

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. K. Diedrich

Das Sentinelkonzept beim Korpuskarzinom und die histopathologische Aufarbeitung der Lymphknoten

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von
Nadine Müller
aus Siegen

Lübeck 2008

1. Berichtersteller: Priv.-Doz. Dr.med. Christopher Altgassen
2. Berichtersteller: Priv.-Doz. Dr.med. Gunther Weitz

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 15.05.2009

gez. Prof. Dr.med. Werner Solbach
-Dekan der Medizinischen Fakultät-

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
Zusammenfassung.....	6
Einleitung	8
1.1. Das Sentinelkonzept.....	8
1.2. Das Korpuskarzinom.....	9
2. Fragestellung	12
3. Patienten, Material und Methode	13
3.1. Studienpopulation und Markierung	13
3.2. Aufarbeitung und konventionelle Färbung der Operationspräparate	14
3.3. Begutachtungsschemata der Lymphknoten.....	15
3.4. Reevaluierung der Lymphknoten in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	18
3.5. Prinzip der Immunhistochemischen Färbung mittels LSAB-Methode	18
3.6. Histologische Begutachtung und Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate	20
3.7. Datenmanagement und Qualitätssicherung.....	21
3.8. Statistische Betrachtung des diagnostischen Tests.....	22
3.9. Statistische Auswertung.....	23
3.9.1. Vergleich des Metastasennachweises in Abhängigkeit der verwendeten Färbung.....	24
3.9.2. Vergleich des Metastasenstatus	24
3.9.3. Vergleich der positiven Lymphknoten unter Berücksichtigung der absoluten Anzahl an positiven Lymphknoten.....	25
4. Ergebnisse.....	26
4.1. Spezielle Patientinnen	27
4.1.1. Patientinnen mit bereits diagnostizierter nodaler Metastasierung.....	28
4.1.2. Patientinnen mit neu diagnostizierter nodaler Metastasierung	37
4.2. Spezielle statistische Betrachtungen	42
4.2.1. Spezielle statistische Betrachtungen im Sentinelverfahren	42
4.2.2. Weitere statistische Betrachtungen.....	43
5. Diskussion.....	44
5.1. Diskussion der klinischen Bedeutung	51

6.	Schlussfolgerungen	56
7.	Literatur	57
8.	Tabellen	63
9.	Anhang.....	71
9.1.	Chemikalien und Reagenzien	71
9.2.	Rezepturen	72
9.3.	Antikörper.....	72
9.4.	Geräte und Materialien	72
9.5.	Prinzip der Immunhistochemischen Färbung mittels LSAB-Methode	73
9.6.	Färbeablauf für Immunhistochemische Färbung mit LSAB-Methode	73
10.	Danksagung	75
11.	Lebenslauf.....	76

Abkürzungen

AJCC	American Joint Committee on Cancer
Ak	Antikörper
CK	Zytokeratin
DAB+	3,3'Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid = Chromogen
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HRP	horse-raddish-peroxidase = Meerrettichperoxidase
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
IHC	Immunhistochemische Färbung mit Panzytokeratinantikörpern
ITC	isolierte Tumorzellen
LN	Lymphknoten
LNges	Gesamtmenge aller extipierten Lymphknoten = SLN + Nicht-SLN
LNpara	paraaortale Lymphknoten
LNpelv	pelvine Lymphknoten
LSAB-Methode	labeled Streptavidin-Biotin-Methode ; immunhistochemisches Verfahren zur Signalverstärkung bei der Markierung von Zielstrukturen mit Hilfe von Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin und biotinylierten Antikörpern
MNF 116	Bezeichnung des verwendeten Panzytokeratinantikörpers
Nicht-SLN	alle Lymphknoten exklusive der Sentinellymphknoten
o.g.	oben genannt
PBS	Peroxidase-Blocking-Solution
SLN	Wächterlymphknoten = Sentinellymphknoten
TNM-System	von der UICC eingeführtes Verfahren zur Tumorklassifikation
u.E.	unseres Erachtens
UICC	Union Internationale contre le Cancer
wahrer LN-Status	Gesamtergebnis aus der durchgeführten Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und immunhistochemischer Färbung (IHC)

Zusammenfassung

Der Nachweis von Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eines Korpuskarzinoms hat einen nachweislichen Einfluss auf die zu erwartende Prognose und die rezidivfreie Überlebenszeit der Patientin. Daher ist die diagnostische Lymphadenektomie bei Patientinnen mit einem Korpuskarzinom Bestandteil des chirurgisch-pathologischen Stagings. Es lassen sich mit den üblichen Methoden bei einem Großteil der operierten Patientinnen jedoch keine Lymphknotenmetastasen nachweisen. Hier stellt sich die Frage, ob eine ausgedehnte Lymphadenektomie hätte vermieden werden können, um den oft älteren und multimorbiden Patientinnen die operationsbedingte Morbidität zu ersparen, ohne die onkologische Sicherheit des Stagings zu verringern.

Das Ziel der Reduktion der operationsbedingten Morbidität wird mit dem Sentinelkonzept verfolgt. Die Hypothese des Sentinellymphknotenkonzeptes besagt, dass Sentinellymphknoten(= Wächterlymphknoten) die primären Metastasierungsorte lymphogen metastasierender Karzinome sind. Es sind dies diejenigen Lymphknoten, die als erste im Lymphabfluss des Tumors liegen. Postuliert wird, dass Sentinellymphknoten den Nodalstatus der gesamten Lymphknotenregion repräsentieren. Dies bedeutet, dass der Verzicht auf eine komplette pelvine und paraaortale Lymphadenektomie aus Gründen der Morbiditätsreduktion beim Korpuskarzinom sinnvoll durchführbar wäre, ohne einen Verlust an diagnostischer Aussagekraft und onkologischer Sicherheit hinnehmen zu müssen.

Zur Identifizierung von Sentinellymphknoten sind Markierungssubstanzen notwendig. Üblicherweise wird die Markierung mittels eines Farbstoffes und/oder Technetium^{99m} durchgeführt.

Nach erfolgter Markierung und gezielter Exstirpation der Sentinellymphknoten erfolgt die histopathologische Aufarbeitung und Begutachtung zur Definition des jeweiligen Nodalstatus. An diesem orientiert sich dann die weitere Therapie.

Basierend auf den Ergebnissen eines neuen subserosalen Applikationsverfahrens wurde die diagnostische Aussagekraft der Sentinellymphknotentechnik für das Korpuskarzinom in Abhängigkeit von der histopathologischen Aufarbeitung überprüft. Hierfür wurden die archivierten Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnittstufen aller entnommenen Lymphknoten und einen repräsentativen Schnitt des jeweiligen Primärtumors reevaluiert. Zusätzlich wurde an einem weiteren Gewebeschnitt der entnommenen Lymphknoten und des Primärtumors eine immunhistochemische Färbung zum Nachweis zytokeratinpositiver Zellen durchgeführt.

Im Bereich der Frauenheilkunde wurde die Wertigkeit des Sentinelverfahrens für das Mammakarzinom bestätigt und hat zur Einführung des Verfahrens in die Routinetherapie geführt. Für das Korpuskarzinom liegen derzeit nur vorläufige Ergebnisse vor.

Das subserosale Applikationsverfahren, auf dessen Grundlage diese Arbeit entstand, kam bei 25 Patientinnen zur Anwendung. Zur Überprüfung der diagnostischen Aussagekraft des Verfahrens standen die Daten von 21 Patientinnen zur Verfügung, da bei vier Patientinnen keine kompletten Lymphknotensätze (SLN+Nicht-SLN) gewonnen werden konnten.

Durch die immunhistochemische Färbemethode mit Panzytokeratinantikörpern gelang der Nachweis von Metastasen des Primärtumors in den Sentinellymphknoten bei insgesamt fünf von 21 Patientinnen (23,8%). Zusätzlich konnten weitere Metastasen in Nicht-Sentinellymphknoten nachgewiesen werden. Insgesamt stellten sich Lymphknotenmetastasen in sechs von 21 Patientinnen dar. In einem Fall blieb der Nachweis von Metastasen in Sentinellymphknoten auch unter Anwendung der Immunhistochemie aus, obwohl in Nicht-Sentinel-Lymphknoten Metastasen gefunden werden konnten. In diesem einzelnen Fall ist das untersuchte Verfahren, unabhängig von der histopathologischen Aufarbeitung, als falsch-negativ zu werten.

Durch die immunhistochemische Färbung einer einzigen weiteren Schnittstufe wurden bei Betrachtung aller Lymphknoten signifikant mehr Lymphknotenmetastasen nachgewiesen. Die Sensitivität des konventionellen Verfahrens (HE) fällt von 66,7% auf 33,3%, wenn alle Lymphknoten immunhistochemisch aufgearbeitet werden (HE+IHC). Der negative Vorhersagewert fällt von 94,7% auf 79,0%.

Werden auch die Sentinellymphknoten immunhistochemisch aufgearbeitet, steigt die Sensitivität auf 83,3% und der negative Vorhersagewert erreicht 93,8%.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Daten der konventionellen Untersuchungen günstiger erscheinen, als sie nach der immunhistochemischen Färbung tatsächlich sind. Durch die immunhistochemische Färbung lassen sich die Sensitivität und der negative Vorhersagewert des Verfahrens erhöhen. Die geringe Gesamtzahl nodal positiver Patientinnen mag der Grund dafür sein, dass die Verbesserung der Sensitivität und des negativen Vorhersagewertes keine Signifikanz erreicht.

Die vorliegende Studie zeigt einen einfachen und Erfolg versprechenden Weg zur Anwendung des Sentinelkonzeptes bei Patientinnen mit einem Korpuskarzinom auf. Durch den Einsatz der immunhistochemischen Färbemethode werden die Sensitivität und der negative Vorhersagewert des Verfahrens ohne großen Mehraufwand erhöht.

Die Ergebnisse der Untersuchung weisen auf eine Überlegenheit des vorgestellten Verfahrens in der Diagnostik des Korpuskarzinoms hin. Um diesbezüglich eine sichere Aussage treffen zu können, müssen nun Studien mit höheren Fallzahlen folgen.

Einleitung

1.1. Das Sentinelkonzept

Die Hypothese des Sentinelkonzeptes besagt, dass es einen Lymphknoten gibt, der die primäre Drainagestation für ein spezifisches Gebiet darstellt (a) und dass dort mit größter Wahrscheinlichkeit die erste Metastasierung stattfindet (b), wobei die Metastasierung von Lymphknoten zu Lymphknoten fortschreitet und keine Lymphknoten übersprungen werden (c). Dieser erste Lymphknoten im Lymphabfluss eines Karzinoms wird Sentinellymphknoten oder Wächterlymphknoten genannt.

Mit dem Sentinelkonzept können grundsätzlich mehrere Ziele verfolgt werden: Die Erfassung eines von der Norm abweichenden Lymphabflusses (i) und Reduktion der Lymphadenektomie auf eine reine Sentinel-Node-Biopsie (ii), da der Sentinellymphknoten, den Nodalstatus der Region korrekt widerspiegelt. Dieses Vorgehen führt zu einer Reduktion der operationsbedingten Morbidität, da nicht mehr alle Lymphknoten einer Region exstirpiert werden, sondern nur noch einige wenige Sentinellymphknoten (iii). Letztlich können an weniger Lymphknoten arbeits- oder kostenintensivere Zusatzuntersuchungen durchgeführt und somit die diagnostische und prognostische Aussagekraft des Verfahrens (iv) gesteigert werden, ohne die onkologische Sicherheit zu reduzieren.

Im Allgemeinen werden im Rahmen des Stagings Schnittstufen von den entnommenen Sentinellymphknoten und Nicht-Sentinellymphknoten angefertigt und konventionell mit Hämatoxylin-Eosin(HE) gefärbt. Durch die Verwendung immunhistochemischer Färbemethoden können Metastasen eines Karzinoms in Lymphknoten nachgewiesen werden²⁷. Es lassen sich durch die immunhistochemischen Färbemethoden insgesamt mehr Metastasen finden als bei alleiniger Anwendung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung^{17,19,33,35}. Dieser Umstand führt unseres Erachtens zu der zu beantwortenden Frage, inwieweit sich die verwendete Färbemethode auf die Wertigkeit des Sentinelkonzeptes auswirkt.

1.2. Das Korpuskarzinom

Das Korpuskarzinom tritt vorwiegend bei älteren Patientinnen auf.

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 67 Jahren. Die altersspezifische Inzidenz des Korpuskarzinoms nimmt ab dem 55. Lebensjahr deutlich zu. In Deutschland gibt es jährlich etwa 11300 Neuerkrankungen¹. Das Korpuskarzinom stellt somit das vierthäufigste Malignom der Frau und das häufigste Malignom des weiblichen Genitales dar. Mit 2,7% aller krebsbedingten Todesfälle des weiblichen Geschlechts nimmt das Endometriumkarzinom in Deutschland die neunte Stelle ein¹. Die Inzidenz in West-Europa betrug im Jahr 2002 22,5/100000². In den Vereinigten Staaten von Amerika stellt das Korpuskarzinom das am häufigsten vorkommende Genitalkarzinom der Frau dar³. Für das Jahr 2004 wurden 40320 Neuerkrankungen und 7090 Todesfälle erwartet.

Das Korpuskarzinom wird grundsätzlich in einen Östrogen-abhängiges (Typ I) und ein Östrogen-unabhängiges Karzinom unterteilt (Typ II). Das endometroide Korpuskarzinom stellt mit 80% den häufigsten histologischen Subtyp dar und hat mit einer 5-Jahres Überlebensrate von 92% eine gute Prognose. Für dieses, als Typ I bezeichnete, Karzinom kann prinzipiell festgehalten werden, dass ein reiner Östrogenstimulus die Entstehung eines Korpuskarzinoms fördert und dass Faktoren, die einen Östrogenstimulus reduzieren oder einen höheren Progesteronspiegel zur Folge haben, protektiv wirken.

Eine Hormonersatztherapie, Übergewicht, anovulatorische Zyklen, Östrogen sezernierende Tumoren und das Alter gelten als klassische Risikofaktoren.

Als Leitsymptom gilt die postmenopausale Blutung. Andere Hinweiszeichen, wie z.B. die sonographisch gemessenen Endometriumdicke führen zu keiner effektiv verbesserten Detektionsrate asymptomatischer Korpuskarzinome⁴. Tritt eine postmenopausale Blutung auf, ist eine fraktionierte Abrasio indiziert. Diese muss mit einer Hysteroskopie kombiniert werden, um gezielt Biopsien für die weitere histopathologische Diagnostik entnehmen zu können.

Wird durch die histologische Untersuchung ein Karzinom oder eine Endometriumhyperplasie mit Atypien bestätigt, ist üblicherweise eine operative Entfernung der Gebärmutter indiziert. Diese wird, in Abhängigkeit von der histopathologischen Stadieneinteilung, gegebenenfalls um eine Entfernung der Adnexe und eine pelvine sowie paraaortale Lymphadenektomie erweitert. Das so erfolgte chirurgisch-pathologische Staging dient der Weichenstellung zur weiteren Therapie und erlaubt eine Abschätzung der Prognose.

Etwa 42% der Patientinnen im klinischen Stadium I müssen infolge einer Staging-Lymphadenektomie dem FIGO-Stadium III zugerechnet werden⁵. Je nach

Gesamtsituation kann die Operation dann auch ein invasives Staging vor einer weiteren strahlentherapeutischen Behandlung darstellen.

Die überwiegende Anzahl der Patientinnen findet sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im FIGO-Stadium I (= pTNM-Stadium 1a-c). In diesem Stadium sind die myometrane Infiltrationstiefe und der Befall des lymphovaskulären Kapillarraumes die wichtigsten unabhängigen Prognosefaktoren, die die Wahrscheinlichkeit eines Lymphknotenbefalls und das rezidiv-freie Überleben beeinflussen^{5,6}.

Bei G1-Karzinomen, die das äußere Drittel des Myometriums erreichen, muss in 11% mit einem Befall pelviner Lymphknoten und in 6% mit einem Befall paraaortaler Lymphknoten gerechnet werden³.

Bei G2-Karzinomen liegt das Risiko einer pelvinen Metastasierung bei einem Befall des inneren Myometrium-Drittels bei 5% und das Risiko einer paraaortalen Metastasierung bei 4%. Das Risiko steigt auf 19%, bzw. 14% bei einem Befall des äußeren Drittels.

Bei myometran fortgeschrittenen G3-Karzinomen muss in 34% mit einer pelvinen und zu 23% mit einer paraaortalen Metastasierung gerechnet werden³.

Durch die Anwendung des zuvor beschriebenen Sentinelkonzeptes könnte bei diesen Patientinnen das Ausmaß der Lymphadenektomie reduziert werden, ohne die onkologische Sicherheit der operativen Therapie zu verringern. In jedem Fall ist die, durch das minimierte Operationsausmaß erzielte Morbiditätsreduktion wünschenswert. Bedeutsam könnte das Sentinelverfahren auch für Patientinnen werden, bei denen mittels fraktionierter Abrasio eine atypische Hyperplasie diagnostiziert wurde. Bislang wird in diesen Fällen auf eine Lymphadenektomie verzichtet, da man nicht von einer Metastasierung ausgeht. Es lassen sich jedoch, bei genauer histologischer Untersuchung der Hysterektomiepräparate, in bis zu 42% invasive Karzinome nachweisen⁷.

Die Grundlage der chirurgischen Behandlung ist die Hysterektomie mit beidseitiger Adnexektomie. Ob zu einem kompletten Staging die pelvine und paraaortale Lymphadenektomie und die Omentektomie gehören, wird kontrovers diskutiert⁸. Adipositas und Begleiterkrankungen sind Argumente, die im klinischen Alltag dazu führen, dass keine Lymphadenektomie durchgeführt wird, obwohl sich ein therapeutischer Effekt nachweisen ließ³. So bleibt es u.E. im Unklaren, welche Faktoren im Einzelfall den Ausschlag zu einem radikalen oder weniger radikalen Vorgehen geben. Bei Frühstadien invasiver Korpuskarzinome wird die Wahrscheinlichkeit eines Lymphknotenbefalls als gering erachtet, obwohl bereits eine Mikrometastasierung vorliegen kann. In diesen Fällen wird bislang auf eine Lymphadenektomie verzichtet. Die intraoperative-palpatorische Bewertung des Lymphknotenstatus hat eine geringe Sensitivität und einen beschränkten positiven Vorhersagewert⁹. Zudem gibt es Hinweise auf eine Unterart des

Korpuskarzinoms, welches die Tendenz hat, hämatogen zu metastasieren¹⁰. In diesem Fall wäre kein therapeutischer Effekt durch eine Lymphadenektomie zu erwarten.

Ebenso können der Ausbildungsstand des Operateurs und die Infrastruktur der Abteilung, bzw. der Klinik einen Einfluss auf das Ausmaß des operativen Vorgehens haben.

Alle diese genannten Faktoren führen interessanter Weise dazu, dass in der Literatur keine eindeutige Evidenz für die isolierte Bedeutung einer Lymphadenektomie zu finden ist. Die zur Verfügung stehenden Studien, in denen diverse Behandlungsverfahren miteinander verglichen werden, greifen auf inhomogene Populationen, die in unterschiedlichem Ausmaß operiert wurden, zurück.

Die mögliche prognostische und therapeutische Bedeutung der Lymphadenektomie, sowie die Komorbidität älterer Patientinnen rechtfertigen u.E. die wissenschaftliche Überprüfung des Sentinelkonzeptes bei Patientinnen mit einem Korpuskarzinom. So könnte beispielsweise die alleinige Exstirpation von Sentinellymphknoten, bei gegebener Wertigkeit, zu einer besseren Versorgung älterer, komorbider Patientinnen führen, die sonst ohne jegliche diagnostische Lymphknotenexstirpation behandelt worden wären. Patientinnen, die sich nach heutigem Stand der Diagnostik und Therapie des Korpuskarzinoms einer umfassenden pelvinen und paraaortalen Lymphadenektomie unterziehen müssten, könnte dieser belastende Teil der Operation erspart werden, wenn die exstirpierten Sentinellymphknoten sich als tumorzellfrei darstellen.

Die Evaluierung des Sentinelverfahrens befindet sich bei Patientinnen mit einem Korpuskarzinom noch am Anfang. Zum Einen wurde noch keine Einigkeit über das anzuwendende Markierungsverfahren erzielt und zum Anderen konnte noch kein Nachweis einer verbesserten Diagnostik durch die Anwendung des Sentinelverfahrens bei Patientinnen mit einem Korpuskarzinom erbracht werden. Der Sinn einer Markierung kann nur dann gegeben sein, wenn sich für die Patientin wenigstens einer der oben genannten Vorteile erzielen und nachweisen lässt. Die folgende Untersuchung widmet sich der Frage, ob sich die diagnostische Aussagekraft der histopathologischen Lymphknotenbegutachtung im Rahmen des Sentinelkonzeptes durch ein geringfügig modifiziertes Untersuchungsschema deutlich steigern lässt, ohne die onkologische Sicherheit zu reduzieren.

2. Fragestellung

Die vorliegende Studie soll beantworten, ob durch eine erneute Musterung und zusätzliche immunhistochemische Färbung von Sentinel- und Nicht-Sentinellymphknotenpräparaten zusätzliche Metastasen eines Korpuskarzinoms entdeckt werden können und so die Wertigkeit des Sentinelkonzeptes belegt oder gesteigert werden kann.

Primäre Studienfrage:

- Lassen sich mittels immunhistologischer Färbung von Sentinel- und Nicht-Sentinellymphknoten weitere Metastasen in Lymphknoten bei Patientinnen mit einem Korpuskarzinom nachweisen, die in der konventionellen histopathologischen Erstuntersuchung als nicht metastasiert beschrieben worden waren und kann somit die Wertigkeit des Sentinelkonzeptes belegt oder gesteigert werden?

Sekundäre Studienfragen:

- Ändert sich das Tumorstadium der Patientinnen durch eine zusätzliche immunhistochemische Färbung der exstirpierten Lymphknoten?
- Verbessern sich die Sensitivität und der negative Vorhersagewert des Verfahrens durch die zusätzliche Anwendung einer immunhistochemischen Färbung?

3. Patienten, Material und Methode

3.1. Studienpopulation und Markierung

Zur Untersuchung standen die Operationspräparate von 25 Patientinnen zur Verfügung, die sich im Zeitraum von April 2004 bis März 2006 an der Universitätsfrauenklinik Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, einer Operation der Gebärmutter in kurativer Absicht unterzogen und in die Teilnahme an der Studie schriftlich eingewilligt hatten¹¹.

Die Untersuchung wurde von der zuständigen Ethikkommission bewilligt (AZ 04/077).

Die Patientinnen willigten in die Teilnahme an der Studie am Vortag der geplanten Operation ein. Von Bedeutung war dabei, dass die Teilnahme freiwillig erfolgte und keine Allergie gegen den verwendeten Farbstoff oder eine Lebensmittelallergie bekannt war. Alle Patientinnen wurden ausdrücklich darauf hingewiesen, dass eine mögliche Ablehnung der Teilnahme keinen negativen Einfluss auf ihre bevorstehende Behandlung haben würde.

Nach Narkoseeinleitung, Eröffnung des Abdomens zur Darstellung des inneren Genitale wurden an acht Stellen 4ml Patentblau® subserös injiziert¹¹ (Abb. 1). Nach 10 Minuten erfolgte das Abklemmen des Uterus und die Eröffnung des Retroperitoneums zur Identifikation möglicher, pelvin gelegener Sentinellymphknoten. Diese wurden, falls vorhanden, isoliert exstirpiert. Es folgte die Hysterektomie mit beidseitiger Adnexektomie. Abhängig vom präoperativen Grading, von der intraoperativen Schnellschnittdiagnose und unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes der Patientin wurde eine komplette pelvine und paraaortale Lymphadenektomie mit infrakolischer Omentektomie durchgeführt. Das entnommene Lymphknoten-Fettgewebe wurde zur histopathologischen Untersuchung gegeben.

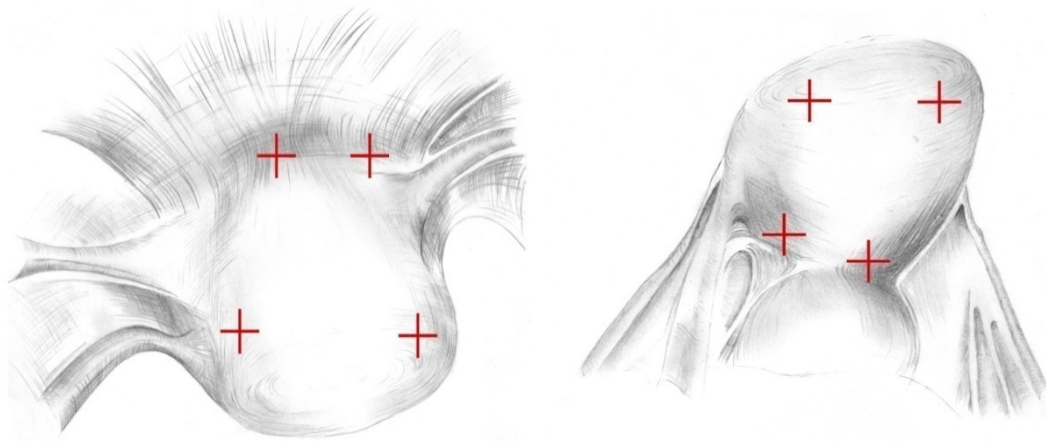


Abb. 1: Darstellung der Injektionsstellen

Das mittlere Alter der Patientinnen betrug 65,0+/-8,1 Jahre (min.-max. 52-83), der mediane Body-Maß-Index betrug 27,5 kg/m² [min.-max. 19-42] (Tab.1). Bei 23 Patientinnen wurde ein endometroides Adenokarzinom, bei einer Patientin wurde ein adenosquamöses Karzinom und bei einer weiteren Patientin ein Karzinosarkom diagnostiziert (Tab.2).

Bei der Operation der 25 Patientinnen wurden pelvin im Mittel 20 Lymphknoten (min.-max. 1-44) und paraaortal insgesamt im Mittel 10 Lymphknoten (min.-max. 3-26) entfernt.

Klinisch wurden im pelvinen Bassin im Mittel drei Sentinellymphknoten entfernt (min.-max. (0)1-7). Histopathologisch wurden in diesen Präparaten im Mittel drei Lymphknoten (SLN) beschrieben (min.-max. 1-13). Nur bei einer Patientin [#12] kam es intraoperativ zur Detektion von drei paraaortal gelegenen Sentinellymphknoten (Tab.3+4).

3.2. Aufarbeitung und konventionelle Färbung der Operationspräparate

Zunächst erfolgte eine makroskopische Befundung, der zur Schnellschnittuntersuchung eingesandten und der zum Teil formalinfixierten Operationspräparate von Uterus, Adnexe, Sentinellymphknoten und Nicht-Sentinellymphknoten.

Es wurden Größe und Gewicht des Uterus, Cavumsondenlänge, Zervixlänge, Myometriumwandbreite, Endometriumbeschaffenheit und Endometriumdicke, Tumorausbreitung (Länge x Breite) und das Ausmaß der Myometriuminfiltration sowie der Tumorwachstumstyp (polypös oder flächig- infiltrativ) beschrieben.

Anschließend erfolgte die Dokumentation von Tubenlänge und Ovargröße.

Die Beschaffenheit der Ovarien, der Parametrien und der Serosa wurden ebenfalls beschrieben und eventuelle makroskopische Auffälligkeiten, wie z.B. das Vorhandensein von Zysten, dokumentiert.

Die zur Untersuchung eingesandten Lymphknoten- und Sentinellymphknotenpräparate wurden zunächst makroskopisch beurteilt, wobei das umgebende Weichgewebe und die bereits makroskopisch nachweisbaren Lymphknoten in Form, Farbe und Größe beschrieben wurden.

Schnellschnittuntersuchungen von Lymphknoten wurden nur vereinzelt durchgeführt. Die Aufarbeitung zur Schnellschnittuntersuchung unterschied sich nicht von der Aufarbeitung zur konventionellen, histopathologischen Untersuchung. Hierzu wurden die makroskopisch gemusterten, kleineren Lymphknoten (≤ 1 cm) zentral halbiert, sodass der größte Durchmesser im Anschnitt liegt. Bei größeren Lymphknoten (> 1 cm) wurde zur Schnellschnittuntersuchung eine Mittelscheibe entnommen. Die Paraffineinbettung der größeren Lymphknoten zur weiteren konventionellen Untersuchung erfolgte in etwa 0,4-0,5 cm breiten Scheiben.

Die Gewebeblöcke aller Hysterektomiepräparate, Adnexextirpationspräparate, sowie der entnommenen Omentumanteile, Appendices und alle durch pelvine oder paraaortale Lymphadenektomie gewonnenen Lymphknoten wurden formalinfixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und paraffineingebettet. Von diesen Paraffinblöcken sowie von den Paraffinblöcken der Schnellschnittuntersuchungen wurden anschließend 1 μ m dünne Schnitte angefertigt. Zum Schneiden der Blöcke diente ein Rotationsmikrotom [Firma Leica].

Nach entsprechender Vorbereitung durch Trocknung, Entparaffinierung und Rehydrierung wurden diese mit Hämatoxylin-Eosin(HE) gefärbt.

3.3. Begutachtungsschemata der Lymphknoten

Als Grundlage der Befundung des Lymphknotenstatus dienen die AJCC-Kriterien für das Lymphknotenstaging bei Brustkrebs¹². Metastasen mit einer Größe von mindestens 2,0 mm sind als Makrometastasen (pN1) zu benennen (Abb. 2.1). Von einer Mikrometastase (pNmi) muss gesprochen werden, wenn der Befund kleiner als 2,0 mm und größer als 0,2 mm ist (Abb. 2.2). Pathologien, die nicht größer als 0,2 mm sind, werden als isolierte Tumorzellen bezeichnet (Abb. 2.3). Die isolierten Tumorzellen können durchaus als Gruppe (*engl. cluster*) zusammenstehen, ohne jedoch die Kriterien für die Bezeichnung Mikrometastase zu erfüllen (Abb. 2.4.). Im Falle des Nachweises von isolierten Tumorzellen mittels immunhistochemischer Methoden, ist das pN-Stadium als pN0(i+) zu dokumentieren.

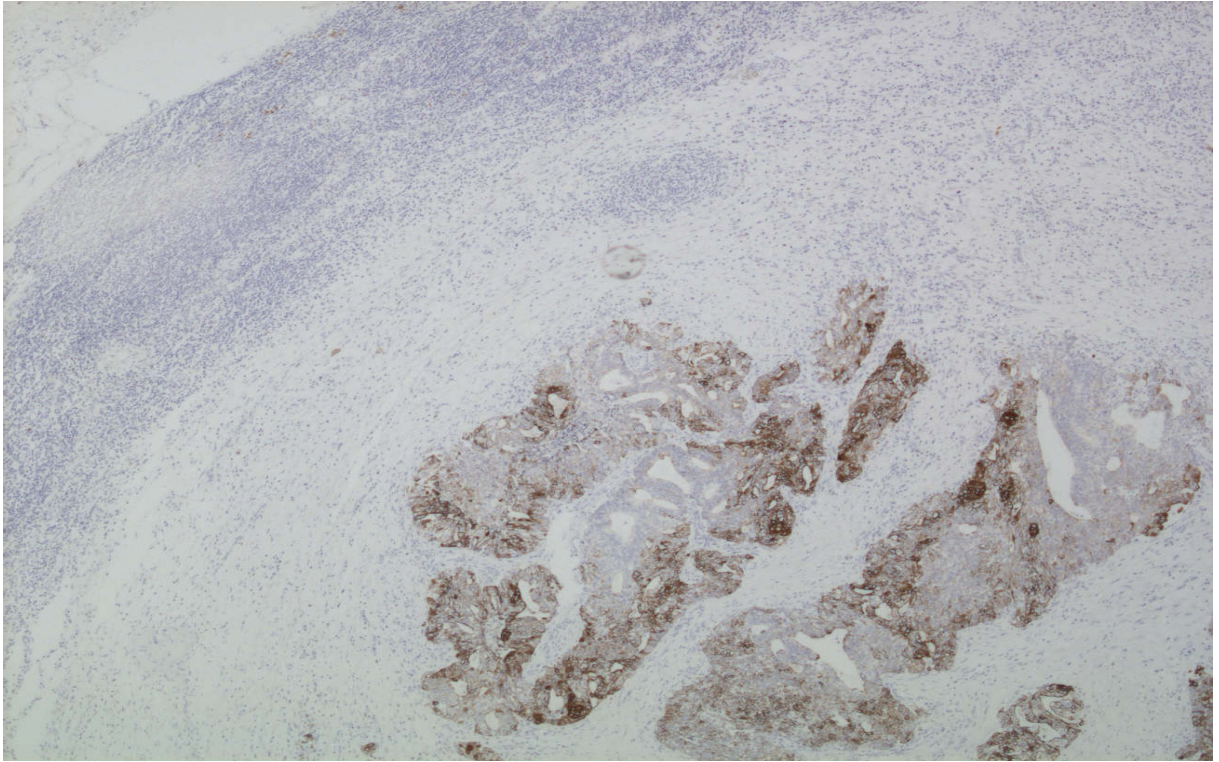


Abb. 2.1.Foto 9818/05 #7 LN pelvin , IHC, Makrometastase >2,0 mm

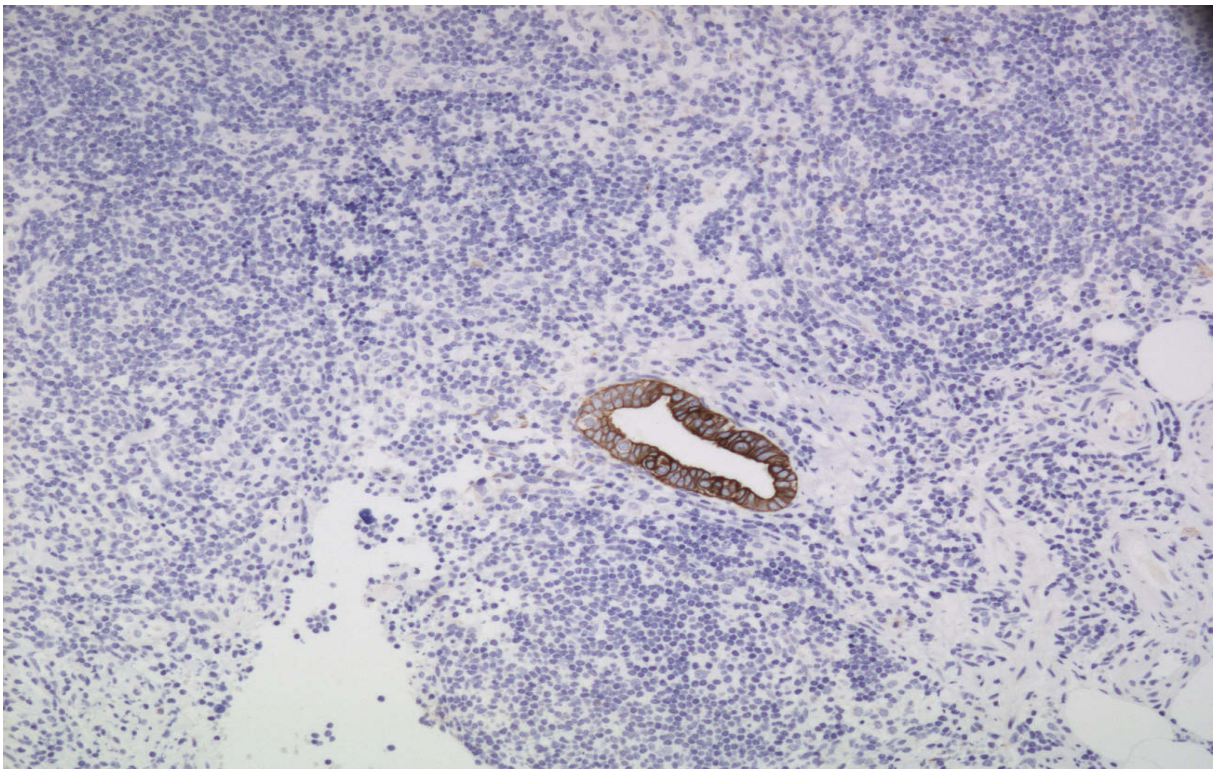


Abb.2.2. Foto 10978/05 LN para,IHC, Mikrometastase

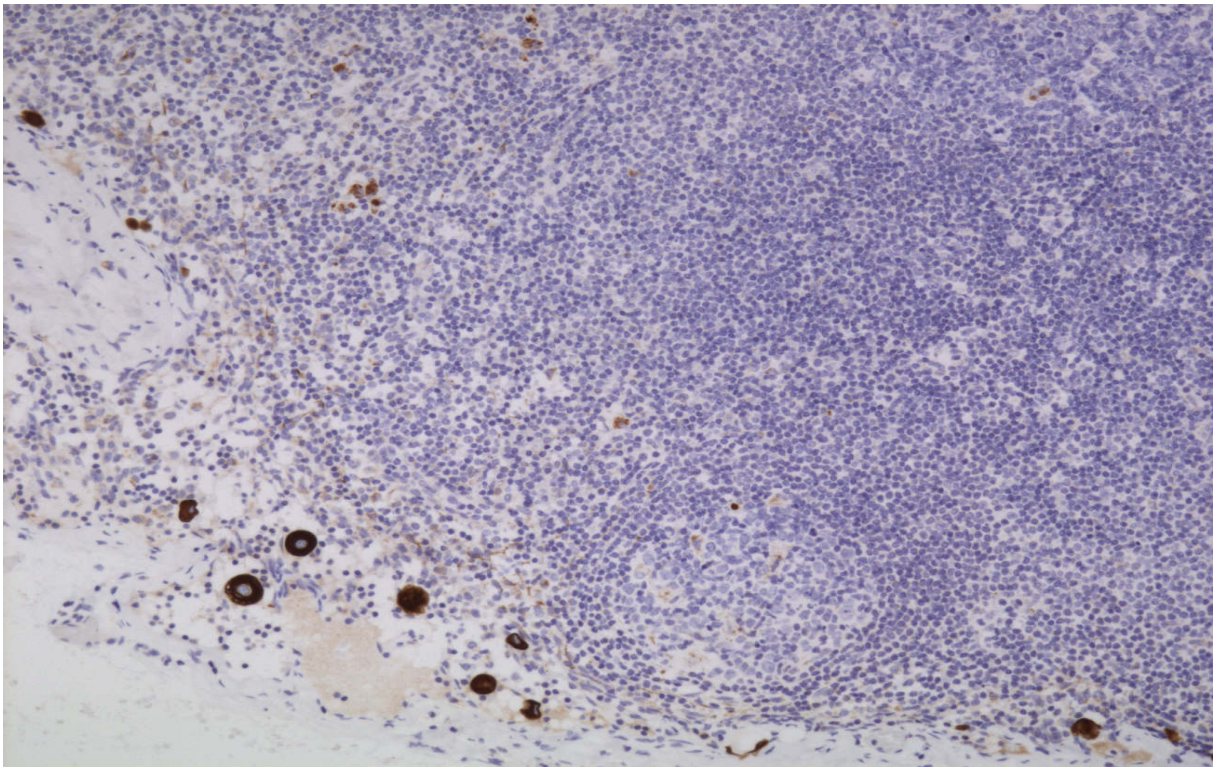


Abb. 2.3. Foto 17246/05 SLN pelv., IHC, einzelne Tumorzellen

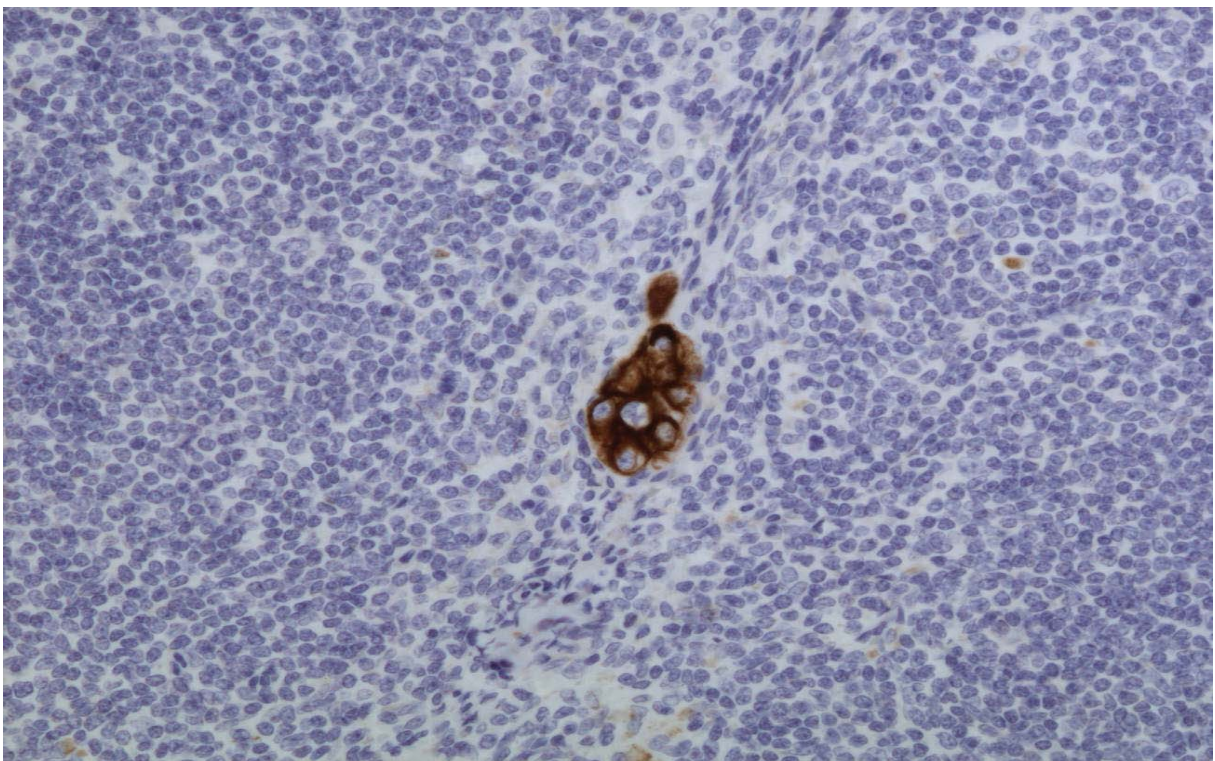


Abb. 2.4. Foto 9818/05 LN para., IHC, Cluster $\leq 0,2\text{mm}$

Aus dieser Beurteilung ergab sich die abschließende Einteilung in die postoperativen FIGO-Stadien. Der endgültige histopathologische Befund wurde im TNM-System angegeben.

3.4. Reevaluierung der Lymphknoten in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die archivierten Schnittstufen von Haupttumor, Lymphknoten und Sentinellymphknoten aller 25 Patientinnen wurden erneut mikroskopisch beurteilt. Zwei unabhängige Untersucher waren mit der erneuten Musterung der Schnitte betraut.

Die Beurteilung der hämatoxylin-eosin gefärbten Gewebeschnitte erfolgte zunächst lichtmikroskopisch in der Übersicht in 25-facher und dann in 250-facher sowie 400-facher Vergrößerung [Lichtmikroskop Leitz Dialux, Wetzlar, Deutschland]. Konnte der Lymphknotenstatus durch dieses Vorgehen nicht eindeutig geklärt werden, wurden die entsprechenden Präparate zusätzlich einem dritten Kollegen zur Begutachtung vorgelegt. Dieser traf dann letztendlich die Entscheidung, ob es sich bei dem fraglichen Lymphknotenbefund um eine Tumorzellabsiedelung handelte oder nicht.

Zudem wurden in unklaren Fällen neue Schnittstufen vom archivierten Paraffinblock angefertigt, mit HE gefärbt und in die zu beurteilenden Präparate eingeschlossen.

Den Untersuchern waren die ursprünglichen histopathologischen Befunde zu jeder Zeit zugänglich und bekannt.

Das Lymphknotenstaging erfolgte nach den geltenden AJCC-Kriterien und die Angabe des histopathologischen Tumorstadiums entsprechend der TNM-Klassifikation.

3.5. Prinzip der Immunhistochemischen Färbung mittels LSAB-Methode

In der hier vorgestellten Studie wurde ein immunhistochemisches Färbesystem zur Darstellung von Panzytokeratin verwendet [Firma Dako Denmark A/M, Dänemark].

Da Zytokeratine von Zellen epithelialen Ursprungs exprimiert werden, lassen sich mit dieser immunhistochemischen Methode Karzinommetastasen bis hin zu einzelnen Tumorzellen nachweisen.

Vor der Färbung der in üblicher Weise formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte ist in den meisten Fällen eine Epitopdemaskierung notwendig.

Unter Epitopdemaskierung versteht man die Freilegung der Strukturen, die vom verwendeten Antikörper erkannt werden können. Mit dieser Demaskierung wird gewährleistet, dass der später applizierte primäre Antikörper optimal an sein entsprechendes Antigen binden kann. In der vorgestellten Arbeit wurde diese Epitopdemaskierung mittels Hitzebehandlung unter Verwendung einer speziellen Demaskierungslösung [Borg Decloaker, Biocare Medical (BD 1000G1), Concord, CA, USA] durchgeführt.

Als primärer Antikörper zur Detektion von Panzytokeratin wurde ein monoklonaler Anti-Human-Zytokeratin-Antikörper aus der Maus verwendet [MNF 116, Dako Cytomation, USA].

Zur Signalverstärkung wurden als Sekundär- und Tertiärreagenzien ein biotinylierter polyklonaler Anti-Maus-Antikörper (aus der Ziege), sowie Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppeltes Streptavidin verwendet.

Jedes biotinylierte Antikörpermolekül kann spezifisch mehrere peroxidasekonjugierte Streptavidinmolekülen binden. Die Aktivität endogener Peroxidase wurde durch den Einsatz von Peroxidase-Blocking-Solution (PBS, Dako REAL™, Dänemark) vor der Inkubation mit Streptavidin-HRP inhibiert.

Zur Visualisierung der Reaktionen diente 3,3'Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB+). Dieses Chromogen wird am Ort des gebundenen Primärantikörpers mit Hilfe der Horseradish-Peroxidase (HRP) in ein braunes Endprodukt umgewandelt.

Eine Gegenfärbung zur besseren Kontrastierung und Darstellung insbesondere der Zellkerne erfolgte mit Hämatoxylin, so dass die Nuklei blau zur Darstellung kommen.

Eine ausführliche Färbanleitung sowie Beschreibung aller verwendeten Reagenzien findet sich im Anhang (S. 71-74)

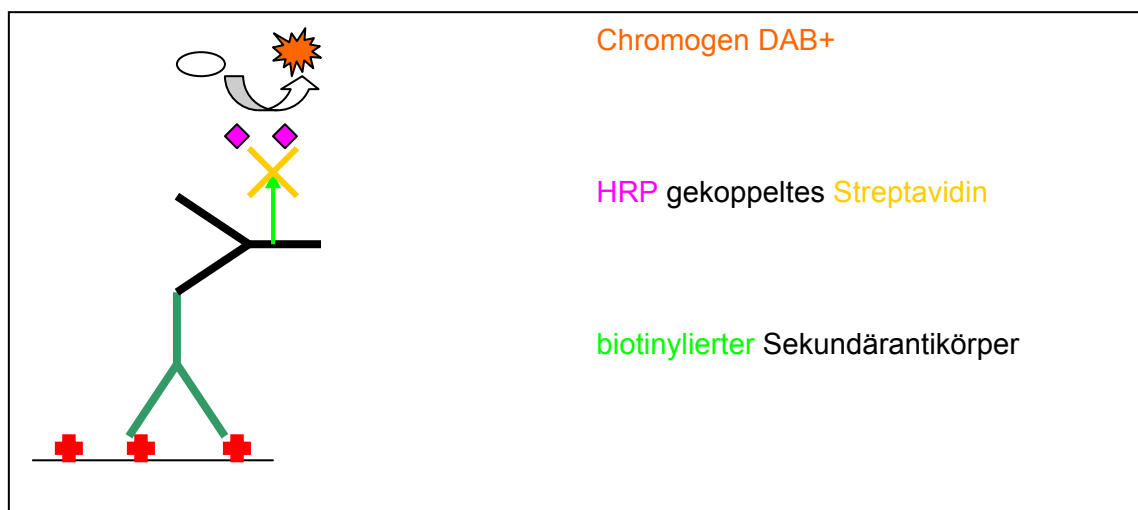


Abb. 3.1. Schema der Immunhistochemischen Färbemethode LSAB¹³

3.6. Histologische Begutachtung und Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate

Das gesamte Lymphknoten- und Sentinellymphknotenmaterial wurde in Scheiben geschnitten und in Paraffin eingebettet (s.o.). Von diesen archivierten Paraffinblöcken wurden 1µm dünne Schnitte für die immunhistochemische Färbung angefertigt.

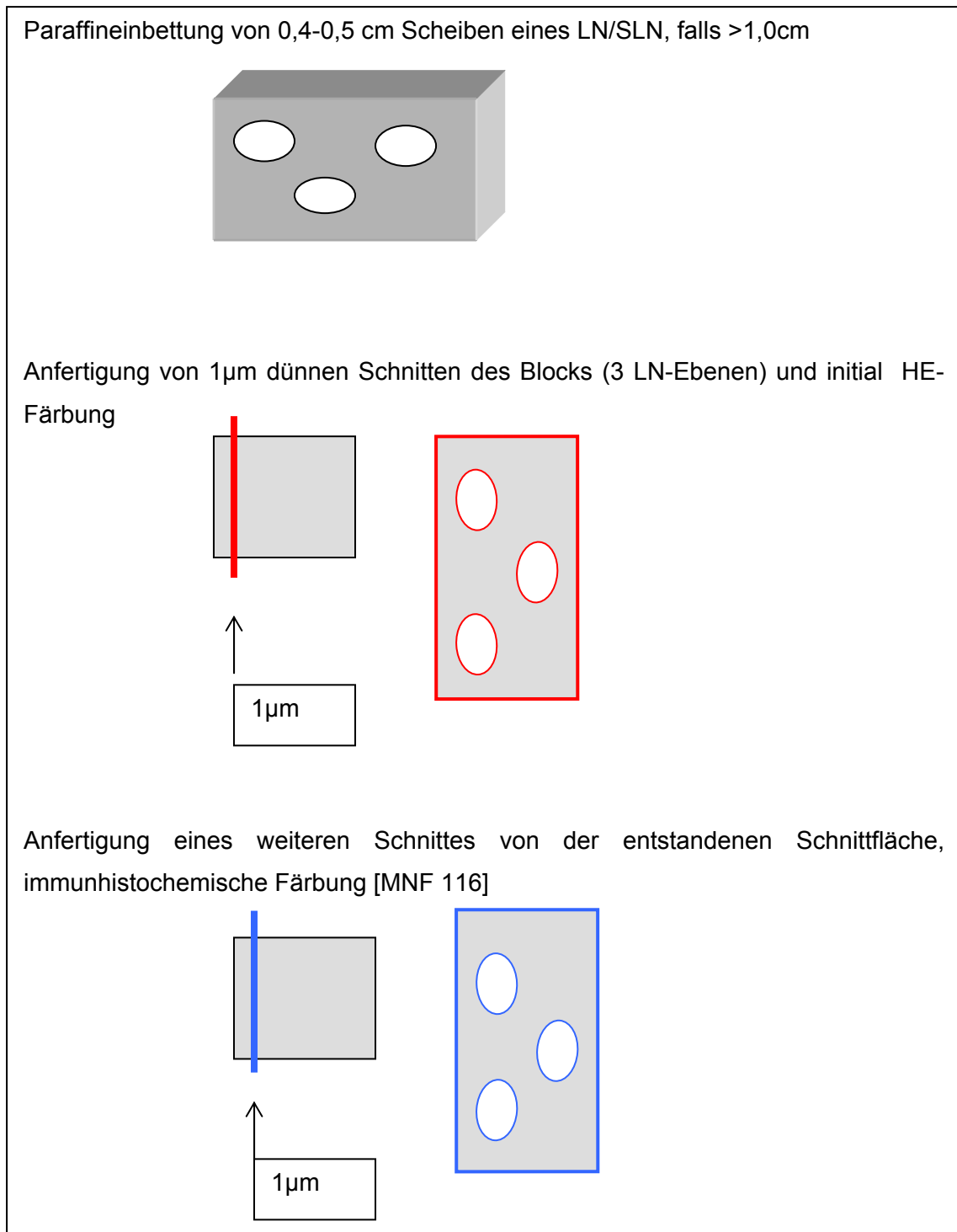


Abb 3.2. Aufarbeitung Lymphknotenpräparate

So wurde zu jedem HE-gefärbten Schnitt ein analoger Schnitt für die immunhistochemische Färbung von mindestens zwei Schnittebenen gewonnen.

Zusätzlich wurde von jedem paraffineingebetteten Haupttumorblock ein repräsentativer Schnitt vom Ort der tiefsten Myometriuminfiltration als Positivkontrolle gewonnen.

Nach entsprechender Vorbereitung durch Entparaffinierung, Rehydrierung und Epitopdemaskierung wurden die Färbung der einzelnen Schnitte mit Hilfe eines Färbeautomaten [Dako Techmate®, USA] durchgeführt.

Die Begutachtung der Schnittstufen erfolgte durch zwei Untersucher in der Übersicht und unter dem Lichtmikroskop in 25-facher, 250-facher und 400-facher Vergrößerung.

Hierbei wurden zusätzlich zu jedem Gewebeschnitt die entsprechenden Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitte als Kontrolle mitgemustert.

In Fällen, in denen die Differenzierung zwischen unspezifischer Färbung, Artefakt und Metastase durch dieses Vorgehen nicht eindeutig gelang, wurden die Gewebeschnitte einem sehr erfahrenen Kollegen zur Beurteilung vorgelegt. Dieser traf dann die Entscheidung zum abschließenden Lymphknotenstaging (s. Abb. 4.1.3.a).

Bei den drei Fällen ([#9, #18, #25]), die in der histopathologischen Untersuchung basierend auf HE-gefärbten Schnitten nodal negativ waren und erst durch Anwendung der Panzytokeratinmarkierung nodal positiv gewertet wurden, erfolgte eine weitere Aufarbeitung der metastatischen Lymphknoten. Von den entsprechenden Sentinellymphknoten und den Haupttumoren wurden zusätzliche Schnitte angefertigt und einer immunhistochemischen p53-Markierung zur ergänzenden Beurteilung der Dignität unterzogen. Diese zusätzliche immunhistochemische Färbung diente der Kontrolle der Ergebnisse aus der Panzytokeratinmarkierung.

Dieses Vorgehen ermöglichte in jedem der 25 untersuchten Fälle die eindeutige Beschreibung des Nodalstatus.

Die Angabe des abschließenden Tumorstadiums erfolgte anhand der FIGO-Stadieneinteilung und des pTNM-Systems. Das Nodalstadium wurde entsprechend der geltenden AJCC-Kriterien dokumentiert¹².

3.7. Datenmanagement und Qualitätssicherung

Alle patientenbezogenen Daten wurden in pseudonymisierter Form erfasst. Jede Patientin ist durch eine Identifikationsnummer, die bei der Registrierung zugewiesen wurde, unverwechselbar gekennzeichnet.

Im Rahmen der intraoperativ durchgeführten Sentinellymphknotenmarkierung mussten zwei unabhängige Mitarbeiter die Anfärbung der Sentinellymphknoten bestätigen. Nur unter dieser Voraussetzung wurden die Lymphknoten als Sentinellymphknoten zur

histopathologischen Begutachtung gegeben. Das exstirpierte Gewebe wurde im Rahmen der konventionellen Untersuchung auf das Vorhandensein von lymphatischen Strukturen untersucht.

Alle erhobenen Daten wurden durch den externen, unabhängigen Untersucher auf ihre Vollständigkeit und Plausibilität überprüft, bevor sie in die Datenbank eingelesen wurden. Die Beurteilung sämtlicher Präparate erfolgte durch zwei unabhängige Gutachter. In Zweifelsfällen wurden die entsprechenden Präparate einem sehr erfahrenen Kollegen vorgelegt, der die endgültige Diagnose stellte. Abweichungen wurden somit erfasst und im Falle von Unstimmigkeit erneut eingelesen oder, falls keine Klärung herbeigeführt werden konnte, komplett ausgeschlossen. Alle erhobenen Daten wurden nach Abschluss der Befundung erneut einer Plausibilitätsprüfung unterzogen, bevor sie in die Datenbank eingelesen wurden. Die erhobenen Daten wurden in einer MS Access®-Datenbank (Microsoft Office 2003, Richmond, Oregon, USA) erfasst und mit MS Excel® (Microsoft Office 2003, Richmond, Oregon, USA) ausgewertet.

3.8. Statistische Betrachtung des diagnostischen Tests

Bei dem Sentinelkonzept geht es um die Evaluierung eines diagnostischen Tests. Er soll beschreiben, ob der Nodalstatus der Sentinellymphknoten den Status der zugehörigen Lymphknotenregion richtig widerspiegelt.

Hierbei gibt die Detektionsrate den Anteil an Patientinnen an, bei denen ein oder mehrere Sentinellymphknoten gefunden wurden. Zur Auswertung zogen wir die Daten der Patientinnen heran, bei denen die Markierung von Sentinellymphknoten durchgeführt und ein kompletter Lymphknotensatz entfernt werden konnte.

Sind die Sentinellymphknoten und alle im Weiteren entfernten Lymphknoten in der histopathologischen Untersuchung frei von einer Metastasierung, spiegelt der Sentinellymphknotenstatus korrekt den regionalen Lymphknotenstatus wider. Es handelt sich um ein richtig negatives Testergebnis (r.n.). Finden sich in der histopathologischen Untersuchung Lymphknotenmetastasen, obwohl in den Sentinellymphknoten durch die histopathologische Untersuchung keine Metastasierung nachgewiesen werden konnte, ist das Testergebnis falsch negativ (f.n.). Wird in einem oder werden in mehreren Sentinellymphknoten histopathologisch Metastasen nachgewiesen, ist das Testergebnis richtig positiv (r.p.). Dies ist unabhängig davon, ob in den übrigen entfernten Lymphknoten in der histopathologischen Untersuchung Metastasen nachgewiesen werden konnten oder nicht, weil die Sentinellymphknoten selbst Bestandteil der gesamten Lymphknotenregion sind. Somit ist der Begriff des falsch-positiven (f.p.) Befundes für das Sentinelkonzept nicht sinnvoll anwendbar.

3.9. Statistische Auswertung

Als klinische Patientenparameter wurden das Geburtsdatum, das Operationsdatum, die Körpermasse und die Körpergröße dokumentiert. Das, aus den Ergebnissen der diagnostischen Ausschabung, Hysteroskopie und Narkoseuntersuchung bekannte präoperative Tumorstadium und die histopathologischen Spezifikation des Karzinoms wurden in einer Datenbank erfasst. Operationsparameter, die das Ausmaß der Operation dokumentieren, wie Adnexektomie, pelvine und paraaortale Lymphadenektomie, Appendektomie und Omentektomie, wurden ebenfalls in die Datenbank eingegeben.

Als Ergebnisparameter wurde die Anzahl entfernter Nicht-Sentinellymphknoten und Sentinellymphknoten, deren Lage und deren histopathologische Untersuchungsbefunde erfasst (Tab. 4).

Zusätzlich wurden die Befunde der konventionellen histopathologischen Aufarbeitung und Färbung mit Hämatoxylin-Eosin, die Ergebnisse der Reevaluierung der HE-gefärbten Präparate, sowie die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung für jeden einzelnen Non-Sentinellymphknoten und Sentinellymphknoten erhoben und in die Datenbank eingegeben.

Alle Daten wurden deskriptiv dargestellt. Kategorielle Variablen wurden als absolute und relative Häufigkeiten berichtet. Für kontinuierliche Variablen wurden Mediane sowie Spannweiten angegeben.

Zur Bewertung des diagnostischen Tests wurden die Daten von 21 Patientinnen [exklusive #2, #3, #4, #21] analysiert. Einschlusskriterien zur Auswertung waren die Therapie eines Korpuskarzinoms in kurativer Absicht in Form einer totalen abdominellen Hysterektomie mit beidseitiger Adnexektomie, sowie eine pelvine und fakultativ paraaortale Lymphadenektomie mit Sentinellymphknotenbiopsie.

Die Daten der vier Patientinnen ([#2, #3, #4, #21]), bei denen eine Lymphadenektomie ohne eine Sentinellymphknotendetektion oder eine isolierte Sentinellymphknotenexstirpation ohne weitere Lymphadenektomie erfolgte, wurden nicht in der Auswertung des diagnostischen Tests berücksichtigt (Tab.4).

Um zu zeigen, dass mittels intensivierter Aufarbeitung der Lymphknotenpräparate mit Immunhistologie im Vergleich zur herkömmlichen Aufarbeitung mit der HE-Färbung, mehr Metastasen gefunden werden können, wurden die Ergebnisse deskriptiv dargestellt sowie statistische Tests mit einer einseitigen Fragestellung durchgeführt.

Zunächst wurden die absoluten Anzahlen an Sentinellymphknoten (SLN) und Nicht-Sentinellymphknoten (NSLN) sowie die Gesamtzahl an Lymphknoten (LNges) pro Patientin angegeben (Tab.4+5).

Zusätzlich wurde für jede Patientin, basierend auf den Lymphknotenklassen (SLN u. NSLN) und den Färbungen (HE u. IHC) der Metastasenstatus definiert. Eine Patientin gilt hierbei als „positiv“, wenn mindestens ein Lymphknoten eine Metastase aufweist. Bei dieser Darstellung wird jedoch nicht berücksichtigt, wie groß der Anteil an positiven Lymphknoten und Sentinellymphknoten unter den extipierten Lymphknoten ist (Tab.6). Bei der Betrachtung des Metastasenstatus der Sentinellymphknoten und Nicht-Sentinellymphknoten wurde das Gesamtergebnis aus der durchgeführten Hämatoxylin-Eosin-Färbung und immunhistochemischer Färbung (HE+IHC) als „wahrer Lymphknotenbefund“ definiert.

3.9.1. Vergleich des Metastasennachweises in Abhängigkeit der verwendeten Färbung

Zum Vergleich der beiden Färbemethoden wurde das Vorhandensein von Metastasen in Sentinel- und Non-Sentinellymphknoten in Abhängigkeit von der durchgeführten Färbung (HE vs. IHC) untersucht. Hierzu wurde zunächst für alle Patientinnen, für jede Färbung und für jede Lymphknotenart (SLN, LNpara, LNpelv) ein Summenscore berechnet, der angibt, wie viele Lymphknoten positiv waren. Anschließend wurde für jede Lymphknotenart die Differenz der Scores (IHC-HE) bei jeder Patientin bestimmt. Unter Verwendung dieser Differenzen wurde für die Sentinellymphknoten sowie für alle Lymphknoten zusammen (LNges) ein exakter Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest durchgeführt und der exakte p-Wert des Tests angegeben.

Dieser Test wurde verwendet, da es sich um zwei abhängige Stichproben handelt, weil jeder Lymphknoten mit beiden Methoden untersucht wird. Außerdem kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Daten einer Normalverteilung folgen. Dies liegt zum einen daran, dass nur ganz zahlige Werte vorkommen können. Zum anderen ist die Verteilung der Scores sehr unausgewogen, da bei einem Großteil der Patientinnen keine Lymphknotenmetastasen detektiert wurden und nur bei einigen wenigen positive Ergebnisse auftraten.

3.9.2. Vergleich des Metastasenstatus

Zum Vergleich des Metastasenstatus in Abhängigkeit der Färbemethode wurden zusätzlich Vierfeldertafeln aufgestellt, die die Grundlage zur Berechnung der Sensitivität und des negativen Vorhersagewertes sind. Die Ergebnisse wurden mittels eines exakten-Binomial-Tests ausgewertet und miteinander verglichen (Tab. 9-13).

3.9.3. Vergleich der positiven Lymphknoten unter Berücksichtigung der absoluten Anzahl an positiven Lymphknoten

In dieser Analyse wird die Anzahl der positiven Lymphknoten berücksichtigt. Der Vergleich der Gruppen erfolgt anhand des Anteils an Lymphknoten, in denen Metastasen gefunden werden konnten. Der wahre Lymphknotenstatus ist wie o.g. definiert (3.9).

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des exakten Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtests (Tab.14).

4. Ergebnisse

Die Sentinellymphknotenmarkierung wurde bei insgesamt 25 Patientinnen, denen die Diagnose eines Korpuskarzinoms gestellt worden war, durchgeführt (Tab. 4). In zwei Fällen konnten keine Sentinellymphknoten detektiert werden. Die Detektionsrate betrug somit 92,0%.

Bei zwei Patientinnen wurde auf eine weitere Lymphadenektomie verzichtet, da intraoperativ kein invasives Wachstum des Karzinoms nachgewiesen werden konnte.

Die spezifischen Charakteristika der Tumoren sind in Tabelle 2 und 3 zusammengefasst.

Insgesamt wurden bei den verbleibenden 21 Patientinnen 673 Lymphknoten entfernt, wobei im Mittel 26 Lymphknoten von jeder Patientin entnommen wurden (min. 17-max. 70).

100 dieser Lymphknoten stellten sich mittels intraoperativ appliziertem Patentblau® als Sentinellymphknoten dar. Es konnten in der histopathologischen Aufarbeitung im Mittel drei Sentinellymphknoten beschrieben werden (min.-max. 1-13). 97 (97%) der SLN fanden sich im pelvinen Basin. Bei einer Patientin fanden sich drei (3%) SLN paraaortal. Von den 100 SLN wiesen insgesamt vier SLN (4%) bei zwei Patientinnen (9,5%) [#8, #12] in den HE-gefärbten Schnitten Tumorabsiedelungen auf. Mittels immunhistochemischer Färbung wurden metastatische Absiedelungen in insgesamt sieben von 100 SLN(7%) bei fünf Patientinnen (23,8%) gefunden [#8, #9, #12, #18, #25].

Die übrigen 573 Nicht-Sentinel-Lymphknoten verteilen sich auf 412 Lymphknoten (71,9%) aus dem pelvinen und 161 (28,1%) Lymphknoten aus dem paraaortalen Kompartiment (Tab.4+5).

In der histologischen Aufarbeitung der NSLN zeigten sich in den HE gefärbten Präparaten von zwei Patientinnen [#7, #12] (9,5%), in insgesamt drei der entnommenen 573 NSLN Metastasen des Endometriumkarzinoms. Einer der metastasierten Lymphknoten fand sich paraaortal [#12], die beiden anderen pelvin [#7, #12].

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung konnten bei insgesamt vier Patientinnen (19%), in sechs von 573 NSLN Tumorzellen nachgewiesen werden. Davon fanden sich vier in paraaortalen NSLN [#7, #8, #12, #18] und zwei in pelvinen NSLN [#7, #12].

Bei einer der 21 Patientinnen (4,8%) waren mit den verwendeten Methoden keine Tumorzellabsiedelungen im SLN nachweisbar. Dennoch fanden wir bei dieser speziellen

Patientin Metastasen in den Nicht-Sentinellymphknoten. Das Verfahren ist somit in diesem einzelnen Fall als „falsch negativ“ zu bewerten [#7] (Tab.8).

Durch die Anwendung der immunhistochemischen Färbung konnten insgesamt zu den sieben konventionell entdeckten Metastasen (HE) sechs weitere Metastasen beschrieben werden (Tab. 7).

Nach erfolgter immunhistochemischer Färbung sind somit bei sechs [#7, #8, #9, #12, #18, #25] von 21 Patientinnen Lymphknotenmetastasen nachgewiesen worden. Bei fünf Patientinnen [#8, #9, #12, #18, #25] gelang der Nachweis von Metastasen in den Sentinellymphknoten.

Der durchgeführte Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ergibt bei Betrachtung aller Lymphknoten eine Überlegenheit des Metastasennachweises mittels immunhistochemischer Färbung ($p=0,031$).

Der alleinige Vergleich des Metastasennachweises innerhalb der Sentinellymphknoten in Abhängigkeit der Färbemethode ergab keine Überlegenheit der immunhistochemischen Färbung ($p=0,125$), obwohl mittels immunhistochemischer Färbung bei fünf von 21 Patientinnen in den Sentinellymphknoten Metastasen nachgewiesen wurden (23,8%). Mittels alleiniger HE-Färbung gelang der Metastasennachweis in Sentinellymphknoten nur bei zwei von 21 Patientinnen (9,5%).

Der Vergleich des Metastasennachweises innerhalb der Gruppe der Nicht-Sentinellymphknoten in Abhängigkeit der Färbemethode ergab ebenfalls keine signifikante Überlegenheit der immunhistochemischen Färbung ($p=0,125$). So konnten mittels immunhistochemischer Färbung bei vier von 21 Patientinnen Metastasen in den Nicht-Sentinellymphknoten nachgewiesen werden (19,1%). Mittels alleiniger HE-Färbung gelang der Metastasennachweis in Nicht-Sentinellymphknoten nur bei zwei von 21 Patientinnen (9,5%).

4.1. Spezielle Patientinnen

Durch die Anwendung der Immunhistochemie wurden bei sechs Patientinnen weitere Lymphknotenmetastasen entdeckt. Bei diesen sechs Patientinnen wurde mindestens jeweils ein Sentinellymphknoten detektiert. Eine Metastasierung war bei drei dieser insgesamt sechs Patientinnen bereits durch die konventionelle histopathologische Aufarbeitung bekannt.

4.1.1. Patientinnen mit bereits diagnostizierter nodaler Metastasierung

Durch die angewandte neue Untersuchungsmethode konnten bei drei Patientinnen zusätzlich Mikrometastasen nachgewiesen werden. Der postoperativen Gesamtstatus änderte sich in diesen Fällen nicht:

Patientin #7 war zum Zeitpunkt der Operation 55 Jahre alt. Sie wurde durch eine Postmenopausenblutung symptomatisch. Durch eine Narkoseuntersuchung, fraktionierte Ausschabung mit Hysteroskopie und die histologische Aufarbeitung des Abradats wurde die Diagnose eines endometroiden Adenokarzinoms im FIGO-Stadium I gestellt. Im Rahmen der Operation wurde eine Hysterektomie mit bilateraler Adnexektomie und pelviner- sowie paraaortaler Lymphadenektomie durchgeführt. Insgesamt wurden 29 pelvine und drei paraaortale Lymphknoten entfernt. Darunter befanden sich klinisch drei Sentinellymphknoten, die identifiziert und gezielt exstirpiert wurden. In der histopathologischen Untersuchung stellten sich diese drei Sentinellymphknoten als acht einzelne Lymphknoten dar. Alle Sentinellymphknoten waren in der konventionellen histopathologischen Untersuchung frei von einer Metastasierung.

Im Bereich der Aufgabelung der A.iliaca communis links befand sich ein klinisch suspekter Non-Sentinellymphknoten, der aus zwei Lymphknoten bestand, von denen einer makrometastasiert war (1/21) [Abb.4.1.1.a/b].

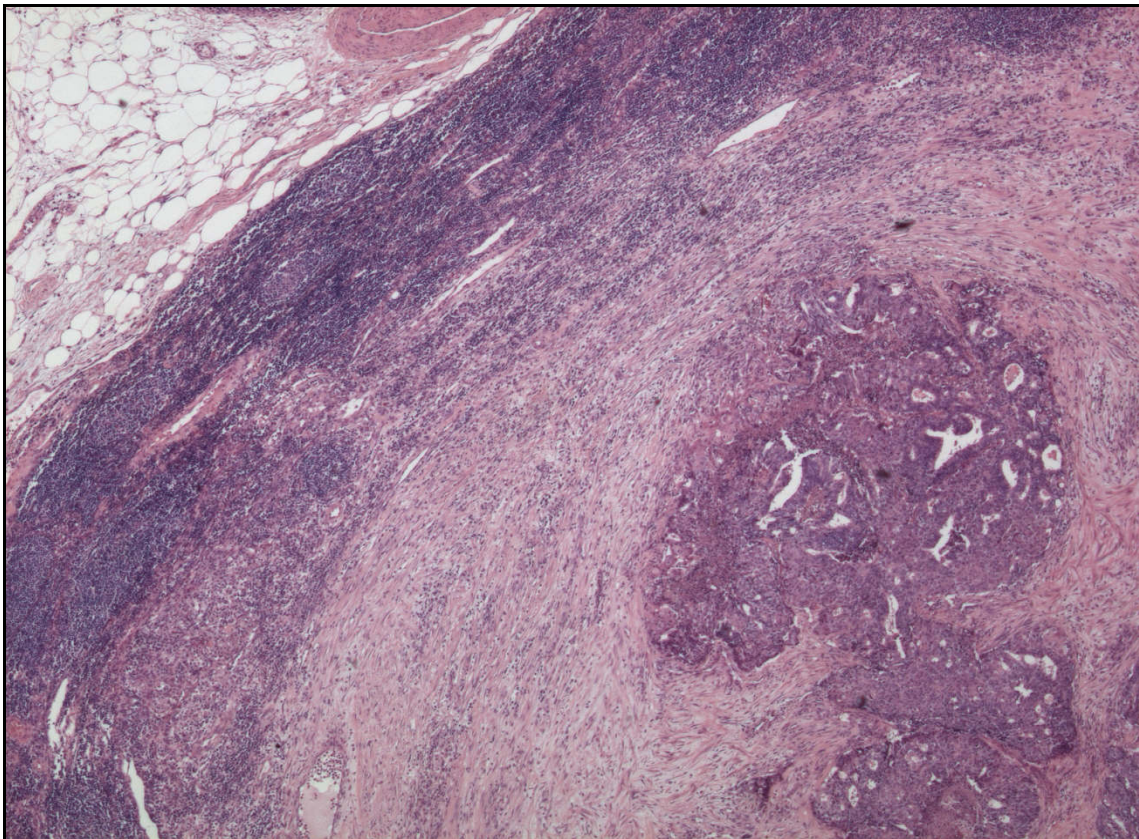


Abb.4.1.1.a, LNpelv,9818/05,#7,Makrometastase,HE

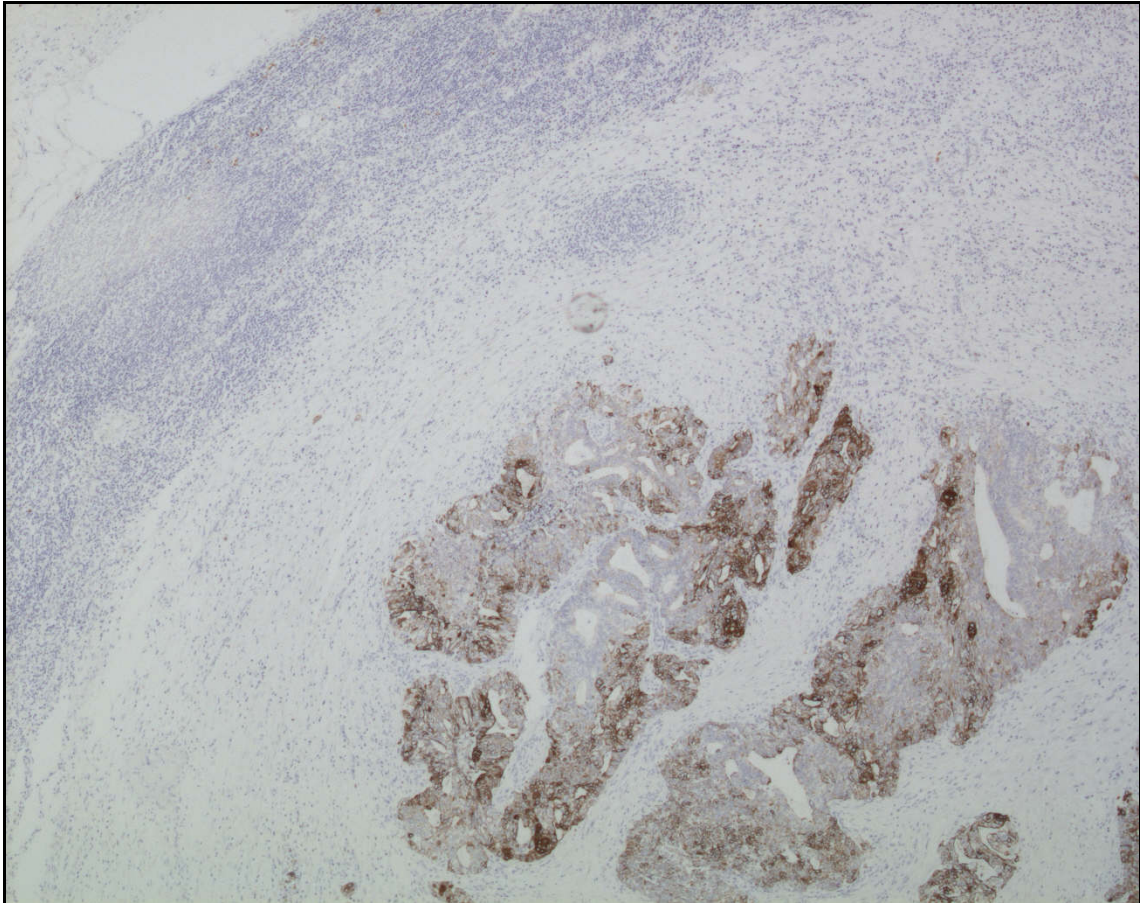


Abb.4.1.1.b LNpelv, 9818/05 , #7, Makrometastase, IHC

Hinsichtlich des diagnostischen Tests handelte es sich in diesem Fall um eine falsch-negative Detektion, da die Sentinellymphknoten nicht den Status der pelvinen Region widerspiegeln. Das abschließende Tumorstadium lautete pT1c, pN1, G2, cM0 bei einem 50mm durchmessenden endometrioidem Adenokarzinom mit einer myometralen Infiltrationstiefe von 10mm bei einer gesamten Myometriumwanddicke von 32mm.

In der Reevaluation aller Lymphknotenpräparate bestätigte sich die in der HE-Färbung durch die konventionelle Aufarbeitung bereits beschriebene Metastase. Unter Verwendung der Panzytokeratinfärbung konnte zusätzlich in einem der drei paraaortalen Lymphknoten ein Tumorzellcluster nachgewiesen werden (1/3) [Abb. 4.1.2.a].

Diese atypischen Zellen waren mit der konventionellen Aufarbeitung und HE-Färbung nicht zu erkennen.

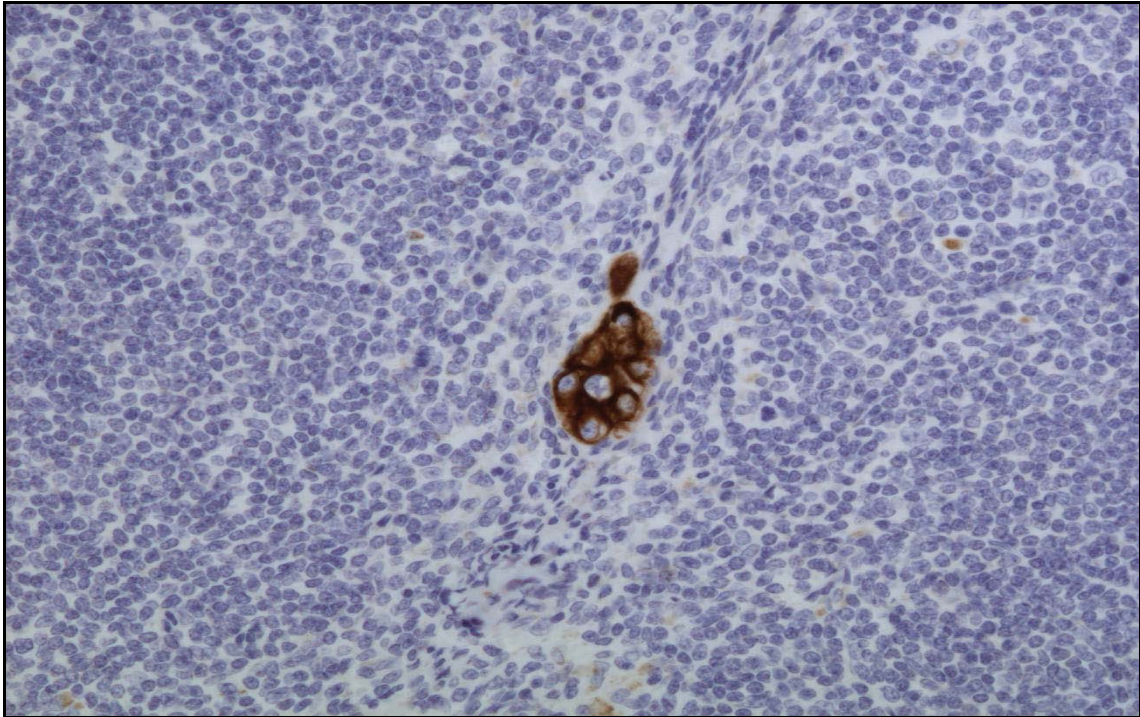


Abb. 4.1.2.a Foto 9818/05 LN para., IHC, Cluster $\leq 0,2$ mm

In den klinisch als Sentinellymphknoten beschriebenen pelvinen Lymphknoten fand sich weder in konventioneller histopathologischer Begutachtung, noch bei erneuter Durchsicht der HE-Schnitte und zusätzlicher Panzytokeratinfärbung ein Anhalt für Metastasierung. Bei den in Abbildung 4.1.3.a,b zu erkennenden Braunfärbungen handelt es sich um unspezifische Färbungen.

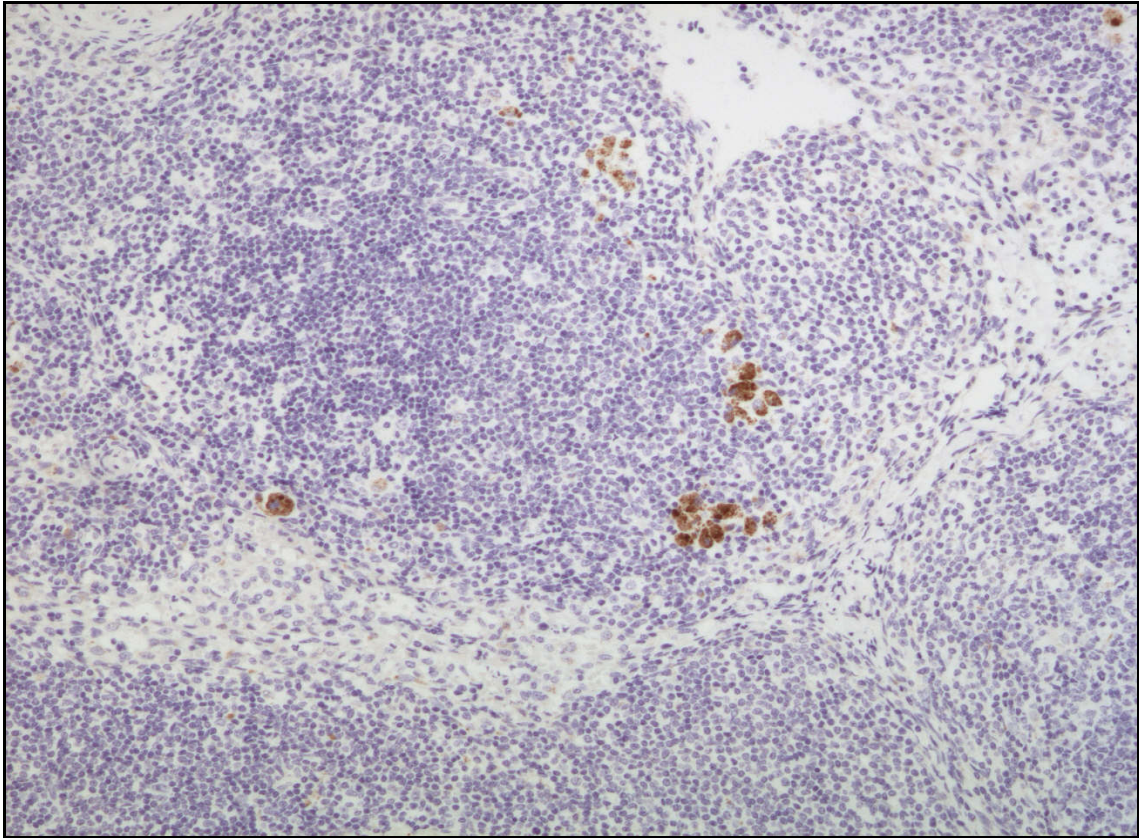


Abb. 4.1.3.a SLNpelv, 9818/05,#7 unspezifische Färbung, IHC, 250-fach

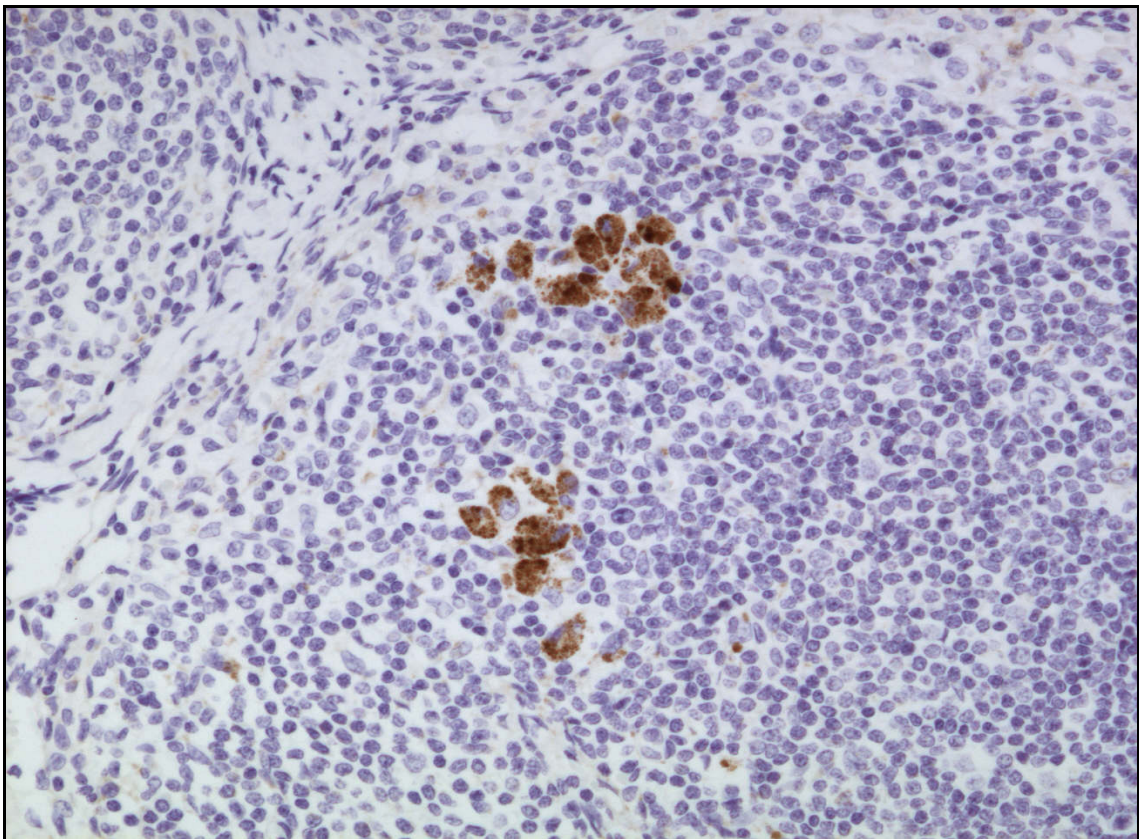


Abb. 4.1.3.b SLNpelv, 9818/05,#7, unspezifische Färbung, IHC, 400-fach

Das abschließende Tumorstadium der konventionellen histopathologischen Beurteilung mittels HE-Färbung pT1c, pN1(1/32) ändert sich in pT1c pN1(2/32).

Patientin #8 war zum Zeitpunkt der Operation 55 Jahre alt. Sie wurde durch eine Postmenopausenblutung symptomatisch. Durch eine Narkoseuntersuchung, eine fraktionierte Ausschabung mit Hysteroskopie und die histologische Aufarbeitung des Abradats wurde die Diagnose eines endometroiden Adenokarzinoms im FIGO-Stadium IB gestellt. In der Operation wurde eine Hysterektomie mit bilateraler Adnexektomie und pelviner- sowie paraaortaler Lymphadenektomie durchgeführt. Insgesamt wurden 70 Lymphknoten entfernt, darunter 44 pelvine und 26 paraaortale Lymphknoten. Es konnten klinisch zwei Sentinellymphknoten identifiziert und gezielt exstirpiert werden. Alle Non-Sentinellymphknoten waren in der konventionellen histopathologischen Untersuchung frei von einer Metastasierung. Einer der Sentinellymphknoten bestand in der histopathologischen Untersuchung aus drei kleinen Lymphknoten, von denen zwei eine Metastasierung aufwiesen, es handelte sich hierbei um Mikrometastasen des beschriebenen Endometriumkarzinoms. Der andere Sentinellymphknoten bestand aus sieben kleineren Lymphknoten, die frei von einer Metastasierung waren. In der konventionellen histopathologischen Untersuchung konnten keine weiteren Lymphknotenmetastasen gesichert werden. Es handelt sich in diesem Fall um eine richtig-positive Detektion. Das abschließende Tumorstadium lautete pT1b, pN1(2/70), G2, cM0 bei einem 38mm durchmessendem, 7mm infiltrierendem Adenokarzinom mit einer Gesamtwanddicke des Uterus von 15mm.

Die, durch die konventionellen Aufarbeitung bereits beschriebenen Mikrometastasen der Sentinellymphknoten konnten in der Reevaluierung aller Lymphknotenpräparate bestätigt werden. In den übrigen Lymphknoten fand sich nach erneuter Durchsicht der HE-Schnitte kein Anhalt für eine weitere Metastasierung. In den übrigen Lymphknoten fand sich nach erneuter Durchsicht der HE-Schnitte kein Anhalt für eine weitere Metastasierung.

Unter den 44 pelvinen Lymphknoten fanden sich insgesamt zehn Sentinellymphknoten, die sich histopathologisch aus zwei klinisch beschriebenen Sentinellymphknoten ergaben. Von den zehn Sentinellymphknoten wiesen zwei eine Mikrometastasierung auf, die mit konventioneller HE-Histologie entdeckt und durch erneute Durchsicht der Präparate sowie Anwendung der immunhistochemischen Färbung bestätigt wurden (2/10 SLN) [Abb.4.2.1.a/b].

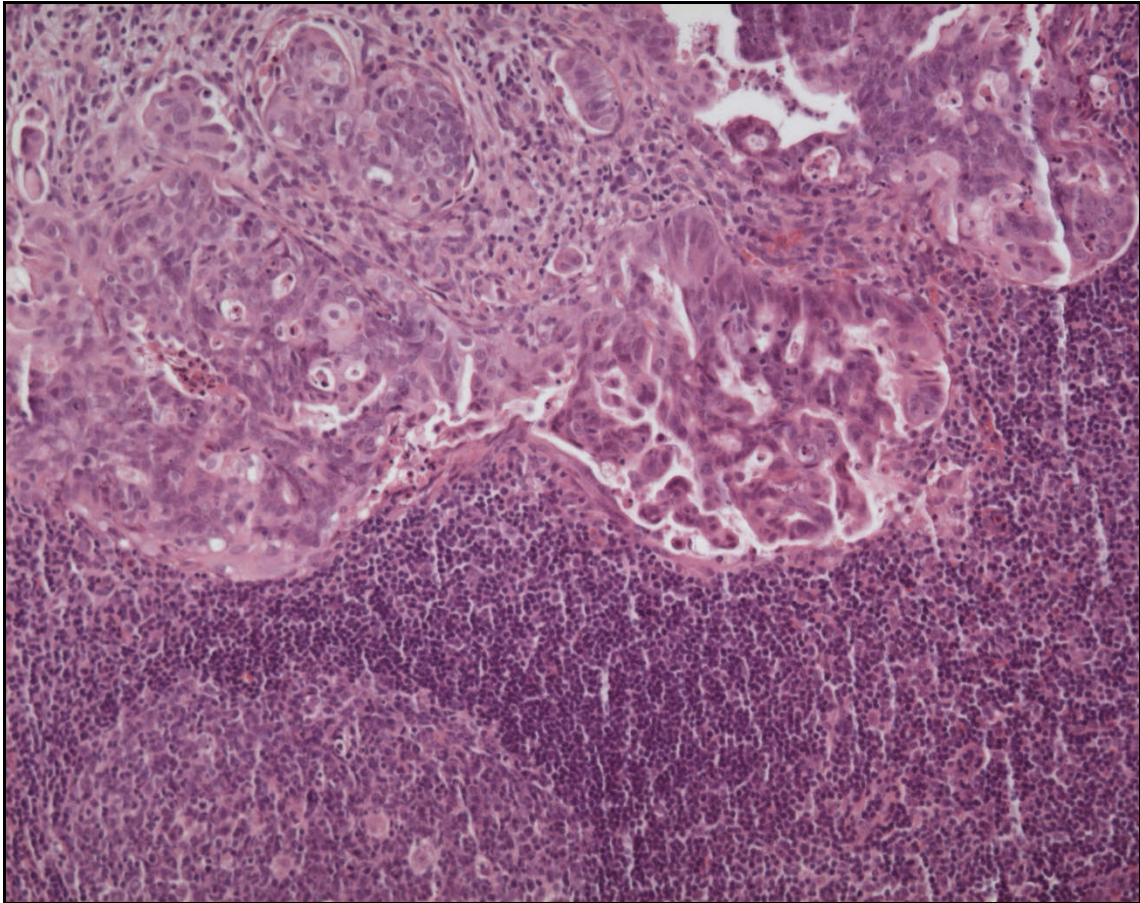


Abb. 4.2.1.a, SLNpelv, #8,10978/05, HE, Mikrometastase

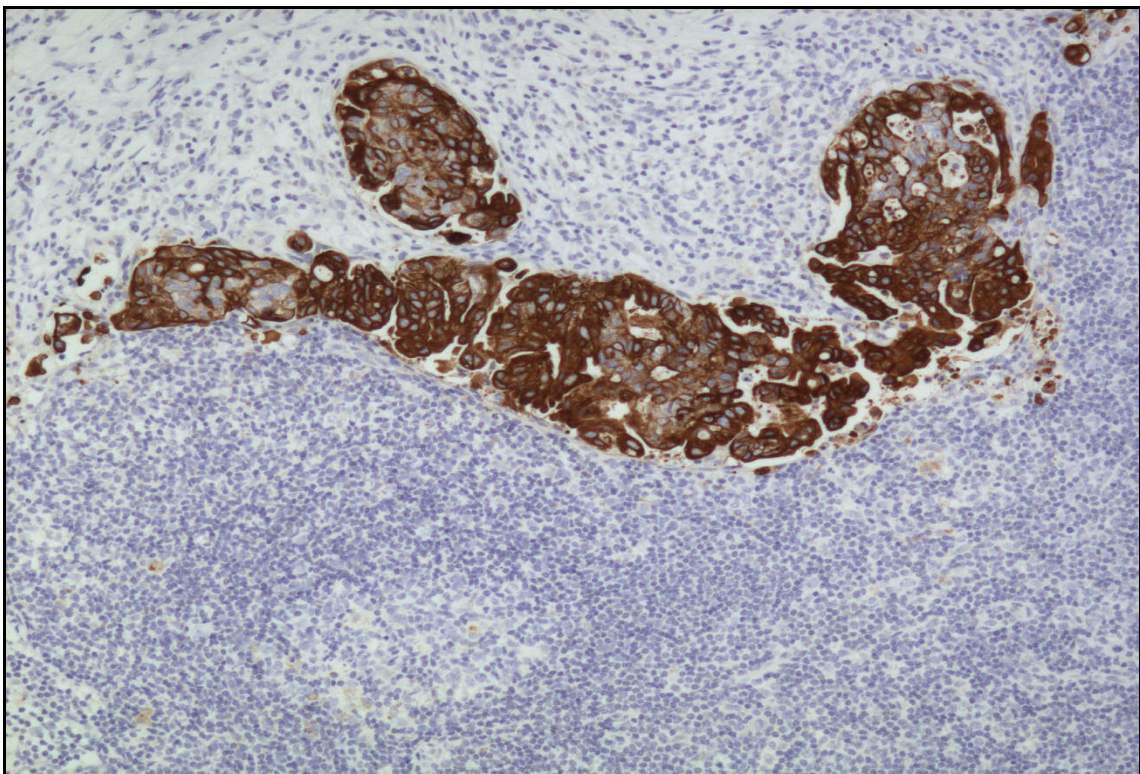


Abb. 4.2.1.b, SLNpelv, 10978/05, #8,CK, Mikrometastase

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung konnte zusätzlich in einem der paraaortalen Lymphknoten eine Mikrometastase entdeckt werden (1/26) [Abb.4.2.2.].

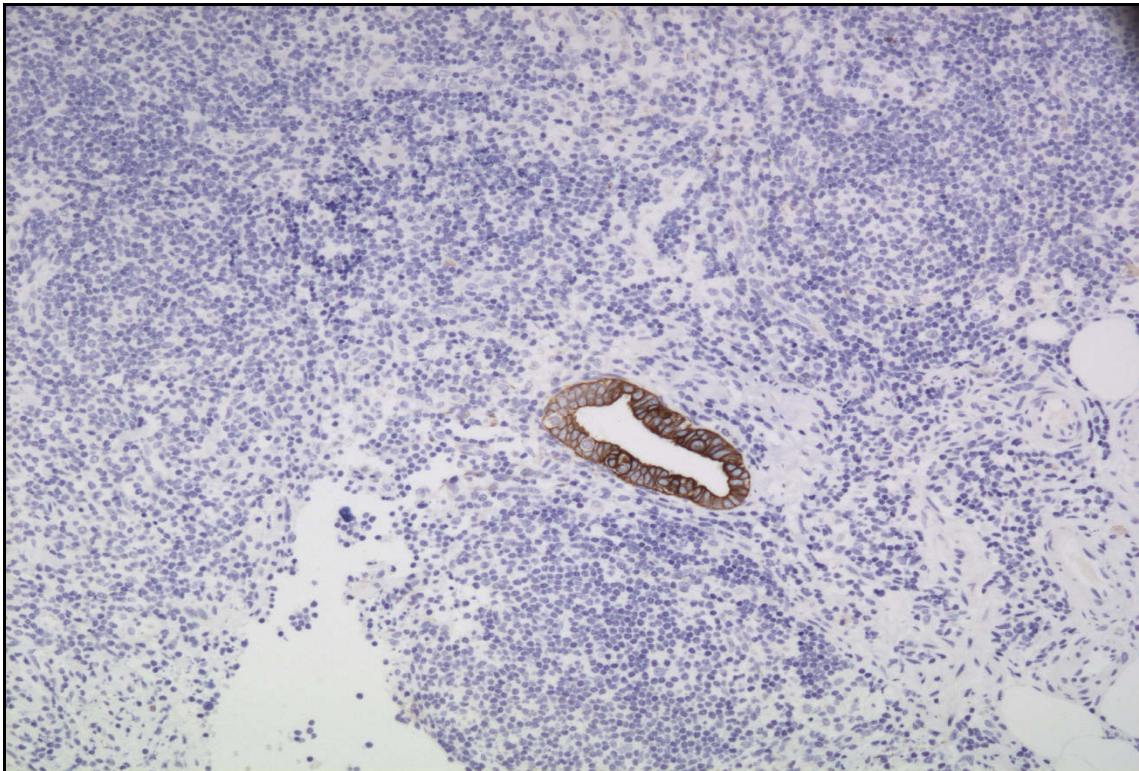


Abb. 4.2.2., LNpara, 10978/05,#8, CK, Mikrometastase

Das abschließende histopathologische Tumorstadium nach konventioneller HE-Färbung lautete pT1b, pN1(2/70). Nach Anwendung der Immunhistochemie änderte sich das Tumorstadium in pT1b, pN1(3/70).

Patientin #12 war zum Zeitpunkt der Operation 66 Jahre alt. Sie wurde durch Ausfluss und eine Postmenopausenblutung symptomatisch. Durch eine Narkoseuntersuchung, eine fraktionierte Ausschabung mit Hysteroskopie und die histologische Aufarbeitung des Abradats wurde die Diagnose eines gering differenzierten, großzelligen Uteruskarzinoms gestellt.

In der Operation wurde eine Hysterektomie mit bilateraler Adnexektomie und pelviner- sowie paraaortaler Lymphadenektomie durchgeführt. Die histologische Begutachtung des Operationspräparates von Haupttumor und Adnexe ergab die Diagnose eines gering differenzierten Karzinosarkoms des Uterus im FIGO-Stadium IIB.

Insgesamt wurden 34 pelvine und 25 paraaortale Lymphknoten entfernt. Darunter konnten klinisch drei Sentinellymphknoten identifiziert und gezielt exstirpiert werden. Ein klinisch

detektierter Sentinellymphknoten lag pelvin und verifizierte sich in der konventionellen histopathologischen Begutachtung nicht als Lymphknoten. Es wurde hier tumorfreies Weichgewebe beschrieben. Ein weiterer Sentinellymphknoten lag paraaortal oberhalb des Abgangs der A. mesenterica inferior, etwas unterhalb der V. renalis dexter und stellte sich in der konventionellen histopathologischen Untersuchung ebenfalls nicht als Lymphknoten dar. Der dritte klinische Sentinellymphknoten lag oberhalb des Abgangs der A. mesenterica inferior und unterhalb der V. renalis dexter. Er bestand histopathologisch aus drei kleinen Lymphknoten, von denen zwei in der konventionellen histopathologischen Aufarbeitung eine Metastasierung aufwiesen. Es konnten jeweils Mikrometastasen des Primärtumors beschrieben werden [Abb.4.3.1.a-c].

In der konventionellen histopathologischen Untersuchung wurden eine weitere pelvine und eine weitere paraaortale Lymphknotenmetastase gesichert. In beiden Fällen handelt es sich um Mikrometastasen des beschriebenen Tumors.

Betrachtet man die paraaortale Region isoliert, handelte es sich um eine richtig-positive Detektion. Bezieht man nur das pelvine Bassin in die Beurteilung ein, kann das Testverfahren nicht angewandt werden, da kein pelviner Sentinellymphknoten histopathologisch verifiziert werden konnte. Das abschließende Tumorstadium lautete pT2b, pN1(4/59), G3, cM0 bei einem 55mm durchmessenden, 9mm infiltrierenden Karzinosarkoms bei einer Uteruswanddicke von 16mm. Das Tumorgewebe erstreckte sich bis in den Zervikalkanal.

Durch die erneute Durchsicht aller Lymphknotenpräparate in der HE-Färbung und zusätzlicher Immunhistologie wurden die zuvor beschriebenen Mikrometastasen bestätigt. Es fanden sich keine weiteren Tumorzellabsiedelungen.

Durch die Anwendung der immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen Panzytokeratin konnten in diesem Falle alle Mikrometastasen bestätigt, jedoch keine weiteren gefunden werden.

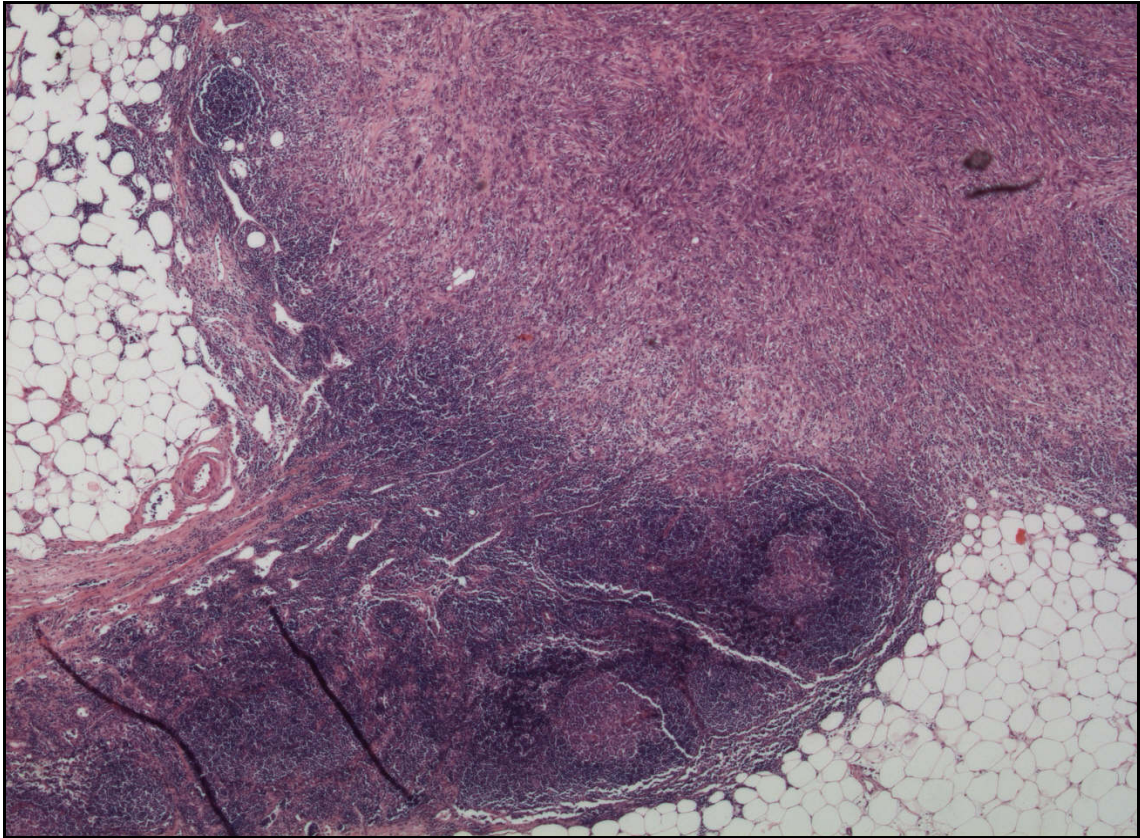


Abb. 4.3.1.a. SLNpara, 18514/05,#12, Mikrometastase, HE

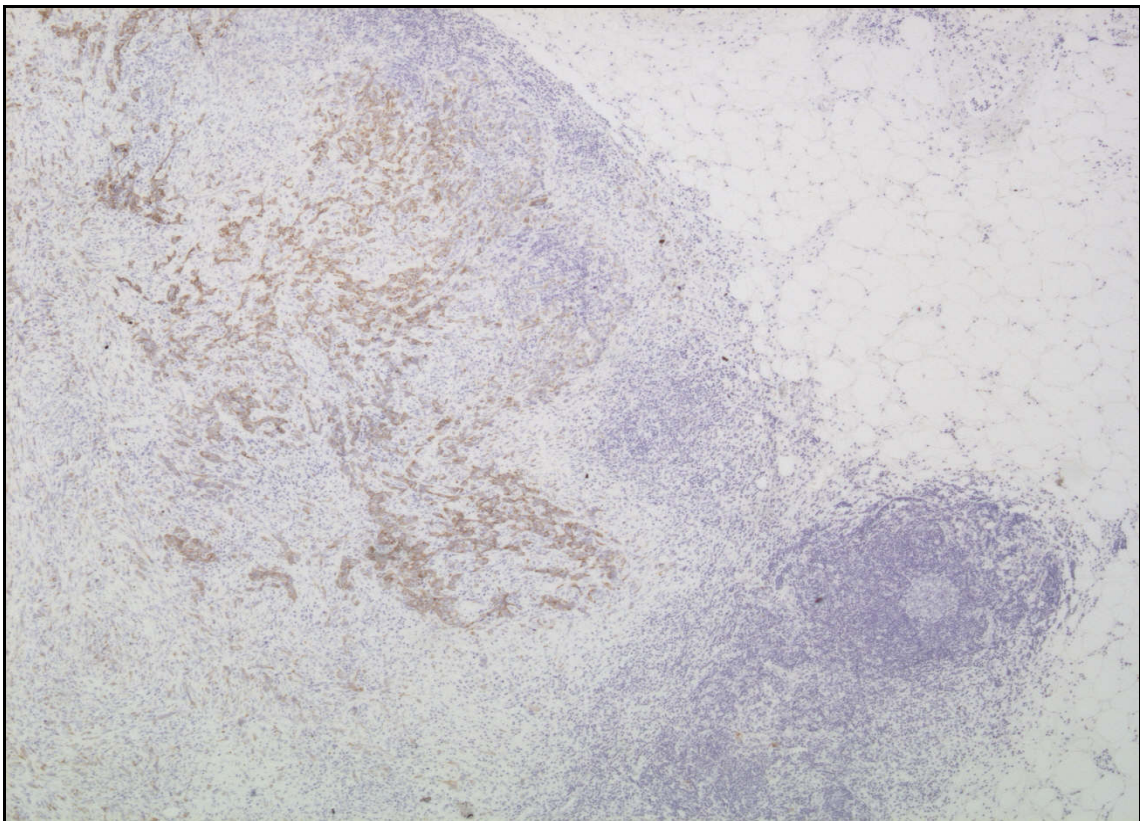


Abb. 4.3.1.b. SLNpara, 18514/05,#12, Mikrometastase, IHC

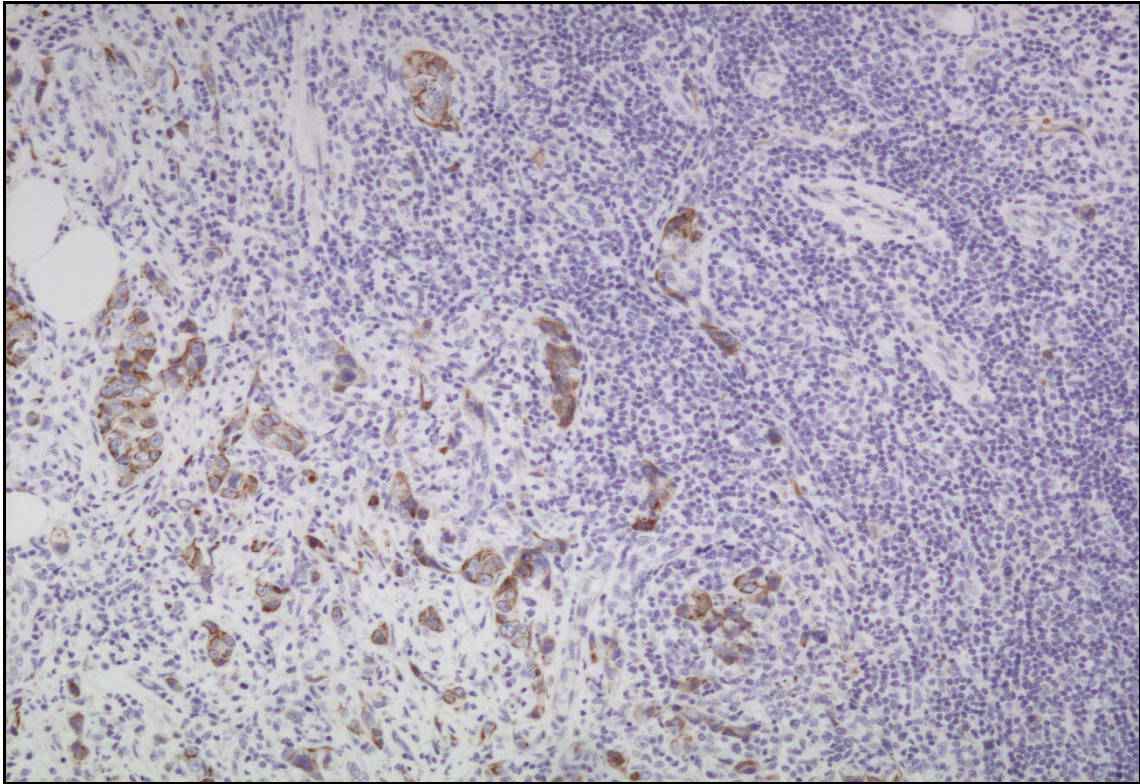


Abb. 4.3.1.c. SLNpara, 18514/05,#12, Mikrometastase, IHC

4.1.2. Patientinnen mit neu diagnostizierter nodaler Metastasierung

Bei drei Patientinnen, die in der konventionellen histopathologischen Aufarbeitung frei von jeglicher Metastasierung waren, kam es durch die angewandte Untersuchungsmethode zum Nachweis von Mikrometastasen oder Tumorzellclustern.

Patientin #9 war zum Zeitpunkt der Operation 66 Jahre alt. Sie wurde durch eine, über zwei Jahre rezidivierende, Postmenopausenblutungen symptomatisch. Durch eine Narkoseuntersuchung, eine fraktionierte Ausschabung mit Hysteroskopie und die histologische Aufarbeitung des Abradats wurde die Diagnose eines endometroiden Adenokarzinoms im FIGO-Stadium IC gestellt. In der Operation wurde eine Hysterektomie mit bilateraler Adnexektomie, sowie pelviner- und paraaortaler Lymphadenektomie durchgeführt. Insgesamt wurden 17 pelvine und zehn paraaortale Lymphknoten entfernt. Darunter befanden sich klinisch zwei Sentinellymphknoten, die identifiziert und gezielt extirpiert wurden.

Alle Sentinellymphknoten waren in der konventionellen histopathologischen Untersuchung frei von einer Metastasierung. Das Tumorstadium nach konventioneller Untersuchung lautete pT1c, pN0 (0/27), G2, cM0 bei einem 40mm durchmessendem Adenokarzinom mit

einer myometralen Infiltrationstiefe von 11mm bei einer gesamten Myometriumwanddicke von 16mm.

Bei der Reevaluation aller HE-gefärbten Lymphknotenpräparate fanden sich keinerlei Hinweise auf eine Metastasierung. Alle Lymphknoten waren frei von atypischen Zellen.

Durch Anwendung der immunhistochemischen Färbung gegen Panzytokeratin und lichtmikroskopischer Begutachtung aller Schnittstufen der Lymphknotenpräparate konnte in einem der pelvinen Sentinellymphknoten eine Tumorzellabsiedlung nachgewiesen werden (1/2) [Abb.4.4.1] Dieser Befund stellte sich als isolierte Tumorzellen dar.

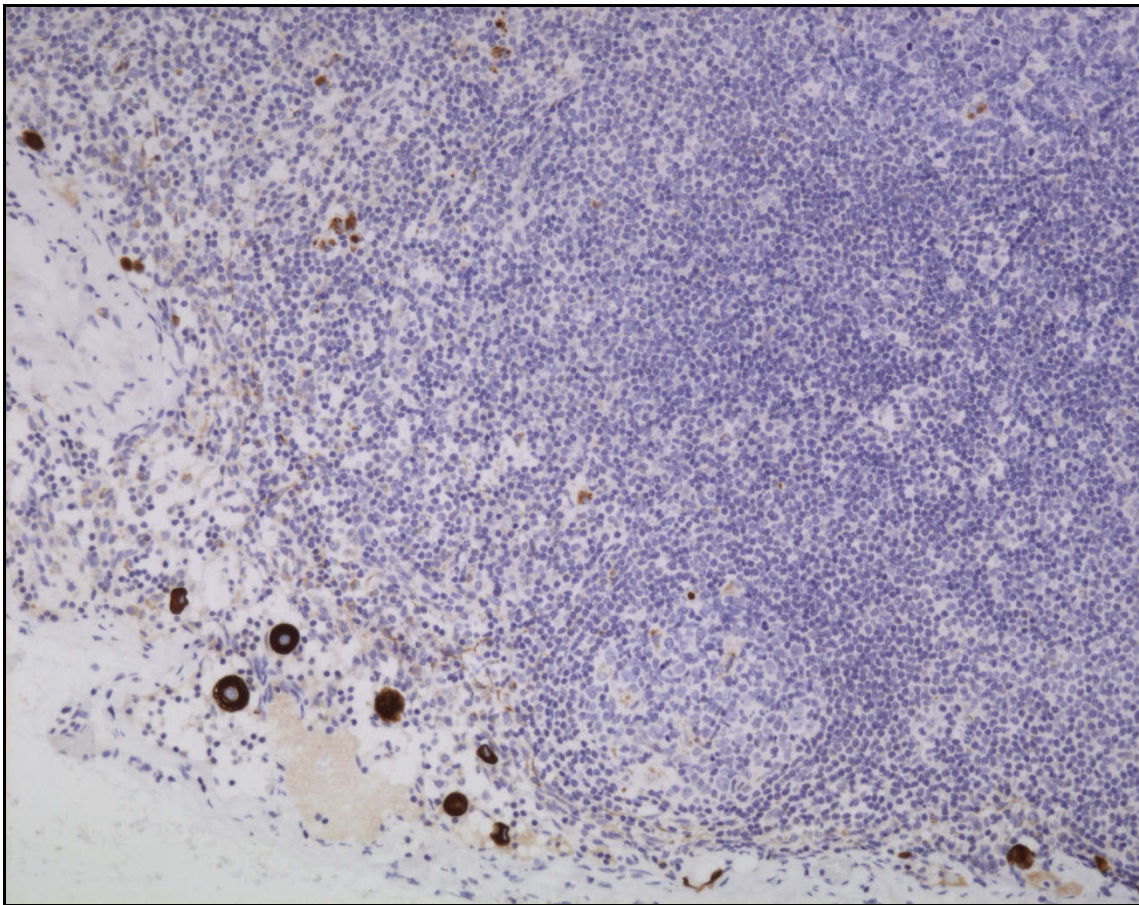


Abb.4.4.1 SLNpelv, 17246/05, #9, isolierte Tumorzellen, IHC

Alle pelvinen und paraaortalen Non-Sentinellymphknoten blieben auch unter Anwendung der Immunhistochemie ohne Nachweis von Metastasen (0/25).

Das histopathologische Tumorstadium änderte sich von pT1c, pN0 (0/27) in das abschließende Stadium nach Immunhistochemie pT1c, pN0(i+) (1/27).

Das postoperative FIGO-Stadium ändert sich von IC in IIIC.

Patientin #18 war zum Zeitpunkt der Operation 76 Jahre alt. Sie wurde durch eine Dauerblutung symptomatisch. Durch eine Narkoseuntersuchung, eine fraktionierte Ausschabung mit Hysteroskopie und die histologische Aufarbeitung des Abradats wurde die Diagnose eines endometroiden Adenokarzinoms im FIGO-Stadium II B gestellt. In der Operation wurde eine Hysterektomie mit bilateraler Adnexektomie sowie pelviner- und paraaortaler Lymphadenektomie durchgeführt. Insgesamt wurden 18 pelvine und drei paraaortale Lymphknoten entfernt. Darunter befanden sich klinisch drei Sentinellymphknoten, die identifiziert und gezielt exstirpiert wurden. Ein klinischer Sentinellymphknoten bestätigte sich in der histopathologischen Untersuchung nicht als lymphatisches Gewebe. Die zwei weiteren Sentinellymphknoten und alle anderen Lymphknoten waren in der konventionellen histopathologischen Untersuchung frei von einer Metastasierung. Das abschließende Tumorstadium der konventionellen histopathologischen Untersuchung lautete pT2b, pN0 (0/21), G2, cM0. Die Infiltrationstiefe betrug 16mm bei einer gesamten Wanddicke des Uterus von 18mm.

Durch die Reevaluation aller HE-gefärbten Lymphknotenschnitte fand sich in einem der pelvinen SLN ein Hinweis auf eine Mikrometastasierung. Diese Mikrometastase war in der ursprünglichen Durchsicht der Präparate dem Nachweis entgangen [Abb. 4.5.1.a].

In der Begutachtung der immunhistochemisch gefärbten Gewebsschnitte konnte diese Mikrometastase im pelvinen Sentinellymphknoten bestätigt werden (1/2).

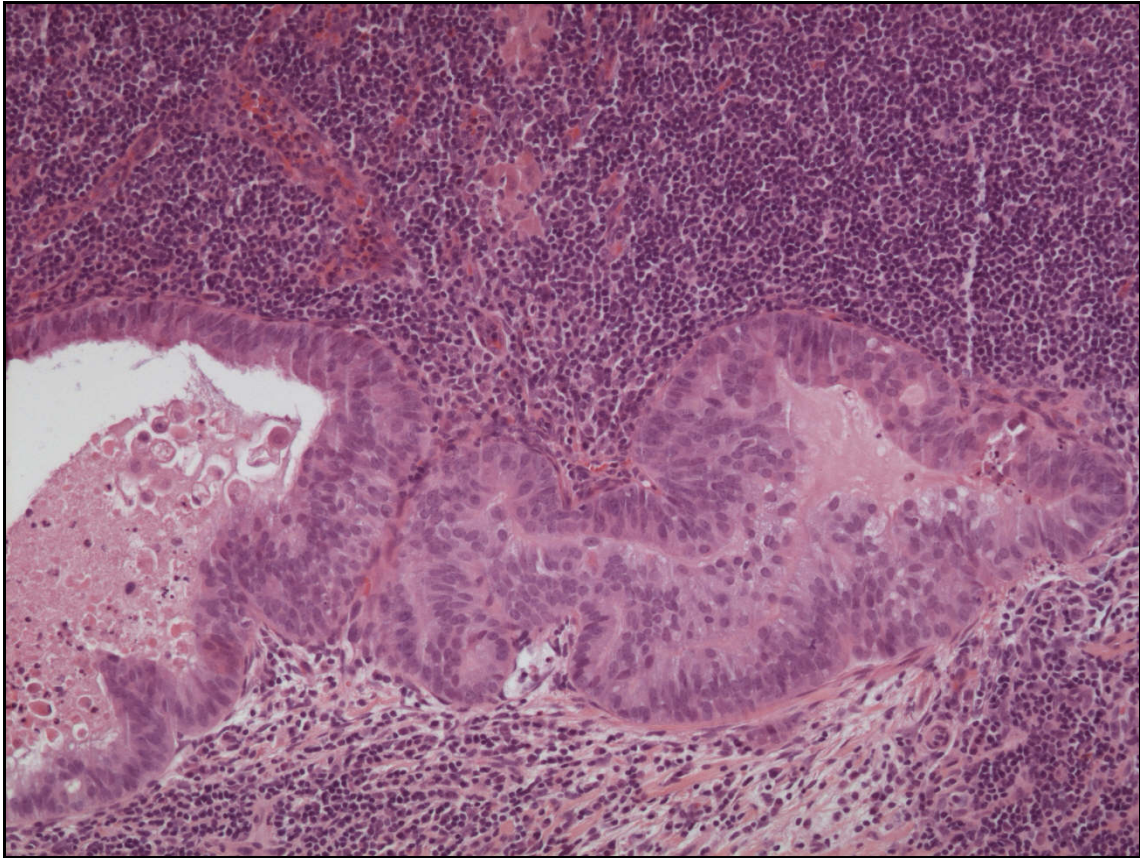


Abb. 4.5.1.a SLNpelv, 27684/05, #18, Mikrometastase, HE

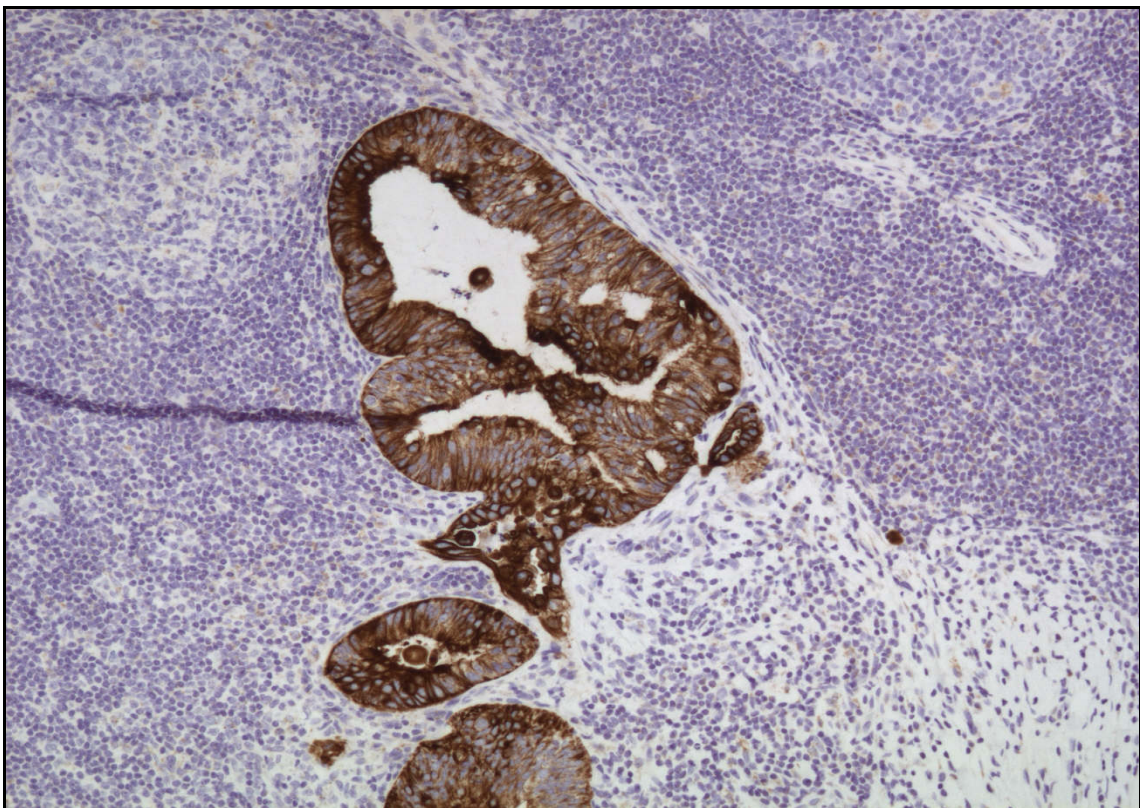


Abb. 4.5.1.b SLNpelv, 27684/05, #18, Mikrometastase, IHC

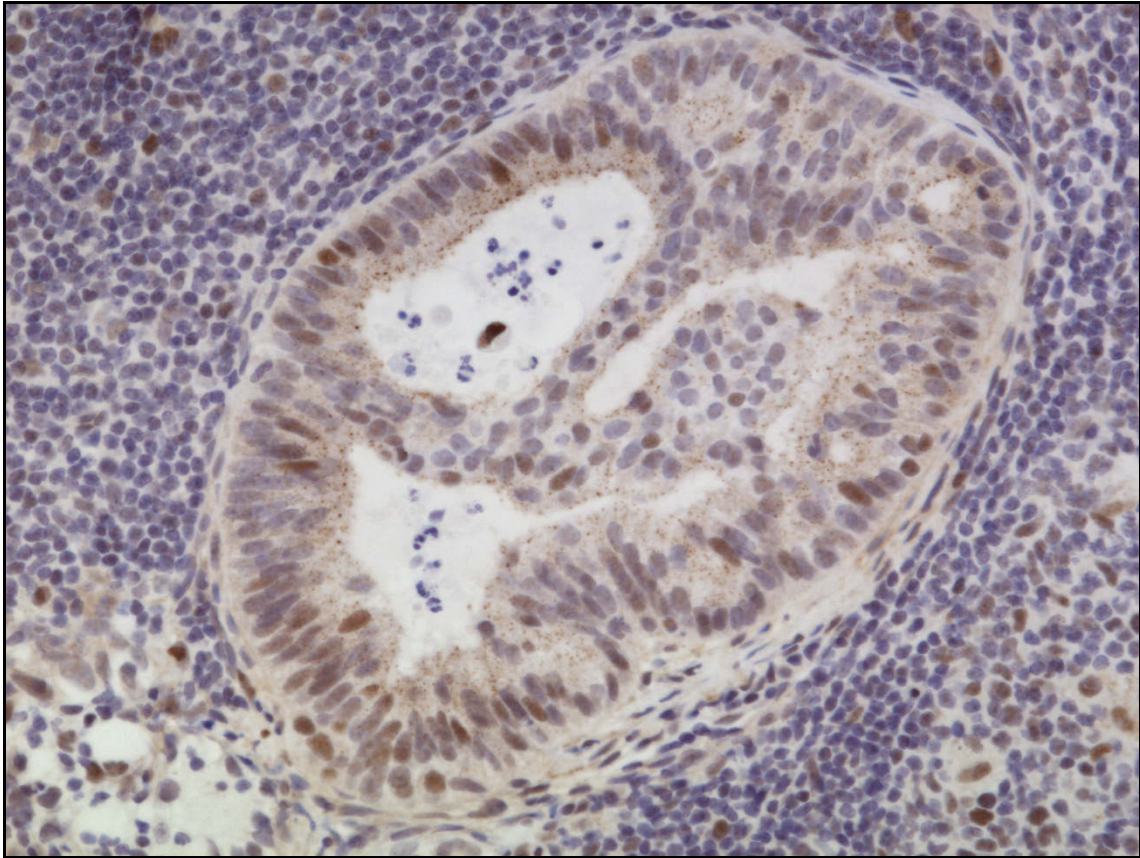


Abb. 4.5.1.c SLNpelv, 27684/05, #18, Mikrometastase, p-53

Zur Sicherung der Diagnose wurde zusätzlich eine p-53-Färbung angeschlossen.

Zudem gelang mittels Immunhistologie der Nachweis eines Tumorzellclusters in einem paraaortal gelegenen Non-Sentinellymphknoten (1/3). Insgesamt ergibt sich daraus das Nodalstadium N1 (2/21). Der ursprüngliche histopathologische Befund pT2b, pN0 (0/21) ändert sich in pT2b, pN1(2/21).

Das postoperative FIGO-Stadium wurde von IIB in IIIC geändert.

Patientin #25 war zum Zeitpunkt der Operation 57 Jahre alt. Sie wurde durch eine Schmierblutung symptomatisch. Durch eine Hysteroskopie mit fraktionierte Ausschabung und die histologische Aufarbeitung des Abradats wurde die Diagnose eines endometroiden Adenokarzinoms im FIGO-Stadium IB gestellt. In der Operation wurde eine Hysterektomie mit bilateraler Adnexektomie, sowie pelviner- und paraaortaler Lymphadenektomie durchgeführt. Insgesamt wurden 32 pelvine und zehn paraaortale Lymphknoten entfernt. Darunter befanden sich klinisch drei Sentinellymphknoten, die nach Identifikation gezielt exstirpiert wurden. Alle Sentinellymphknoten waren in der konventionellen histopathologischen Untersuchung frei von einer Metastasierung. Das abschließende Tumorstadium der konventionellen histopathologischen Untersuchung

lautete pT1b, pN0 (0/42), G1, cM0 bei einem 4mm durchmessenden, 2mm infiltrierenden Adenokarzinom bei einer Uteruswanddicke von 12mm. Bei der Reevaluierung aller Lymphknoten in HE-Färbung fanden sich keine Hinweise auf eine Metastasierung.

Bei Auswertung der immunhistochemische gefärbten Schnitte aller Lymphknoten konnte eine Mikrometastase in einem der drei Sentinellymphknoten beschrieben werden. Die übrigen Lymphknoten waren frei von Tumorzellen.

Das postoperative Nodalstadium änderte sich von N0(0/42) auf N1(1/42).

Demnach ergibt sich für das histopathologische Stadium eine Änderung von pT1b, pN0(0/42) zu pT1b pN1(1/42).

Das postoperative FIGO-Stadium ändert sich von IB in IIIC.

4.2. Spezielle statistische Betrachtungen

4.2.1. Spezielle statistische Betrachtungen im Sentinelverfahren

Durch die Anwendung des Sentinelverfahrens wurden mittels konventioneller Aufarbeitung zwei Patientinnen als richtig positiv und eine als falsch negativ detektiert.

Durch die Anwendung immunhistochemischer Färbung (IHC) wurden drei weitere Patientinnen als metastasiert beschrieben. Diese drei Patientinnen weisen Tumorzellen in ihren Sentinellymphknoten auf. Bei einer Patientin fanden sich zusätzlich Metastasen des Endometriumkarzinoms in nachgeschalteten Nicht-Sentinellymphknoten. Da wir die Befundung nach HE und IHC als Gesamtbefund auffassen (s.o.), kam es bei insgesamt sechs Patientinnen zum Nachweis eines tumorösen Lymphknotenbefalls. Somit wurden durch die konventionelle Technik 50% der tatsächlich metastasierten Patientinnen erkannt. Damit beträgt die Sensitivität der konventionellen histopathologischen Aufarbeitung 50% (CI₉₅ 11,8-88,2) und der negative Vorhersagewert ist 83,3% (CI₉₅ 58,6-96,4) [Tab.9].

4.2.1.1. SLN(HE) versus LNges(HE)

Bei der klassischen Anwendung der Sentinellymphknotentechnik und alleiniger HE-Färbung aller Lymphknoten erhält man eine Sensitivität von 66,7 % (CI₉₅ 9,4-99,2) und einen negativen Vorhersagewert von 94,7 % (CI₉₅ 74,0-99,9) (Tab. 12). Bei dieser konventionellen Betrachtung werden jedoch die, erst durch die IHC-Färbung detektierten Lymphknotenmetastasen nicht erfasst [Tab.10].

4.2.1.2. SLN(HE) versus LNges(IHC)

Berücksichtigt man nun die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung aller exstirpierten Lymphknoten (HE/IHC) bei konventioneller Untersuchung (HE) der Sentinellymphknoten errechnet sich eine Sensitivität von 33,3% (CI₉₅ 4,3-77,7) und ein negativer Vorhersagewert 79,0% (CI₉₅ 54,4-94,0), (Tab. 12). Diese Betrachtung spiegelt die eigentliche Praxis wider, bei der weniger Informationen über den Nodalstatus gewonnen werden, da die Begutachtung der Präparate auf die alleinige HE-Färbung begrenzt ist [Tab.11].

4.2.1.3. SLN(IHC) versus LNges(IHC)

Durch die zusätzliche immunhistochemische Färbung der Sentinellymphknoten ergibt sich eine Sensitivität von 83,3% (CI₉₅ 35,9-99,6) und ein negativer Vorhersagewert von 93,8% (CI₉₅ 69,8-99,8), (Tab. 12). Bei dieser erweiterten Betrachtung wird nun die wahre Wertigkeit des Sentinelverfahrens betrachtet, da alle Lymphknoten zusätzlich immunhistochemisch evaluiert wurden [Tab.12].

4.2.2. Weitere statistische Betrachtungen

Sensitivität und negativer Vorhersagewert der konventionellen Untersuchung fallen deutlich, wenn alle Lymphknoten zusätzlichen immunhistochemisch gefärbt und als Bewertungshintergrund herangezogen werden. Zieht man die Sentinellymphknoten in die immunhistochemische Betrachtung mit ein, steigen die Sensitivität und der negative Vorhersagewert des diagnostischen Tests. Die Unterschiede erreichen jedoch keine statistische Signifikanz [Tab.9-13].

5. Diskussion

Die Sentinellymphknotenbiopsie ist in der Therapie des Mammakarzinoms als Standardtherapie in Deutschland anerkannt. Die Morbidität der operativen Behandlung wird durch die Anwendung dieses Verfahrens deutlich gesenkt.

Im Gegensatz zur früheren Vorgehensweise wird nur noch eine Sentinellymphknotenbiopsie durchgeführt. Sind die exstirpierten Sentinellymphknoten in der histopathologischen Begutachtung frei von einer Metastasierung, wird auf eine komplette axilläre Lymphadenektomie verzichtet. Eine geringere Bewegungseinschränkung und eine raschere Konvaleszenz sind die Folge, da es seltener zu Parästhesien und Lymphödembildungen kommt. Die Anwendung des Sentinelverfahrens ist bei allen Malignomen, die vorwiegend lymphogen metastasieren von grundsätzlichem Interesse. Ein wesentliches Ziel des Sentinelkonzeptes ist die Steigerung der diagnostischen und prognostischen Aussagekraft, indem an den ausgewählten Lymphknoten, den Sentinellymphknoten, ressourcen-intensivierte Untersuchungen durchgeführt werden. Solche Untersuchungsmethoden stellen z.B. immunhistochemische Färbungen und/oder die Anwendung von Stufenserienschnitten dar. Zudem wird mit dem Sentinelkonzept das Ziel einer Reduktion der operationsbedingten Morbidität und Mortalität verfolgt, ohne die onkologische Sicherheit der Therapie zu gefährden. Für gynäkologische Karzinome ist das Sentinelverfahren noch im Stadium der Erprobung und Entwicklung.

Grundsätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Genauigkeit des Nachweises von Metastasen einerseits vom Engagement des Untersuchers abhängt und andererseits von der Intensität der Aufarbeitung, worunter zunächst die Anzahl der angefertigten Schnitte zu verstehen ist¹⁴. Wird zum Beispiel nur eine Ebene eines Lymphknoten histologisch erfasst, kann es dazu kommen, dass 26% der Metastasen nicht detektiert werden¹⁵. Bei Anfertigung von Stufenschnitten ist es möglich bei 20-33% der Patientinnen weitere Metastasen nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Anfärbung kann bei der Erkennung weiterer Metastasen von Hilfe sein. Daneben kann sie ein Korrektiv bedeuten, welches hilft eine Metastasierung zu entdecken, die zwar in der konventionellen Färbung hätte unter Umständen erkannt werden können, dem Betrachter aber, wie in unserer Studie (#18) beschrieben, entgangen ist¹⁶. Ob Mikrometastasen eine Bedeutung für die rezidivfreie Zeit und das Gesamtüberleben haben, wird für jede einzelne Tumorentität kontrovers diskutiert.

Bei Brustkrebspatientinnen konnte gezeigt werden, dass sich das Vorhandensein von Mikro- und Nanometastasen, die durch Stufenschnitte und immunhistochemisch Färbung detektiert wurden, signifikant negativ auf die rezidivfreie Zeit und das Gesamtüberleben auswirken¹⁷. Jedoch bleibt es bei Mammakarzinompatientinnen unklar, ob auch isolierte Tumorzellen in Sentinellymphknoten eine negative Auswirkung auf die rezidivfreie Zeit und das Gesamtüberleben haben¹⁸.

Auch für das Vulvakarzinom konnte gezeigt werden, dass mittels Ultrastaging und immunhistochemischer Färbung zusätzliche Mikrometastasen in Sentinellymphknoten nachgewiesen werden können¹⁹. Sie können, wie ein Fallbericht zeigt, zu einem Rezidiv führen²⁰. In weiteren Studien zum Vulvakarzinom blieb jedoch der Nachweis aus, daß mit einem Ultrastaging der Sentinellymphknoten und durch die nachträgliche, zusätzliche Anwendung von Panzytokeratinantikörpern (AE1/AE3) weitere Metastasen detektiert werden können^{21,22}. Dies weist u.E. auf den Umstand hin, dass eine sorgfältige Aufarbeitung und Musterung der histologischen Präparate für eine korrekte Diagnosestellung ausreichend sein kann. Es bleibt jedoch die Frage, was unter einer ausreichenden Aufarbeitung und Durchsicht der Präparate zu verstehen ist.

Bei einer Untersuchung an 29 Patientinnen mit einem Zervixkarzinom erbrachte die nachträgliche Aufarbeitung aller Lymphknoten (Sentinellymphknoten und Non-Sentinellymphknoten) durch Serienschnitte und immunhistochemische Färbung eine Mikrometastasierung in weiteren fünf Patientinnen³⁵. Hierbei fanden sich die Mikrometastasen bei drei Patientinnen nur in Nicht-Sentinellymphknoten. Die Autoren stellen die kritische Frage, ob die Sentineldiagnostik wirklich valide ist.

Welche Bedeutung das Sentinelkonzept im Rahmen der Therapie des Korpuskarzinoms hat und inwiefern Mikrometastasen für die Prognose der Patientinnen mit einem Korpuskarzinom eine Rolle spielen, wird weiterhin diskutiert.

Zytokeratinmarkierungen kommen in Studien zur Invasions- und Ausbreitungsdiagnostik von Korpuskarzinomen zur Anwendung. Gegenüber dem Nachweis mittels HE-Färbung führen immunhistochemische Untersuchungsverfahren zu einer gesteigerten Detektion der Infiltration des lymphangischen Raumes bei den Primärtumoren²³. Der immunhistochemische Nachweis einer Infiltration des lymphangischen Raumes beim Primärtumor konnte jedoch nicht signifikant mit der rezidivfreien Zeit und dem Überleben assoziiert werden²⁴, obwohl mit dem konventionellen Nachweis eine verkürzte rezidivfreie Zeit nachgewiesen wurde. Die Studien zum immunhistochemischen Nachweis bestätigen damit frühere Untersuchungen²⁵. Die Autoren erklärten diesen Umstand damit, dass in der Kohorte keine verlässliche Information über eine Mikrometastasierung in den

Lymphknoten vorgelegen hat. Diese Argumentation mag für isolierte Tumorzellen, bzw. Tumorzellareale kleiner als 0,2mm, zutreffen. In einer Studie, bei der pelvine und paraaortale Lymphknoten begutachtet wurden, fanden sich bei 19,7% der untersuchten, initial nodal negativen Patientinnen, bzw. 1,8% der untersuchten Lymphknoten, isolierte Tumorzellen. Die Lymphknoten lagen zu 68% pelvin und zu 32% paraaortal²⁶. Nach einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 33 Monaten fand sich kein signifikanter Einfluss durch den Nachweis von isolierten Tumorzellen auf die rezidivfreie Zeit. Die Autoren schlussfolgern, dass der Nachweis von isolierten Tumorzellen aufgrund ihrer Ergebnisse keinen Einfluss auf die Prognose der Patientinnen hat. Zu bedenken ist bei der Interpretation dieser Ergebnisse, dass keine systematische Lymphadenektomie durchgeführt wurde und die Patientinnen unterschiedliche adjuvante Behandlungen erfuhren.

Zytokeratine sind grundsätzlich geeignet, um bei Patientinnen mit einem Korpuskarzinom Lymphknotenmetastasen nachzuweisen²⁷. Mittels reverser-Polymerasen-Kettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis von Zytokeratin-20 lassen sich bei bis zu 30% der nodal negativen Patientinnen mit einem Korpuskarzinom Mikrometastasen nachweisen²⁸. Dieser hohe Prozentsatz ist jedoch bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom mit einer hohen falsch-positiv-Rate assoziiert¹⁴, so dass sich die Frage stellt, ob dieser hohe Mikrometastasennachweis mittels RT-PCR klinisch verwertbar ist²⁹. Deshalb wird der Nachweis von Mikrometastasen weitgehend mit Zytokeratinantikörpern geführt.

So weist eine sorgfältig durchgeführte Untersuchung nach, dass eine Expression von Zytokeratin bei 16,4% der 225 Metastasen-negativen Lymphknoten eine okkulte Metastasierung (Tumorzellfragmente) darstellt, die ihrerseits auf eine Mikrometastasierung hinweist. Die Expression von Zytokeratinen in Lymphknoten wurde in dieser Untersuchung als unabhängiger Prognosefaktor für das Auftreten eines Rezidivs des Korpuskarzinoms gewertet³⁰.

Bei Patientinnen mit einem high-risk Korpuskarzinom wurde gezeigt, dass durch eine immunhistochemische Färbung (AE1/AE3) Mikrometastasen nachgewiesen werden können¹⁶. Hierbei war der Nachweis mit einer erhöhten Rezidivneigung assoziiert. Unter einem „high-risk“ Korpuskarzinom versteht man Karzinome des FIGO-Stadiums III oder solche mit einer myometranen Infiltrationstiefe größer 50%.

Stufenschnitte, wie sie bei der Untersuchung von Sentinellymphknoten bei Mammakarzinomen angewendet werden, setzt man nun auch in Untersuchungen zum Sentinelkonzept beim Korpuskarzinom ein³¹.

Hierbei werden die Sentinellymphknoten und Nicht-Sentinellymphknoten unterschiedlich aufgearbeitet. Während bei Sentinellymphknoten Stufenschnitte angefertigt werden und eventuell eine immunhistochemische Färbung durchgeführt wird, werden die Nicht-Sentinellymphknoten weniger intensiv aufgearbeitet und immunhistochemisch gefärbt³¹⁻³³. Ähnlich unserer Untersuchung führte die Anfertigung eines einzigen, weiteren Schnittes, der in Folge mit Panzytokeratinantikörpern (KL 1) gefärbt wurde, zum Nachweis einer Mikrometastase bei einer initial nodal negativen Patientin. Zuvor wurden in Intervallen von 250µm vier Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin-Safran angefärbt. Die Stufenaufarbeitung und Panzytokeratinfärbung wurde nur an Sentinellymphknoten durchgeführt³³. Wie auch in unserer Untersuchung gezeigt, lassen sich dadurch zusätzliche Mikrometastasen nachweisen³².

Um die Frage nach einer sinnvollen Anwendung immunhistochemischer Färbungen in Kombination mit dem Sentinelkonzept beantworten zu können, wäre zunächst eine identische Aufarbeitung aller Lymphknoten sinnvoll. Diese Untersuchung wurde von Niikura et al. durchgeführt²⁹. Ausgeschlossen wurden in dieser Untersuchung alle Patientinnen, bei denen in der Routineuntersuchung an einer Schnittstufe mit der HE-Färbung und Zytokeratinantikörpern (AE1/AE3) Metastasen nachgewiesen wurden. Die Lymphknotenpräparate aller nodal negativen Patientinnen mit Sentinellymphknotennachweis wurden erneut aufgearbeitet. Hierzu wurden Stufen-Serienschnitte in 200-500µm Intervallen aller entfernten Lymphknoten (SLN und NSLN) angefertigt.

Bei fünf Patientinnen (20%) konnten Mikrometastasen nachgewiesen werden.

Die Untersucher fanden in den Sentinellymphknoten von drei (15%) der 20, initial nodal negativen Patientinnen, Mikrometastasen (0,2mm-2,0mm) und bei einer Patientin isolierte Tumorzellen im Sentinellymphknoten. Bei einer weiteren Patientin fanden sich Mikrometastasen in Nicht-Sentinellymphknoten, bei unauffälligen Sentinellymphknoten (falsch negative Detektion).

Auf die Anzahl untersuchter Sentinellymphknoten gerechnet, ließen sich in vier von 74 Sentinellymphknoten (5%) Mikrometastasen nachweisen. In den 1350 untersuchten Nicht-Sentinellymphknoten fanden sich in vier Lymphknoten mit 0,3% signifikant weniger Mikrometastasen ($P < 0,01$). Die vier Nicht-Sentinellymphknoten, in denen Tumorzellabsiedelungen nachgewiesen werden konnten, fanden sich bei einer Patientin, in deren Sentinellymphknoten keine Mikrometastasen nachweisbar waren.

Vier Patientinnen erhielten aufgrund anderer Risikofaktoren eine adjuvante Therapie und blieben rezidivfrei. Eine Patientin erhielt keine adjuvante Chemotherapie. Sie entwickelte 48 Monate nach ihrer initialen Behandlung ein Rezidiv. In einer kürzlich veröffentlichten

Arbeit mit identischen Studiendesign fanden sich außerhalb der Sentinellymphknoten keine weiteren Mikrometastasen³⁴.

Ein Ziel des Sentinelkonzeptes ist es, die geschilderten ressourcenintensiven Untersuchungen auf die Sentinellymphknoten zu beschränken. Die diagnostische Aussagekraft dieser Vorgehensweise muss mit der vergleichbar sein, die die intensive Aufarbeitung aller Lymphknoten bietet.

Wir konnten mit unserer Untersuchung zeigen, dass durch die Anfertigung von immunhistochemisch gefärbten Einzelschnitten zusätzliche Mikrometastasen in beiden Lymphknotengruppen (SLN + NSLN) entdeckt werden können.

Die Untersuchung einer japanischen Arbeitsgruppe zum Thema der Detektion von Lymphknotenmetastasen bei Patientinnen mit einem Korpuskarzinom kommt zu dem Ergebnis, dass sich nur durch die Kombination aus immunhistochemischer Färbung und Stufenserienschnitten mehr Lymphknotenmetastasen finden lassen²⁹.

In der zugrunde liegenden Untersuchung hatten Niikura et al. durch die alleinige Anwendung der Immunhistochemie an Einzelschnitten keine zusätzlichen Tumorzellabsiedelungen in den untersuchten Lymphknoten finden können³⁶. Erst die Reevaluierung der Präparate durch Anfertigung von Stufenserienschnitten und zusätzlicher Färbung mit Antikörpern gegen Panzytokeratin brachte den Nachweis weiterer, zuvor unentdeckter Metastasen²⁹.

Die Ergebnisse unserer Studie lassen sich mit der Arbeit von Lopes et al. vergleichen³⁷. In der genannten Arbeit wurden ebenfalls Einzelschnitte von Lymphknoten untersucht.

Die Lymphknoten (n=543) von 25 nodal negativen Patientinnen wurden immunhistochemisch unter Verwendung von AE1/AE3 Antikörpern erneut untersucht. Bei einer Patientin konnte eine zusätzliche Metastase nachgewiesen werden.

In einer weiteren Studie wurden alle Sentinellymphknoten und Nicht-Sentinellymphknoten von 14 initial nodal negativen Patientinnen mit einem frühen Korpuskarzinom aufgearbeitet. Durch die Anfertigung von Stufenschnitten und immunhistochemischer Färbung, ließen sich in diesen Fällen keine zusätzlichen Metastasen nachweisen³⁸.

Auch andere Untersuchungen beschränken sich auf die Befundung weniger histologischer Schnitte.

So wurden von den entfernten Lymphknoten von 16 nodal negativen Patientinnen jeweils zwei Schnitte zur HE-Färbung angefertigt¹⁶, nachdem zuvor zwei Schnitte in einer Schnellschnittuntersuchung untersucht worden waren. Von den gewählten Ebenen

wurden jeweils ein weiterer Schnitt für die immunhistochemischen Färbung (AE1/AE3) angefertigt.

Bei zwei der 16 Patientinnen konnten mit dieser Methodik Mikrometastasen detektiert werden (12,5%). Eine der Patientinnen verstarb nach 2,8 Jahren an einem Tumorrezidiv. Aufgrund der niedrigen Fallzahl ließ sich kein signifikanter Einfluss von zytokeratin-positiven Lymphknoten auf das Gesamtüberleben der, in der HE-Färbung initial nodal-negativen, Patientinnen nachweisen.

Aus diesen Arbeiten und aus unseren Ergebnissen lässt sich u. E. ableiten, dass eine komplette Stufen-Serienschnittaufarbeitung der extipierten Lymphknoten nicht notwendig ist, um eine verlässliche Aussage über den Nodalstatus treffen zu können. Durch die Anfertigung eines immunhistochemisch gefärbten Einzelschnittes lässt sich eine vergleichbare Aussage erzielen.

Operativ entfernte Lymphknoten werden üblicherweise, der allgemein gängigen Routine entsprechend, nach konventioneller histopathologischer Aufarbeitung und Färbung mit Hematoxylin-Eosin unter dem Lichtmikroskop auf Metastasen des Primärtumors hin untersucht. Hierbei ist es durchaus möglich, dass kleine und kleinste Tumorzellabsiedelungen schwierig zu identifizieren sind oder gar dem Nachweis entgehen²³. Durch die Anwendung immunhistochemischer Techniken zur Darstellung der Zytokeratinexpression in paraffineingebetteten Lymphknotenpräparaten lassen sich diese Mikrometastasen ($>0.2\text{mm}$ - $<2\text{mm}$) und Tumorzellcluster ($=\text{ITC}=\leq 0.2\text{mm}$) nachweisen^{18,23}.

In der hier vorgestellten Studie wurden die konventionell HE-gefärbten Schnitte und zusätzlich mit immunhistochemischer Färbemethode gefärbte Gewebeschnitte begutachtet. Die Lymphknotenebene, aus der die Schnitte für die Panzytokeratinfärbung entnommen wurden, schloss sich der Schnittebene der HE-gefärbten Präparate direkt an. Es konnte so ein, mit dem HE-gefärbten Präparat direkt vergleichbarer, immunhistologischer Schnitt gewonnen werden.

Die so erhaltenen $1\mu\text{m}$ dünnen Schnitte wurden nach Färbung mit Hematoxylin-Eosin und nach Markierung mit dem Antikörper MNF 116 auf das Vorhandensein von Mikrometastasen untersucht.

Die in dieser Arbeit verwendete Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode zur Markierung von Zytokeratinen mit Hilfe von, gegen Panzytokeratin gerichteten primären Antikörpern, wurde bereits in vorangehenden Studien erfolgreich zum Nachweis von Lymphknotenmetastasen bei Patientinnen mit einem Endometriumkarzinom

angewandt^{16,29,30}. Der Nachweis in Lymphknoten gelingt erst, falls diese pathologisch verändert sind.

Eventuelle Schwierigkeiten bei der Interpretation der immunhistochemisch gefärbten Schnitte ergeben sich durch die unerwünschte Zytokeratin-Immunreaktivität interstitieller Retikulumzellen bei entzündlich oder neoplastisch veränderten Lymphknoten³⁹. Die mögliche Ähnlichkeit einiger Karzinometastasen in Lymphknoten mit benignen Histiozyten kann gleichermaßen diagnostische Schwierigkeiten bereiten⁴⁰. Daher wurden zytokeratin-exprimierende Einzelzellen und Zellcluster (<0,2mm) nur als neoplastische Zellen anerkannt, wenn deren mikroskopisch genauestens betrachtete Morphologie mit der von neoplastischen Zellen übereinstimmte.

In nicht eindeutigen Fällen wurden die jeweiligen Präparate einem sehr erfahrenen Kollegen zur Befundung vorgelegt und eventuell zusätzliche Färbungen (z.B. p53) zur Befundklärung eingesetzt.

Es konnte bestätigt werden, dass die Verwendung des monoklonalen Antihuman-Zytokeratin-Antikörpers (MNF 116) die Detektionsrate von Tumorzellabsiedelungen < 2,0 mm in SLN und NSLN beim Endometriumkarzinom erhöht³³.

Bei sechs (28,6%) der untersuchten Patientinnen wurden durch Anwendung der Panzytokeratinfärbung zusätzliche Lymphknotenmetastasen nachgewiesen, die in der konventionellen Färbung unentdeckt geblieben waren. In drei Fällen waren die Metastasen in SLN und in ebenfalls drei Fällen in NSLN nachweisbar. Drei Patientinnen, die mit der üblichen histopathologischen Untersuchung als nodalnegativ befundet worden waren, mussten nach immunhistochemischer Aufarbeitung aller Lymphknoten in N0 (i+) oder N1 eingruppiert werden. So änderte sich für drei von 21 Patientinnen (14,3%) das FIGO-Stadium in Stadium IIIC.

Von den 18 Fällen, in denen durch die Untersuchung der HE-gefärbten Gewebeschnitte keine Lymphknotenmetastasen gefunden werden konnten, stellten sich unter Verwendung der Immunhistologie in drei Fällen (16,7%) zytokeratin-positive Lymphknoten dar.

Die Ergebnisse der vorgestellten Studie unterstützen somit die von Bosquet et al. gemachte Aussage, dass die Zytokeratinfärbung entnommener Lymphknoten, die Sensitivität des chirurgischen Stagings des Endometriumkarzinoms verbessern kann¹⁶.

Den Ergebnissen der Untersuchungen von Niikura et al. sowie Horn et al. zufolge lässt sich durch die Kombination von Stufen-Serienschnitten und Markierung mit monoklonalen Antikörpern gegen Panzytokeratin die Detektionsrate für Mikrometastasen und ITC in Gewebeproben erhöhen^{29,41}.

Es konnte gezeigt werden, dass sich durch die immunhistochemische Färbung von 1µm dünnen Einzelschnitten die Detektionsrate von kleinen und kleinsten Tumorzellabsiedelungen in vergleichbarem Maße erhöhen lässt.

Von den Patientinnen, deren Sentinellymphknoten zytokeratin-negativ waren, konnten in 93,8% Fällen (15/16) auch in den übrigen Nicht-Sentinellymphknoten keine Tumorzellabsiedelungen gefunden werden. In einem der Fälle (6,2%) mit zytokeratin-negativen Sentinellymphknoten fanden sich Metastasen in Nicht-Sentinellymphknoten.

Der Status der Sentinellymphknoten lässt sich demnach in mehr als 93% der untersuchten Patientinnen auf die nachgeschalteten Nicht-Sentinellymphknoten übertragen.

Diese Ergebnisse bezüglich der Übertragbarkeit des SLN-Status auf die übrigen Lymphknoten decken sich mit denen von Lopes et al.³⁷ und sprechen für die Durchführbarkeit des Sentinelkonzeptes beim Korpuskarzinom.

Es ist jedoch bezüglich der Anwendbarkeit der Sentinellymphknotentechnik beim Korpuskarzinom grundlegend kritisch zu hinterfragen, wie die Markierung der Sentinellymphknoten durchgeführt wurde. Die Frage der Applikation der Markierungssubstanz ist für das Korpuskarzinom noch nicht abschließend geklärt, da für das Korpuskarzinom noch kein Konsens über ein adäquates Markierungsverfahren vorliegt⁴². Hierzu bedarf es weiterer Studien.

Die vorliegende Untersuchung basiert auf einem zuvor entwickelten und beschriebenen, subserosalen Markierungsverfahren, durch das eine Detektionsrate von 92% erzielt wurde¹¹. Der Beweis einer korrekten Applikation kann u.E. nicht ausschließlich über eine hohe Detektionsrate geführt werden. Wegweisend sollte der Umstand sein, dass sich bei Patientinnen mit einer minimalen Metastasierung die detektierten Metastasen, seien es Makro- oder Mikrometastasen, in den Sentinellymphknoten befinden.

5.1. Diskussion der klinischen Bedeutung

Bislang gibt es noch keine Einigung über das aussichtsreichste Markierungsverfahren bei Patientinnen mit einem Korpuskarzinom zur Darstellung von Sentinellymphknoten.

Zur Diskussion stehen Verfahren, bei denen die Markierungssubstanz hysteroskopisch um das Karzinom appliziert wird. Daneben wurden zervikale, subserosale und duale Markierungsverfahren vorgeschlagen. Zur Anwendung kommt dabei offene Radioaktivität (^{99m}Tc), Patentblau® oder die Kombination beider Substanzen. Die Fallzahl ist in allen Studien gering, so dass die Wertigkeit des diagnostischen Tests anhand des Markierungsverfahrens nicht verlässlich geschätzt werden kann. Die Sensitivität und der

negative Vorhersagewert als Parameter zur Bewertung des diagnostischen Tests hängen von der Prävalenz metastasierter Patientinnen ab.

Auch in der hier vorgestellten Studie war das Vorkommen nodal metastasierter Patientinnen gering. Das ist u.E. auch der Grund dafür, dass bezüglich der Sensitivität kein signifikanter Unterschied bei der Betrachtung der unterschiedlichen Färbungen der Sentinellymphknoten festgehalten werden konnte. Dennoch werfen die erzielten Ergebnisse ein neues Licht auf die Validität des diagnostischen Tests, den das Sentinelkonzept statistisch gesehen darstellt.

Die Sensitivität des Sentinelverfahrens bei herkömmlicher Begutachtung betrug 66,7%.

Hierbei wurden alle Lymphknoten konventionell aufgearbeitet und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Dieses Vorgehen basiert auf einer einheitlichen Betrachtung und Bewertung aller Lymphknoten.

In der ersten Arbeit zur Sentinellymphknotendetektion beim Endometriumkarzinom an 15 Patientinnen wurden eine Sensitivität von 22% und ein negativer Vorhersagewert von 88% erzielt⁴³. Drei von zehn Patientinnen mit Sentinellymphknoten waren nodal metastasiert. Alle Lymphknoten wurden hierzu konventionell aufgearbeitet.

Andere Studien zum Sentinelkonzept erzielen bei einer einheitlichen, konventionellen Betrachtung eine Sensitivität und einen negativen Vorhersagewert 100%^{44,45}. Hierbei wurden zwischen 18 und 26 Patientinnen markiert, von denen bis zu vier Patientinnen eine nodale Metastasierung aufwiesen.

Die meisten Studien zur Sentineldiagnostik bei Patientinnen mit einem Korpuskarzinom arbeiten nur die Sentinellymphknoten intensiviert auf und färben diese immunhistochemisch. Die Nicht-Sentinellymphknoten hingegen werden konventionell aufgearbeitet und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Dabei erzielen die Untersucher eine Sensitivitäten und negative Vorhersagewerte von 100%^{32,46-49}. Die Anzahl untersuchter Patientinnen lag zwischen 12 und 43 Patientinnen, von denen drei bis zehn eine nodale Metastasierung aufwiesen.

Aus theoretischen Überlegungen und statistischer Betrachtung kann man vermuten, dass es hierbei zu einer Verzerrung der Ergebnisse kommt und daher die statistischen Aussagen kritisch zu bewerten sind.

Die ungleich gewichtete Aufarbeitung der entnommenen Lymphknoten stellt in diesem Zusammenhang einen wichtigen Punkt dar. Werden alle Lymphknoten intensiviert aufgearbeitet, erhält man eine höhere Detektion von Metastasen, Mikrometastasen und isolierten Tumorzellen insgesamt. Für die Betrachtung und Bewertung der vorgestellten Studienergebnisse wurden die Ergebnisse der intensivierten Aufarbeitung als

Bewertungshintergrund herangezogen und als „wahrer Lymphknotenstatus“ angesehen. Wenn nun die Befunde der konventionell bearbeiteten Sentinel lymphknoten in Bezug zum wahren Hintergrund gesetzt werden, sinken die Sensitivität auf 33,3% und der negative Vorhersagewert auf 79%.

Die Aufarbeitung aller Lymphknoten zur intensivierten Diagnostik in dieser Untersuchung ist ebenso einheitlich wie der Bewertungshintergrund. Hierzu werden alle Sentinel lymphknoten und Nicht-Sentinel lymphknoten identisch aufgearbeitet. Es resultiert eine Sensitivität der intensivierten Aufarbeitung mittels immunhistochemischer Färbung von 83,3%. Diese ist somit höher als bei der konventionellen HE-Färbung. In der Literatur findet sich nur eine Arbeit zur Sentinel lymphknotendetektion an 20 initial nodal negativen Patientinnen mit einem Korpuskarzinom in der alle Lymphknoten, Sentinel- und Nicht-Sentinel lymphknoten, identisch in Stufenschnitten und immunhistochemischer Färbung aufgearbeitet wurden²⁹.

So berichten Niikura et al. über eine Serie an 28 Patientinnen, von denen 23 Patientinnen Sentinel lymphknoten aufwiesen³⁶. Eine der Patientinnen zeigte Metastasen im Sentinel lymphknoten, so dass die Sensitivität und der negative Vorhersagewert 100% betrugen. Nach einer konventionellen Untersuchung wurde bei allen negativen Lymphknoten eine Färbung mit Zytokeratinantikörpern durchgeführt (MNF116, DAKO, Japan). Die Anwendung dieses Antikörpers führte zu keiner weiteren Detektion von Mikrometastasen in anderen Lymphknoten (SLN und NSLN). Die Arbeitsgruppe führte ihre Untersuchung an 20 initial nodal negativen Patientinnen mit einem Korpuskarzinom fort. Hierzu wurden alle Lymphknoten, Sentinel- und Nicht-Sentinel lymphknoten, identisch in Stufenschnitten und immunhistochemischer Färbung (AE1/AE3) aufgearbeitet²⁹.

5% der Sentinel lymphknoten enthielten Mikrometastasen oder isolierte Tumorzellen. Im Vergleich hierzu waren in Nicht-Sentinel lymphknoten mit 0,3% Mikrometastasen oder isolierte Tumorzellen signifikant seltener nachzuweisen. Die vier Mikrometastasen in NSLN fanden sich bei einer Patientin, deren Sentinel lymphknoten ohne einen Nachweis von Mikrometastasen oder isolierten Tumorzellen blieben. Bei dieser Patientin ist das Sentinelverfahren somit als falsch-negativ zu bewerten. Alle anderen Patientinnen wiesen Mikrometastasen und isolierte Tumorzellen in den Sentinel lymphknoten auf.

Die Untersuchung zeigt, dass durch die verfeinerte Aufarbeitung in 25% (5/ 20) initial nodal negativen Patientinnen Mikrometastasen oder isolierte Tumorzellen gefunden werden konnten.

Eine theoretische Betrachtung hilft, die Zahlen um die Arbeitsgruppe von Niikura et al. mit den hier vorgestellten Ergebnissen vergleichen zu können.

In der ersten Untersuchung betrug die Sensitivität und der negative Vorhersagewert 100 %³⁶. Eine einzige Patientin war nodal metastasiert (1/23). Die Metastasierung befand sich im Sentinellymphknoten und wurde ohne Panzytokeratinfärbung entdeckt. Die Lymphknoten aller anderen 22 Patientinnen waren mittels Panzytokeratinfärbung (MNF116) negativ.

Berücksichtigen man nun die Detektion von Mikrometastasen und isolierten Tumorzellen bei 20²⁹ der initial 22³⁶ nodal negativen Patientinnen, müssen die Sensitivität und der negative Vorhersagewert anders berechnet werden.

In unserer Betrachtungsweise wurde nur eine der insgesamt sechs metastasierten Patientinnen mit der Sentineltechnik korrekt erkannt. Die Sensitivität beträgt somit 14% und der negative Vorhersagewert beträgt 70%.

Identisch verhält es sich in einer weiteren Studie an 23 Patientinnen, bei denen alle initial negativen Lymphknoten mittels immunhistochemischer Färbung (AE1/AE3) untersucht wurden³⁴. Bezieht man die Ergebnisse der konventionellen Bewertung auf die Ergebnisse der immunhistochemischen Aufarbeitung sinkt die Sensitivität auf 40% und der negative Vorhersagewert auf 82%. In der Gesamtbetrachtung der immunhistochemischen Aufarbeitung betrugen diese jeweils 100%.

Die vorgelegten Ergebnisse werden also durch die Neuberechnungen gestützt und beschreiben eine reduzierte Sensitivität und einen erniedrigten negativen Vorhersagewert, wenn man die erweiterten Informationen berücksichtigt, die durch die immunhistochemische Lymphknotenaufarbeitung gewonnen werden können.

Erst durch das Hinzuziehen der Informationen aus den ebenfalls intensiviert aufgearbeiteten Sentinellymphknoten erhöht sich die Sensitivität auf 86% und der negative Vorhersagewert auf 93%.

Der entscheidende Unterschied besteht in der Gesamtanzahl an nodalpositiven Patientinnen, die durch die Begutachtung der immunhistochemisch gefärbten Lymphknoten ansteigt. In der vorgestellten Studie konnte bei drei Patientinnen durch die Anwendung von Panzytokeratinantikörpern eine nodale Metastasierung beschrieben werden, die in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung dem Nachweis entgangen war. Niikura et al. entdeckten fünf weitere Patientinnen, die initial nodal negativ waren²⁹. Delpech et al. gelang der Nachweis von zusätzlichen Metastasen bei drei weiteren Patientinnen³⁴.

Im Gegensatz zu den beiden genannten Untersuchungen^{29,34} konnte die Steigerung des Nachweises nodal metastasierter Patientinnen, in der hier gezeigten Studie, durch die Anfertigung eines einzigen weiteren Schnittes, der immunhistochemisch gefärbt wurde, erzielt werden.

Niikura et al. fertigten Serienschritte an und verarbeiteten somit das gesamte Lymphknotengewebe. Sie bieten daher die exakteste bisher veröffentlichte Aufarbeitung an.

Bei einem reduzierten Arbeitsaufwand sind die von uns gemachten Ergebnisse absolut vergleichbar.

Genau dieser reduzierte Arbeitsaufwand ist für den klinischen Alltag bedeutsam. Je einfacher, zeit- und kostengünstiger sich ein Verfahren zur Lymphknotendiagnostik beim Korpuskarzinom darstellt, umso eher wird es in der klinischen Routine eingesetzt werden können.

Mit Hilfe des vorgestellten Konzeptes könnte es dann möglich sein, bei den Patientinnen, die in der bisherigen Routinediagnostik als nodal negativ beschrieben wurden, Metastasen in Sentinellymphknoten zu finden. Dies würde zu einer tatsächlich stadiengerechten Therapie der Patientinnen führen.

6. Schlussfolgerungen

Die Feinheit der histopathologischen Aufarbeitung und Färbungen der Lymphknoten spielen eine wesentliche Rolle bei der Detektion von Lymphknotenmetastasen. Den Pathologen stehen hierzu die Lymphknoten zur Verfügung, die der Operateur ausgewählt und exstirpiert hat. Optimal wäre eine umfassende Aufarbeitung aller Lymphknoten. Dies erscheint, da kosten- und zeitaufwendig, nicht praktikabel.

Mit dem Sentinelkonzept wird nun versucht, die Lymphknoten zu finden und zu exstirpieren, anhand derer man unabhängig von der Markierungsmethodik am verlässlichsten eine Metastasierung nachweisen kann. Diese Sentinellymphknoten können dann intensiver aufgearbeitet werden, um die Wahrscheinlichkeit eines Metastasennachweises zu erhöhen. Damit ist die Hoffnung verbunden, verlässlich und genau die Patientinnen mit einer nodalen Metastasierung zu identifizieren und entsprechend adäquat therapieren zu können.

Studienergebnisse beschreiben eine geringe Sensitivität des Testverfahrens, wenn die konventionelle Aufarbeitung der Sentinellymphknoten in einen Bezugsrahmen gesetzt wird, in dem alle Nicht-Sentinellymphknoten intensiviert aufgearbeitet werden. Erst wenn die Sentinellymphknoten identisch aufgearbeitet werden, steigt die Sensitivität wieder an. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass sich die Wertigkeit des diagnostischen Tests nicht in Abhängigkeit von der Exaktheit der Lymphknotenaufarbeitung verändert, wenn alle Lymphknoten gleich aufgearbeitet werden. Der wichtigste Unterschied besteht jedoch darin, dass durch die immunhistochemische Färbemethode unter Verwendung von Panzytokeratinantikörpern absolut gesehen mehr Patientinnen mit einer nodalen Metastasierung entdeckt werden.

Das Sentinelverfahren kann somit einen Beitrag zur besseren Diagnostik und angemessenen Therapie bei Patientinnen mit einem Korpuskarzinom leisten.

7. Literatur

1. Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Hentschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Stabenow R, Stegmaier C, Ziegler H. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut(RKI).2006, ISBN 3-9808880-3-7
2. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. In: 2002 G, ed. Lyon: IARCPress, 2001.
3. Hacker N. Uterine Cancer. In: Berek J, Hacker N, eds. Practical Gynecologic Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 397-442.
4. Gerber B, Krause A, Kuelz T, Quasmeh A, Reimer T, K. F. Rating of transvaginal sonography in the evaluation of postmenopausal bleeding. *Zentralbl Gynakol* 1999;**121**(3):143-8.
5. Giradi F, Petru E, Heydarfadaei M, Haas J, Winter R. Pelvic Lymphadenectomy in the Surgical Treatment of Endometrial Cancer. *Gynecol Oncol* 1993;**49**:177-180.
6. Mariani A, Webb M, Keeney G, Aletti G, Podratz K. Predictors of Lymphatic Failure in Endometrial Cancer. *Gynecol Oncol* 2002;**84**:437-442.
7. Trimble C. Atypical endometrial hyperplasia: a tough call. *Int J Gynecol Cancer* 2005;**15**:401.
8. Benedet JL, Bender H, Jones H 3rd, Ngan HY, Pecorelli S.FIGO staging classifications and clinical practice guidelines for gynecologic cancers.FIGO Committee on Gynecologic Oncology.*Int J Gynaecol Obstet* 2000 Aug;**70**(2):209-62.
9. Arango H, Hoffman M, Roberts W, Decesare S, Fiorica J, Drake J. Accuracy of Lymph Node Palpation to Determine Need for Lymphadenectomy in Gynecologic Malignancies. *Obstet Gynecol* 2000;**95**:553-556.
10. Mariani A, Webb M, Keeney G, Calori G, Podratz K. Hematogenous dissemination in corpus cancer. *Gynecol Oncol* 2001;**80**(2):233-8.

11. Altgassen C, Pagenstecher J, Hornung D, Diedrich K, Hornemann A. A new approach to label sentinel nodes in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2007;**105**(2):457-61.
12. Singletary S, Allred C, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;**20**(17):3628-36.
13. Boenisch T. Handbuch Immunhistochemischer Färbemethoden. 3rd ed. CA: DakoCytomation Corp., 2003.
14. Rampaul R, Miremadi A, Pinder S, Lee A, Ellis O. Pathological validation and significance of micrometastasis in sentinel nodes in primary breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001;**3**(2):113-6.
15. Reich O, Winter R, Pickel H, Tamussino K, Haas J, Petru E. Does the size of pelvic lymph nodes predict metastatic involvement in patients with endometrial cancer? *Int J Gynecol Cancer* 1996;**6**(6):445-7.
16. Bosquet J, Keeney G, Mariani A, Webb M, Cliby W. Cytokeratin staining of resected lymph nodes may improve the sensitivity of surgical staging for endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2003;**91**(3):518-25.
17. Querzoli P, Pedriali M, Rinaldi R, et al. Axillary lymph node nanometastases are prognostic factors for disease-free survival and metastatic relapse in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;**12**(22):6696-701.
18. Imoto S, Ochiai A, Okumura C, Wada N, Hasebe T. Impact of isolated tumor cells in sentinel nodes detected by immunohistochemical staining. *Eur J Surg Oncol* 2006;**32**(10):1175-9.
19. Terada K, Shimizu D, Wong J. Sentinel node dissection and ultrastaging in squamous cell cancer of the vulva. *Gynecol Oncol* 2000;**76**(1):40-4.
20. Tamussino K, Bader A, Lax S, Aigner R, Winter R. Groin recurrence after micrometastasis in a sentinel lymph node in a patient with vulvar cancer. *Gynecol Oncol* 2003;**86**(1):99-101.
21. Moore R, Granai C, Gajewski W, Gordinier M, Steinhoff M. Pathologic evaluation of inguinal sentinel lymph nodes in vulvar cancer patients: a comparison of

- immunohistochemical staining versus ultrastaging with hematoxylin and eosin staining. *Gynecol Oncol* 2003;**91**(2):378-82.
22. Hakam A, Nasir A, Raghuwanshi R, et al. Value of multilevel sectioning for improved detection of micrometastases in sentinel lymph nodes in invasive squamous cell carcinoma of the vulva. *Anticancer Res* 2004;**24**(2C):1281-6.
23. Alexander-Sefre F, Singh N, Ayhan A, Salveson H, Wilbanks G, Jacobs I. Detection of tumor lymphovascular space invasion using dual cytokeratin and CD31 immunohistochemistry. *J Clin Pathol* 2003;**56**(10):786-788.
24. Alexander-Sefre F, Singh N, Ayhan A, Thomas J, Jacobs I. Clinical value of immunohistochemically detected lymphovascular invasion in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2004;**92**(2):653-659.
25. Tsuruchi N, Kaku T, Kamura T, et al. The prognostic significance of lymphovascular space invasion in endometrial cancer when conventional hematoxylin and eosin staining is compared to immunohistochemical staining. *Gynecol Oncol* 1995;**57**(3):307-312.
26. Amezcua C, MacDonald H, Lum C, Muderspach L, Roman L, Felix J. Endometrial cancer patients have a significant risk of harboring isolated tumor cells in histologically negative lymph nodes. *Int J Gynecol Cancer* 2006;**16**:1336-41.
27. Liu F, Wang Y, Wang J, Xue Q, Jiang S, Ma Y. Study on cytokeratin and CA 125 for diagnosing lymph node micrometastases in endometrial cancer. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2004;**39**(9):612-5.
28. Fishman A, Klein A, Zemer R, et al. Detection of micrometastases by cytokeratin-20 (reverse transcription polymerase chain reaction) in lymph nodes of patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2000;**77**(3):399-404.
29. Niikura H, Okamoto S, Yoshinaga K, et al. Detection of micrometastases in the sentinel lymph nodes of patients with endometrial cancers. *Gynecol Oncol* 2007;**105**(3):683-6.

30. Yabushita H, Shimazu M, Yamada H, Sawaguchi K, Nogushi M, Nakanishi M. Occult Lymph Node Metastases Detected by Cytokeratin Immunohistochemistry Predict Recurrence in Node-Negative Endometrial Cancer. *Gynecol Oncol* 2001;**80**(2):139-144.
31. Delaloye J-F, Pampallona S, Chardonnens E, et al. Intraoperative lymphatic mapping and sentinel node biopsy using hysteroscopy in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2007;**106**(1):89-93.
32. Bats A-S, Clement D, Larousserie F, et al. Does sentinel node biopsy improve the management of endometrial cancer? *J Surg Oncol* 2008;**97**(2):141-5.
33. Bats A-S, Clément D, Larousserie F, et al. La biopsie du ganglion sentinelle dans les cancers de l'endomètre est-elle faisable? Résultats sur 26 cas. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2005;**34**(8):768-74.
34. Delpech Y, Cortez A, Coutant C, et al. The sentinel node concept in endometrial cancer: histopathologic validation by serial section and immunohistochemistry. *Ann Oncol* 2007;**18**(11):1799-803.
35. Marchiolè P, Buénerd A, Scoazec J-Y, Dargent D, Mathevet P. Sentinel Lymph Node Biopsy Is Not Accurate in Predicting Lymph Node Status for Patients with Cervical Carcinoma. *Cancer* 2004;**100**:2154-9.
36. Niikura H, Okamura C, Utsunomiya H, et al. Sentinel lymph node detection in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2004;**92**:669-674.
37. Lopes L, Nicolau S, Baracat F, et al. Sentinel lymph node in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2007;**17**(5):1113-7.
38. Delpech Y, Coutant C, Morel O, Uzan S, Darai E, Barranger E. Value of sentinel lymph node procedure in endometrial cancer. *Gynecol Obstet Fertil* 2007;**35**(7-8):618-24.
39. Gould V, et al. Increased number of cytokeratin-positive interstitial reticulum cells in reactive inflammatory and neoplastic lymphadenopathies: hyperplastic or induced expression? *Virchows Arch* 1995;**425**:617-29.

40. McKenney J, Kong C, Longacre T. Endometrial Adenocarcinoma Associated With Subtle Lymph-Vascular Space Invasion and Lymph Node Metastasis: A Histologic Pattern Mimicking Intravascular and Sinusoidal Histiocytes. *Int J Gynecol Pathol* 2005;**24**(1):73-8.
41. Horn L, Fischer U, Höckel M. Occult tumor cells in surgical specimens from cases of early cervical cancer treated by liposuction-assisted nevre sparing radical hysterectomy. *Int J Gynecol Cancer* 2001;**11**(2):159-63.
42. Khoury-Collado F, Abu-Rustum N. Lymphatic mapping in endometrial cancer: a literature review of current techniques and results. *Int J Gynecol Cancer* 2008.
43. Burke TW, Levenback C, Tornos C, Morris M, T. WJ, Gershenson DM. Intraabdominal Lymphatic Mapping to Direct Selective Pelvic and Paraaortic Lymphadenectomy in Women with High-Risk Endometrial Cancer: Results of a Pilot Study. *Gynecol Oncol* 1996;**62**(2):169-173.
44. Raspagliesi F, Ditto A, Kusamura S, et al. Hysteroscopic injection of tracers in sentinel node detection of endometrial cancer: A feasibility study. *Am J Obst Gynecol* 2004;**191**:435-9.
45. Maccauro M, Lucignani G, Aliberti G, et al. Sentinel lymph node detection following the hysteroscopic peritumoural injection of ^{99m}Tc-labelled albumin nanocolloid in endometrial cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;**32**:569-574.
46. Pelosi E, Arena V, Baudino B, et al. Preliminary Study of Sentinel Node Identification with ^{99m}Tc Colloid and Blue Dye in Patients with Endometrial Cancer. *Radioguided and Radioimmunoguided Oncology: Present and Future* 2002:S9-10.
47. Pelosi E, Arena V, Baudino B, et al. Pre-operative lymphatic mapping and intraoperative sentinel lymph node detection in early stage endometrial cancer. *Nuc Med Com* 2003;**24**:971-5.
48. Ballester M, Dubernard G, Rouzier R, Barranger E, Darai E. Use of the Sentinel Node Procedure to Stage Endometrial Cabcer. *Ann Surg Oncol* 2008.

49. Lelievre L, Camatte S, Le Frere-Belda M, et al. Sentinel lymph node biopsy in cervix and corpus uteri. *Int J Gynecol Cancer* 2004;**14**:271-8.

8. Tabellen

Tabelle 1 : Patientencharakteristika

	Alter(Jahre)	BMI(kg/m ²)
Mittelwert/Median	65,0 ± 8,1	27,5
Min-Max	52 - 83	19 - 42

Tabelle 2 : Karzinomarten

	Adeno-Karzinom	Adenosquamöses Karzinom	Karzino-Sarkom
n	23	1	1
(%)	92	4	4

Tabelle 3 : Tumorcharakteristika der 25 Patientinnen und Gesamtanzahl der exstirpierten Lymphknoten

Pat-ID	FIGO präOP	FIGO postOP	G	Karzinom (mm)	IT (mm)	MD (mm)	Lnges pelvin (n)	LNges para (n)
9	I	IIIC _{IHC}	2	40	11	16	17	10
18	IIB	IIIC _{IHC}	2	k.A.	16	18	18	3
25	I	IIIC _{IHC}	1	4	2	12	32	10
7	I	IIIC _{HE}	2	50	10	32	29	3
8	I	IIIC _{HE}	2	38	7	15	44	26
12	IIB	IIIC _{HE}	3	55	9	16	34	25
1	IIB	IB	2	k.A.	1	9	31	-
2	I	IA	1	kl. Areale	0	30	2	-
3	I	IC	1	25	8	15	1	-
4	I	IB	2	12	k.A.	13	17	-
5	I	IB	1	25	5	20	20	6
6	I	IA	n.a.	Atypie	n.a.	25	25	-
10	I	IA	3	60	15	29	25	-
11	I	IIIA	3	55	30	30	22	15
13	I	IA	2	k.A.	0	k.A.	32	19
14	I	IB	1	4	1	k.A.	22	-
15	I	IB	1	15	5	15	20	-
16	I	IB	2	k.A.	3	17	18	8
17	I	IB	1	30	2	12	17	-
19	IIB	IIB	2	20	7	10	33	10
20	I	IB	1	25	2	12	12	8
21	I	IB	1	2	2	11	3	-
22	I	IA	1	15	0	18	21	-
23	I	IB	3	20	3	10	17	8
24	I	IB	3	15	10	25	20	13

n.a.= nicht ausgewertet , da kein Karzinom sondern atypische Hyperplasie

HE= Färbung mit Hemtoxylin und Eosin;

IHC=Färbung mit Panzytokeratinantikörpern

k.A. = keine Angaben

MD = Myometriumdicke

IT = Invasionstiefe

LNges = Anzahl aller entnommenen Lymphknoten

para = paraaortal

pelv = pelvin

G = Grading

Tabelle 4 : Lymphknotenstatus in HE und IHC-Färbung der 25 Patientinnen

Pat	LN ges	LNkli	SLNkli	LNpara (HE)	LNpara (IHC)	LNpelv (HE)	LNpelv (IHC)	SLN (HE)	SLN (IHC)
1	0/31	9	5	-	-	0/22	0/22	0/9	0/9
2	0/2	-	2	-	-	-	-	0/2	0/2
3	0/1	2	-	-	-	0/1	0/1	-	-
4	0/17	4	-	-	-	0/17	0/17	-	-
5	0/26	6	3	0/6	0/6	0/17	0/17	0/3	0/3
6	0/25	3	2	-	-	0/23	0/23	0/2	0/2
7	1/32;2/32	5	3	0/3	1/3	1/21	1/21	0/8	0/7
8	2/70;3/70	3	2	0/26	1/26	0/34	0/34	2/10	2/10
9	0/27;1/27	12	2	0/10	0/10	0/15	0/15	0/2	0/2
10	0/25	5	2	-	-	0/24	0/24	0/1	0/1
11	0/37	5	2	0/15	0/15	0/19	0/19	0/3	0/3
12	4/59;4/59	7	3	1/22	1/22	1/34	1/34	2/3	2/3
13	0/51	4	6	0/19	0/19	0/19	0/19	0/13	0/13
14	0/22	3	2	-	-	0/17	0/17	0/5	0/5
15	0/20	2	3	-	-	0/16	0/16	0/4	0/4
16	0/26	6	3	0/8	0/8	0/15	0/15	0/3	0/3
17	0/17	3	1	-	-	0/16	0/16	0/1	0/1
18	0/21;2/21	3	3	0/3	1/3	0/16	0/16	0/2	1/2
19	0/43	4	2	0/10	0/10	0/27	0/27	0/6	0/6
20	0/20	4	2	0/8	0/8	0/9	0/9	0/3	0/3
21	0/3	-	3	-	-	-	-	0/3	0/3
22	0/21	3	3	-	-	0/13	0/13	0/8	0/8
23	0/25	4	4	0/8	0/8	0/14	0/14	0/3	0/3
24	0/33	7	7	0/13	0/13	0/12	0/12	0/8	0/8
25	0/42;1/42	6	3	0/10	0/10	0/29	0/29	0/3	1/3

kli = klinisch
ges = gesamt
para = paraaortal
pelv = pelvin

Tabelle 5 : Anzahl der extipierten SLN, NSLN und LNgesamt der 21 Patientinnen

	SLN	NSLN	LNges
Min.	1	13	17
1 st Qu.	3	19	22
Median	3	23	26
Mittelwert	4,8	27,3	32,1
3 rd Qu.	8	34	37
Max.	13	60	70

Tabelle 6 : Metastasenstatus der 21 Patientinnen(SLN, NSLN und LNges in Abhängigkeit von der Färbung)

	SLN(HE)	SLN(IHC)	LN(HE)	LN(IHC)	LNges(HE)	LNges(IHC)
0	19	16	19	17	18	15
1	2	5	2	4	3	6

n= 21

0= kein Nachweis von Metastasen

1= Nachweis von Metastasen (≥1)

bei einer Patientin war der SLN falsch negativ (f.n.)

Tabelle 7 : Anzahl der metastasierten und nicht metastasierten Lymphknoten (Vergleich der konventionellen HE-Färbung mit der immunhistochemischen Färbung)

	SLN -	SLN+	NSLN -	NSLN +	LNges -	LNges +
HE	96	4	570	3	666	7
IHC	93	7	567	6	660	13

0= kein Nachweis von Metastasen

1= Nachweis von Metastasen (≥1)

Tabelle 8 : Histopathologische Ergebnisse nodal positiver Patientinnen

Pat-ID	SLN-Lok.	pTNM	Histo	SLN pelv/pa						LN pelv(n)	LN pelv	LN pa(n)	LN pa
9	pelv	Ic	HE.	-	-	-	-	-	-	15		10	
			HE _R	-	-	-	-	-	-				
			IHC	I	-	-	-	-	-				
18	pelv	IIb	HE	-	-	-	-	-	-	16		3	
			HE _R	m	-	-	-	-	-				
			IHC	m	-	-	-	-	-				c
25	pelv	Ib	HE	-	-	-	-	-	-	29	0	10	
			HE _R	-	-	-	-	-	-				
			IHC	m	-	-	-	-	-				
7	pelv	Ic	HE.	-	-	-	-	-	-	21	M	3	
			HE _R	-	-	-	-	-	-		M		
			IHC	-	-	-	-	-	-		M		c
-	pelv	Ib	HE	m	-	-	-	-	-	34		26	
			HE _R	m	-	-	-	-	-				
			IHC	m	-	-	-	-	-				m
12	pa	IIb	HE	m	-	-	-	-	-	34	m	22	m
			HE _R	m	-	-	-	-	-		m		m
			IHC	m	-	-	-	-	-		m		m

M = Makrometastase > 0,2cm

m = Mikrometastasen ≤ 0,2cm und > 0,2mm

I = isolierte Tumorzellen < 0,2mm

c = Cluster

HE= Befund der initialen HE-Färbung

HE_R = Befund nach Reevaluation der HE-Färbung

IHC = Befund der immunhistochemischen Färbung

SLN-Lok=Lage der Sentinellymphknoten

pTNM= Stadieneinteilung nach initialer Untersuchung

SLNpelv/pa = Untersuchungsergebnis für die SLN

LN_{pelv/pa} = Anzahl pelviner/paraaortaler LNs , ohne SLN

LNpelv/pa= Untersuchungsergebnisse nach Reevaluation/IHC

Pat-ID= Identifikationsnummer der Patientin

Tabelle 9 :Ergebnisse der konventionellen Lymphknotenaufarbeitung (HE) vor dem Hintergrund des tatsächlichen Lymphknotenstatus (HE/IHC) der 21 Patientinnen

	LNges – (HE/IHC)	LNges + (HE/IHC)	total
LNges - (HE)	15	3	18
LNges + (HE)	0	3	3
total	15	6	21

Sensitivität (HE) = 50,0%

Negativ Prädiktiver Wert(HE) = 83,3%

“-“ = nodalnegativ

“+“= nodalpositiv

Tabelle 10 :Ergebnisse der konventionellen Sentinellymphknotenaufarbeitung (HE) vor dem Hintergrund des konventionellen Lymphknotenstatus (HE) der 21 Patientinnen

	LNges - (HE)	LN ges+(HE)	total
SLN -(HE)	18	1	19
SLN +(HE)	0	2	2
total	18	3	21

“-“ = nodalnegativ

“+“= nodalpositiv

p-Wert = 1

npV = 94,7 %

Sens = 66,7%

Tabelle 11: Ergebnisse der konventionellen Aufarbeitung der
Sentinellymphknotenaufarbeitung (HE) vor dem Hintergrund der zusätzlichen
Aufarbeitung aller Lymphknoten (HE und IHC)

	LNges - (HE/IHC)	LNges +(HE/IHC)	total
SLN -(HE)	15	4	19
SLN +(HE)	0	2	2
total	15	6	21

“-“ = nodalnegativ
 “+“= nodalpositiv
 p-Wert = 1
 npV= 79%
 Sens= 33,3%

Tabelle 12: Ergebnisse der erweiterten Aufarbeitung (HE und IHC)der
Sentinellymphknoten und Non-Sentinellymphknoten

	LNges - (IHC)	LNges +(IHC)	total
SLN -(IHC)	15	1	16
SLN +(IHC)	0	5	5
total	15	6	21

“-“ = nodalnegativ
 “+“= nodalpositiv
 p-Wert = 1
 npV= 93,8%
 Sens= 83,3%

Tabelle 13 : Sensitivität und Negativer Vorhersagewert bei unterschiedlicher Lymphknotenaufarbeitung

		SLN(HE) – LNges(HE)	SLN(HE) – LNges(IHC)	SLN(IHC) – LNges(IHC)
Sensitivität	(%)	66,7	33,3	83,3
	CI ₉₅	9,4-99,2	4,3-77,7	35,9-99,6
negativer Vorhersagewert	(%)	94,7	79	93,8
	CI ₉₅	74,0-99,9	54,4-94,0	69,8-99,8

Tabelle 14 : exakter Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest zum Vergleich der Metastasen-positiven Lymphknoten

	SLN(HE)	LNges(HE)		SLN(HE)	LNges(IHC)		SLN(IHC)	LNges(IHC)
7	0	0.500	7	0	1.000	7	0	1.000
8	1	0.667	8	1	1.000	8	1	1.000
9	0	0.000	9	0	1.000	9	1	1.000
12	1	1.000	12	1	1.000	12	1	1.000
18	0	0.000	18	0	1.000	18	1	1.000
25	0	0.000	25	0	1.000	25	1	1.000

Zahlenwerte entsprechen den, durch die jeweilige Methode entdeckten, Lymphknotenmetastasen, im Bezug auf den „wahren Lymphknotenstatus“

n.s. = p-Werte = 1

9. Anhang

9.1. Chemikalien und Reagenzien

Alle Standardreagenzien, wie z.B. Alkohol und Aqua dest., wurden von der universitätseigenen Apotheke bezogen.

Als Grundlage für die Immunhistochemische Färbung diente das Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Code K5001) der Firma Dako Denmark A/M.

1. BORG Decloaker (RTU) [Biocare Medical (BD 1000G1)]
Demaskierungslösung, pH 9,5 für HIER-Verfahren
2. Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution [Code-Nr. S2023]
Blockierung der endogenen Peroxidase
3. Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase (HRP) [Code K5001, Fläschen B]
Peroxidasekonjugiertes Streptavidin
isoliert aus Streptomyces avidinii, konjugiert mit HRP (Dako REAL™, Code K5001)
4. Dako REAL™ DAB+ Chromogen (X50) [Code K5001, Fläschen C]
50-fach konzentriertes 3,3 Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
Substrat, erste Komponente des Substratsystems, ergibt ein braunes Endprodukt am Ort des Zielantigens
5. Dako REAL™ HRP Substrat Buffer [Code K5001, Fläschen D]
Gepufferte Substratlösung mit Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel
zweite Komponente des Substratsystems
6. Dako REAL™ Hematoxylin [Code-Nr. S2020]
Gegenfärbung / Kernfärbung, ergibt eine nukleäre Blaufärbung
7. Tris-Puffer
8. Dako REAL™ Antibody Diluent [Code-Nr. S2022]
9. Verdünnung des konzentrierten primären Mausantikörpers
10. Aqua dest.
11. Ethanol (100% , 99% , 96% , 70%)
12. Xylol
13. Isopropanol (99%)

9.2. Rezepturen

1. Tris-Puffer
87,8 g NaCl
+ 9g Tris-Base
+ 10L Aqua dest.
+ 68,5g Tris-HCl
+ 3ml Tween (20%)
2. Substratarbeitslösung (CHROM, Code-Nr. K5001)
20µl DAB+ Chromogen [Code K5001, Fläschen C]
+ 1ml HRP Substrate Buffer [Code 5001, Fläschen D]

9.3. Antikörper

Alle Antikörper wurden von der Firma Dako Denmark A/M bezogen.

1. Monoclonal Mouse Anti-Human-Cytokeratin, Clone MNF 116 [Dako Cytomation, Code-Nr. M 0821]
Primärer Antikörper, Isotyp IgG1,Kappa; dient der Identifizierung neoplastischer Zellen epithelialen Ursprungs, antikeratinische Breitspektrumreagenz, regiert mit CK 5,6,8,17 und 19
2. Dako REAL[®] Biotinylated Secondary Antibodies(AB 2) [Code K5001, Fläschen A]
Biotinylierter Ziege-Anti-Maus-Immunglobuline, in gepufferter Lösung mit stabilisierendem Protein und Natriumazid

9.4. Geräte und Materialien

1. Gewebsschnitte (etwa 1µm, formalinfixierte paraffineingebettete Schnitte)
2. Kapillarobjektträger [Dako Cytomation], Deckgläser und Eindeckmedium
3. Färbeautomat Dako Techmate mit Protokoll für die Verwendung von Dako REAL[™] Detection System, Peroxidase/DAB+,Rabbit/Mouse [Code-Nr. K5001]
4. Lichtmikroskop [Leitz Dialux]
5. Rotationsmikrotom [Leica]

9.5. Prinzip der Immunhistochemischen Färbung mittels LSAB-Methode

Vor der Färbung erfolgte eine Epitopdemaskierung mittels Hitzebehandlung unter Verwendung einer Demaskierungslösung.

Als primärer Ak zur Detektion von Panzytokeratin wurde ein monoklonaler Anti-Human-Zytokeratin- Mausantikörper verwendet.

Dieser wurde durch einen biotinylierten sekundären polyklonalen Anti-Maus-Antikörper (aus der Ziege)detektiert.

Als Tertiärreagenz diente HRP (= horseradish-peroxidase) gekoppeltes Streptavidin, welches spezifisch an Biotin bindet.

Zur Visualisierung diente DAB+. Dieses Chromogen wird durch Peroxidase in ein braunes Endprodukt umgewandelt.

9.6. Färbeablauf für Immunhistochemische Färbung mit LSAB-Methode

1. Schnitte für 25 min. Xylol entparaffinieren
2. Durchlaufen der absteigenden Alkoholreihe, bei jedem Schritt Präparat gut spülen (2x 99% Alkohol, 1x 96% Alkohol, 1x 70% Alkohol)
3. Schnitte mit Tris-Puffer spülen
4. hitzeinduzierte Epitopdemaskierung mittels Dampfgerar bei pH 9,5 in Demaskierungslösung (Biocare BD 1000G1) für 45 min.
5. Spülung mit Tris-Puffer
6. Inkubation mit primärem Antikörper (Code-Nr. M 0821) in einer Verdünnung von 1:50 in Antibody Diluent (Code-Nr. S2022) für 25 min. bei Raumtemperatur
7. Spülung mit Tris-Puffer
8. Inkubation mit biotinyliertem sekundären Antikörper (K5001, AB2)für 20 min. bei Raumtemperatur
9. Spülung mit Tris-Puffer
10. Blocken der endogenen Peroxidase mit Peroxidase Blocking Solution (Code-Nr.2023) für 3x 5 min.
11. Spülung mit Tris-Puffer
12. Inkubation mit Tertiärreagenz (K5001,HRP-konjugiertes Streptavidin) für 20 min bei Raumtemperatur
13. Spülung mit Trispuffer

14. Entwicklung mit Substratarbeitslösung CHROM (K5001, 20µlDAB+ mit 1ml HRP Substrate Buffer) für 3 min. bei Raumtemperatur
15. Spülung mit Aqua dest.
16. Gegenfärbung mit Hematoxylin (Code-Nr. S2020) für 5 min.
17. Bläuen mit Leitungswasser für 5 min.
18. Durchlaufen der aufsteigenden Alkoholreihe (1x 70% Alkohol, 1x 96% Alkohol, 2 x 100% Alkohol, 1x Isopropanol, 3x Xylol) und Eindecken

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.- Prof. Dr. med. K. Diedrich dafür, dass er mir ermöglichte, die Arbeit an seiner Klinik durchzuführen.

Herrn PD Dr. Altgassen gebührt mein Dank für die freundliche Überlassung des Themas und die stetige Unterstützung und umfassende Hilfe bei der Realisierung der Arbeit.

Insbesondere gilt mein Dank auch Herrn Dr. Tiantom Jarutat, Institut für Pathologie, für seine intensive Betreuung, Beratung und Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei Frau Dipl. Inform. Silke Szymczak, Institut für Medizinische Biometrie und Statistik, für ihre umfassende statistische Beratung und Betreuung während der Arbeit.

Gleichfalls danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des histopathologischen Labors des Instituts für Pathologie, insbesondere Frau Katharina Vogel, für die Unterstützung und Hilfe bei der Anfertigung der Präparate.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Eltern herzlichst dafür danken, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben.

11. Lebenslauf

Name: Nadine Müller
geboren: 20. März 1979
Geburtsort: Siegen, NRW
Eltern: Hans-Joachim Müller und Christine Müller

Schul Ausbildung:

1985-1989 Grundschule Oberfischbach
1989-1998 Peter-Paul-Rubens-Gymnasium, Siegen
Mai 1998 Abitur

Berufsausbildung :

1995-2001 Staatliche Lehranstalt für MTA an der Universitätsklinik der
Philipps-Universität, Marburg
September 2001 Staatliche Prüfung zur MTRA

Studium:

Oktober 2001 Immatrikulation an der Medizinische Fakultät der Christian-
Albrechts-Universität, Kiel
August 2003 Ärztliche Vorprüfung, Kiel
Oktober 2003 Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Universität
Lübeck
August 2004 1. Teil der Ärztlichen Prüfung nach alter AO, Lübeck
Oktober 2007 2. Teil der Ärztlichen Prüfung nach neuer AO, Lübeck