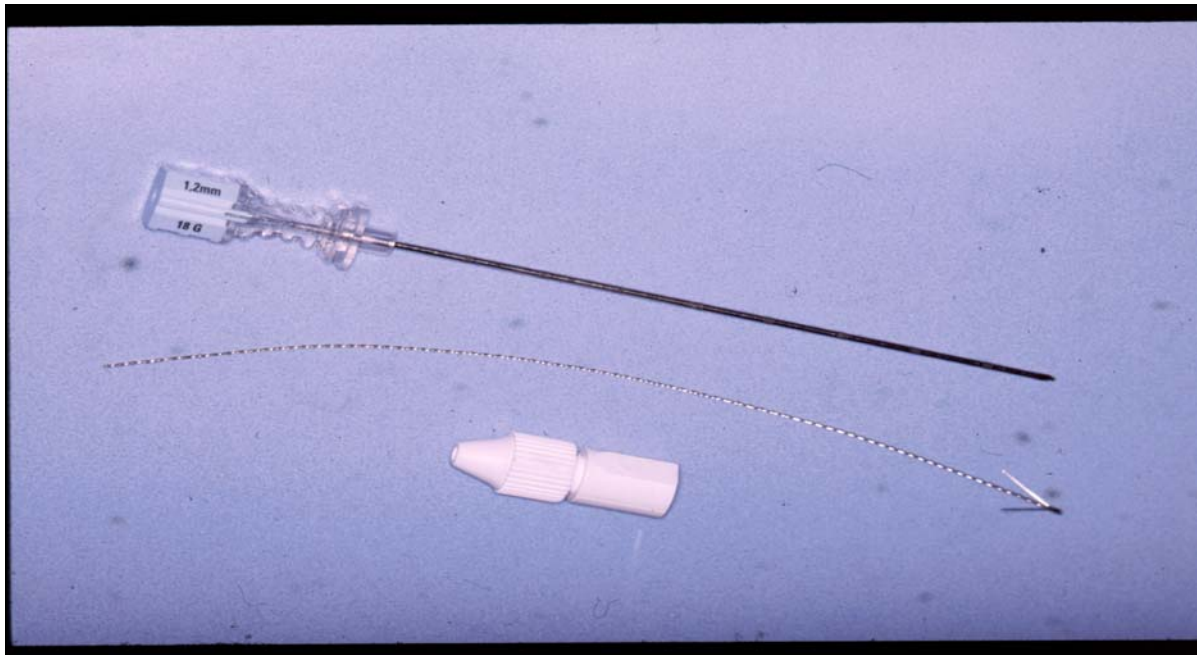


Abb. 10: Anchor Wire Localization Set

Auf diese Weise verankert sich der Draht sonographiegesteuert sicher in der Metastase. Die Drahtmarkierung erfolgt im Vorraum des OP und ohne weitere Umlagerung (zur Vermeidung einer Dislokation des Drahtes) wird die Metastase entlang des Drahtes exstirpiert. Dies erlaubt kurze Operationsschnitte und verringert das Gewebstrauma. Zwei Patienten wiesen zwei In transit Metastasen auf, 8 weitere nur jeweils eine solitäre Metastase in besonders tiefer, intra-oder inframuskulärer Lokalisation. In 11/12 Prozeduren lag die Drahtspitze intraoperativ tatsächlich innerhalb der Läsion; in einem Fall verfehlte die Nadelspitze die Läsion um weniger als 5 mm und war damit nahe genug am Ziel, um das Auffinden der Metastase zu ermöglichen. Alle Operationen waren aufgrund der Drahtmarkierung mit geringerer Invasivität und in Lokalanästhesie möglich. Verbreitung von Tumorzellen entlang der Drahtmarkierung im Sinne einer Stichkanalmetastasierung wurde nicht beobachtet. Auf diese Weise kann die ultraschallgesteuerte Drahtmarkierung Metastasen in der Nachsorgesituation mittels Ultraschall sichtbar machen und eine sichere komplette Resektion unterstützen. Dies ist auch bei noch sehr kleinen Metastasen in

ungünstiger Position möglich (108).

6. Tumormarker in der Melanomnachsorge

6.1. Tyrosinase als Tumormarker

In vielen Bereichen der Hämatologie und Onkologie ist es primäres Ziel, durch ein „Erkennen“ von Tumorzellen in der Peripherie in Form von Mikrometastasen oder zirkulierenden Tumorzellen den Nachweis einer „minimal residual disease“ zu liefern und hiermit ein Werkzeug zur Frühdiagnostik eines sich entwickelnden Rezidivs zu schaffen oder als Therapiemonitor zu nutzen (109;110). Tyrosinase ist das Schlüsselenzym der Melaninbiosynthese, das spezifisch für Melanozyten und Melanomzellen ist. Tyrosinase katalysiert die ersten beiden Schritte, die Hydroxilierung von Tyrosin zu Dopa und die anschließende Oxidation zu Dopachinon (111-113). 1991 konnten mit der Kombination aus RT/PCR zum Nachweis von Tyrosinase mRNA erstmals zirkulierende Melanomzellen bei Patienten mit metastasiertem Melanom im peripheren Blut nachgewiesen werden (101). In weiteren Studien wurde zunächst versucht, den neuen Tumormarker durch unterschiedlichste Labormethoden nachzuweisen und die Nachweisgrenze auf ein geringes Niveau zu senken. So gelang der Nachweis einer Tumorzelle in 10 ml Blut (114) oder innerhalb von 10 Millionen peripherer mononukleärer Zellen (PBMC=peripheral blood mononuclear cells). Möglicherweise aufgrund der unterschiedlichen Aufarbeitung d.h. ohne Vorliegen eines standardisierten Tests ergaben sich für die klinische Anwendung dieses Tumormarkers manchmal sogar innerhalb ein und derselben Studie (115) widersprüchliche Ergebnisse (110;116;117). So variierte bei Melanompatienten mit einer Fernmetastasierung die Anzahl der im Blut Tyrosinase positiven Patienten zwischen 0% (118) und 100% (114). Um den unterschiedlichen Aufarbeitungstechniken in den einzelnen Laboren

gerecht zu werden wurde ein zentral von der EORTC durchgeführter Ringversuch initiiert, der die Sensitivität der einzelnen Labore – unter anderen unseres – prüfte (119). Zusätzliche Anwendung findet der Nachweis von Tyrosinase als Lymphknotenstaging zur noch sensitiveren Diagnostik des Sentinel Nodes (36;37;120;121) oder in Abwandlung als Tyrosinase RT-PCR aus Feinnadelaspiraten von Lymphknoten (102).

6.2. Ein negatives Aspirat aus einer sonographisch auffälligen Läsion kann eine positive Tyrosinase-PCR liefern

Ultraschall und zytologische Untersuchung des Materials erreichen ihre technischen Grenzen, wenn die entdeckten Läsionen im Ultraschall beispielsweise aufgrund der geringen Größe nicht mehr eindeutig metastasenverdächtig sind. Bei sehr kleinen Läsionen treffen die oben geschilderten sonographischen Parameter (u.a. Vassallo-Index) nicht mehr zu (82). Aufgrund der geringen Größe gestaltet sich die Feinnadelpunktion schwierig und das erhaltene Material kann entsprechend „nicht diagnostisch“ ausfallen, d.h. die erforderliche Anzahl von 100 suspekten Zellen auf 2 Objektträgern, die unser Kriterium für ein diagnostisches Punktat darstellt, wird nicht erreicht. So konnte gezeigt werden, dass eine sonomorphologisch auffällige, jedoch kleine und zytologisch negative Läsion, die zudem kein Größenwachstum über 8 Monaten aufwies, eine positive Tyrosinase PCR aus der FNAC lieferte. Die nach Beginn des Größenwachstums erforderliche Exzision bestätigte eine Melanommetastase. In wenigen sonographischen Arbeiten wird die Möglichkeit des Vorliegens von Melanommetastasen ohne fassbares Größenwachstum beschrieben. Bei nicht eindeutiger Ultraschalldiagnostik einer Raumforderung ist das empfohlene Vorgehen, den Patienten kurzfristig mit Ultraschall nachzukontrollieren und eine Exstirpation nur bei Änderung von Morphologie oder Größe durchzuführen (52). Sollten diese Änderungen nicht fassbar sein, käme es zu einer Verschleppung der

Diagnose (122). Ähnlich haben im geschilderten Beispiel sowohl die Klinik, die sonographische Vermessung und die noch als Zusatzdiagnostik mehrfach durchgeführte Zytologie eine benigne Läsion ohne Größenwachstum für die Dauer von 8 Monaten wahrscheinlich gemacht. Die Durchführung der zusätzlichen Tyrosinase-RT-PCR Untersuchung empfiehlt sich generell, vor allem aber bei technisch schwierigen Läsionen – insbesondere bei Vorliegen von sich widersprechenden diagnostischen Ergebnissen (81).

6.3. Tyrosinase FNA-PCR – eine minimal invasive molekularbiologische Diagnostik

Patienten, die an einem Melanom mit einer Tumordicke größer 1,5 mm erkrankt sind, weisen ein hohes Risiko einer Metastasierung in die regionalen Lymphknotenstation auf. Die klinische Untersuchung weist Metastasen oft nur in einem späten Stadium auf. Durch die Einführung der Weichteilsonographie lassen sich viele Lymphknotenmetastasen in einem noch nicht palpablen Zustand nachweisen. In der Diagnostik derartiger Veränderungen hat sich die Feinadelaspirationszytologie (FNAC) als günstig erwiesen. Jedoch zeigen sich in der sonographischen Untersuchung oft auch metastasenverdächtige kleine Raumforderungen, die sich aus den oben angeführten Gründen nur durch Exzision und histologische Untersuchung sicher diagnostizieren lassen. Durch die Einführung der molekularbiologischen Techniken zum Nachweis von Tyrosinase mRNA mittels Kombination von Reverser Transkriptase (RT) und Polymerasekettenreaktion (PCR) aus Feinnadelpunktaten wurden Verbesserungen in der Diagnostik erreicht. In einer Vorläuferstudie konnte die Durchführbarkeit der Methode auch an derart kleinem Material bewiesen werden (102). Ziel unserer Studie war es an einer größeren Fallzahl nachzuweisen, ob sich Verbesserungen in der Früherkennung von Metastasen ergeben.

Im Rahmen der Melanomnachsorge wurden 81 Melanomrezidive entdeckt, von

denen 9 palpabel waren. Technisch gelang die Gewinnung von Feinnadelausstrichen in allen Fällen, währenddessen die Gewinnung von vitaler RNA in 2 Fällen in der Anfangsphase misslang. 79 Läsionen konnten komplett mittels B-scan, FNAC und FNA-PCR evaluiert werden. Die Methoden der Verifizierung wurden in ihrer Sensitivität verglichen. Im Nachweis der 44 Metastasen zeigte sich die FNA-PCR mit Positivität in allen Metastasen (100%) den anderen Methoden überlegen. Die klinische Untersuchung führte zum Nachweis bei 20% der Metastasen (n=9, $p < 0.0001$), die Ultraschalluntersuchung bei 80% (n=35, $p < 0.005$) und die FNAC bei 89% (n=39, $p < 0,05$). Vor allem in den sehr kleinen Metastasen mit einem Durchmesser unter 1 cm erwies sich die FNA-PCR den anderen Methoden deutlich überlegen. Erneut gelang der Metastasennachweis der FNA-PCR in 100% (n=18), im Gegensatz zu 6 % bei der klinischen Untersuchung (n=1, $p < 0.0001$), in 72% bei der Ultraschalluntersuchung (n=13, $p < 0.05$) und in 78% mit der FNAC (n=14, $p < 0.07$) (99). Eine zusätzliche Stadienabhängigkeit der Tyrosinasebestimmung aus dem zeitgleich abgenommenen peripheren Blut konnte bei den Patienten mit Melanomrezidiv nachgewiesen werden. Jedoch auch bei den Patienten ohne zeitgleichen Rezidivnachweis konnte eine Zunahme der Tyrosinasepositivität mit zunehmendem Stadium beobachtet werden.

6.4. Tyrosinase RT-PCR aus dem peripheren Blut als Metastasierungsmarker

Das biologische Verhalten eines Melanoms ist beim einzelnen Patienten schwer vorhersehbar (123). Prognostische Kriterien des Primärtumors wie Tumordicke, Ulzeration und Sentinel node Status sind bei Melanompatienten im fortgeschrittenen Stadium (Stadium III/IV) ohne Aussagekraft. Seit jeher war das Bestreben, einen früheren und besseren prognostischen Marker besonders für Patienten in einem fortgeschrittenen Melanomstadium zu finden (124). Meist kommt es zum

disseminierten Stadium durch hämatogene Metastasierung. Der Nachweis von Melanomzellen im Blut nach Resektion des Primärtumors oder Resektion eines befallenen Lymphknotens könnte deshalb ein nützlicher Indikator für die Patienten sein, die im Begriff sind klinisch evidente Metastasen zu entwickeln (125;126). Von der Entdeckung zirkulierender Tumorzellen erhofft man sich, eine Vorhersage für das Gesamtüberleben ableiten und Therapien überwachen zu können (126).

Tyrosinase ist einer der spezifischsten Marker für die Melanozytendifferenzierung (116) und mithilfe der durch Smith et al erstmalig beschriebene Methode gelang es, eine einzige Melanomzelle in verschiedensten Serienverdünnungsexperimenten vor dem Hintergrund von z. B. 1 Million mononukleären Blutzellen (127;128) nachzuweisen. Melanozyten zirkulieren normalerweise nicht im peripheren Blut (127). Weitere Hinweise lieferte der fehlende Nachweis von Tyrosinase im Blut gesunder Individuen (114;127;129;130). 50 Kontrollpatienten - gesunde Kontrollen und Patienten mit anderen malignen Tumoren - waren in einer größeren Studie von Mellado et al. im Blut ohne Tyrosinasenachweis (131). Während die früheren Studien eher die Sensitivität der Methode an größeren Melanompatienten Kollektiven in unterschiedlicher Aufarbeitung untersuchten (114;115;118;123;129;132) (133;134) haben neuere Arbeiten versucht, eine Korrelation des Bluttests mit dem klinischen Verlauf zu schaffen und Bezüge zu Gesamt- und rezidivfreiem Überleben herzustellen (126;131;135-137). So ging die Tyrosinase-Blutpositivität bei 9/48 Patienten in einem disseminierten Melanomstadium mit einer Tumorprogression parallel, während man bei Tyrosinase negativen Patienten keinen Tumor nachweisen konnte (127). Mellado et al berichteten, dass 9/17 Stadium II und III Patienten mit einem positiven Tyrosinasebluttest Rezidive entwickelten. Zum Vergleich zeigten nur 3/22 Patienten derselben Studie mit einem negativen Bluttestergebnis ein Rezidiv. Hoon et al. favorisieren die Anwendung einer Multimarker PCR, wobei jedoch eigene

Arbeiten (Inauguraldissertation Ivonne Bedei, Ulm) beispielsweise eine hohe Rate an falsch positiven Muc-18 Proben bei der Bestimmung aus dem Blut gesunder Kontrollpersonen zeigte. PCR Tests mit Muc-18, gp 100 und p 97 aus dem Blut von gesunden Patienten verliefen auch in einer Studie von Curry et al. positiv (125). 66% der Stadium I, II, und III Patienten hatten parallel zu ihren Rezidiven positive Tyrosinasebestimmungen aus dem peripheren Blut zu einem Zeitpunkt von 3 Monaten nach Resektion. Für Stadium III Patienten allein war dies sogar in 73% der Rezidivpatienten der Fall. Jedoch war bei 16/47 Patienten mit Rezidiv der Bluttest falsch negativ. Dies führen die Autoren auf eine intermittierende Ausschüttung von Tumorzellen in das periphere Blut zurück oder auf wenige Tumorzellen unterhalb der Nachweisgrenze (136) und fordern als Ausblick längere Nachbeobachtungsdauern der einzelnen Studien. Ähnliche Schlüsse zogen auch Reinhold et al. aus den Ergebnissen von chronologisch gestaffelten Blutabnahmen am selben Tag (138). In einer Studie von Ghossein wurde erstmalig die Bedeutung des Tyrosinase nachweises im Knochenmark neben Bluttirosinasebestimmungen untersucht (124). Ein spezifischer Nachweis der Tyrosinase in beiden Kompartimenten gelingt. Während die PCR Ergebnisse aus beiden Kompartimenten bei Stadium IV Patienten keine prädiktive Aussagekraft auf das Überleben hatten, war die Bestimmung von Tyrosinase aus dem peripheren Blut signifikant mit dem Gesamtüberleben von Stadium II und III Patienten korreliert. Als Ausblick forderten die Autoren die Notwendigkeit der Studie von seriellen Blutabnahmen bei einer größeren Patientenkohorte.

In einer eigenen Studie wollten wir den prognostischen Wert der Tyrosinase RT-PCR für den Routinegebrauch im Rahmen der Melanomnachsorge testen. Insgesamt 212 Blutproben von Melanompatienten in allen klinischen Stadien wurden prospektiv untersucht und die prozentuale Anzahl der im Blut Tyrosinase positiven

Melanompatienten stieg an. Nach einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 36 Monaten zeigten die Stadium III Patienten mit einer positiven Tyrosinasebestimmung im Blut ein signifikant verkürztes rezidivfreies Überleben im Vergleich zu den Tyrosinasenegativen Patienten. In multipler Regressionsanalyse blieben klinisches Stadium und Tyrosinase positive Bluttests die besten prognostischen Faktoren. Die „Hazard Ratio“ für das Gesamtüberleben waren 97.0 (Konfidenzintervall 12,7-741, $p=0.0001$) für metastatische Erkrankung versus rezidivfreier Melanomerkrankung und 4,33 (Konfidenzintervall 1,69-11,1, $p=0,002$) für positive versus negative Tyrosinase RT-PCR.

6.5. Serielle Tyrosinase Bestimmungen aus dem peripheren Blut liefern Aussagen über die Rezidivwahrscheinlichkeit

Aufgrund der unterschiedlichen Angaben über die Positivität der Tyrosinase im peripheren Blut und der Rate an falsch positiven Tyrosinase Tests schlugen einige Autoren serielle Tyrosinasebestimmungen in Kombination mit einer längeren Nachbeobachtungszeit vor (125;126). Trotz der klinischen Anwendung von insbesondere zwei weiteren Tumormarkern, dem 27 kD Protein S-100 oder das Protein MIA („melanoma inhibitory activity“), das ursprünglich aus der Hirnmetastase eines Melanompatienten isoliert wurde, erlosch das Interesse an Studien mit der Tyrosinase-RT-PCR nie. Mehr denn je wird versucht die interessanten prognostischen Ergebnisse in weiteren prospektiven Studien zu bestätigen. So konnte eine australische Studie zeigen, dass die Tyrosinase-RT-PCR ein wichtigerer prognostischer Faktor für das erkrankungsfreie Überleben eines Melanompatienten ist als Tumordicke oder der Lymphknotenstatus (136). Neuere Studien können beispielsweise eine enge Korrelation zur Tumorlast nachweisen (38), nutzen die Methodik zum Nachweis von Melanomzellen im Liquor cerebrospinalis (139) oder zur Überwachung einer Vakzinetherapie (140). In einer eigenen Studie haben wir die

klinische Relevanz von zirkulierenden Melanomzellen anhand serieller Blutabnahmen derselben Patienten untersucht. Von 66 Stadium II Patienten und 34 Stadium III Patienten (jeweils AJCC Staging System) wurden insgesamt 248 Blutproben in einem Testintervall von 3 Jahren mit einem RT-PCR Assay seriell untersucht. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 3,5 Jahre. Das krankheitsfreie Überleben wurde kalkuliert als Zeit von der ersten Blutabnahme bis zum Melanom bedingten Versterben. Patienten mit einem positiven RT-PCR Test zeigten in einem Cox Modell ein deutlich höheres Risiko, an einem Melanom zu versterben mit einem Risikoverhältnis („hazard ratio“) von 48.7 (95% - Konfidenzintervall 5,0-474,0, $p < 0,001$). Somit konnte in dieser Studie eine enge Assoziation zwischen PCR Ergebnis und krankheitsspezifischem Überleben gezeigt werden und könnte in ähnlicher Weise wie der Sentinel Node Status wichtige prognostische Hinweise auf den Verlauf der individuellen Melanomerkrankung liefern (141). Dies bedeutet vor allem, dass die serielle Tyrosinasebestimmung keine Entscheidungshilfe im Moment der Blutabnahme darstellt, aber durch Korrelation mit einer Langzeitbeobachtung einen prognostischen Faktor darstellen könnte. Mit dieser Stratifikationshilfe könnten Patienten als Hochrisikopatienten herausgefiltert werden und adjuvanten Therapien zugeführt werden (141). Die Studie war so angelegt, dass die seriellen Tyrosinasebestimmungen im Rahmen der regulären Melanomnachsorge stattfanden und sich die Häufigkeit der Blutabnahmen pro Patient nach der Engmaschigkeit ihrer Nachsorgeintervalle, d.h. nach der Tumordicke richteten.

6.6. MIA-Proteinbestimmung im peripheren Blut als Metastasierungsmarker

Die serielle Tyrosinasebestimmung in unserer prospektiven Studie konnte problemlos begleitend zur Nachsorge durchgeführt werden. Allerdings sind große limitierende Faktoren die Zeitdauer und die notwendigen internen und externen Kontrollen bei der

RT-PCR.

Eine sehr große Tumornachsorge mit vielen Melanompatienten, wie dies in der Charité der Fall ist, kann günstiger mit einem schnell zu verarbeitenden Tumormarker überwacht werden. So wird ein mittlerweile ein kommerziell erhältlicher Kit angeboten, mit dem viele Blutproben des Tumormarkers MIA gleichzeitig als ELISA verarbeitet werden können.

MIA, auch „melanoma inhibitory activity“ genannt, wurde zunächst als lösliches 11 kD Protein aus einer Melanomzelllinie in vitro isoliert, die aus einer Hirnmetastase eines Melanompatienten etabliert worden war (142;143). Zunehmend wurde aus dem in vitro Ansatz heraus die in vivo Anwendung an Melanompatienten erprobt. Eine stadienabhängige Zunahme der MIA-positivität konnte in einer Studie von 1997 gezeigt werden, wobei erhöhte MIA-Level, gemessen in einem nichtradioaktiven ELISA, sogar bei 100% aller Melanompatienten im Stadium III und IV auftraten (144). MIA sei in seiner Sensitivität auch dem Tumormarker S 100 überlegen (144).

In einer weiteren Arbeit wurde eine Korrelation der klinisch sichtbaren Tumorlast bei Stadium III und IV Patienten und dem erhöhten MIA-Level beschrieben und der Erfolg einer Chemotherapie auch am absinkenden MIA-Level gemessen (145).

Eine mögliche Anwendung für Metastasen von Aderhautmelanomen wurde zusätzlich nachgewiesen (146).

Eine schwache Expression von MIA wurde auch in Naevuszellnaevi, nicht jedoch in normalen Melanozyten oder Keratinozyten beschrieben. Zusätzlich wurden erhöhte MIA werte in fortgeschrittenen Stadien von Brustkrebs nachgewiesen, wobei die Anwendung von MIA als Marker für maligne epitheliale Neoplasien als geeignet erschien (147). Die in allen Arbeiten immer wieder beschriebenen, erhöhten MIA-werte bei Stadium I und II Patienten um die 20% konnten in ihrer prognostischen Bedeutung noch nicht letztendlich gedeutet werden. In einer neueren Studie mit 830

MIA-Blutwerten an 326 Melanompatienten zeigten 5,6% der Blutproben von Stadium I/II erhöhte MIA-level im Vergleich zu 60% im Stadium III und 89, 5% im Stadium IV (148).

Weiterhin wurde die Anwendung von MIA zum Monitoring von Therapien (polyvalente Melanomvakzine, IFN-alpha 2b Therapie, Interleukin-2 Therapie) untersucht, wobei Patienten mit fehlenden klinischen Metastasennachweis oder Therapieansprecher niedrigere Level aufwiesen als solche mit fortschreitender Erkrankung (149). Ähnlich wie MIA war auch der Tumormarker S100, ein 27kD Protein, als nützlich zur Verlaufsbeobachtung von Melanompatienten unter Therapie beschrieben worden (150). In einer vergleichenden Studie wurde die Signifikanz der beiden Marker hinsichtlich Nachsorge, Therapiemonitoring und prognostischem Wert untersucht. Beide Tumormarker schienen geeignet, den Patienten unter Chemotherapie in seinem Verlauf und Ansprechen sowie den Nachsorgepatienten mit Rezidiv korrekt zu beurteilen, wobei MIA gegenüber S100 eine etwas höhere Spezifität und Sensitivität aufwies (151). In einem weiteren direkten Vergleich zwischen S100 und MIA zeigte S100 in 81,5% der Fälle eine direkte Korrelation zwischen Markerwerten und klinischem Verlauf, aber auch in 20% falsch positive und in weiteren 20 % falsch negative Werte.

MIA wies in dieser Studie eine Korrelation zum klinischen Verlauf in 73,8% auf, bei 8% falsch positiven und 32,5% falsch negativen Werten (152). Jedoch zeigten auch Patienten mit kolorektalen, Magen-, Pankreas-, hepatozellulären und Gallenblasenkarzinomen, die an einem fortschreitenden Tumorgeschehen litten, erhöhte Level von MIA und S100 (153). In einer niederländischen Arbeitsgruppe, die eine RT-PCR zum Nachweis von MIA als Melanom-spezifischem Kandidatengen durchführten, konnte MIA mRNA bei 16/19 Melanomzelllinien und bei 7/16 Nichtmelanomzelllinien nach 30 Zyklen einer RT-PCR nachgewiesen werden. Nach

einer Erhöhung der Zyklenzahl auf 60 Zyklen konnte MIA mRNA sogar in allen Zelllinien nachgewiesen werden, ebenso wie im Blut von gesunden Probanden, so dass MIA zum Nachweis von geringsten Mengen von Melanomzellen im Sinne einer „minimal residual disease“ nicht geeignet erschien (154). Weitere widersprüchliche Daten liefern die Untersuchungen von Deichmann et al, der die Anwendung der Tumormarker MIA, S100 und der Laktatdehydrogenase (LDH) testete. In seinen Untersuchungen an 71 Stadium IV (AJCC Staging) Melanompatienten war nur die Laktatdehydrogenase (LDH) als einziger statistisch signifikanter Marker hinsichtlich des klinischen Verlaufs tauglich (155).

In der Nachsorge bedeutet ein erhöhter Tumormarker, bei einem Patienten mit weder klinisch noch sonographisch evidenten Metastasen konsequenterweise zunächst eine Kontrolle des Laborwertes, dann aber auch die Einleitung erweiterter Stagingmaßnahmen. Neben der psychischen Verunsicherung des Patienten, entstehen im Falle eines erhöhten Tumormarkers und fehlendem Metastasennachweis in den apparativen Untersuchungen, auch erhebliche Kosten. Ein solch falsch positiver Tumormarker bedarf letztendlich ebenfalls ein längeres Follow-up an einem großen Patientenkollektiv, um die Frage einer verschlechterten Langzeitprognose durch den erhöhten Tumormarker zu klären.

Andererseits kann ein erhöhter Tumormarker begleitend zu einem klinisch oder sonographisch bereits in der Nachsorge evidenten Metastasennachweis auftreten, d.h. der Tumormarker korreliert zwar mit dem Tumornachweis, führt aber selbst nicht zur Metastasenentdeckung.

Die dritte und für die klinische Anwendung eines Tumormarkers wünschenswerteste Variante ist ein im Rahmen eines Routinestaging zufällig erhöhter Tumormarker, der ein Staging nach sich zieht und auf diese Weise zur Metastasenentdeckung führt. In einer Studie mit großen Fallzahlen an der Hautklinik Charité versuchen wir derzeit zu

klären, inwieweit der Tumormarker MIA selbst eine Metastasenentdeckung ausgelöst hat und wie hoch Sensitivität und vor allem Spezifität sind. Es sind vor allem die falsch positiven Werte und damit die erniedrigte Spezifität, die die Anwendung eines Tumormarkers klinisch limitieren.

Derzeit findet die statistische Auswertung an seriellen MIA-Blutbestimmungen von 2000 Melanompatien statt. Dabei werden klinischer Verlauf, rezidivfreies und Gesamtüberleben sowie die verursachten Kosten betrachtet, aber auch insbesondere Sensitivität und Spezifität des MIA-Wertes berechnet.

7. Diskussion

Prognose bei einer Lymphknotenmetastasierung

Es ist allgemein akzeptiert, dass Patienten nach Resektion eines klinisch manifesten Lymphknotenbefalls eine deutlich schlechtere 5-Jahresüberlebensrate haben (15%) als Patienten mit einem nur mikroskopisch nachweisbaren Lymphknotenbefall (5 –JÜR:50%) (156). Ebenso wurde gezeigt, dass die Gesamtüberlebensrate von Melanompatien mit der Anzahl der befallenen Lymphknoten einer Lymphknotenstation abnimmt (157) (158) (159). Patienten mit nur einer Lymphknotenmetastase haben eine bessere 5-Jahresüberlebensrate (42-58%) als solche mit 5 oder mehr befallenen Lymphknoten. (10-18%) (17;71). In einer Studie von Buzaid et al. war jedoch die Größe der Lymphknotenmetastasen, wie sie durch die klinische Untersuchung bestimmt wurden sowie die Größe des größten histologisch vermessenen Lymphknotens kein zuverlässiger prognostischer Faktor für das Überleben (65). Im Gegensatz dazu konnte in der von uns an einem großen Melanompatienkollektiv durchgeführten Studie eindeutig gezeigt werden, dass Patienten mit einem kleineren Durchmesser (< 15 mm) der Lymphknoten-Melanommetastasen, die nur mittels Ultraschall entdeckt werden können, ein

verbessertes Gesamtüberleben aufwiesen als die Patienten mit einem größeren Durchmesser der Metastasen (71).

Ultraschalldiagnostik in der Melanomnachsorge

Bei Vergleich der Nachsorgekriterien wird der Ultraschall noch nicht als effektives Hilfsmittel in Nachsorge und Management des malignen Melanoms allgemein akzeptiert. Obwohl einige Autoren in kleineren Studien die Nutzung des Ultraschalls zum präoperativen Staging und zur Nachsorge empfehlen (66-69), wird Ultraschall außerhalb Europas kaum eingesetzt. Obwohl Ultraschall der Palpation in der Metastasenentdeckung überlegen ist, erscheint er zu teuer oder zu zeitintensiv. Bei einem routinierten Untersucher dauert es ca. 5 Minuten, eine beidseitige Lymphknotenstation sicher zu schallen. Die Lymphknoten-sonographie ist mit einer Sensitivität zwischen 92 (69;160) und 100% (66) sicher in der Lage, nicht neoplastische Lymphknoten von Metastasen zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu weist die klinische Untersuchung nur eine Sensitivität zwischen 23% (69) und 52% (66) auf. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte die Ultraschalldiagnostik der Lymphknotenstationen als kostengünstige, nicht invasive Methode grundsätzlich als Standarduntersuchung in der Melanomnachsorge durchgeführt werden (69). Die frühe Erkennung von Lymphknotenrezidiven vermag weiterhin die Patienten mit einem hohen Rezidivierungsrisiko zu identifizieren, die besonders geeignet sind für adjuvante Therapien im Anschluß an eine Metastasenexstirpation.

Bedeutung der Feinnadelaspirationszytologie

Die sonographiegesteuerte FNAC ermöglicht die sichere Diagnose von auch sehr kleinen, nur mit dem Ultraschall entdeckbaren Läsionen (69;70). So ist ein wesentlich frühzeitigeres Staging mit den entsprechenden Therapieentscheidungen möglich, da die Indikation für eine FNAC wesentlich leichter als die Indikation zu einer chirurgischen Extirpation einer suspekten Läsion zu stellen ist. Die FNAC

konnte in der Studie von Rossi (69) alle durch Ultraschall und Palpation als falsch positiv interpretierten Läsionen einer richtigen Diagnose zuführen. So wird einer Vielzahl von Patienten die Exzision von klinisch verdächtigen, tatsächlich aber benignen Läsionen erspart. Darüber hinaus wird in vielen Arbeiten von Tumoren der Kopf/Hals Region der Wert des Ultraschalls in der Nachsorge sogar höher bewertet als die Computertomographie, da bei letzterer Methode die kleineren Metastasen häufiger übersehen werden (161).

Weitere Möglichkeiten des Ultraschalls

In einem dritten Einsatzbereich vermag der Ultraschall das präoperative Auffinden von kutanen, subkutanen oder Lymphknotenmetastasen zu erleichtern. Zusätzlich kann in schwierigen Lokalisationen oder bei Vorliegen einer Rezidivoperation eine Drahtmarkierung erfolgen. Diese Technik ist für Patienten mit solitären Metastasen von Bedeutung, da diese so mit hoher Sicherheit des Auffindens der Metastase operiert werden können.

Bei Stadium IV Patienten gelten in multifaktorieller Analyse die Anzahl der metastatischen Lokalisationen (162), die Remissionsdauer sowie die anatomischen Regionen der Metastasen als primäre prognostische Faktoren (163). Coit fasste folgende prognostische Faktoren als günstig zusammen: längeres rezidivfreies Intervall, eine Metastasierungsregion, komplette Resektion und fehlender Organbefall (164). Patienten mit isolierten, nicht viszeralen Metastasen hatten die beste Prognose, wohingegen Patienten mit viszeralen Metastasen (plus oder minus nicht viszerale Metastasen) einen schlechteren Verlauf zeigten (mittleres Überleben 8 Monate versus 3 Monate; 1 Jahresüberleben 46% versus 18%). Deswegen scheinen diese Patienten eine Untergruppierung zu sein, die am meisten von einer Drahtmarkierung zur definitiven Entfernung ihrer solitären Metastasen profitieren könnten. Dies gilt besonders für tief subkutane in transit Metastasen oder solitäre

Rezidive von Lymphknotenmetastasen nach einer therapeutischen Lymphknotendissektion bei fehlendem Nachweis einer Fernmetastasierung.

Ein weiterer derzeit besonders interessanter Vorteil ist die sichere Beschaffung von patienteneigenem Tumormaterial zur Herstellung von autologen Vakzinen im Rahmen einer adjuvanten oder palliativen Vakzinierungstherapie. Hier könnten vor allem im Stadium III Patienten von einer adjuvanten spezifischen Immuntherapie profitieren.

In unserem Nachsorgeprotokoll dient der Ultraschall in erster Linie dazu, klinisch unauffällige, tatsächlich aber befallene Lymphknoten zu erkennen. Zweitens soll die Feinnadelpunktion als nicht invasive, zuverlässige Technik die nötige „Bestätigungsreaktion“ liefern, die ambulant kostengünstig durchführbar ist. Nach Auswertung unserer Nachsorgeprotokolle sind Lymphknotenmetastasen ab einer Größe von 3 mm schon erkennbar, ab 5 - 10 mm gelang es, sie sicher zu diagnostizieren. Auch in der Erkennung des Sentinel Nodes und der Aussage, ob dieser befallen ist oder nicht, tritt zunehmende Sicherheit mit steigenden Untersuchungszahlen auf, wodurch diese sonographisch oft benigne imponierenden, echoreicheren Punktionsziele der Feinnadeldiagnostik zuführbar werden.

8. Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist ein Tumor, der eine rasch steigende Inzidenz und auch Mortalität aufweist. Trotz verbesserter Chemo- und Immuntherapien sowie neuartiger Tumorstabilisierungstherapien ist die Prognose von Patienten im Stadium der Fernmetastasierung infaust. Daher gilt neben der Prävention die frühzeitige Exzision des Primärtumors in einem kurativen Stadium als Therapie der Wahl. Abhängig von der Tumordicke ist eine lymphogene oder hämatogene Metastasierung möglich. Die Metastasierung in die regionären Lymphknotenstationen ist die häufigste Metastasierungsart. Durch die Einführung der Weichteilsonographie der regionären Lymphknotenstationen wurde versucht, eine Verbesserung in der Diagnostik dieser Metastasen zu erreichen.

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeiten war es, die verschiedenen Muster, die sich in der sonographischen Abbildung von Lymphknoten ergeben, näher zu charakterisieren. So konnte schon durch die rein bildgebende Darstellung eine valide Differenzierung zwischen „benigne“ und „maligne“ ermöglicht werden. In einer großen prospektiven Studie ließ sich zeigen, dass die Früherkennung von Lymphknotenmetastasen zu einem verbesserten rezidivfreien und Gesamtüberleben der untersuchten Melanompatienten führte. Durch Kombination der Sonographie mit einer sonographiegesteuerten Feinnadelpunktion konnte eine hohe diagnostische Sicherheit im Erkennen von Melanommetastasen mit hoher Sensitivität und Spezifität bewiesen werden, die zudem noch eine minimal invasive Methode darstellt und im Falle von benignen Befunden die diagnostische Exstirpation erübrigt. Diese Diagnostik kann auf sehr kleine Ziele angewendet werden, wie auch beispielsweise den Sentinelnode als Bestandteil der Diagnostik nach Exzision des Primärtumors.

Sonographisch entdeckte Metastasen, die sich in einer sehr ungünstigen Position befinden, können mit Hilfe einer ultraschallgesteuerten Drahtmarkierung so gut gekennzeichnet werden, dass eine operative Resektion besser gelingt.

Mit dem Nachweis von Transskripten des Enzyms Tyrosinase im Blut mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion war eine grundsätzliche Möglichkeit beschrieben worden, eine lymphogene oder hämatogene Metastasierung schon auf Zellebene entdecken zu können. In unseren Arbeiten wird diese Methode eingesetzt, eine frühe Metastasierung des Lymphknotens mit dem Vorliegen weniger oder keiner maligner Zellen im Aspirat durch Kombination einer PCR aus dem Feinnadelaspirat als FNA-PCR zu ermöglichen. Dies ist auch schon als Frühdiagnostik aus dem Sentinel node möglich. Zusätzlich wurde der Wert der Tyrosinasebestimmungen aus dem peripheren Blut untersucht. Es ließ sich eine Zunahme der Prozentzahl an positiven Laborwerten mit steigendem klinischem Stadium nachweisen. Außerdem konnte an seriellen Untersuchungen derselben Stadium II und III Melanompatienten unter Einbeziehung einer langen Nachbeobachtungszeit gezeigt werden, dass die Tyrosinase-PCR Untersuchung aus dem peripheren Blut vor allen Dingen einen validen Marker für die Langzeitprognose der genannten Stadien darstellt und ein positives Ergebnis mit einer deutlichen Verschlechterung des krankheitspezifischen Überlebens einhergeht.

Eine Alternative zur Tyrosinasebestimmung aus dem peripheren Blut bietet die Bestimmung des Tumormarkers MIA, insbesondere zur Verlaufskontrolle von disseminierten Stadien eines Melanoms unter Therapie. Eine Untersuchung an einem großen Kollektiv von Melanompatienten befindet sich derzeit in statistischer Auswertung.

Die Arbeit führt, gestützt auf die Literatur und eigene Untersuchungen, zu neuen Einsichten und Konzepten in der Melanomnachsorge und der Früherkennung von

Rezidiven. Ein umfassendes Verständnis dieser Möglichkeiten ist vielleicht entscheidend für den richtigen Zeitpunkt einer therapeutischen Entscheidung.

9. Als Bestandteil der Habilitationsschrift eingereichte Publikationen

- Keilholz U, Willhauck M, Rimoldi D, Brasseur F, Dummer D, Rass K, de Vries T, Blaheta J, Voit C, Lethé B, S Burchill: Reliability of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) – assays for the detection of circulating tumour cells: a quality assurance initiative of the EORTC Melanoma Cooperative Group. *Eur J Cancer* 34:750-753, 1998
- Voit C, Schoengen A, Weber L, Proebstle T: Identification of melanoma metastases by tyrosinase - reverse transcription - polymerase chain reaction of fine needle aspirates. *J Am Acad Dermatol* 39:1030-1032, 1998
- Voit C, Schoengen A, Schwürzer M, Weber L, Mayer T, Proebstle TM: Detection of regional melanoma metastases by ultrasound B-scan, cytology or tyrosinase RT-PCR of fine needle aspirates. *Brit J Cancer* 80(10): 1672-1677, 1999
- Proebstle TM, Jiang W, Högel J, Keilholz U, Weber L, Voit C: Correlation of positive RT-PCR for tyrosinase in peripheral blood of malignant melanoma patients with clinical stage, survival and other risk factors. *Brit J Cancer* 82(1):118-123, 2000
- Voit C, Mayer T, Proebstle TM, Weber L, Kron M, Krupiński M, Zeelen U, Sterry W, Schoengen A: Ultrasound guided fine needle aspiration cytology (FNAC) in the early detection of melanoma metastases. *Cancer* 90(3):186-193, 2000
- Voit C, Mayer T, Proebstle TM, Schwürzer-Voit M, Weber L, Sterry W, Schoengen A: Stellenwert von Ultraschallnachsorge mit ultraschallgesteuerter Feinnadelaspirationszytologie (FNAC) bei Patienten mit malignem Melanom. *Ultraschall in Med* 21:218-222, 2000
- Voit C, Proebstle TM, Winter H, Kimmritz J, Sterry W, Schwürzer M: Presurgical Ultrasound Guided Wire Marking of Malignant Melanoma Metastases in Stage III Patients. *Dermatol Surg* ;27:129-132, 2001
- Voit C, Mayer T, Kron M, Schoengen A, Sterry W, Weber L, Proebstle TM: Efficacy of Ultrasound B-scan compared to Physical Examination in Follow-Up of Melanoma Patients. *Cancer* ;91:2409-2416, 2001

Review:

J. Ulrich, C.Voit: Ultrasound in Dermatology; Part II: Ultrasound of Regionary lymph nodes and subcutaneous tumors. Eur J of Dermatol 2001; 11:73-79

Voit C, Schoengen A, Schwürzer-Voit M, Weber L, Sterry W, Proebstle TM: The Part of Ultrasound in Detection and Management of Regional Disease in Melanoma Patients. Semin Oncol 2002 Aug;29(4):353-60

10. Literatur

1. Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer statistics, 1995. *CA Cancer J.Clin.* 1995;45:8-30.
2. Berwick M. Epidemiology: Current trends, risk factors, and environmental concerns. Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S-J, and editors. *Cutaneous melanoma: Clinical Management and Treatment Results Worldwide.* (ed 3), 11-35. 1998. St.Louis, Missouri, Quality Medical Publishing.
3. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann.Surg.* 1970;172:902-8.
4. Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969;29:705-27.
5. Orfanos CE, Jung EG, Rassner G, Wolff HH, Garbe C. [Position and recommendations of the Malignant Melanoma Committee of the German Society of Dermatology on diagnosis, treatment and after- care of malignant melanoma of the skin. Status 1993/94]. *Hautarzt* 1994;45:285-91.
6. Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID et al. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer* 2000;88:1484-91.
7. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J.Clin.Oncol.* 2001;19:3622-34.
8. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for

- cutaneous melanoma. *J.Clin.Oncol.* 2001;19:3635-48.
9. Brown CD, Zitelli JA. The prognosis and treatment of true local cutaneous recurrent malignant melanoma. *Dermatol.Surg.* 1995;21:285-90.
 10. Fusi S, Ariyan S, Sternlicht A. Data on first recurrence after treatment for malignant melanoma in a large patient population. *Plast.Reconstr.Surg.* 1993;91:94-8.
 11. Ames FC, Balch CM, and Reintgen, D. Local recurrences and their management. Balch CM, Houghton AN, and Milton GW, et al eds. *Cutaneous Melanoma*. 2nd edition. 287-294. 1992. Philadelphia, JB Lippincott.
 12. Urist MM, Balch CM, Soong S, Shaw HM, Milton GW, Maddox WA. The influence of surgical margins and prognostic factors predicting the risk of local recurrence in 3445 patients with primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1985;55:1398-402.
 13. Singletary SE, Tucker SL, Boddie AW, Jr. Multivariate analysis of prognostic factors in regional cutaneous metastases of extremity melanoma. *Cancer* 1988;61:1437-40.
 14. Cascinelli N, Bufalino R, Marolda R, Belli F, Nava M, Galluzzo D et al. Regional non-nodal metastases of cutaneous melanoma. *Eur.J.Surg.Oncol.* 1986;12:175-80.
 15. Karakousis CP, Moore R, Holyoke ED. Surgery in recurrent malignant melanoma. *Cancer* 1983;52:1342-5.

16. Roses DF, Harris MN, Rigel D, Carrey Z, Friedman R, Kopf AW. Local and in-transit metastases following definitive excision for primary cutaneous malignant melanoma. *Ann.Surg.* 1983;198:65-9.
17. Buzzell RA, Zitelli JA. Favorable prognostic factors in recurrent and metastatic melanoma. *J.Am.Acad.Dermatol.* 1996;34:798-803.
18. Balch CM, Soong SJ, Bartolucci AA, Urist MM, Karakousis CP, Smith TJ et al. Efficacy of an elective regional lymph node dissection of 1 to 4 mm thick melanomas for patients 60 years of age and younger. *Ann.Surg.* 1996;224:255-63.
19. Balch CM, Cascinelli, N., Sim, F. H., and et al. Elective Lymph Node Dissection:Results of Prospective Randomized Trials. Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, and et al.eds. *Cutaneous Melanoma: Clinical Management and Results Worldwide.* (3 rd edition), 209-225. 1998. St.Louis, MO, Quality Medical Publishing.
20. Balch CM, Soong S-J, and Shaw, H. M. An Ananalysis of prognostic Factors in 8500 Patients with Cutaneous Melanoma. Balch CM, Houghton AN, Milton, G. W., and et al.eds. *Cutaneous Melanoma: Clinical Management and Treatment Results Worldwide (ed 2).* 165-187. 1992. Philadelphia, Lippincott.
21. Habal N, Giuliano AE, Morton DL. The use of sentinel lymphadenectomy to identify candidates for postoperative adjuvant therapy of melanoma and breast cancer. *Semin.Oncol.* 2001;28:41-52.

22. 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.* 1991;214:491-9.
23. Veronesi U, Adamus J, Bandiera DC, Brennhovd O, Caceres E, Cascinelli N et al. Delayed regional lymph node dissection in stage I melanoma of the skin of the lower extremities. *Cancer* 1982;49:2420-30.
24. Sim FH, Taylor WF, Ivins JC, Pritchard DJ, Soule EH. A prospective randomized study of the efficacy of routine elective lymphadenectomy in management of malignant melanoma. Preliminary results. *Cancer* 1978;41:948-56.
25. Wong JH, Cagle LA, Morton DL. Lymphatic drainage of skin to a sentinel lymph node in a feline model. *Ann.Surg.* 1991;214:637-41.
26. Cochran AJ, Wen DR, Morton DL. Management of the regional lymph nodes in patients with cutaneous malignant melanoma. *World J.Surg.* 1992;16:214-21.
27. Morton DL, Wen DR, Foshag LJ, Essner R, Cochran A. Intraoperative lymphatic mapping and selective cervical lymphadenectomy for early-stage melanomas of the head and neck. *J.Clin.Oncol.* 1993;11:1751-6.
28. Catalona WJ. Role of lymphadenectomy in carcinoma of the penis. *Urol.Clin.North Am.* 1980;7:785-92.
29. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch.Surg.* 1992;127:392-9.

30. Leong SP, Steinmetz I, Habib FA, McMillan A, Gans JZ, Allen RE, Jr. et al. Optimal selective sentinel lymph node dissection in primary malignant melanoma. *Arch.Surg.* 1997;132:666-72.
31. Krag DN, Meijer SJ, Weaver DL, Loggie BW, Harlow SP, Tanabe KK et al. Minimal-access surgery for staging of malignant melanoma. *Arch.Surg.* 1995;130:654-8.
32. Albertini JJ, Cruse CW, Rapaport D, Wells K, Ross M, DeConti R et al. Intraoperative radio-lympho-scintigraphy improves sentinel lymph node identification for patients with melanoma. *Ann.Surg.* 1996;223:217-24.
33. Lukowsky A, Bellmann B, Ringk A, Winter H, Audring H, Fenske S et al. Detection of melanoma micrometastases in the sentinel lymph node and in nonsentinel nodes by tyrosinase polymerase chain reaction. *J.Invest Dermatol.* 1999;113:554-9.
34. Porter GA, Ross MI, Berman RS, Sumner WE, III, Lee JE, Mansfield PF et al. How many lymph nodes are enough during sentinel lymphadenectomy for primary melanoma? *Surgery* 2000;128:306-11.
35. Blaheta HJ, Schitteck B, Breuninger H, Garbe C. Detection of micrometastasis in sentinel lymph nodes of patients with primary cutaneous melanoma. *Recent Results Cancer Res.* 2001;158:137-46.
36. Blaheta HJ, Schitteck B, Breuninger H, Sotlar K, Ellwanger U, Thelen MH et al. Detection of melanoma micrometastasis in sentinel nodes by reverse transcription-polymerase chain reaction correlates with tumor thickness and is predictive of micrometastatic disease in the lymph node basin. *Am.J.Surg.Pathol.* 1999;23:822-8.

37. Bostick PJ, Morton DL, Turner RR, Huynh KT, Wang HJ, Elashoff R et al. Prognostic significance of occult metastases detected by sentinel lymphadenectomy and reverse transcriptase-polymerase chain reaction in early-stage melanoma patients. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:3238-44.
38. Palmieri G, Pirastu M, Strazzullo M, Ascierto PA, Satriano SM, Motti ML et al. Clinical significance of PCR-positive mRNA markers in peripheral blood and regional nodes of malignant melanoma patients. Melanoma Cooperative Group. *Recent Results Cancer Res.* 2001;158:200-3.
39. Feun LG, Gutterman J, Burgess MA, Hersh EM, Mavligit G, McBride CM et al. The natural history of resectable metastatic melanoma (Stage IVA melanoma). *Cancer* 1982;50:1656-63.
40. Wong JH, Skinner KA, Kim KA, Foshag LJ, Morton DL. The role of surgery in the treatment of nonregionally recurrent melanoma. *Surgery* 1993;113:389-94.
41. Wornom IL, III, Smith JW, Soong SJ, McElvein R, Urist MM, Balch CM. Surgery as palliative treatment for distant metastases of melanoma. *Ann.Surg.* 1986;204:181-5.
42. Ryan L, Kramar A, Borden E. Prognostic factors in metastatic melanoma. *Cancer* 1993;71:2995-3005.
43. Ollila DW, Hsueh EC, Stern SL, Morton DL. Metastasectomy for recurrent stage IV melanoma. *J.Surg.Oncol.* 1999;71:209-13.
44. Agrawal S, Yao TJ, Coit DG. Surgery for melanoma metastatic to the gastrointestinal tract. *Ann.Surg.Oncol.* 1999;6:336-44.

45. Keilholz U, Conradt C, Legha SS, Khayat D, Scheibenbogen C, Thatcher N et al. Results of interleukin-2-based treatment in advanced melanoma: a case record-based analysis of 631 patients. *J.Clin.Oncol.* 1998;*16*:2921-9.
46. Lakhani S, Selby P, Bliss JM, Perren TJ, Gore ME, McElwain TJ. Chemotherapy for malignant melanoma: combinations and high doses produce more responses without survival benefit. *Br.J.Cancer* 1990;*61*:330-4.
47. Keilholz U, Eggermont AM. The emerging role of cytokines in the treatment of advanced melanoma. For the EORTC Melanoma Cooperative Group. *Oncology* 2000;*58*:89-95.
48. Reintgen D, Kirkwood J. The adjuvant treatment of malignant melanoma. *J.Fla.Med.Assoc.* 1997;*84*:147-52.
49. Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J.Clin.Oncol.* 1996;*14*:7-17.
50. Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sosman JA, Sondak VK, Agarwala SS, Ernstoff MS et al. High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. *J.Clin.Oncol.* 2001;*19*:2370-80.
51. Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, Richards J, Flaherty LE, Ernstoff MS et al. High- and low-dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J.Clin.Oncol.* 2000;*18*:2444-58.

52. Orfanos CE, Jung EG, Rassner G, Wolff HH, Garbe C. [Position and recommendations of the Malignant Melanoma Committee of the German Society of Dermatology on diagnosis, treatment and after-care of malignant melanoma of the skin. Status 1993/94]. *Hautarzt* 1994;45:285-91.
53. Avril MF, Nguyen T, Duvillard P, Bognel C, Margulis A. [Late recurrence of melanoma beyond 10 years]. *Ann.Dermatol.Venereol.* 1994;121:454-8.
54. Moloney DM, Gordon DJ, Briggs JC, Rigby HS. Recurrence of thin melanoma: how effective is follow-up? *Br.J.Plast.Surg.* 1996;49:409-13.
55. Basseres N, Grob JJ, Richard MA, Thirion X, Zarour H, Noe C et al. Cost-effectiveness of surveillance of stage I melanoma. A retrospective appraisal based on a 10-year experience in a dermatology department in France. *Dermatology* 1995;191:199-203.
56. Kersey PA, Iscoe NA, Gapski JA, Osoba D, From L, DeBoer G et al. The value of staging and serial follow-up investigations in patients with completely resected, primary, cutaneous malignant melanoma. *Br.J.Surg.* 1985;72:614-7.
57. Baughan CA, Hall VL, Leppard BJ, Perkins PJ. Follow-up in stage I cutaneous malignant melanoma: an audit. *Clin.Oncol.(R.Coll.Radiol.)* 1993;5:174-80.
58. Dicker TJ, Kavanagh GM, Herd RM, Ahmad T, McLaren KM, Chetty U et al. A rational approach to melanoma follow-up in patients with primary cutaneous melanoma. Scottish Melanoma Group. *Br.J.Dermatol.* 1999;140:249-54.
59. Johnson RC, Fenn NJ, Horgan K, Mansel RE. Follow-up of patients with a thin melanoma. *Br.J.Surg.* 1999;86:619-21.

60. Kittler H, Weitzdorfer R, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Compliance with follow-up and prognosis among patients with thin melanomas. *Eur.J.Cancer* 2001;37:1504-9.
61. Garbe, C. Melanoma Diagnostics and Follow-up. 76, 514. 2001. *Z Hautkr* 76, 513-535.
62. Poo-Hwu WJ, Ariyan S, Lamb L, Papac R, Zelterman D, Hu GL et al. Follow-up recommendations for patients with American Joint Committee on Cancer Stages I-III malignant melanoma. *Cancer* 1999;86:2252-8.
63. Blessing C, Feine U, Geiger L, Carl M, Rassner G, Fierlbeck G. Positron emission tomography and ultrasonography. A comparative retrospective study assessing the diagnostic validity in lymph node metastases of malignant melanoma. *Arch.Dermatol.* 1995;131:1394-8.
64. Miller EJ, Daly JM, Synnestvedt M, Schultz D, Elder D, Guerry D. Loco-regional nodal relapse in melanoma. *Surg.Oncol.* 1992;1:333-40.
65. Buzaid AC, Tinoco LA, Jendiroba D, Tu ZN, Lee JJ, Legha SS et al. Prognostic value of size of lymph node metastases in patients with cutaneous melanoma. *J.Clin.Oncol.* 1995;13:2361-8.
66. Prayer L, Winkelbauer H, Gritzmann N, Winkelbauer F, Helmer M, Pehamberger H. Sonography versus palpation in the detection of regional lymph-node metastases in patients with malignant melanoma. *Eur.J.Cancer* 1990;26:827-30.
67. Binder M, Kittler H, Steiner A, Dorffner R, Wolff K, Pehamberger H. Lymph node sonography versus palpation for detecting recurrent disease in patients with malignant melanoma. *Eur.J.Cancer* 1997;33:1805-8.

68. Nazarian LN, Alexander AA, Rawool NM, Kurtz AB, Maguire HC, Mastrangelo MJ. Malignant melanoma: impact of superficial US on management. *Radiology* 1996;199:273-7.
69. Rossi CR, Seno A, Vecchiato A, Foletto M, Tregnaghi A, De Candia A et al. The impact of ultrasound scanning in the staging and follow-up of patients with clinical stage I cutaneous melanoma. *Eur.J.Cancer* 1997;33:200-3.
70. Voit C, Mayer T, Proebstle TM, Weber L, Kron M, Krupienski M et al. Ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology in the early detection of melanoma metastases. *Cancer* 2000;90:186-93.
71. Voit C, Mayer T, Kron M, Schoengen A, Sterry W, Weber L et al. Efficacy of ultrasound B-scan compared with physical examination in follow-up of melanoma patients. *Cancer* 2001;91:2409-16.
72. Jemec GB, Gniadecka M, Ulrich J. Ultrasound in dermatology. Part I. High frequency ultrasound. *Eur.J.Dermatol.* 2000;10:492-7.
73. Ulrich J, Voit C. Ultrasound in dermatology. Part II. Ultrasound of regional lymph node basins and subcutaneous tumours. *Eur.J.Dermatol.* 2001;11:73-9.
74. Vassallo P, Wernecke K, Roos N, Peters PE. Differentiation of benign from malignant superficial lymphadenopathy: the role of high-resolution US. *Radiology* 1992;183:215-20.
75. Alexander AA, Nazarian LN, Capuzzi DM, Jr., Rawool NM, Kurtz AB, Mastrangelo MJ. Color Doppler sonographic detection of tumor flow in superficial melanoma metastases: histologic correlation. *J.Ultrasound Med.* 1998;17:123-6.

76. Nazarian LN, Alexander AA, Kurtz AB, Capuzzi DM, Jr., Rawool NM, Gilbert KR et al. Superficial melanoma metastases: appearances on gray-scale and color Doppler sonography. *AJR Am.J.Roentgenol.* 1998;170:459-63.
77. Vassallo P, Edel G, Roos N, Naguib A, Peters PE. In-vitro high-resolution ultrasonography of benign and malignant lymph nodes. A sonographic-pathologic correlation. *Invest Radiol.* 1993;28:698-705.
78. Fornage BD, Deshayes JL. Ultrasound of normal skin. *J.Clin.Ultrasound* 1986;14:619-22.
79. Wu CH, Hsu MM, Chang YL, Hsieh FJ. Vascular pathology of malignant cervical lymphadenopathy: qualitative and quantitative assessment with power Doppler ultrasound. *Cancer* 1998;83:1189-96.
80. Moehrle M, Blum A, Rassner G, Juenger M. Lymph node metastases of cutaneous melanoma: diagnosis by B-scan and color Doppler sonography. *J.Am.Acad.Dermatol.* 1999;41:703-9.
81. Voit C, Schoengen A, Weber L, Proebstle T. Identification of melanoma metastases by tyrosinase-reverse transcription-polymerase chain reaction of fine needle aspirates. *J.Am.Acad.Dermatol.* 1998;39:1030-2.
82. Voit C, Mayer T, Proebstle T, Schwurzer-Voit M, Kron M, Weber L et al. [Ultrasound-guided fine needle aspiration cytology (FNAC) of unclear lesions in melanoma patients]. *Ultraschall Med.* 2000;21:218-22.
83. Miyauchi S, Tada M, Miki Y. Echographic evaluation of nodular lesions of the skin. *J.Dermatol.* 1983;10:221-7.

84. Nessi R, Betti R, Bencini PL, Crosti C, Blanc M, Uslenghi C. Ultrasonography of nodular and infiltrative lesions of the skin and subcutaneous tissues. *J.Clin.Ultrasound* 1990;18:103-9.
85. Blum A, Schlagenhauff B, Stroebel W, Breuninger H, Rassner G, Garbe C. Ultrasound examination of regional lymph nodes significantly improves early detection of locoregional metastases during the follow-up of patients with cutaneous melanoma: results of a prospective study of 1288 patients. *Cancer* 2000;88:2534-9.
86. S.R.Orell, G.F.Sterrett, M.N-I.Walters, and D.Whitaker. *Manual and Atlas of Fine Needle Aspiration Cytology*. 2nd ed. 1992. Churchill Livingstone Inc., 650 Avenue of the Americas, New York, N.Y. 10011, Churchill Livingstone.
87. Perry MD, Seigler HF, Johnston WW. Diagnosis of metastatic malignant melanoma by fine needle aspiration biopsy: a clinical and pathologic correlation of 298 cases. *J.Natl.Cancer Inst.* 1986;77:1013-21.
88. Basler GC, Fader DJ, Yahanda A, Sondak VK, Johnson TM. The utility of fine needle aspiration in the diagnosis of melanoma metastatic to lymph nodes. *J.Am.Acad.Dermatol.* 1997;36:403-8.
89. Fornage BD, Lorigan JG. Sonographic detection and fine-needle aspiration biopsy of nonpalpable recurrent or metastatic melanoma in subcutaneous tissues. *J.Ultrasound Med.* 1989;8:421-4.
90. Layfield LJ, Ostrzega N. Fine needle aspirate smear morphology in metastatic melanoma. *Acta Cytol.* 1989;33:606-12.

91. Schoengen, A., Binder T, Schiffelholz W, Schulz PC, and Zeelen, U. Fine-needle aspiration guided by ultrasound in suspected cancer. *17*, 420-426. 1994. *Onkologie*.
92. Schoengen A, Binder T, Faiss S, Weber L, Zeelen U. [Fine needle aspiration cytology of metastatic malignant melanoma. Improvement of results with ultrasound control]. *Hautarzt* 1993;*44*:703-7.
93. Binder T, Swobodnik W, Wechsler JG, Loschinger K, Eckert E, Schoengen A et al. [Ultrasound guided fine- and coarse-needle puncture of the abdominal and retroperitoneal space]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 1987;*113*:43-8.
94. Binder T. Feinnadelaspirationszytologie: Verbesserte Punktionstechnik mit einem neuen Aspirationsgerät. *8*, 36-39. 1987. *Tumor in Diagnostik und Therapie*.
95. Smith EH. Complications of percutaneous abdominal fine-needle biopsy. *Review. Radiology* 1991;*178*:253-8.
96. Engzell U, Esposti PL, Rubio C, Sigurdson A, Zajicek J. Investigation on tumour spread in connection with aspiration biopsy. *Acta Radiol.Ther.Phys.Biol.* 1971;*10*:385-98.
97. Fornari F, Civardi G, Cavanna L, Di Stasi M, Rossi S, Sbolli G et al. Complications of ultrasonically guided fine-needle abdominal biopsy. Results of a multicenter Italian study and review of the literature. The Cooperative Italian Study Group. *Scand.J.Gastroenterol.* 1989;*24*:949-55.
98. von Schreeb T, Arner O, Skovsted G, Wikstad N. Renal adenocarcinoma. Is there a risk of spreading tumour cells in diagnostic puncture? *Scand.J.Urol.Nephrol.* 1967;*1*:270-6.

99. Voit C, Schoengen A, Schwurzer M, Weber L, Mayer T, Proebstle TM. Detection of regional melanoma metastases by ultrasound B-scan, cytology or tyrosinase RT-PCR of fine-needle aspirates. *Br.J.Cancer* 1999;*80*:1672-7.
100. Voit, C. and Kron M, Mayer T Proebstle TM Schwürzer-Voit M Weber L Mooser G Zeelen U Sterry W Schoengen A. Ultrasound Guided Fine Needle Aspiration Cytology (FNAC) for early Verification of Melanoma. *20(1)*, 360a. 2001. *Proc Am Soc Clin Oncol, J Clin Oncol*.
101. Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991;*338*:1227-9.
102. Schwurzer-Voit M, Proebstle TM, Sterry W. Identification of lymph node metastases by use of polymerase chain reaction (PCR) in melanoma patients. *Eur.J.Cancer* 1996;*32A*:264-8.
103. Panelli MC, Riker A, Kammula U, Wang E, Lee KH, Rosenberg SA et al. Expansion of tumor-T cell pairs from fine needle aspirates of melanoma metastases. *J.Immunol.* 2000;*164*:495-504.
104. Kahle B, Hoffend J, Hartschuh W, Petzoldt D. [Ultrasound imaging of the sentinel lymph node in malignant melanoma]. *Hautarzt* 2000;*51*:915-9.
105. Bossi MC, Sanvito S, Lovati E, De Fiori E, Testori A, Bellomi M. Role of high resolution color-Doppler US of the sentinel node in patients with stage I melanoma. *Radiol.Med.(Torino)* 2001;*102*:357-62.
106. Willhauck M, Vogel S, Keilholz U. Internal control for quality assurance of diagnostic RT-PCR. *Biotechniques* 1998;*25*:656-9.

107. Rodrigues LK, Habib FA, Wilson M, Turek L, Kerlan RK, Leong SP. Resection of metastatic melanoma following wire localization guided by computed tomography or ultrasound. *Melanoma Res.* 1999;9:595-8.
108. Voit C, Proebstle TM, Winter H, Kimmritz J, Kron M, Sterry W et al. Presurgical ultrasound-guided anchor-wire marking of soft tissue metastases in stage III melanoma patients. *Dermatol.Surg.* 2001;27:129-32.
109. Brossart P, Keilholz U, Scheibenbogen C, Mohler T, Willhauck M, Hunstein W. Detection of residual tumor cells in patients with malignant melanoma responding to immunotherapy. *J.Immunother.* 1994;15:38-41.
110. Ghossein RA, Carusone L, Bhattacharya S. Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in melanoma prostatic and breast carcinomas. *In Vivo* 2000;14:237-50.
111. Kwon BS, Haq AK, Pomerantz SH, Halaban R. Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987;84:7473-7.
112. Ponnazhagan S, Hou L, Kwon BS. Structural organization of the human tyrosinase gene and sequence analysis and characterization of its promoter region. *J.Invest Dermatol.* 1994;102:744-8.
113. Muller G, Ruppert S, Schmid E, Schutz G. Functional analysis of alternatively spliced tyrosinase gene transcripts. *EMBO J.* 1988;7:2723-30.
114. Brossart P, Keilholz U, Willhauck M, Scheibenbogen C, Mohler T, Hunstein W. Hematogenous spread of malignant melanoma cells in different stages of disease. *J.Invest Dermatol.* 1993;101:887-9.

115. Glaser R, Rass K, Seiter S, Hauschild A, Christophers E, Tilgen W. Detection of circulating melanoma cells by specific amplification of tyrosinase complementary DNA is not a reliable tumor marker in melanoma patients: a clinical two-center study. *J.Clin.Oncol.* 1997;15:2818-25.
116. Buzaid AC, Balch CM. Polymerase chain reaction for detection of melanoma in peripheral blood: too early to assess clinical value. *J.Natl.Cancer Inst.* 1996;88:569-70.
117. Alao JP, Mohammed MQ, Slade MJ, Retsas S. Detection of tyrosinase mRNA by RT-PCR in the peripheral blood of patients with advanced metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 1999;9:395-9.
118. Foss AJ, Guille MJ, Occeleston NL, Hykin PG, Hungerford JL, Lightman S. The detection of melanoma cells in peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Br.J.Cancer* 1995;72:155-9.
119. Keilholz U, Willhauck M, Rimoldi D, Brasseur F, Dummer W, Rass K et al. Reliability of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)- based assays for the detection of circulating tumour cells: a quality- assurance initiative of the EORTC Melanoma Cooperative Group. *Eur.J.Cancer* 1998;34:750-3.
120. Blaheta HJ, Schitteck B, Breuninger H, Maczey E, Kroeber S, Sotlar K et al. Lymph node micrometastases of cutaneous melanoma: increased sensitivity of molecular diagnosis in comparison to immunohistochemistry. *Int.J.Cancer* 1998;79:318-23.

121. van d, V, Schipper ME, de Weger RA, Hennipman A, Borel R, I. Sentinel node biopsies in melanoma patients: a protocol for accurate, efficient, and cost-effective analysis by preselection for immunohistochemistry on the basis of Tyr-PCR. *Ann.Surg.Oncol.* 2000;7:51-4.
122. Carl M, Stroebel W, Rassner G, Garbe C. [The difficulty of ultrasound diagnosis of lymph node metastases of malignant melanoma in protracted tumor growth]. *Hautarzt* 1997;48:234-9.
123. Battayani Z, Grob JJ, Xerri L, Noe C, Zarour H, Houvaeneghel G et al. Polymerase chain reaction detection of circulating melanocytes as a prognostic marker in patients with melanoma. *Arch.Dermatol.* 1995;131:443-7.
124. Ghossein RA, Coit D, Brennan M, Zhang ZF, Wang Y, Bhattacharya S et al. Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow tyrosinase messenger RNA in malignant melanoma. *Clin.Cancer Res.* 1998;4:419-28.
125. Curry BJ, Myers K, Hersey P. Polymerase chain reaction detection of melanoma cells in the circulation: relation to clinical stage, surgical treatment, and recurrence from melanoma. *J.Clin.Oncol.* 1998;16:1760-9.
126. Ghossein RA, Bhattacharya S, Coit DG. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of melanoma-related transcripts in the peripheral blood and bone marrow of patients with malignant melanoma. What have we learned? *Recent Results Cancer Res.* 2001;158:63-77.
127. Kunter U, Buer J, Probst M, Duensing S, Dallmann I, Grosse J et al. Peripheral blood tyrosinase messenger RNA detection and survival in malignant melanoma. *J.Natl.Cancer Inst.* 1996;88:590-4.

128. van d, V, Roijers JF, Bouwens-Rombouts A, de Weger RA, De Graaf PW, Tilanus MG et al. Molecular test for the detection of tumor cells in blood and sentinel nodes of melanoma patients. *Am.J.Pathol.* 1996;*149*:759-64.
129. Hoon DS, Wang Y, Dale PS, Conrad AJ, Schmid P, Garrison D et al. Detection of occult melanoma cells in blood with a multiple-marker polymerase chain reaction assay. *J.Clin.Oncol.* 1995;*13*:2109-16.
130. Proebstle TM, Jiang W, Hogel J, Keilholz U, Weber L, Voit C. Correlation of positive RT-PCR for tyrosinase in peripheral blood of malignant melanoma patients with clinical stage, survival and other risk factors. *Br.J.Cancer* 2000;*82*:118-23.
131. Mellado B, Colomer D, Castel T, Munoz M, Carballo E, Galan M et al. Detection of circulating neoplastic cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in malignant melanoma: association with clinical stage and prognosis. *J.Clin.Oncol.* 1996;*14*:2091-7.
132. Pittman K, Burchill S, Smith B, Southgate J, Joffe J, Gore M et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for expression of tyrosinase to identify malignant melanoma cells in peripheral blood. *Ann.Oncol.* 1996;*7*:297-301.
133. Jung FA, Buzaid AC, Ross MI, Woods KV, Lee JJ, Albitar M et al. Evaluation of tyrosinase mRNA as a tumor marker in the blood of melanoma patients. *J.Clin.Oncol.* 1997;*15*:2826-31.
134. Farthmann B, Eberle J, Krasagakis K, Gstottner M, Wang N, Bisson S et al. RT-PCR for tyrosinase-mRNA-positive cells in peripheral blood: evaluation strategy and correlation with known prognostic markers in 123 melanoma patients. *J.Invest Dermatol.* 1998;*110*:263-7.
135. Mellado B, Gutierrez L, Castel T, Colomer D, Fontanillas M, Castro J et al. Prognostic significance of the detection of circulating malignant cells by

- reverse transcriptase-polymerase chain reaction in long-term clinically disease-free melanoma patients. *Clin.Cancer Res.* 1999;*5*:1843-8.
136. Curry BJ, Myers K, Hersey P. Utility of tests for circulating melanoma cells in identifying patients who develop recurrent melanoma. *Recent Results Cancer Res.* 2001;*158*:211-30.
137. Hoon DS, Bostick P, Kuo C, Okamoto T, Wang HJ, Elashoff R et al. Molecular markers in blood as surrogate prognostic indicators of melanoma recurrence. *Cancer Res.* 2000;*60*:2253-7.
138. Reinhold U, Ludtke-Handjery HC, Schnautz S, Kreysel HW, Abken H. The analysis of tyrosinase-specific mRNA in blood samples of melanoma patients by RT-PCR is not a useful test for metastatic tumor progression. *J.Invest Dermatol.* 1997;*108*:166-9.
139. Hoon DS, Kuo CT, Wascher RA, Fournier P, Wang HJ, O'Day SJ. Molecular detection of metastatic melanoma cells in cerebrospinal fluid in melanoma patients. *J.Invest Dermatol.* 2001;*117*:375-8.
140. Bystryn JC, Albrecht J, Reynolds SR, Rivas MC, Oratz R, Shapiro RL et al. Decrease in circulating tumor cells as an early marker of therapy effectiveness. *Recent Results Cancer Res.* 2001;*158*:204-7.
141. Voit, C. Long Term Survival of stage II and III melanoma patients with respect to Serial Tyrosinase RT-PCR testing in peripheral blood . M.Kron, M. Schwürzer-Voit L. Weber W. Sterry T. M. Proebstle. 1-5-2002.

142. Bogdahn U, Apfel R, Hahn M, Gerlach M, Behl C, Hoppe J et al. Autocrine tumor cell growth-inhibiting activities from human malignant melanoma. *Cancer Res.* 1989;*49*:5358-63.
143. Blesch A, Bosserhoff AK, Apfel R, Behl C, Hessdoerfer B, Schmitt A et al. Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. *Cancer Res.* 1994;*54*:5695-701.
144. Bosserhoff AK, Kaufmann M, Kaluza B, Bartke I, Zirngibl H, Hein R et al. Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res.* 1997;*57*:3149-53.
145. Bosserhoff AK, Hauschild A, Hein R, Schadendorf D, Stockflesh E, Bogenrieder T et al. Elevated MIA serum levels are of relevance for management of metastasized malignant melanomas: results of a German multicenter study. *J.Invest Dermatol.* 2000;*114*:395-6.
146. Schaller UC, Mueller AJ, Bosserhoff AK, Haraida S, Lohrs U, Buettner R et al. [Melanoma inhibitory activity (MIA). Evaluation of a new tumor- associated antigen as a serum marker for uveal melanomas]. *Ophthalmologe* 2000;*97*:429-32.
147. Bosserhoff AK, Moser M, Hein R, Landthaler M, Buettner R. In situ expression patterns of melanoma-inhibiting activity (MIA) in melanomas and breast cancers. *J.Pathol.* 1999;*187*:446-54.
148. Stahlecker J, Gauger A, Bosserhoff A, Buttner R, Ring J, Hein R. MIA as a reliable tumor marker in the serum of patients with malignant melanoma. *Anticancer Res.* 2000;*20*:5041-4.

149. Bosserhoff AK, Dreau D, Hein R, Landthaler M, Holder WD, Buettner R. Melanoma inhibitory activity (MIA), a serological marker of malignant melanoma. *Recent Results Cancer Res.* 2001;*158*:158-68.
150. Henze G, Dummer R, Joller-Jemelka HI, Boni R, Burg G. Serum S100--a marker for disease monitoring in metastatic melanoma. *Dermatology* 1997;*194*:208-12.
151. Juergensen A, Holzapfel U, Hein R, Stolz W, Buettner R, Bosserhoff A. Comparison of two prognostic markers for malignant melanoma: MIA and S100 beta. *Tumour.Biol.* 2001;*22*:54-8.
152. Djukanovic D, Hofmann U, Sucker A, Rittgen W, Schadendorf D. Comparison of S100 protein and MIA protein as serum marker for malignant melanoma. *Anticancer Res.* 2000;*20*:2203-7.
153. Wagner V, Rudi J, Naher H, Stremmel W. Seropositivity for MIA and S100 in patients with gastrointestinal carcinomas. *Med.Oncol.* 2000;*17*:35-8.
154. de Vries TJ, Fourkour A, Punt CJ, Diepstra H, Ruiter DJ, van Muijen GN. Melanoma-inhibiting activity (MIA) mRNA is not exclusively transcribed in melanoma cells: low levels of MIA mRNA are present in various cell types and in peripheral blood. *Br.J.Cancer* 1999;*81*:1066-70.
155. Deichmann M, Benner A, Bock M, Jackel A, Uhl K, Waldmann V et al. S100-Beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. *J.Clin.Oncol.* 1999;*17*:1891-6.

156. Reintgen D, Albertini J, Berman C, Cruse CW, Fenske N, Glass LF et al. Accurate Nodal Staging of Malignant Melanoma. *Cancer Control* 1995;2:405-14.
157. Cohen MH, Ketcham AS, Felix EL, Li SH, Tomaszewski MM, Costa J et al. Prognostic factors in patients undergoing lymphadenectomy for malignant melanoma. *Ann.Surg.* 1977;186:635-42.
158. Bevilacqua RG, Coit DG, Rogatko A, Younes RN, Brennan MF. Axillary dissection in melanoma. Prognostic variables in node-positive patients. *Ann.Surg.* 1990;212:125-31.
159. Balch CM, Soong SJ, Murad TM, Ingalls AL, Maddox WA. A multifactorial analysis of melanoma: III. Prognostic factors in melanoma patients with lymph node metastases (stage II). *Ann.Surg.* 1981;193:377-88.
160. Verbanck J, Vandewiele I, De Winter H, Tytgat J, Van Aelst F, Tanghe W. Value of axillary ultrasonography and sonographically guided puncture of axillary nodes: a prospective study in 144 consecutive patients. *J.Clin.Ultrasound* 1997;25:53-6.
161. van den Brekel MW, Pameijer FA, Koops W, Hilgers FJ, Kroon BB, Balm AJ. Computed tomography for the detection of neck node metastases in melanoma patients. *Eur.J.Surg.Oncol.* 1998;24:51-4.
162. Barth A, Wanek LA, Morton DL. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J.Am.Coll.Surg.* 1995;181:193-201.

163. Stadelmann WK, Rapaport DP, Soong S-J, Reintgen, DS., Buzaid, A. C., and Balch CM. Prognostic clinical and pathological features. Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S-J, and eds. Cutaneous Melanoma: Clinical Management and Treatment Results Worldwide. (3ed), 11-35. 1998. St. Louis, Missouri, Quality Medical Publishing.
164. Coit DG. Role of surgery for metastatic malignant melanoma: a review. *Semin.Surg.Oncol.* 1993;9:239-45.

Dank

Herrn Prof. Dr. Wolfram Sterry möchte ich aufrichtig danken. Als der Direktor der Hautkliniken in Ulm und der Charité in Berlin ermöglichte er mir die Ausübung meiner klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeit, die er durch großzügige Förderung, stete Anregung und positive Bestätigung über viele Jahre begleitete. Insbesondere möchte ich für die stetige Unterstützung meiner Person und meiner Familie danken und dafür, dass er immer Verständnis für familiäre Belange zeigte.

Herrn Prof. Dr. Lutz Weber schulde ich großen Dank dafür, mein Interesse für die Dermatologie geweckt und mir den klinischen Blick für diverse besondere Krankheitsbilder geöffnet zu haben sowie dafür, dass er meine Projekte stets vorbehaltlos unterstützt und gefördert hat und meine wissenschaftliche Karriere eingeleitet hat.

Besonderen Dank schulde ich auch Herrn Dr. Alfred Schoengen, dem Leiter der Hämatologie/Onkologie des Bundeswehrkrankenhauses Ulm, der mich für die Feinnadelaspirationszytologie begeisterte und mich in vielen lehrreichen Stunden über dem Mikroskop an die Materie herangeführt hat. Besonders danke ich ihm dafür, dass ich von ihm hoffentlich lernen konnte, mit wieviel Herz und Feingefühl er mit seinen onkologischen Patienten umgeht.

Aus derselben Arbeitsgruppe danke ich Frau Irma Loch und Herrn Dr. Thomas Mayer für die stets zuverlässige, freundliche und kompetente Auswertung aller ankommenden Problemstellungen und die Art, wie sie die viele zusätzliche Arbeit bedingt durch die Krebshilfestudie mühelos auf sich genommen haben.

Meine Dankbarkeit drücke ich allen Doktoranden, studentischen Hilfskräften, technischen Assistentinnen und Kollegen, die mit vollem Einsatz an meinen Projekten mitgearbeitet haben. Namentlich erwähnen möchte ich meine medizinisch

technische Assistentin, Frau Hannelore Willeken, meine Mitarbeiter an der Melanomdatenbank Frau Anne Kosse, Herrn Robert Elfers und Felix Gussmann sowie die Doktoranden Herr Felix Gussmann, Frau Susanne Bisold und Herr Andreas Fritsche (Doktoranden in einem Coprojekt mit OA Dr. Uwe Trefzer) und vor allen Dingen dem Doktoranden Herrn Gregor Schäfer, der mir durch seine ruhige und gewandte Mithilfe bei den klinischen Arbeiten am Krebshilfeprojekt größtmögliche Unterstützung und vor allen Dingen Spass am Arbeiten verschaffte.

Danken möchte ich auch meiner langjährigen Freundin und „Stütze“ in allen statistischen Fragen, Frau Dr. Martina Kron, Abteilung Biometrie und Medizinische Dokumentation der Universität Ulm, die es stets geschafft hat, auch aus der Ferne aus größten Datenbanken sinnvolle Statistik zu berechnen und mir diese Werte in logischer Weise näher bringen konnte. Ihre Mitarbeit hat auf stets freundschaftliche Weise zum Gelingen der diversen Projekte beigetragen.

Wichtig für mich waren stets auch die hilfreichen Kommentare und Anstöße durch Professor Dr. Ulrich Keilholz und PD Dr. Carmen Scheibenbogen, die mich beide durch ihre kompetente, freundliche und vor allem bescheidene Art immer wieder beeindruckten.

Danken möchte ich auch den Schwestern, vor allem denen der Poliklinik, die mir bewiesen haben, dass der gefürchtete Berliner Charme immer mit einer Portion Herz verbunden ist.

Vor allem danken möchte ich auch meinen beiden Mitstreitern in der Melanomnachsorge, Herrn Oberarzt Dr. Hans Barthelmes und Herrn Dr. Raoul Hasert.

Ihre Mitarbeit, Teamgeist und Freundschaft haben in besonderer Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auf diese Weise konnte eine patientengerechte und sehr umfassende Melanomnachsorge geschaffen werden, die interdisziplinär die meisten Fragestellungen selbst regelt und trotz der immensen Patientenzahlen

besonders viel Spass bei der Arbeit macht.

Danken möchte ich meiner Kollegin, Dr. Sylke Gellrich, für ideenreiche Diskussionen und stets kollegiales Verhalten sowie meinem Kollegen OA Dr. Uwe Trefzer für viele fruchtbare Diskussionen und wissenschaftliche Zusammenarbeit in der Betreuung der Melanompatienten.

Besonderen Dank schulde ich auch meinen Eltern, die mir letztendlich den Weg dorthin ermöglichten, mich motivierten, nicht zwischenzeitlich aufzugeben und mich bis heute durch familiäre Einsätze in vieler Hinsicht unterstützten, ohne die Kongressbesuche oder Vorträge im Ausland nie möglich gewesen wären.

Und nicht zuletzt, sondern vor allen Dingen möchte ich meinem Mann Markus danken, der lange Jahre selbst an der Hautklinik Ulm und der Charité gearbeitet hat und mir den stets einsatzfreudigen, überaus fleissigen, schnellen und allseits routinierten Kollegen vorgelebt hat, wie ich sie am meisten schätze. Für seine stetige liebevolle Unterstützung in all meinen wissenschaftlichen und klinischen Arbeiten, aber auch zuhause bin ich ihm großen Dank schuldig.

Und vor allem möchte ich auch meinen Söhnen Michael und Lukas danken, die mir stets auf heitere Weise nahe bringen, dass es noch viel Wichtiges außerhalb der Klinik gibt.

Liste der wissenschaftlichen Arbeiten

- Voit C, Kalveram CM, Merkel M, Gall H: Soforttypallergie auf Hirse. *Allergologie* 19(8):379-381, 1996
- Voit C, Gall H, Sünkel S, Peter R: Papular-purpuric "gloves and socks" Syndrom (PPGSS) nach Influenza-B-Virusinfektion. *Akt. Dermatol.* 23:303-305, 1997
- Voit C, Schoengen A, Weber L, Proebstle T: Identification of melanoma metastases by tyrosinase - reverse transcription - polymerase chain reaction of fine needle aspirates. *J Am Acad Dermatol* 39:1030-1032, 1998
- Voit C, Schoengen A, Schwürzer M, Weber L, Mayer T, Proebstle TM: Detection of regional melanoma metastases by ultrasound B-scan, cytology or tyrosinase RT-PCR of fine needle aspirates. *Brit J Cancer* 80(10): 1672-1677, 1999
- Proebstle TM, Jiang W, Högel J, Keilholz U, Weber L, Voit C: Correlation of positive RT-PCR for tyrosinase in peripheral blood of malignant melanoma patients with clinical stage, survival and other risk factors. *Brit J Cancer* 82(1):118-123, 2000
- Voit C, Mayer T, Proebstle TM, Weber L, Kron M, Krupienski M, Zeelen U, Sterry W, Schoengen A: Ultrasound guided fine needle aspiration cytology (FNAC) in the early detection of melanoma metastases. *Cancer* 90(3):186-193, 2000
- Voit C, Mayer T, Proebstle TM, Schwürzer-Voit M, Weber L, Sterry W, Schoengen A: Stellenwert von Ultraschallnachsorge mit ultraschallgesteuerter Feinnadelaspirationszytologie (FNAC) bei Patienten mit malignem Melanom. *Ultraschall in Med* 21:218-222, 2000

- Voit C, Proebstle TM, Winter H, Kimmritz J, Sterry W, Schwürzer M: Presurgical Ultrasound Guided Wire Marking of Malignant Melanoma Metastases in Stage III Patients. *Dermatol Surg* ;27:129-132, 2001
- J. Ulrich, Voit C: Ultrasound in Dermatology; Part II: Ultrasound of Regionary lymph nodes and subcutaneous tumors. *Eur J Dermatol* ; 11:73-79, 2001
- Voit C, Mayer T, Kron M, Schoengen A, Sterry W, Weber L, Proebstle TM: Efficacy of Ultrasound B-scan compared to Physical Examination in Follow-Up of Melanoma Patients. *Cancer* ;91:2409-2416, 2001
- Voit C, Sterry W, Schwürzer-Voit M: Stellenwert der stadiengerechten Nachsorge bei Patienten mit Hauttumoren. *Klinikerarzt* 31 (5), 86-89, 2002
- Voit C, Schoengen A, Schwürzer-Voit M, Weber L, Sterry W, Proebstle TM: The Part of Ultrasound in Detection and Management of Regional Disease in Melanoma Patients. *Semin Oncol* ;29(4):353-60, 2002
- Keilholz U, Willhauck M, Rimoldi D, Brasseur F, Dummer D, Rass K, de Vries T, Blaheta J, Voit C, Lethé B, S Burchill: Reliability of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) – assays for the detection of circulating tumour cells: a quality assurance initiative of the EORTC Melanoma Cooperative Group. *Eur J Cancer* 34:750-753, 1998
- Proebstle TM, Weisel G, Voit C, Peter U: Endoscopic fasciotomy and subfascial perforator division for chronic stasis ulcers. *Hautarzt* 50(8):566-571, 1999

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

Trefzer U, Voit C, Milling A, Audring H, Sterry W: Malignant melanoma arising in a radiotherapy field: report of two cases and review of the literature. Dermatology, 2002, in press

Buchbeiträge:

Voit C et al in:

Sterry W, Paus R: Checkliste Dermatologie. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2001

Eingereichte Publikationen:

- Voit C, Schwürzer-Voit M, Sterry W, Proebstle T: Autologous Active Specific Immunotherapy for Adjuvant Treatment of Melanoma Patients with Resectable Stage III Disease. Zur Publikation eingereicht
- Voit C, Kron M, Weber L, Schwürzer-Voit M, Sterry W, Proebstle T: Prognostic Impact of serial Tyrosinase RT-PCR During Long Time Follow-Up of Stage II and III Melanoma Patients. Zur Publikation eingereicht
- Hugo T, Weber L, Voit C: Lichen trichophyticus bei einem dreijährigen Kind. Zur Publikation eingereicht
- Atugoda S, Audring H, Voit C, Sterry W, Blume-Peytavi U: Chronic indurated ulceration on the leg. Zur Publikation eingereicht
- Trefzer U, Friedrich C, Voit C, Volk H, Döcke W, Sterry W: Neoadjuvant immunotherapy with IL-2 and IFN-alpha 2a in melanoma patients: a pilot study. Zur Publikation eingereicht

Vorträge und Poster:

- 12/13.4.1997 Voit C, Proebstle TM, Weber L, Peter R.
 Identification of Lymph node Metastases by Use of Fine needle
 Aspiration and RT-PCR in Melanoma Patients.
 Diagnostic PCR in Oncology
 12. und 13. April 1997, Heidelberg, Germany
 Proebstle Th, Voit C, Weber L, Jiang W.
 Association of positive RT-PCR for Tyrosinase in Peripheral
 Blood of Malignant Melanoma Patients with Clinical Stage,
 Disease free
 Survival and Other Risk Factors”
 Diagnostic PCR in Oncology
 12. und 13. April 1997, Heidelberg, Germany
- 19.06.1997 Voit C. Stellenwert der Weichteilsonographie und Feinnadel-
 aspirationszytologie in der Melanomnachsorge.
 Kolloquium “experimentelle Dermatologie” der Universität Ulm
- 26./27.09.1997 Voit C, Schoengen A, Proebstle TM, Weber L, Peter R.
 Früherkennung von Lymphknotenmetastasen bei
 Melanompatienten: Vergleich zwischen Feinnadel-
 aspirationszytologie (FNAC) und Kombination von RT/PCR und
 Feinnadelbiopsie (FNA-PCR) zum Nachweis von Tyrosinase
 mRNA. H+G Band 72, Heft 9, S.692, 1997
 7. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische
 Onkologie (ADO), 26.-27.09.1997, Kiel
- 3./4.10.1997 Voit C, Gall H, Sünkel S, Peter R.
 Papular-purpuric Gloves and Socks Syndrome (PPGS).
 127. Tagung der Vereinigung Südwestdeutscher Dermatologen
 03.-04.10.1997, Regensburg
- 12.-15.10.1997 Keilholz U, Willhauck M, Rimoldi D, Brasseur F, Dummer W,
 Rass K, de Vries, Blaheta J, Voit C, Lehte B, Burchill S.
 RT-PCR Assays zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen: ein
 Ringversuch der EORTC.
 Onkologie 20 (1): 8 (Abstr 26), 1997

- Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie,
12. - 15.10.1997, Linz, Österreich
- 03.-07.10.1997 Voit C, Schoengen A, Proebstle T, Weber L, Peter R. Early Identification of Lymph Node Metastases by Combination of Fine Needle Aspiration and Polymerase Chain Reaction in Melanoma Patients in Comparison to PCR from Peripheral Blood and Association with Clinical Stage.
J Invest Dermatol 109(3): 462, 1997
27th Annual Meeting ESDR, 03.-06.10.1997, Rome, Italy
- 14/15.12.1997 Voit C Wertigkeit der FNA-PCR bei Lymphknotenmetastasen des malignen Melanoms”
“Neue diagnostische Optionen in der Therapie und Nachsorge von malignen Melanomen: eine Standortbestimmung”
14.-15.12.1997; Günzburg/Donau
- 15-18.01.1998 Voit C, Schoengen A, Peter U. Increased sensitivity in early detection of submicroscopic lymph node metastases in melanoma patients.
Brit J Cancer 1998; 77(1): 29
International Symposium on Metastases in Head and Neck Cancer, 15.-18.1.1998
Kiel, Germany
- 07.-10.05.1998 Voit C, Mayer T, Krupienski M, Peter U, Weber L, Zeelen U, Schoengen A. Early detection of metastases in melanoma patients by fine needle aspiration cytology.
J Invest Dermatol 1998; 110(4): 580
International Investigative Dermatology 1998, Third Joint Meeting of the ESDR, SID, JSID, Cologne, Germany
- 08.-10-06.1998 Zeelen U, Krupienski M, Mayer T, Schick R, Voit C, Weber L, Schoengen A. Detection of Metastases in Melanoma Patients by Fine Needle Aspiration Cytology (FNAC).
J of Cancer Research and Clin Oncol 124 (suppl): 139, 1998
Deutscher Krebskongress, Berlin, 08. - 12.06.1998
- 02.-03.10.1998 Voit C, Mayer T, Proebstle TM, Weber L, Schoengen A.

- Stellenwert der Sonographie mit Feinnadelaspirationszytologie (FNAC) in der Melanomnachsorge.
H+G Band 73, Heft 9:629-630, 1998
8. Jahrestagung Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO), 02.-02.10.1998, Homburg, Saar
Proebstle TM, Jiang W, Hoegel J, Weber L, Voit C, Peter R.
Tyrosinase RT-PCR im peripheren Blut von Melanompatienten und Korrelation mit Stadium, Überleben und anderen Risikofaktoren.
H+G Band 73, Heft 9: 631, 1998
- 8 Jahrestagung Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO), 02.-02.10.1998, Homburg, Saar
- 15./16.10.1998 Mayer T, Voit C, Zeelen U, Schick R, Schoengen A.
Stellenwert der Sonographie mit Feinnadelaspirationszytologie (FNAC) in der Melanomnachsorge - eine retrospektive Studie von 1983 –1997.
Ultraschall in Med 19 (suppl): 109, 1998
22. Dreiländertreffen der Schweizerischen, Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Ultraschall in der Medizin, 14.-17.10.1998, Zürich, Schweiz
- 25.-28.10.1998 Mayer T, Voit C, Zeelen U, Schick R, Weber L, Schoengen A.
Early Diagnosis of Small Melanoma Metastases by Fine needle Aspiration Cytology.
Ann Haematol 77(2), 225, 1998
- Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie , 25.-28.10.1998, Frankfurt,Main
- 12.05.1999 Voit C. Grundlagen der Lymphknotenultraschallsonographie.
40. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG),12.-15.05.1999, Hamburg
- 17.-18.09.1999 Proebstle T, Schwürzer-Voit M, Sterry W, Knop J, Voit C.
Detection of regional Melanoma Metastases by Ultrasound B-scan, Cytology or tyrosinase RT-PCR of Fine Needle Aspirates.
Minimal Residual Disease in Melanoma – International

- 17.-18.09.1999 Symposium on Biology, Detection, and Clinical Relevance of Micrometastases, 17.-18.9.1999, Homburg/Saar, Germany
 Voit C, Knop J, Sterry W, Proebstle TM.
 Sensitivity of Ultrasound Bscan compared to Physical Examination in Follow-up of Melanoma Patients.
- 23.09.1999 Minimal Residual Disease in Melanoma – International Symposium on Biology, Detection, and Clinical Relevance of Micrometastases, 17.-18.9.1999, Homburg/Saar, Germany
 Voit C, Proebstle TM
 Efficacy of Ultrasound compared to Physical examination in Follow-up of Melanoma Patients
 Symposium New Directions in Melanoma Primary Prevention
 EORTC Melanoma Cooperative Group
 Rotterdam, 23.-25.09.1999
- 01.10.1999 Proebstle TM, Weisel G, Voit C, Peter R.
 Endoscopic Fasciotomy and subfascial perforator division for chronic stasis ulcers.
 European Phlebology Congress, Bremen, Germany
- 06./0.11.2000 Voit C: Vorträge im Rahmen des Sonographiekurses „Lymphknoten und Weichteilsonographie in Magdeburg (DEGUM Kursleiterin)
- 11./12.03 2000 Voit C: Vorträge im Rahmen des Sonographiekurses „Lymphknoten und Weichteilsonographie in Magdeburg (DEGUM Kursleiterin)
- 07.04.2000 Vortrag im Rahmen des HNO Ultraschallkurses der Charité
 Voit C: „Stellenwert des Ultraschalls in der Melanom- und Lymphomnachsorge“
- 06.-10.5.2000 Voit C, Knop J, Sterry W, Proebstle T. Sensitivity of Ultrasound B-scan compared to physical Examination in Follow-up of Melanoma Patients.
 Ultrasound in Med and Biol, Vol 26(2):184A, 2000
 9th Congress of the World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology, 06.-10.05.2000, Florence, Italy
- 20.-23.5.2000 Voit C, Mayer T, Schwürzer-Voit M, Kron M, Schoengen A,

- Sterry W, Proebstle TM
Sensitivity of Ultrasound B scan compared to physical examination in Follow-up of Melanoma Patients. Prognostic Value of early detection of regional metastases.
J Clin Oncol, Proc Am Soc Clin Oncol 19: 568a, 2000
ASCO 2000, 20-23. 05.2000, New Orleans, LA, USA
- 26.05.2000 Voit C. Sonographie und Feinnadelaspirationszytologie bei malignen Lymphomen
2.Assistententreffen cutane Lymphome, Charité, Berlin
- 27.05.2000 Schwürzer-Voit M, Voit C, Kimmritz J, Winter H, Sterry W
Sonographiegesteuerte Drahtmarkierung von Melanommetastasen als präoperatives Management.
H+G Band 75, Heft 5, 289-290, 2000
23. Jahrestagung der Vereinigung Operative Dermatologie (VOD), Dresden, 26.-27.05.2000
- 13.-16.05.2001 Voit C, Kron M, Mayer T, Proebstle TM, Schwürzer-Voit M, Weber L, Mooser G, Zeelen U, Sterry W, Schoengen A.
Ultrasound Guided Fine Needle Aspiration Cytology (FNAC) for Early Verification of Melanoma.
J Clin Oncol, Proc Am Soc Clin Oncol 20: 360a, 2001
ASCO 2001, 13.-16.05.2001, San Francisco, CA, USA
- 18./19.03.2001 Vorträge im Rahmen des Sonographiekurses „Lymphknoten und Weichteilsonographie in Magdeburg (DEGUM Kursleiterin)
- 01./02.05.2001 Voit C.
Stellenwert der Ultraschalldiagnostik und der Feinnadelaspirationszytologie in der Melanomnachsorge
41. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG),01.-5.05.2001, Berlin
- 20.07.2001 Voit C, Schwürzer-Voit M, Kron M, Weber L, Proebstle TM, Sterry W, Schoengen A.
Ultrasound Guided Fine needle Aspiration (FNAC) for Early Verification of Melanoma Metastases
8th World Congress on Cancers of the Skin, July 18-21, 2001, Zürich, Schweiz

- 30.09.-
01.10.2001 Mayer T, Voit C, Kron M, Weber L, Moser G, Zeelen U, Schoengen A:
Ultrasound Guided Fine Needle Aspiration Cytology for Early Identification of Melanoma Metastases (Update).
Onkologie 24 (Sonderheft 6): 36 (Abstract No 130), 2001
Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie,
30.09. - 01.10.2001, Mannheim
- 17.11.2001 Voit C, Ulrich J: Vorträge im Rahmen des Sonographiekurses
„Lymphknoten und Weichteilsonographie in Magdeburg (DEGUM Kursleiterin)
- 10.-14.03.2002 Voit C, Schwürzer-Voit M, Proebstle T, Winter H, Sterry W.
Vortrag P*618
Drahtmarkierung bei Melanommetastasen
Deutscher Krebskongress 2002 in Berlin
Journal of Cancer Research and Clinical Oncology (JCRCO)"
- 15.-18.05.2002 Voit C, Kron M, Schwürzer-Voit M, Weber L, Sterry W, Schoengen A, Proebstle T: Serial Tyrosinase RT-PCR as prognostic factor in follow-up of stage II and III melanoma patients.
J Invest Dermatol 2002; abstr. 36
63th annual meeting of the Society for Investigative Dermatology
15.-18.05.2002, Los Angeles, USA
- 18.05.-
22.5.2002 Voit C, Kron M, Schwürzer-Voit M, Weber L, Sterry W, Schoengen A, Proebstle TM
Long Term Survival of stage II and III melanoma patients with respect to Serial Tyrosinase RT-PCR testing in peripheral blood
J Clin Oncol, Proc Am Soc Clin Oncol 21: 340a, 2002
Oral Presentation
ASCO 2002, 18.-22.05.2001, Orlando, Florida, USA
- 15.09.-
18.09.2002 Schoengen A, Mayer T, Zeelen U, Mooser G, Voit C: Ultrasound Guided Fine Needle Aspiration Cytology (FNAC) for Early Verification of Melanoma
28th European Congress of Cytology, Antwerpen, Belgium

Abkürzungen

AJCC	American Joint Committee on Cancer (AJCC)
TD	Tumordicke
UICC	Union International Contre le Cancer
PT	Primärtumor
N	regionäre Lymphknoten
M	Fernmetastasen
DDG	Deutsche Dermatologische Gesellschaft (DDG)
RT-PCR	Reverse Transskriptase Polymerase Kettenreaktion (hier: Tyrosinase)
FNA – PCR	Tyrosinase RT-PCR aus Feinnadelmaterial
FNAC	Feinnadelaspirationszytologie
SN	Sentinel Node

Eidesstattliche Versicherung

Gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift