

Zusammenfassung

Die Wächterlymphknotenbiopsie gewährleistet eine sehr zuverlässige Ausbreitungsdiagnostik des regionären Lymphabflussgebietes für Patienten mit primärem Melanom. Der histologische Status des Wächterlymphknotens ist von herausragender prognostischer Bedeutung. Innerhalb der histologisch positiven Patienten können anhand des Tumordurchmessers prognostische heterogene Gruppen identifiziert werden. Aufgrund der erhöhten Sensitivität zur Tumorzelldetektion kann durch die zusätzliche Durchführung von RT-PCR-Untersuchungen eine Verbesserung der prognostischen Relevanz der Wächterlymphknotenbiopsie erzielt werden.

Abstract

The technique of sentinel lymph node biopsy is highly accurate in staging the regional lymph node basins in primary melanoma patients. The histological status of the sentinel lymph node is one of the most important prognostic factors for recurrence. In patients with positive histological status the extend of nodal tumour mass has been to shown to correlate with recurrence. Due to the increased sensitivity of tumour cell detection by molecular biological techniques the additional use of RT-PCR is able to improve the clinical impact of sentinel lymph node biopsy.

Durch die selektive, minimal-invasive Technik der Wächterlymphknotenbiopsie (WLKB) steht seit gut 10 Jahren ein diagnostisches Verfahren im Stadium der klinischen Erprobung, welches den regionären Lymphknotenstatus mit hohem prädiktiven Wert erfasst [29]. Durch eine Reihe von Arbeiten konnte demonstriert werden, dass der Wächterlymphknoten (WLK) eine herausragende diagnostische und prognostische Bedeutung für Patienten mit primärem kutanen Melanom besitzt [8,15,24,38].

Zuverlässigkeit der Wächterlymphknotenbiopsie

Verschiedene Faktoren können jedoch die Zuverlässigkeit der WLKB, eine regionäre Lymphknotenmetastasierung anzuzeigen, beeinflussen. Hier ist zum einen, die, wenn auch geringe Rate von Patienten mit einer regionären Lymphknotenmetastasierung bei Vorliegen eines histologisch negativen WLK aufzuführen [5,15,28,28,36,42,43] (Tab. 1). In der Mehrzahl der Arbeiten wurden diese Untersuchungen bei Patienten mit am Körper-

stamm und an den Extremitäten lokalisierten Melanomen durchgeführt. Hier zeigte sich in bis zu 2% der Patienten eine regionäre Lymphknotenmetastasierung trotz negativem WLK. Allerdings kann die Rate von Patienten mit metastatischem Lymphknotenbefall bei negativem WLK in Abhängigkeit von der Lokalisation des Primärtumors deutlich variieren. Für Melanome im Kopf-/Hals-Bereich ist die Durchführung der WLKB deutlich diffiziler. Für diese Lokalisation konnte bei 7% der Patienten eine regionäre Lymphknotenmetastasierung bei negativem WLK dokumentiert werden [21].

Welche Kriterien sollten berücksichtigt werden, um eine möglichst hohe Zuverlässigkeit der WLKB zu gewährleisten? Die Aufnahme des Radiokolloids und damit die Detektionsrate wird wesentlich von der physiologischen Integrität, d.h. der funktionellen Kapazität des WLK beeinflusst [13]. Wenn Lymphknotenparenchym durch Tumorgewebe ersetzt worden ist, kann aufgrund der verringerten lymphatischen Kapazität nur eine verminderte Aufnahme des Radiotracers erfolgen. Zudem können bei ausge-

Institutsangaben

Universitäts-Hautklinik Tübingen, Tübingen

Korrespondenzadresse

H.-J. Blaheta · Universitäts-Hautklinik Tübingen · Liebermeisterstraße 25 · 72076 Tübingen

Bibliografie

Akt Dermatol 2002; 28: 279–284 © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 0340-2541

Tab. 1 Metastasen in nachgeschalteten Lymphknoten bei negativem WLK

Autor, Jahr	Detektionstechnik	Detektionsrate (%)	Lymphknotenmetastasen bei negativem WLK (%)
Morton et al. 1992	Farbstoff	82	2
Morton et al. 1993	Farbstoff	90	0
Uren et al. 1994	Farbstoff*	98	2
Reintgen et al. 1994	Farbstoff*	100	0
Thompson et al. 1995	Farbstoff*	87	2
Blaheta et al. 1999	LAS	92	1
Gershenwald et al. 1999	Farbstoff + LAS ^x	95	1
Jansen et al. 2000	Farbstoff + LAS	90	7

* Mit Lymphabstromszintigraphie (ohne intraoperative Gamma-Sonde); LAS: Lymphabstromszintigraphie und mit intraoperativer Gamma-Sonde; ^x nicht in allen Patienten durchgeführt.

prägender Tumorinfiltration des WLK afferente Lymphgefäße obstruiert werden. Dadurch kann sich der afferente Lymphabfluss substanziiell ändern [7]. Dies kann zur Folge haben, dass durch Ausbildung von Umgehungskreisläufen der eigentliche WLK umgangen wird und ein nachgeschalteter Lymphknoten zum „WLK“ wird. Insofern gilt ein klinisch negativer Lymphknotenstatus als Grundvoraussetzung für die Durchführung einer WLKB. Neben diesen beschriebenen Einflussfaktoren wird die diagnostische und damit prognostische Bedeutung des WLK vor allem durch die Sensitivität und Spezifität des jeweiligen Tumorzellnachweises (Histologie, Molekularbiologie) bestimmt.

Histopathologische Untersuchungen des Wächterlymphknotens

Die selektive Entnahme eines repräsentativen WLK ermöglicht es, diesen sehr differenziert nach Tumorzellen zu untersuchen. Die Nachweisgenauigkeit wird unter anderem bestimmt durch

die Art des histologischen Tumorzellnachweises: Durchführung einer konventionellen Hämatoxylin-Eosin-(H&E)-Färbung bzw. von immunhistochemischen Detektionsverfahren. Mittlerweile wurde eine Vielzahl von klinischen Studien zur WLKB publiziert, in denen insbesondere in den aktuelleren Arbeiten auch immunhistochemische Untersuchungen zur histopathologischen Aufarbeitung des WLK durchgeführt wurden [1,5,8,15–17,22,23,26,29,30,34,36,38,42]. Hierbei zeigte sich, dass in ungefähr 20% (9 bis 42%) der Patienten mit primärem Melanom metastatische Absiedlungen in den WLK gefunden werden konnten (siehe Tab. 2).

Aufgrund der verbesserten Sensitivität zur Tumorzelldetektion, gegenüber einer alleinigen H&E-Analyse, wird die Durchführung der Immunhistochemie mittlerweile als essenzieller Bestandteil bei der histologischen Beurteilung von WLK angesehen. Trotz der dadurch verbundenen Verbesserung der histopathologischen Untersuchung können durch die routinemäßige Diagnostik des WLK „okkulte“ Tumorzellen übersehen werden.

Tab. 2 Histopathologische Detektion von Tumorzellen in WLK

Autor, Jahr	histologische Marker	Patienten	positive Patienten
Morton et al. 1992	H & E, S-100, NKIC3	194	40/194 (21%)
Reintgen et al. 1994	H & E, S-100*, HMB-45*	42	8/42 (19%)
Krag et al. 1995	H & E	118	15/118 (13%)
Pijpers et al. 1995	H & E	41	8/41 (20%)
Thompson et al. 1995	H & E	105	22/105 (21%)
Albertini et al. 1996	H & E, S-100*, HMB-45*	106	16/106 (15%)
Glass et al. 1996	H & E, S-100, HMB-45	148	21/148 (14%)
Leong et al. 1997	H & E, S-100*	160	30/160 (19%)
Gogel et al. 1998	H & E, S-100*, HMB-45*	68	6/68 (9%)
Mraz-Gernhardt et al. 1998	H & E, S-100, HMB-45	215	46/215 (21%)
Shivers et al. 1998	H & E	114	23/114 (20%)
Blaheta et al. 1999	H & E, S-100, HMB-45	73	13/73 (18%)
Bostick et al. 1996b	H & E, S-100, HMB-45	72	17/72 (24%)
Gershenwald et al. 1999	H & E, S-100, HMB-45	580	85/580 (15%)
Lukowsky et al. 1999	H & E, S-100	24	10/24 (42%)

* Nicht routinemäßig durchgeführt.

Molekularbiologische Untersuchungen des Wächterlymphknotens

In den letzten zwei Jahrzehnten gelang es, durch die Entwicklung neuer analytischer molekularbiologischer Techniken, Tumorzellen aufgrund der Expression tumorspezifischer oder -assoziierter Gene extrem sensitiv nachzuweisen [35]. Die spezifischen Zielsequenzen der entsprechenden Gene können mittels einer geschachtelten Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (nested RT-PCR) exponenziell amplifiziert und damit selbst eine minimale Anzahl von Tumorzellen nachgewiesen werden. Hierdurch kann die Sensitivität zum Tumorzellenachweis im Lymphknoten gegenüber dem „Goldstandard“ der Histopathologie signifikant gesteigert werden [31,45]. Für den molekularbiologischen Nachweis von Melanozyten stehen spezifische gewebe- und tumorassoziierte Marker zur Verfügung. Von den gewebeassoziierten Markern wurde das Schlüsselenzym der Melaninbiosynthese, Tyrosinase, am intensivsten für die RT-PCR-Analyse von (Wächter-)Lymphknoten verwendet. Da Melanozyten mit Ausnahme von nodalen Nävuszellnestern nicht in Lymphknoten lokalisiert sind, wird die Expression des Tyrosinase-Gens als Nachweis von Tumorzellen gewertet.

Durch den Einsatz der extrem sensitiven RT-PCR-Technik konnte eine Tyrosinase-Expression in (Wächter-)Lymphknoten zwischen 49 und 73% der Patienten mit primärem Melanom nachgewiesen werden [3,5,25,38,44,45] (Tab. 3). Bezogen auf Patienten mit histopathologisch negativen (Wächter-)Lymphknoten konnte in diesen Studien eine Tyrosinase-Expression bei 38–65% der Patienten demonstriert werden. Die Spezifität dieser molekularen Nachweismethode konnte demonstriert werden, indem in fast allen histopathologisch positiven (Wächter-)Lymphknoten auch eine Tyrosinase-Genexpression nachgewiesen werden konnte. Dennoch kann aufgrund der Heterogenität der Genexpression in metastasierenden Melanomen nicht erwartet werden, Tyrosinase in allen histologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen nachzuweisen [11,32]. Deshalb wurden neben Tyrosinase gleichzeitig noch weitere Marker zur molekularen Diagnostik eingesetzt. So wurden von Bostick u. Mitarb. mehrere spezifische Marker (Tyrosinase, Melan A/MART-1 und MAGE-3) gleichzeitig zur PCR-Analyse von WLK eingesetzt [8]. Durch diese Multimarker-PCR konnte die Sensitivität der Methode gesteigert werden, indem bei gleichzeitigem Nachweis von mindestens zwei Markergenen, die Nachweisrate sogar auf 79% erhöht werden konnte (Tab. 3).

Die Spezifität der Tyrosinase-RT-PCR wurde außerdem evaluiert, indem Lymphknoten bzw. -aspirate von Patienten ohne Melanom untersucht wurden [3,4,8,19,20,37,44,46]. Insgesamt wurden in diesen Arbeiten gut 250 Lymphknoten als Negativkontrollen auf eine mögliche Tyrosinase-Genexpression untersucht. In diesen Studien wurde in lediglich zwei Lymphknoten (<1%) Tyrosinase-mRNA nachgewiesen, die hohe Spezifität dieses Assays dokumentierend. Bei einem dieser beiden positiven Lymphknoten konnten histologisch Nävozyten als Ursache eines falsch positiven Tyrosinase-Befundes nachgewiesen werden. Analog wurden Untersuchungen zur Melan-A-Expression in Lymphknoten von Kontrollpersonen (Patienten mit nicht-melanozytären Erkrankungen) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Melan A bei 3 (13%) von 24 untersuchten Patienten nachgewiesen werden konnte (eigene Daten, noch nicht publiziert). Damit werden die Ergebnisse von Palmieri u. Mitarb. bestätigt, welche bei einem von 18 Patienten (6%), die als Negativkontrollen dienten, Transkripte von Melan A detektierten [33]. Insofern muss zum derzeitigen Zeitpunkt Tyrosinase als zuverlässigster molekularer Tumormarker angesehen werden. Um falsch positive PCR-Ergebnisse auszuschließen, müssen ausschließlich PCR-positive WLK sehr genau nach Nävozyten untersucht werden. Benigne Nävuszellaggregate können aufgrund ihrer typischen Morphologie, der klassischen intrakapsulären Lokalisation und ihrer Immunreaktivität (S-100 positiv, HMB-45 negativ) relativ leicht detektiert und gegenüber metastatischen Melanomzellen abgegrenzt werden [10]. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass das für die molekulare Analyse eingesetzte Material histologisch nicht mehr untersucht werden kann (sog. sampling error). Insofern können falsch positive PCR-Ergebnisse nicht obligat ausgeschlossen werden.

Klinische Relevanz von histologisch nachgewiesenen Tumorzellen

Durch eine Reihe von Arbeiten konnte aufgezeigt werden, dass der histologische Status des WLK ein exzellenter prognostischer Faktor ist [12,15,17,27,41]. Im Rahmen einer Multizenterstudie wurde der Einfluss des histologischen Status des WLK auf das rezidivfreie Überleben bei Patienten mit primärem Melanom untersucht [15]. In diese Studie wurden 612 Patienten aufgenommen, die über einen Zeitraum von 40 Monaten (Median) nachuntersucht wurden. In einer multivariaten Analyse konnte der histologische WLK-Status – neben der Tumordicke – als hochsigni-

Tab. 3 Molekularer Nachweis von Tumorzellen in (Wächter-)Lymphknoten

Autor, Jahr	molekulare Marker	histologisch +	PCR +	histologisch – PCR +
Wang et al. 1994	Tyrosinase	11/29 (38%)	19/29 (66%)	8/18 (44%)
Velde-Z. et al. 1996	Tyrosinase	4/16 (25%)	10/16 (63%)	6/12 (50%)
Bieligk et al. 1998	Tyrosinase	6/26 (23%)	19/26 (73%)	13/20 (65%)
Shivers et al. 1998	Tyrosinase	23/114 (20%)	70/114 (61%)	47/91 (52%)
Blaheta et al. 1999	Tyrosinase	13/73 (18%)	36/73 (49%)	23/60 (38%)
Li et al. 2000	Tyrosinase	52/233 (22%)	163/233 (70%)	111/181 (61%)
Bostick et al. 1999b	Tyrosinase, MAGE-3, Melan A	17/72 (24%)	36*/72 (79%)	20*/55 (36%)

* Expression von mindestens zwei Tumormarkern.

fikanter Prognosefaktor identifiziert werden. Zusätzlich ist es möglich, anhand der mikromorphometrisch bestimmten Tumormast des WLK, innerhalb der nodal metastasierenden Patienten prognostisch heterogene Gruppen zu differenzieren. Anhand der Maximum-Likelihood-Methode konnte demonstriert werden, dass mit zunehmender nodaler Metastasengröße (als stetige Variable berücksichtigt) eine signifikante Verkürzung des rezidivfreien Überlebens verbunden ist (eigene Daten, noch nicht publiziert). Dieser Zusammenhang war insbesondere im Bereich von einem sehr geringen Metastasendurchmesser evident. Mit zunehmender Größe des Metastasendurchmessers (insbesondere ab 4 mm) zeigte sich, dass dieser prognostische Einfluss deutlich an Relevanz verlor. Insgesamt können damit die Ergebnisse von Starz u. Mitarb. zur prognostischen Signifikanz der nodalen Metastasengröße bestätigt werden [39,40]. Sollten sich diese vielversprechenden Ergebnisse in prospektiven Studien mit standardisierten Untersuchungsbedingungen unter Einschluss einer größeren Patientenzahl bestätigen, könnte die mikromorphometrische Quantifizierung des Tumorbefalls im WLK dazu beitragen, zu einer besseren individuellen Prognoseschätzung zu gelangen. Möglicherweise könnte die nodale Tumormasse dann als zusätzlicher Stratifizierungsfaktor für weiterführende Therapieentscheidungen herangezogen werden (z. B. Durchführung von adjuvanten Immuntherapien oder einer radikalen Lymphonodektomie).

Klinische Relevanz von molekularbiologisch nachgewiesenen Tumorzellen

Bei relativ kurzen Nachbeobachtungszeiten von unter 2 Jahren konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass die molekulare Detektion von Melanomzellen eine klinische Relevanz hinsichtlich des Auftretens einer Tumorphorprogression besitzt [6, 8, 24, 38]. Um dies zu demonstrieren, wurde der Status des WLK anhand der Ergebnisse von Histologie und Molekularbiologie in drei Gruppen eingeteilt (Tab. 4). Patienten mit einem histologisch positiven WLK wurden der Gruppe I zugeordnet. Patienten mit histologisch negativem WLK-Status konnten aufgrund des PCR-Befundes in Gruppe II (Histologie negativ, PCR positiv) bzw. Gruppe III (Histologie negativ, PCR negativ) aufgeteilt werden.

Patienten mit histologisch positiven WLK (Gruppe I) wiesen die höchsten Rezidivraten (31–67%) auf. Innerhalb der histopathologisch negativen Patienten konnten durch die PCR zwei Gruppen differenziert werden (II und III), die sich in der Rezidivrate bzw. im rezidivfreien Überleben signifikant unterschieden

($p < 0,05$) [6, 38]. So entwickelten Patienten, die bei negativem histologischen WLK-Ergebnis aufgrund einer positiven PCR der Gruppe II zugeordnet wurden, in 10–25% eine Tumorphorprogression. Demgegenüber zeigten PCR-negative Patienten (Gruppe III) deutlich niedrigere Rezidivraten, welche zwischen 0 und 6% lagen. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass durch die molekulare Analyse des WLK Tumorzellen identifiziert werden können, die biologisch aktiv und damit klinisch relevant sind. Die PCR-Positivität des WLK ist jedoch überraschend hoch und übersteigt damit deutlich die Rate von Patienten, bei denen im weiteren Krankheitsverlauf eine Metastasierung erwartet werden muss. In der Tat, eine Metastasierung wurde bei ungefähr 30% aller Patienten mit primärem Melanom (Tumordicke > 1 mm) beschrieben [9, 14]. Insofern darf nicht erwartet werden, dass bei allen Patienten mit positiven molekularbiologischen Befunden eine Krankheitsprogression eintritt. Was ist die Ursache für die Diskrepanz zwischen der hohen Rate von positiven PCR-Befunden und der „verhältnismäßig“ niedrigen Rate von Patienten, in welchen tatsächlich eine Melanomprogression zu erwarten ist? Ist die extrem hohe Sensitivität der PCR möglicherweise die Ursache für falsch positive molekularbiologische Befunde? Wie bereits ausgeführt, können nodale Nävozyten eine Ursache für „falsch positive“ PCR-Befunde sein. Allerdings kann dieses Phänomen die hohe Rate positiver PCR-Befunde nur bedingt erklären. Auf der anderen Seite werden durch die PCR, Tumorzellen unabhängig von ihrem Metastasierungspotenzial nachgewiesen [2]. Das bedeutet, dass der molekularbiologische Nachweis von tumorspezifischen Markern nicht notwendigerweise eine autonome Tumorzellproliferation indiziert. Insofern darf der alleinige PCR-Nachweis von Tumortranskripten nur als eine notwendige Voraussetzung, keinesfalls jedoch als hinreichende Bedingung für eine nachfolgende Metastasierung betrachtet werden. Dementsprechend kann zum jetzigen Zeitpunkt die klinische Bedeutung des molekularen Stagings nicht abschließend beurteilt werden. Der alleinige molekulare Nachweis melanozytärer Zellen im WLK stellt zum derzeitigen Zeitpunkt keinen validen Parameter dar, um daraus eine Therapieindikation, außerhalb von klinischen Studien zu stellen. Derzeit werden in der Sunbelt-Melanoma-Studie, PCR-Ergebnisse des WLK als Kriterium herangezogen, um nach Randomisierung, Patienten in verschiedene Therapiearme zu integrieren.

Perspektiven

Durch die WLKB steht eine minimal-invasive, diagnostische Methode zur Verfügung, durch welche der regionäre Lymphknotenstatus mit hohem prädiktiven Wert erfasst werden kann [29]. Es

Tab. 4 Rezidivraten in Abhängigkeit vom Status des WLK

Autor, Jahr	Gruppe I Histologie + PCR +	Gruppe II Histologie – PCR +	Gruppe III Histologie – PCR –
Shivers et al. 1998	14/23 (61%)	6/47 (13%)	1/44 (2%)
Bostick et al. 1999b	5/16 (31%)	3/20* (15%)	0/35 (0%)
Li et al. 2000	18/49 (37%)	11/109 (10%)	1/64 (2%)
Blaheta et al. 2000	10/15 (67%)	9/36 (25%)	4/65 (6%)

* Expression von mindestens zwei mRNA Markern.

konnte demonstriert werden, dass der histologische Status des WLK eine herausragende prognostische Bedeutung für Patienten mit primärem kutanen Melanom besitzt. Daneben können, innerhalb der histologisch positiven Patienten, anhand des Tumordurchmessers des WLK prognostisch heterogene Gruppen differenziert werden. Insofern mag dieser prognostische Faktor (Metastasendurchmesser des WLK) zukünftig eine Bedeutung für klinische Entscheidungen erlangen, so z.B. für adjuvante Therapien oder die bisher obligate Durchführung einer radikalen Lymphknotendissektion nach histologisch positivem WLK. Durch die zusätzliche Durchführung von molekularbiologischen Untersuchungen des WLK konnte eine Verbesserung der prognostischen Relevanz (gegenüber der alleinigen histopathologischen Untersuchung) aufgezeigt werden. Zukünftig könnte durch den quantitativen Nachweis von molekularen Tumorzelltranskripten (Real-time-PCR), die prognostische Signifikanz der molekularen Diagnostik möglicherweise verbessert werden. Inwieweit die quantitative Analyse des zuverlässigsten melanozytären Markers, Tyrosinase, aussagekräftig genug ist oder ob durch Berücksichtigung weiterer molekularer Marker zusätzliche prognostische Informationen gewonnen werden können, wird durch zukünftige Studien zu untersuchen sein. Insgesamt erscheint diese Nachweismethode gegenüber der konventionellen PCR sehr vielversprechend, auch wenn klinische Daten zum Melanom zum derzeitigen Zeitpunkt noch ausstehen.

Inwieweit durch die Exstirpation des WLK bzw. bei nodaler Metastasierung durch die radikale Lymphknotendissektion ein Überlebensvorteil für diese Patienten verbunden ist, muss durch prospektive Studien nachgewiesen werden. Diese Frage wird zur Zeit im Rahmen einer großen, prospektiv-randomisierten Studie geprüft (sog. Sunbelt Melanoma Trial).

Literatur

- Albertini JJ, Cruse CW, Rapaport D, Wells K, Ross M, DeConti R, Berman CG, Jared K, Messina J, Lyman G, Glass F, Fenske N, Reintgen DS. Intraoperative radiolymphoscintigraphy improves sentinel lymph node identification for patients with melanoma. *Ann Surg* 1996; 223: 217–224
- Battayani Z, Grob JJ, Xerri L, Noe C, Zarour H, Houvaeneghel G, Delpero JR, Birnbaum D, Hassoun J, Bonerandi JJ. Polymerase chain reaction detection of circulating melanocytes as a prognostic marker in patients with melanoma. *Arch Dermatol* 1995; 131: 443–447
- Bieligk SC, Ghossein R, Bhattacharya S, Coit DG. Detection of tyrosinase mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in melanoma sentinel nodes. *Ann Surg Oncol* 1999; 6: 232–240
- Blaheta HJ, Schitteck B, Breuninger H, Maczey E, Kroeber S, Sotlar K, Ellwanger U, Thelen MH, Rassner G, Bultmann B, Garbe C. Lymph node micrometastases of cutaneous melanoma: Increased sensitivity of molecular diagnosis in comparison to immunohistochemistry. *Int J Cancer* 1998; 79: 318–323
- Blaheta HJ, Schitteck B, Breuninger H, Sotlar K, Ellwanger U, Thelen MH, Maczey E, Rassner G, Bultmann B, Garbe C. Detection of melanoma micrometastasis in sentinel nodes by RT-PCR correlates with tumor thickness and is predictive for micrometastatic disease in the lymph node basin. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 822–828
- Blaheta HJ, Ellwanger U, Schitteck B, Sotlar K, Maczey E, Breuninger H, Thelen MH, Bultmann B, Rassner G, Garbe C. Examination of regional lymph nodes by sentinel node biopsy and molecular analysis provides new staging facilities in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 637–642
- Borgstein PJ, Pijpers R, Comans EF, van-Diest PJ, Boom RP, Meijer S. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: guidelines and pitfalls of lymphoscintigraphy and gamma probe detection. *J Am Coll Surg* 1998; 186: 275–283
- Bostick PJ, Morton DL, Turner RR, Huynh KT, Wang HJ, Elashoff R, Essner R, Hoon DSB. Prognostic significance of occult metastases detected by sentinel lymphadenectomy and reverse transcriptase-polymerase chain reaction in early-stage melanoma patients. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3238–3244
- Buttner P, Garbe C, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos HI, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE et al. Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. *Cancer* 1995; 75: 2499–2506
- Carson KF, Wen DR, Li PX, Lana AMA, Bailly C, Morton DL, Cochran AJ. Nodal nevi and cutaneous melanomas. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 834–840
- Chen YT, Stockert E, Tsang S, Coplan KA, Old LJ. Immunophenotyping of melanomas by tyrosinase: implications for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8125–8129
- Cherpelis BS, Haddad F, Messina J, Cantor AB, Fitzmorris K, Reintgen DS, Fenske NA, Glass LF. Sentinel lymph node micrometastasis and other histologic factors that predict outcome in patients with thicker melanomas. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 762–766
- Ege GN, Nold JB, Eng RR, Durakovic A, Conklin JJ. Effects of a metastatic (13762) and nonmetastatic (R3230AC) mammary adenocarcinoma on radiocolloid localization in regional lymph nodes in Fischer 344 rats. *J Reticuloendothel Soc* 1983; 34: 449–462
- Garbe C, Buttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos HI, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE et al. Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. *Cancer* 1995; 75: 2492–2498
- Gershenwald JE, Thompson W, Mansfield PF, Lee JE, Colome MI, Tseng CH, Lee JJ, Balch CM, Reintgen DS, Ross MI. Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: The prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. *J Clin Oncol* 1999; 17: 976–983
- Glass LF, Messina JL, Cruse W, Wells K, Rapaport D, Miliotes G, Berman C, Reintgen D, Fenske NA. The use of intraoperative radiolymphoscintigraphy for sentinel node biopsy in patients with malignant melanoma. *Dermatol Surg* 1996; 22: 715–720
- Gogel BM, Kuhn JA, Ferry KM, Fisher TL, Preskitt JT, O'Brien JC, Lieberman ZH, Stephens JS, Krag DN. Sentinel lymph node biopsy for melanoma. *Am J Surg* 1998; 176: 544–547
- Harlow SP, Krag DN, Ashikaga T, Weaver DL, Meijer SJ, Loggie BW, Tanabe KK, Whitworth PJ, Kuhn J, Kusminsky R, Carp NZ, Gadd M, Rawlings MJ, Slingluff CLJ. Gamma probe guided biopsy of the sentinel node in malignant melanoma: a multicentre study. *Melanoma Res* 2001; 11: 45–55
- Hatta N, Fujimoto A, Takehara K, Takata M. Mapping of occult melanoma micrometastases in the inguinal lymph node basin by immunohistochemistry and RT-PCR. *Melanoma Res* 1999; 9: 401–406
- Hatta N, Takata M, Takehara K, Ohara K. Polymerase chain reaction and immunohistochemistry frequently detect occult melanoma cells in regional lymph nodes of melanoma patients. *J Clin Pathol* 1998; 51: 597–601
- Jansen L, Koops HS, Nieweg OE, Doting MHE, Kapteijn BAE, Balm AJM, Vermey A, Plukker JT, Hoefnagel CA, Piers DA, Kroon BBR. Sentinel node biopsy for melanoma in the head and neck region. *Head and Neck Journal* 2000; 22: 27–33
- Krag DN, Meijer SJ, Weaver DL, Loggie BW, Harlow SP, Tanabe KK, Laughlin EH, Alex JC. Minimal-access surgery for staging of malignant melanoma. *Arch Surg* 1995; 130: 654–658
- Leong SPL, Steinmetz I, Habib FA, McMillan A, Gans JZ, Allen RE, Morita ET, Elkadi M, Epstein HD, Kashani-Sabet M, Sagebiel RW. Optimal selective sentinel lymph node dissection in primary malignant melanoma. *Arch Surg* 1997; 132: 666–673
- Li W, Stall A, Shivers SC, Lin J, Haddad F, Messina J, Glass LF, Lyman G, Reintgen DS. Clinical relevance of molecular staging for melanoma: comparison of RT-PCR and immunohistochemistry staining in sentinel lymph nodes of patients with melanoma. *Ann Surg* 2000; 231: 795–803
- Li WG, Stall A, Shivers SC, Lin J, Haddad F, Messina J, Glass LF, Lyman G, Reintgen DS. Clinical relevance of molecular staging for melanoma – Comparison of RT-PCR and immunohistochemistry staining in sentinel lymph nodes of patients with melanoma. *Ann Surg* 2000; 231: 795–801

- ²⁶ Lukowsky A, Bellmann B, Ringk A, Winter H, Audring H, Fenske S, Sterry W. Detection of melanoma micrometastases in the sentinel lymph node and in nonsentinel nodes by tyrosinase polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 554–559
- ²⁷ Morton DL, Thompson JF, Essner R, Elashoff R, Stern SL, Nieweg OE, Roses DF, Karakousis CP, Mozzillo N, Reintgen D, Wang HJ, Glass EC, Cochran AJ. Validation of the accuracy of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early-stage melanoma – A multicenter trial. *Ann Surg* 1999; 230: 453–463
- ²⁸ Morton DL, Wen DR, Foshag LJ, Essner R, Cochran A. Intraoperative lymphatic mapping and selective cervical lymphadenectomy for early-stage melanomas of the head and neck. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1751–1756
- ²⁹ Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992; 127: 392–399
- ³⁰ MrazGernhard S, Sagebiel RW, KashaniSabet M, Miller JR, Leong SPL. Prediction of sentinel lymph node micrometastasis by histological features in primary cutaneous malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1998; 134: 983–987
- ³¹ Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction: Comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification. *Am J Pathol* 1996; 148: 649–656
- ³² Orlov SJ, Hearing VJ, Sakai C, Urabe K, Zhou BK, Silvers WK, Mintz B. Changes in expression of putative antigens encoded by pigment genes in mouse melanomas at different stages of malignant progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10152–10156
- ³³ Palmieri G, Ascierto PA, Cossu A, Mozzillo N, Motti ML, Satriano SM, Botti G, Caraco C, Celentano E, Satriano RA, Lissia A, Tanda F, Pirastu M, Castello G. Detection of occult melanoma cells in paraffin-embedded histologically negative sentinel lymph nodes using a reverse transcriptase polymerase chain reaction assay. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1437–1443
- ³⁴ Pijpers R, Collet GJ, Meijer S, Hoekstra OS. The impact of dynamic lymphoscintigraphy and gamma probe guidance on sentinel node biopsy in melanoma. *Eur J Nucl Med* 1995; 22: 1238–1241
- ³⁵ Raj GV, Moreno JG, Gomella LG. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer* 1998; 82: 1419–1442
- ³⁶ Reintgen D, Cruse CW, Wells K, Berman C, Fenske N, Glass F, Schroer K, Heller R, Ross M, Lyman G et al. The orderly progression of melanoma nodal metastases. *Ann Surg* 1994; 220: 759–767
- ³⁷ Schwurzer Voit M, Proebstle TM, Sterry W. Identification of lymph node metastases by use of polymerase chain-reaction (PCR) in melanoma patients. *Eur J Cancer* 1996; 32: 264–268
- ³⁸ Shivers SC, Wang XN, Li WG, Joseph E, Messina J, Glass LF, DeConti R, Cruse CW, Berman C, Fenske NA, Lyman GH, Reintgen DS. Molecular staging of malignant melanoma: Correlation with clinical outcome. *JAMA* 1998; 280: 1410–1415
- ³⁹ Starz H, Bachter D, Balda BR, Gerstel C, Büchels H. Qualitative und quantitative Auswertung der Sentinel-Lymphknoten bei malignen Hauttumoren. *Der Nuklearmediziner* 1999; 22: 253–260
- ⁴⁰ Starz H, Balda BR, Kramer KU, Buchels H, Wang H. A micromorphometry-based concept for routine classification of sentinel lymph node metastases and its clinical relevance for patients with melanoma. *Cancer* 2001; 91: 2110–2121
- ⁴¹ Stadius MM, van Leeuwen PA, de Lange-De Klerk ES, van Diest PJ, Pijpers R, Ferwerda CC, Vuylsteke RJ, Meijer S. The sentinel lymph node status is an important factor for predicting clinical outcome in patients with Stage I or II cutaneous melanoma. *Cancer* 2001; 91: 2401–2408
- ⁴² Thompson JF, McCarthy WH, Bosch CM, O'Brien CJ, Quinn MJ, Paramasvaran S, Crotty K, McCarthy SW, Uren RF, Howman Giles R. Sentinel lymph node status as an indicator of the presence of metastatic melanoma in regional lymph nodes. *Melanoma Res* 1995; 5: 255–260
- ⁴³ Uren RF, Howman GR, Thompson JF, Shaw HM, Quinn MJ, O'Brien CJ, McCarthy WH. Lymphoscintigraphy to identify sentinel lymph nodes in patients with melanoma. *Melanoma Res* 1994; 4: 395–399
- ⁴⁴ Van der Velde Zimmermann D, Roijers JF, Bouwens Rombouts A, De Weger RA, De Graaf PW, Tilanus MG, Van den Tweel JG. Molecular test for the detection of tumor cells in blood and sentinel nodes of melanoma patients. *Am J Pathol* 1996; 149: 759–764
- ⁴⁵ Wang X, Heller R, Van Voorhis N, Cruse CW, Glass F, Fenske N, Berman C, Leo Messina J, Rappaport D, Wells K et al. Detection of submicroscopic lymph node metastases with polymerase chain reaction in patients with malignant melanoma. *Ann Surg* 1994; 220: 768–774
- ⁴⁶ Wrightson WR, Wong SL, Edwards MJ, Chao C, Conrad AJ, Albrecht J, Viar V, McMasters KM. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of nonsentinel nodes following completion lymphadenectomy for melanoma. *J Surg Res* 2001; 98: 47–51