

Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen  
Sektion Dermatologische Onkologie

**Untersuchung prognostischer Einflussfaktoren zum  
Überleben von 1475 Melanompatienten zum Zeitpunkt  
der Wächterlymphknotenentnahme**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Luttermann, Felix**

**2021**

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. T. Eigentler
2. Berichterstatter:	Professorin Dr. E.-M. Grischke
Tag der Disputation:	14.12.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Das maligne Melanom.....	1
1.2. Die Wächterlymphknotenbiopsie .....	4
1.3. Die Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie .....	6
1.4. Prognostische Faktoren .....	7
1.5. Fragestellung .....	12
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.1. Studienaufbau .....	13
2.2. Einschlusskriterien .....	14
2.3. Ausschlusskriterien .....	14
2.4. Endpunkte .....	15
2.5. Datenerhebung .....	16
2.6. Auswertung .....	18
2.6.1. Statistische Methoden .....	18
2.6.2. Geschlechtergerechte Sprache .....	19
2.6.3. Zustimmung der Ethikkommission .....	19
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>20</b>
3.1. Patientenkollektiv .....	20
3.1.1. Geschlecht.....	21
3.1.2. Alter .....	22
3.2. Dauer der Beobachtung .....	22
3.3. Allgemeine Tumoreigenschaften.....	24
3.3.1. Lokalisation der Primärmelanome .....	24
3.3.2. Histologischer Subtyp.....	24
3.3.3. Tumordicke nach Breslow .....	25
3.3.4. Invasionslevel nach Clark .....	25
3.3.5. Histopathologische Merkmale.....	26

3.3.6. AJCC-Stadium .....	26
3.4. Zellen des Differentialblutbilds .....	27
3.5. Histopathologische Regression .....	34
3.6. Wächterlymphknotenstatus .....	38
3.6.1. Die konventionelle SNB .....	40
3.6.2. Die Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie (LDI).....	41
3.6.3. Positive LDI bei negativer konventioneller SNB.....	44
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>48</b>
4.1. Qualität der Daten .....	48
4.2. Prognostischer Einfluss des Differentialblutbildes .....	49
4.3. Prognostischer Einfluss der Regression.....	52
4.4. Prognostischer Einfluss der LDI im Vergleich zur konventionell- pathologischen Aufarbeitung des SN .....	57
4.5. Limitationen dieser Studie .....	60
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>62</b>
<b>6. Veröffentlichungen .....</b>	<b>64</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>65</b>
<b>8. Erklärung zum Eigenanteil.....</b>	<b>76</b>
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>77</b>

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: T-Klassifikation des Primärtumors (AJCC 2009) .....	2
Tab. 2: N-Klassifikation der regionären Lymphknoten (AJCC 2009).....	3
Tab. 3: M-Klassifikation der Fernmetastasen (AJCC 2009) .....	3
Tab. 4: AJCC-Stadieneinteilung des malignen Melanoms (AJCC 2009) .....	4
Tab. 5: Deskriptive Statistik klinisch-pathologischer Hauptmerkmale und Assoziation zum Gesamtüberleben .....	20
Tab. 6: Einfluss des Geschlechts auf das Auftreten von Tod, Fernmetastase und Rückfall.....	21
Tab. 7: Deskriptive Statistik der Altersverteilung .....	22
Tab. 8: Deskriptive Statistik der Endpunkte dieser Studie .....	23
Tab. 9: Deskriptive Statistik der Tumordicke nach Breslow .....	25
Tab. 10: Prävalenz histologischer Besonderheiten.....	26
Tab. 11: Deskriptive Statistik des AJCC-Stadiums .....	27
Tab. 12: Deskriptive Statistik des Differentialblutbildes .....	28
Tab. 13: Univariable Analyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom Differentialblutbild .....	29
Tab. 14: Multivariable Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom ADBC-Score.....	31
Tab. 15: Cofaktoren der histopathologischen Regression .....	34
Tab. 16: Univariable Analyse des Rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Regression .....	35
Tab. 17: Multivariable Regressionsanalyse des Rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Regression.....	37
Tab. 18: Multivariable Regressionsanalyse des Rückfallfreien Überlebens nach T-Stadium in Abhängigkeit von der Regression.....	38
Tab. 19: Deskriptive Statistik der Lymphknoten-Disaggregations- Immunzytologie .....	39

Tab. 20: Univariable Analyse des Rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit vom histopathologischen Lymphknotenstatus .....	41
Tab. 21: Univariable Analyse des Rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit von der DCCD .....	41
Tab. 22: Multivariable Regressionsanalyse des Rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit von der DCCD.....	43
Tab. 23: Deskriptive Statistik der Wächterlymphknotenuntersuchung .....	45
Tab. 24: Univariable Analyse des Rückfallfreien Überlebens aller konventionell-pathologisch negativen SNB in Abhängigkeit von der DCCD .....	45

## **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom ADBC-Score .....	32
Abb. 2: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom RDBC-Score .....	33
Abb. 3: Kaplan-Meier-Analyse des Rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Regression.....	36
Abb. 4: Kaplan-Meier-Analyse des Rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit vom histopathologischen Lymphknotenstatus .....	40
Abb. 5: Kaplan-Meier-Analyse des Rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit von der DCCD .....	42
Abb. 6: Kaplan-Meier-Analyse des Rückfallfreien Überlebens aller konventionell-pathologisch negativen SNB in Abhängigkeit von der DCCD .....	46

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	engl. absolute basophil count, absolute Basophilenzahl
ADBC	engl. absolute differential blood count
AEC	engl. absolute eosinophil count, absolute Eosinophilenzahl
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALC	engl. absolute lymphocyte count, absolute Lymphozytenzahl
ALM	akrolentiginöses Melanom
AMC	engl. absolute monocyte count, absolute Monozytenzahl
ANC	engl. absolute neutrophil count, absolute Neutrophilenzahl
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
bzw.	beziehungsweise
MUP	engl. melanoma of unknown primary, Melanom mit unbekanntem Primarius
DCCD	disseminated cancer cell density
DMFS	engl. distant metastasis free survival, Überleben ohne Fernmetastasen
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HR	Hazard Ratio
LDH	Laktatdehydrogenase
LDI	Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie
LMM	lentigo maligna Melanom
LMR	Lymphozyten-zu-Monozyten-Ratio
MM	malignes Melanom
Mio.	Million (1.000.000)
µl	Mikroliter (1/1.000.000 Liter)
mm	Millimeter (1/1000 Meter)

NA	engl. not available, Daten nicht verfügbar
NLR	Neutrophilen-zu-Lymphozyten-Ratio
NM	noduläres malignes Melanom
OS	engl. overall survival, Gesamtüberleben
OTH	engl. other, andere Melanom-Subtypen
RBC	engl. relative basophil count, relativer Basophilenanteil
RDBC	engl. relative differential blood count
REC	engl. relative eosinophil count, relativer Eosinophilenanteil
RFS	engl. relapse free survival, Rückfallfreies Überleben
RLC	engl. relative lymphocyte count, relativer Lymphozytenanteil
RMC	engl. relative monocyte count, relativer Monozytenanteil
RNC	engl. relative neutrophil count, relativer Neutrophilenanteil
S3	Leitlinie der höchsten Qualitätsstufe (S3) der AWMF
SN	engl. sentinel node, Wächterlymphknoten
SNB	engl. sentinel node biopsy, Wächterlymphknotenbiopsie
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
Tab.	Tabelle
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
UV	ultraviolettes Licht
vs.	versus
WBC	engl. white blood count, Leukozytenzahl
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
95% CI	engl. 95% confidence interval, 95% Konfidenzintervall

# 1. Einleitung

## 1.1. Das maligne Melanom

Der Begriff malignes Melanom (von altgriechisch μέλας „schwarz“) bezeichnet den sogenannten schwarzen Hautkrebs, einen hochgradig bösartigen Tumor der Melanozyten, also der Pigmentzellen der Haut. Durch Entartung der Melanozyten kommt es zur ungehemmten Vermehrung. Nach initial horizontaler Ausbreitung wachsen Melanome in vertikaler Richtung (Breslow 1970, LeBoit et al. 2006). Neben der Haut kann das maligne Melanom auch andere Organe und Gewebe befallen (z.B. Auge, Anus, Schleimhäute und ZNS). Das Melanom ist ein sehr aggressiver Hauttumor, der mit früher Metastasierung und schneller Progression einhergeht, sobald er metastasiert ist (Balch et al. 2009). Hierbei metastasiert der Tumor in 2/3 der Fälle primär lymphogen, weshalb der Lymphknotenstatus, wie bei vielen anderen Malignomen, von hoher prognostischer Bedeutung ist (Garbe und Schaumburg-Lever 1997).

Im Jahre 2016 erkrankten etwa 23.000 Menschen in Deutschland an einem malignen Melanom, wobei die Inzidenz stetig steigt. Das Melanom ist die vierthäufigste maligne Neoplasie der Frau und die fünfhäufigste maligne Neoplasie des Mannes. Das mittlere Erkrankungsalter lag 2016 für Frauen bei 60 Jahren und für Männer bei 68 Jahren. Es sterben mehr Menschen pro Jahr an Melanomen als an allen anderen Hautkrebsarten zusammen. Insgesamt ist das Melanom für 1% der Krebstodesfälle verantwortlich. Die 5-Jahres-Überlebensrate von Melanopatienten lag bei 93% für Frauen und bei 91% für Männer. (Robert-Koch-Institut 2019)

Als Risikofaktoren gelten neben genetischer Prädisposition, eine starke UV-Exposition vor allem in der Kindheit, ein heller Hautton, helle Haarfarbe, eine hohe Anzahl an Nävi, eine Schwächung des Immunsystems, eine Störung von DNA-Reparaturmechanismen (Xeroderma pigmentosum) und eine hohe Anzahl an Sonnenbränden (World Health Organization).

Klinisch-histologisch wird das kutane Melanom in 4 Subtypen unterteilt: Das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das noduläre Melanom (NM), das lentigo

maligna Melanom (LMM) und das akrolentiginöse Melanom (ALM), wobei das SSM mit 57,4% den am häufigsten vorkommenden Subtyp darstellt. Von den kutanen Melanomen unterscheidet man die Gruppe der nicht-klassifizierbaren Melanome, zu denen man die Aderhaut-, Schleimhaut-, Hirnhaut-, und die okkulten Melanome zählt (Garbe und Schaumburg-Lever 1997, LeBoit et al. 2006).

Eine wichtige Methode zur einheitlichen Einteilung von Melanomen ist, wie bei vielen anderen Malignomen auch, die TNM-Klassifikation. Die in dieser Studie betrachteten Patienten wurden nach der AJCC-Klassifikation Version 7 von 2009 eingeteilt (Balch et al. 2009) (Tab. 1-4). Mittlerweile gibt es eine neue AJCC-Klassifikation (Gershenwald et al. 2017), die seit 01.01.2018 von der aktuellen S3-Leitlinie zur Einteilung des malignen Melanoms empfohlen wird. Diese wird allerdings, aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Neuerungen für die Stadien I-II im Vergleich zur Klassifikation von 2009, für die hier observierten Patienten nicht dargestellt (Leitlinienprogramm Onkologie 2020). In dieser Arbeit werden lediglich die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der hier betrachteten Patienten geltenden und angewandten Richtlinien zur TNM-Klassifikation sowie die damals geltende nationale Leitlinie zum malignen Melanom dargestellt und diskutiert (Balch et al. 2009, Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

**Tab. 1: T-Klassifikation des Primärtumors (AJCC 2009)**

<b>T-Klassifikation</b>	<b>Tumordicke</b>	<b>Weitere prognostische Parameter</b>
<b>Tis</b>		Melanoma in situ, keine Tumordinvasion
<b>Tx</b>	Keine Angabe	Stadium nicht bestimmbar *
<b>T1</b>	≤ 1,00 mm	a: ohne Ulzeration, Mitosen <1/mm <sup>2</sup> b: mit Ulzeration oder Mitoserate ≥1/mm <sup>2</sup> **
<b>T2</b>	1,01-2,00 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
<b>T3</b>	2,01-4,00 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
<b>T4</b>	> 4,00 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
* Fehlen einer Bestimmung der Tumordicke und/oder Ulzeration oder unbekannter Primärtumor ** Die Bestimmung der Mitoserate erfolgt am HE-Schnitt vgl. Balch et al. 2009		

**Tab. 2: N-Klassifikation der regionären Lymphknoten (AJCC 2009)**

<b>N-Klassifikation</b>	<b>Zahl metastatisch befallener LK</b>	<b>Ausmaß der LK-Metastasierung</b>
<b>N1</b>	1 LK	a: mikroskopisch nodale Metastase * b: makroskopisch nodale Metastase
<b>N2</b>	2-3 LK	a: mikroskopisch nodale Metastasen * b: makroskopisch nodale Metastasen c: Satellit(en) oder In-transit-Metastase(n) ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>N3</b>	≥ 4 LK oder verbackene Lymphknoten oder Satelliten oder In-transit-Metastasen mit regionärer Lymphknotenbeteiligung	

\* Der Nachweis einer Mikrometastasierung ist auch das Auffinden einer einzelnen Zelle, die immunhistochemisch positiv reagiert. Diese Fälle sollten extra gekennzeichnet werden.  
LK: Lymphknoten  
vgl. Balch et al. 2009

**Tab. 3: M-Klassifikation der Fernmetastasen (AJCC 2009)**

<b>M-Klassifikation</b>	<b>Art der Fernmetastasierung</b>	<b>LDH</b>
<b>M1a</b>	Metastasen in Haut, Subkutis oder Lymphknoten jenseits der regionären Lymphknoten	normal
<b>M1b</b>	Lungenmetastasen	normal
<b>M1c</b>	Fernmetastase(n) anderer Lokalisation oder Fernmetastase(n) jeder Lokalisation mit erhöhten Serumwerten der Laktatdehydrogenase (LDH)	normal erhöht

LDH: Laktatdehydrogenase  
vgl. Balch et al. 2009

Tab. 4: AJCC-Stadieneinteilung des malignen Melanoms (AJCC 2009)

Stadien	Primärtumor (pT)	Regionäre LK-Metastasen (N)	Fernmetastasen (M)
<b>0</b>	in-situ-Tumore	keine	keine
<b>IA</b>	T1a	keine	Keine
<b>IB</b>	T1b T2a	keine keine	keine keine
<b>IIA</b>	T2b T3a	keine keine	keine keine
<b>IIB</b>	T3b T4a	keine keine	keine keine
<b>IIC</b>	T4b	keine	keine
<b>IIIA</b>	T1-4a	N1a, N2a	keine
<b>IIIB</b>	T1-4a T1-4b	N1b, N2b, N2c N1a ,N2a	keine
<b>IIIC</b>	T1-4b jedes T	N1b, N2b, N2c N3	keine
<b>IV</b>	jedes T	jedes N	M1

LK: Lymphknoten  
vgl. Balch et al. 2009

## 1.2. Die Wächterlymphknotenbiopsie

Das maligne Melanom wächst in der frühen Krankheitsphase zunächst horizontal, beginnt jedoch nach einer variablen Zeit sich vertikal auszubreiten. Die Messung der vertikalen Tumordicke hat sich als wichtiger prognostischer Faktor erwiesen und wird jeher als Tumordicke nach Breslow in Millimetern angegeben (Breslow 1970). Ab einer Tumordicke nach Breslow von  $\geq 1,00$  mm, empfiehlt die S3-Leitlinie für das maligne Melanom eine Entnahme des sogenannten Wächterlymphknotens (engl. sentinel node, SN). Bei Vorliegen von Risikofaktoren (Alter  $< 40$  Jahre, Ulzeration vorhanden, erhöhte Mitoserate) wird eine Wächterlymphknotenentnahme bereits ab einer Tumordicke von 0,75 mm empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie 2013, Eigentler et al. 2017).

Als Wächterlymphknoten wird jener Lymphknoten bezeichnet, der als erster das Lymphabflussgebiet des Tumors drainiert (Morton et al. 1992). Die Markierung des SN erfolgt heutzutage in zwei Schritten. Zuerst werden mittels einer präoperativen Lymphabflussszintigraphie  $^{99m}\text{Tc}$ -markierte Nanokolloide um den Primärtumor bzw. dessen Exzisionsnarbe injiziert. Im zweiten Schritt wird der Tumor bzw. dessen Exzisionsnarbe unmittelbar präoperativ mit Patent-Blau oder Isosulfan-Blau umspritzt. Sowohl das radioaktiv markierte Nanokolloid als auch das Patent- bzw. Isosulfan-Blau gelangen nun über die Lymphbahnen in den ersten Lymphknoten, der das Hautgebiet des Primärmelanoms drainiert. Dort lagern sie sich an und markieren somit den gesuchten Wächterlymphknoten farblich bzw. radioaktiv. Intraoperativ kann dieser nun visuell und mittels einer Gamma-Sonde identifiziert werden. So konnte in Studien in bis zu 99,1% der Fälle der SN richtig erkannt werden (Morton et al. 1999).

Nachdem der Wächterlymphknoten identifiziert und entnommen wurde, folgt die histopathologische Untersuchung des Knotens auf Hinweise für eine Metastase des Primärtumors. Hierzu wird der Lymphknoten formalin-fixiert, mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefärbt und mikroskopiert. Zusätzlich werden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt, da sich zeigte, dass bei alleiniger HE-Färbung nicht selten eine Lymphknotenbeteiligung übersehen wird, zumal isolierte Tumorzellen und Mikrometastasen mit dieser Methode kaum detektierbar sind (Messina et al. 1999, Baisden et al. 2000). Die immunhistochemischen Färbungen umfassen Antikörper gegen S100 und gp100 (HMB-45). Hiermit gelingt es, auch kleinere Tumorzellverbände oder sogar einzelne Tumorzellen anzufärben bzw. darzustellen.

Die HMB-45-Färbung benutzt Antikörper, um prämelanosomale Proteine (gp100) anzufärben. Diese können jedoch in Melanom-Zellen fehlen, wodurch die HMB-45-Färbung wenig sensitiv ist. Ihre Spezifität für das maligne Melanom ist allerdings sehr hoch (Ulmer et al. 2014).

Das S100-Protein ist in unterschiedlichen Zellen des Körpers nachweisbar. Neben den Melanozyten findet man es auch in Zellen des Nervensystems (hauptsächlich in Glia- und Schwannzellen), Knorpelzellen, dendritischen Zellen der

Lymphknoten und in den Langerhans-Zellen der Epidermis. Dadurch ist die Spezifität der Färbung eingeschränkt (Cochran et al. 1984, Kleine et al. 2003). Ihre Sensitivität ist jedoch höher als die der HMB-45-Färbung (Messina et al. 1999, Zubovits et al. 2004).

In der Universitätsklinik Tübingen wird jeder entnommene SN sowohl klassisch mittels HE-Färbung, als auch immunhistochemisch per S100- und HMB-45-Färbung untersucht. Weist der untersuchte SN in einer der Untersuchungen Hinweise auf eine Metastase des malignen Melanoms auf, erfolgte bis zu den Anpassungen der Leitlinien an die negativen Ergebnisse der prospektiven MSLT-II und der DeCOG-SLT Studien 2016/2017 anschließend eine therapeutische Lymphknotendisektion der drainierenden Lymphknotenregion (Leiter et al. 2016, Faries et al. 2017). Boten sowohl die HE-Färbung als auch die immunhistochemischen Untersuchungen keinen Anhalt für eine Melanom-Metastase, wurde auf eine komplettierende radikale Lymphknotendisektion verzichtet.

### 1.3. Die Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie

Die Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie (LDI) ist ein innovatives immunzytologisches Verfahren zur Detektion einzelner Melanom-Zellen in Wächterlymphknoten von Melanompatienten, welches in Tübingen entwickelt wurde. Hierbei wird der unfixierte SN in 1 mm große Stücke geschnitten, mechanisch von einem rotierenden Messer disaggregiert, in vielen Einzelschritten präpariert und mittels Neubauer Zählkammer gezählt (Ulmer et al. 2014). Schließlich werden je 1.000.000 Zellen mit Antikörpern gegen gp100 (HMB45) und Melan A angefärbt (Ulmer et al. 2005). Nach Auszählung der gp100- bzw. Melan A positiven, also angefärbten Zellen, wird das Ergebnis in Form der ‚disseminated cancer cell density‘ (DCCD) angegeben. Die DCCD gibt die Anzahl der gp100-positiven Zellen pro eine Million Lymphknotenzellen an (Ulmer et al. 2014).

Dieses Verfahren wird in der Universitäts-Hautklinik Tübingen seit 2008 nach Möglichkeit bei jedem SN, zusätzlich zur konventionellen histopathologischen Aufarbeitung, durchgeführt. Der entnommene SN wird längs in der Mitte geteilt.

Eine Hälfte wird konventionell mikroskopisch (HE-, S100-, HMB-45-Färbungen), die andere Hälfte disaggregiert und immunzytologisch mit der LDI untersucht. Sollte der SN für eine Längsteilung zu klein oder nicht eindeutig von anderem lymphatischem Gewebe differenzierbar sein, wird das gesamte lymphatische Material an die Histopathologie gesendet. Während der Untersuchung des SN werden die jeweiligen Untersucher nicht über das Ergebnis der jeweils anderen Untersuchungsmethode informiert, um einen diagnostischen Bias zu vermeiden (Ulmer et al. 2005). Ulmer et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass eine DCCD > 0/Mio. mit einem erhöhten Sterberisiko einhergeht und dass die DCCD ein stärkerer Prädiktor für das melanom-spezifische Überleben ist als der konventionelle histopathologische Lymphknotenstatus (Ulmer et al. 2005).

## 1.4. Prognostische Faktoren

Das American Joint Committee on Cancer (AJCC) untersuchte 2009 insgesamt 30.946 Patienten mit Melanomen der Stadien I,II und III und 7972 Patienten mit Stadium IV, um die bekannten klinischen prognostischen Faktoren als Grundlage für die TNM-Klassifikation zu verifizieren und andere Faktoren auf ihre prognostische Aussagekraft zu untersuchen (Balch et al. 2009). Die gewonnenen Erkenntnisse führten zu einer Neuordnung der TNM-Klassifikation des malignen Melanoms. Diese Klassifikation war die Basis für die nationale S3-Leitlinie (Leitlinienprogramm Onkologie 2013) nach deren Maßgabe diese Kohorte behandelt wurden.

Neben den klassischen prognostischen Faktoren wie vertikale Tumordicke nach Breslow, Lymphknotenstatus und Fernmetastasierung wurden auch andere, weniger offensichtliche, Risikofaktoren in der AJCC-Klassifikation berücksichtigt. So flossen im Stadium T1 die Mitoserate und in die Stadien T1-4 das Vorhandensein einer Ulzeration mit in das Grading ein. Im Stadium III spielt neben der Metastasierung des angrenzenden Lymphsystems auch die Ausbildung von Satelliten- und In-Transit-Metastasen eine Rolle. Im Stadium IV wurde neben den von der

Fernmetastasierung betroffenen Organen die Höhe der Laktatdehydrogenase (LDH) als relevanter prognostischer Faktor berücksichtigt (Balch et al. 2009).

Der wichtigste prognostische Faktor war und ist jedoch die Tumordicke nach Breslow. Diese bezeichnet die vertikale Ausbreitung des Primärtumors und wird am histopathologischen Resektat bestimmt. Ihre prognostische Relevanz rührt daher, dass Melanome in ihrer horizontalen Wachstumsphase nur selten zur Metastasierung neigen. Sobald sie jedoch in das vertikale Wachstum eintreten, nimmt die Gefahr einer Metastasierung mit zunehmender Dicke zu (Breslow 1970, Breslow et al. 1995). Die vertikale Tumordicke nach Breslow ist definiert als der Abstand zwischen Stratum granulosum und den tiefsten ins Gewebe infiltrierenden Zellen, und wird in Millimetern angegeben. Die AJCC-Klassifikation von 2009 teilt die Tumordicke nach Breslow in 4 Gruppen ein (Tab. 1). Die 10-Jahres-Überlebensrate liegt bei Melanomen mit einer Tumordicke unter einem Millimeter bei 95%, bei solchen mit einer Tumordicke über vier Millimeter sinkt diese auf 50% (Balch et al. 2009).

Neben der Tumordicke werden noch weitere histologische Merkmale des Primärtumors zur Bewertung der Prognose herangezogen. Hierzu gehört die Neigung des Tumors zu ulzerieren. Das Vorhandensein einer Ulzeration, also eines Gewebedefekts der Epidermis, welche Teile des Primärtumors bedeckt, wird mikroskopisch von Dermatohistopathologen am Tumorsektat überprüft. Man hat festgestellt, dass Primärtumoren, die ulzeriert sind, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in den Wächterlymphknoten metastasieren (McMasters et al. 2001, Karakousis et al. 2006, Testori et al. 2009, Kunte et al. 2010, Yonick et al. 2011). Das Vorhandensein einer Ulzeration des Primärtumors ist also ein wichtiger Prognosefaktor für die Metastasierung und damit für das Überleben der Patienten (Balch et al. 2001, Balch et al. 2009, Amin et al. 2017, Gershenwald et al. 2017).

Außerdem hat auch das Invasionslevel nach Clark prognostische Bedeutung, insbesondere bei dünnen Melanomen (Balch et al. 2001). Clark unterteilt die Invasion in fünf Level, wobei sich die vertikale Invasion des Melanoms mit zunehmendem Level erhöht, bevor es in Level V nach Clark bis in die Subkutis reicht. Im Level IV liegt eine Invasion des Stratum reticulare vor, die Subkutis ist jedoch

noch nicht betroffen (Clark et al. 1969). In den Empfehlungen der AJCC von 2009 fand das Clark-Level jedoch kaum noch Anwendung. Stattdessen wurde im Normalfall die Mitoserate bestimmt, um dünne Melanome zu unterteilen. Nur wenn die Bestimmung der Mitoserate uneindeutig war, wurde das Clark-Level herangezogen, um Melanome des Stadiums T1b zu definieren (Balch et al. 2009).

Bei Melanomen <1 mm Tumordicke wurde die Mitoserate als histopathologischer Faktor herangezogen, um sie zu unterteilen. Sie hat Einfluss auf das Ergebnis der Wächterlymphknotenbiopsie und damit auf die Prognose (Azzola et al. 2003, Kesmodel et al. 2005). Die Mitoserate wird in der Einheit 1/mm<sup>2</sup> angegeben und bezeichnet die Anzahl mikroskopisch detektierbarer Mitosen pro Quadratmillimeter Tumorsektat. Ab einer Mitoserate von  $\geq 1/\text{mm}^2$  erfolgte in der TNM-Klassifikation von 2009 eine Hochstufung dünner Melanome von T1a auf T1b (Balch et al. 2009). In der neuesten AJCC-Klassifikation von 2017 findet die Mitoserate zur TNM-Klassifikation von malignen Melanomen keine Berücksichtigung mehr (Gershenwald et al. 2017).

Bei Melanomen des Stadiums IV wird der Serumspiegel der Laktatdehydrogenase (LDH) herangezogen, um die Stadien der Fernmetastasierung des Melanoms genauer zu definieren. So wird ein metastasiertes Melanom, unabhängig von der Lokalisation der Metastasierung, automatisch als M1c klassifiziert, sobald die LDH erhöht ist (Tab. 3). Die Laktatdehydrogenase ist ein Enzym, welches einen Schritt der Glykolyse, also der Energiegewinnung der Zellen, katalysiert und somit in jeder Zelle des menschlichen Körpers vorkommt. Ihre Bedeutung als Tumormarker erlangt die LDH dadurch, dass sie bei übermäßigem Zellssterben, zum Beispiel durch Hämolyse, aber eben auch durch eine Tumorerkrankung, im peripheren Blut messbar ansteigt. In der groß angelegten AJCC-Studie von 2009 konnte gezeigt werden, dass Patienten mit M-Stadium M1a bzw. M1b, also Patienten mit metastasiertem Melanom, jedoch ohne LDH-Erhöhung, ein Ein-Jahres-Überleben von 62% (M1a) beziehungsweise 53% (M1b) hatten. Solche mit M-Stadium M1c, also mit Fernmetastasen an soliden Organen oder mit LDH-Erhöhung, hatten jedoch nur ein Ein-Jahres-Überleben von 33% (Balch et al. 2009). Das AJCC schließt daraus, dass eine LDH-Erhöhung einen

zusätzlichen Risikofaktor für Patienten mit einem Stadium IV Melanom darstellt (Balch et al. 2009, Gershenwald et al. 2017).

Bisher keine Berücksichtigung in der TNM-Klassifikation des malignen Melanoms findet die Regression des Primärmelanoms. Auch diese lässt sich durch Dermatohistopathologen in der Untersuchung des Tumorresektates feststellen. Ihre Erhebung im Rahmen der histopathologischen Untersuchung des Primärmelanoms wird seit einiger Zeit empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie 2013, Eigentler et al. 2017, Leitlinienprogramm Onkologie 2020). Als Regression bezeichnet man die entzündliche Immunantwort des Körpers auf das Melanom, wobei der Tumor mit einem lymphozytenreichen Infiltrat durchsetzt wird. Aus dieser lymphozytären Entzündung resultiert eine Regressionszone, bestehend aus Fibrose, einem verstrichenen Reteleistenrelief sowie Melanophagen. In dieser Regressionszone wird der Tumor in kleine Stücke isoliert und von den Abwehrzellen attackiert (Guitart et al. 2002, Kaur et al. 2008, Burton et al. 2011, Leitlinienprogramm Onkologie 2020). Es existieren widersprüchliche Forschungsergebnisse zum Einfluss der Regression auf die Prognose von Melanompatienten (Mandala et al. 2009, Burton et al. 2011, Ribero et al. 2013, Ribero et al. 2019). Einige Autoren berichten von einer Assoziation zwischen dem Vorliegen einer Regression und negativem Lymphknotenstatus (Kaur et al. 2008, Morris et al. 2008, Ribero et al. 2015 und 2016).

Ein weiterer häufig in der histopathologischen Untersuchung erhobener Faktor von Melanomen, der jedoch bisher ebenfalls keine Beachtung in der TNM-Klassifikation findet, ist die Nävusassoziation. Diese gibt an, ob ein Melanom auf dem Boden eines melanozytären Nävus entstanden ist oder ob es sich ‚de novo‘ auf regulärer Haut entwickelt hat. Das Vorhandensein einer Nävusassoziation lässt sich, je nach Studie, in ganz unterschiedlicher Häufigkeit feststellen (4-72%) und ihr prognostischer Wert ist umstritten (Rhodes et al. 1983, Stolz et al. 1989, Skender-Kalnenas et al. 1995, Massi et al. 1999, Kaddu et al. 2002, Bevona et al. 2002, Haenssle et al. 2016). Ihre Erhebung wird ebenfalls seit einiger Zeit von den geltenden nationalen Leitlinien empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie 2013, Eigentler et al. 2017, Leitlinienprogramm Onkologie 2020).

Auch das Differentialblutbild findet keine Beachtung in der TNM-Klassifikation von 2009 (Balch et al. 2009), obwohl bekannt ist, dass inflammatorische Prozesse die Genese, Metastasierung und Progression solider Tumoren beeinflussen können (Coussens und Werb 2002, Hanahan und Weinberg 2011, Gabrilovich et al. 2012, Diakos et al. 2014). Auch beim malignen Melanom konnte ein Zusammenhang zwischen der Prognose von Melanompatienten und der Höhe bestimmter Differentialblutbild-Parameter nachgewiesen werden. So scheinen hohe neutrophile Granulozyten und eine hohe Neutrophilen-zu-Lymphozyten-Ratio (NLR) mit einer Tumorprogression unter Immuntherapie bei AJCC-Stadium IV Patienten assoziiert zu sein (Schmidt et al. 2005 und 2007, Cananzi et al. 2014, Rochet et al. 2015). Außerdem gibt es zunehmende Evidenz, dass periphere Blutzellen Einfluss auf die Wirksamkeit von Immuncheckpoint-Inhibitoren und damit auf die Prognose von Melanompatienten in fortgeschrittenen Tumorstadien haben (Gebhardt et al. 2014, Larkin et al. 2015, Ferrucci et al. 2016, Weide et al. 2016, Martens et al. 2016).

## 1.5. Fragestellung

Das maligne Melanom ist in Deutschland mit rund 23.000 Neuerkrankungen pro Jahr die dritthäufigste maligne Neoplasie der Haut und die Inzidenz nimmt stetig zu. Außerdem sterben mehr Menschen pro Jahr an Melanomen als an allen anderen Hautkrebsarten zusammen (Robert-Koch-Institut 2019). Deshalb ist es umso wichtiger die prognostischen Faktoren zu erkennen und zu verstehen. So kann das Melanom im Einzelfall richtig eingeschätzt werden, um Patienten mit reduzierter Prognose frühzeitig identifizieren und anschließend geeignet therapieren zu können.

Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit 1475 Patienten retrospektiv untersucht, die in den Jahren 2010 bis 2015 im Zentrum für Dermatatoonkologie der Universitäts-Hautklinik Tübingen eine SNB aufgrund eines Melanoms erhielten oder dafür geplant waren. Der weitere Krankheitsverlauf wurde bis Juli 2018 beobachtet.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung klinischer, hämatologischer und histopathologischer Faktoren des malignen Melanoms im Hinblick auf ihre prognostische Bedeutung.

Insgesamt wurde hierbei der Fokus auf folgende Fragestellungen gelegt:

- Hat das Differentialblutbild Einfluss auf die Prognose einer Melanom-Erkrankung und falls ja, welche Laborwerte sind dabei von besonderer prognostischer Bedeutung?
- Hat das Vorhandensein einer histopathologischen Regression im Primär-melanom prognostische Aussagekraft und mit welchen anderen Faktoren hängt diese zusammen?
- Stellt die Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie in der Diagnostik eine sinnvolle Ergänzung zur traditionellen histopathologischen Untersuchung des Wächterlymphknotens dar?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Studienaufbau

Bei dieser Studie handelt es sich um eine monozentrische, retrospektive Kohortenstudie, welche am Zentrum für Dermatatoonkologie (ZDO) des Universitätsklinikums Tübingen (UKT) durchgeführt wurde. Die der Studie zugrunde liegenden Daten wurden durch retrospektive Auswertung der digitalen Patientenakten erhoben.

Die Rekrutierung des Patientenkollektivs erfolgte zunächst durch systematische Sichtung der digitalen Operationspläne der Dermatologie des UKT aller im Zeitraum von 2010 bis 2015 operierten Patienten. Hierdurch konnten alle Patienten ermittelt werden, bei denen im Zeitraum von 01. Januar 2010 bis 31. Dezember 2015 in der Dermatologie des UKT eine Exstirpation des Wächterlymphknoten (SNB) nach Diagnosestellung eines Melanoms durchgeführt wurde. Hierbei wurden die Kriterien der deutschen S3-Leitlinie Version 1.0 zur Behandlung des malignen Melanoms bezüglich der Entnahme des Wächterlymphknotens zugrunde gelegt (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Außerdem wurde der weitere Krankheitsverlauf (Follow Up) der Patienten bis 12. Juli 2018 anhand der elektronischen Krankenakten erfasst und ausgewertet, da die meisten Patienten, gemäß der deutschen Leitlinie zur Behandlung des malignen Melanoms, regelmäßig in Tübingen zur Nachsorge erschienen oder die Ergebnisse der externen Nachsorge nach Tübingen übermittelt wurden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Im für diese Studie relevanten Zeitraum wurde, falls möglich, bei jedem Patienten, dem erfolgreich ein SN entnommen werden konnte, der SN geteilt und eine Hälfte zusätzlich zur konventionellen pathologischen Untersuchung per LDI auf Melanom-Zellen untersucht.

Patienten mit einem histopathologisch negativen Ergebnis der Wächterlymphknotenbiopsie wurden, analog zur Vorgehensweise der Universitätsklinik Tübingen, klassisch als frei von Lymphknotenmetastasen (N0) gewertet und behandelt, unabhängig vom Ergebnis der LDI.

## 2.2. Einschlusskriterien

Das Patientenkollektiv bestand aus 1475 Patienten, die in der Universitäts-Hautklinik Tübingen zwischen 2010 und 2015 aufgrund eines kürzlich diagnostizierten Melanoms eine Wächterlymphknotenentnahme erhielten. Als Grundlage für die Graduierung und Behandlung der Patienten wurden die damals geltende Klassifikation des AJCC von 2009 (Balch et al. 2009) sowie die geltende nationale Leitlinie für das maligne Melanom (Leitlinienprogramm Onkologie 2013) verwendet. Nach Identifizierung der SNB-Patienten wurden mit Hilfe der digitalen Patientenakten die Daten genau dieser Patienten eingesehen und erfasst.

Es wurden auch Patienten miterfasst, deren Primärtumor laut Leitlinien eigentlich zu dünn für eine SNB war, bei denen auf persönlichen Wunsch, oder spezifische Empfehlung, trotzdem eine Entnahme durchgeführt wurde.

## 2.3. Ausschlusskriterien

Um zumindest ein kurzes Follow Up zu ermöglichen, wurden Patienten nur erfasst, wenn mindestens eine dokumentierte Nachsorge-Untersuchung vorlag. Patienten, die nie zu einer Nachsorge-Untersuchung erschienen sind wurden ausgeschlossen.

Es wurden nur Patienten berücksichtigt, deren Wächterlymphknoten aufgrund eines primären Melanoms entnommen wurde. Patienten, bei denen die SNB aufgrund einer lokalen Rückkehr eines früheren bekannten Melanoms oder aufgrund eines Hauttumors anderer Entität durchgeführt wurde, wurden aus der Datenanalyse ausgeschlossen.

Zur multivariablen Cox-Regressionsanalyse der einzelnen Risikofaktoren des malignen Melanoms wurden jeweils nur diejenigen Patienten in die Analyse eingeschlossen, bei denen Daten zu den jeweiligen Risikofaktoren vorlagen. Lagen zu den untersuchten Faktoren keine Daten vor, wurden die Patienten von der jeweiligen Analyse ausgeschlossen.

## 2.4. Endpunkte

Allgemein wurde das Follow Up der Patienten ab dem Datum der SNB bis zum letzten Patientenkontakt erhoben. Zusätzlich wurde der Eintritt der Endpunkte „Tod, erster Rückfall und erstes Auftreten einer Fernmetastasierung“ und deren zeitlicher Abstand zur SNB erhoben.

Die hier angeführten Überlebenszeitanalysen beziehen sich entweder auf das Rückfallfreie Überleben (engl. relapse-free survival, RFS) oder das Gesamtüberleben (engl. overall survival, OS). Zusätzlich wurde das Fernmetastasen-freie Überleben (engl. distant metastasis free survival, DMFS) erhoben, jedoch wurden die Fernmetastasen bereits im RFS miteingefasst, sodass das DMFS aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht zur Auswertung von Überlebenszeitanalysen herangezogen wurde.

Als Gesamtüberleben wird in dieser Studie die Zeit seit der SNB bis zum Tode bezeichnet.

Als RFS wird hier das Überleben nach der SNB bis zum Zeitpunkt eines Rückfalls bezeichnet. Als Rückfall wurden sowohl eine Rückkehr des Primarius, lokale Metastasen, In-Transit-Metastasen, als auch Fern- oder Lymphknotenmetastasen gewertet. Als Datum des Rückfalls wurde das exakte Datum der zweifelsfreien Diagnose eines Rückfalls gewertet.

Als Fernmetastase wurden Metastasen in anderen Organen und Metastasen der Haut gewertet, die sich an einer anderen Extremität jenseits der lokoregionären Lymphknotenstation befanden. Als Datum wurde das Datum der zweifelsfreien Diagnose der ersten Fernmetastase gewertet.

Im Vergleich zum OS (147 Todesfälle) war die Anzahl an statistischen Events, die für das RFS maßgeblich waren deutlich grösser (329 Rückfälle). Außerdem korrelierte zumindest bis in die 2010er Jahre das RFS bei malignen Melanomen stark mit dem Gesamtüberleben. Deshalb wird es hier für die Auswertung der histopathologischen Regression und der Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie (LDI) als Surrogatmarker für die Prognose bzw. das Überleben der

Patienten betrachtet (Suciu et al. 2018). Lediglich die Auswertung des Differentialblutbildes und die deskriptive Statistik allgemeiner Tumor- und Patientenparameter (Tab. 5) erfolgte, analog zur Publikation dieser Daten von Wagner et al. 2020, nach dem Gesamtüberleben.

## 2.5. Datenerhebung

Die Daten der 1475 Patienten wurden mittels Microsoft Excel pseudonymisiert tabellarisch eingetragen, wobei jedem Datensatz eine fortlaufende ID-Nummer zugeteilt wurde.

Es wurden folgende klinische und epidemiologische Parameter erhoben:

- Patientengeschlecht
- Patientenalter
- Datum der SNB
- Ergebnis der konventionell-pathologischen Untersuchung des SN
- Höhe der DCCD
- Ergebnis einer möglicherweise durchgeführten Lymphadenektomie
- Ergebnis einer Behandlung mit Interferon oder anderen Adjuvantien
- Lokalisation des Primärmelanoms

Des Weiteren wurden alle zur Verfügung stehenden histologischen Daten zum Primarius erhoben:

- AJCC-Stadium
- Tumordicke nach Breslow
- Clark-Level
- Ulzerationsstatus
- Vorhandensein einer Regression
- Vorhandensein einer Nävusassoziation.

Außerdem wurde die Höhe verschiedener Laborparameter inklusive des Tumormarkers S100B, der LDH und der Zellen des Differentialblutbildes erhoben.

Bezüglich des Differentialblutbildes wurden sowohl die absolute Gesamtzahl der Leukozyten (WBC) in 1000/ $\mu$ l, als auch der relative Anteil der einzelnen Differentialblutbildparameter an der Gesamtzahl in Prozent erfasst. Die absoluten Zahlen der einzelnen Leukozyten-Anteile waren ebenfalls in der Patientenakte ersichtlich. Diese wurden jedoch nicht erfasst, sondern aus den erfassten relativen Blutbildwerten errechnet, um Übertragungsfehler zu vermeiden. Dies geschah, indem der relative Wert mit dem WBC multipliziert und durch 100 geteilt wurde (absoluter Wert = relativer Wert in Prozent x WBC /100). Außerdem wurden Verhältnisse der absoluten Anteile der Leukozyten gebildet: Die Neutrophilen-zu-Lymphozyten-Ratio (NLR) als Verhältnis der absolutem Neutrophilen-Zahl zur absoluten Lymphozyten-Zahl sowie die Lymphozyten-zu-Monozyten-Ratio (LMR) als Verhältnis der absoluten Lymphozyten-Zahl zur absoluten Monozyten-Zahl. Die erfassten Laborwerte basierten jeweils auf der am ersten postoperativen Tag nach der lokalen Exzision des Primärmelanoms durchgeführten Blutentnahme. Die Zellen des Differentialblutbildes wurden lediglich bei vollständig vorhandenen Werten für alle Zellanteile erfasst.

Bezüglich der Lokalisation des Primärmelanoms wurden vier verschiedene Lokalisationen unterschieden: Der Körperstamm, die Extremitäten, Kopf und Nacken, sowie das Gesicht. Hierbei wurden Melanome, die peripher der Schultern beziehungsweise Leisten auftraten als den Extremitäten zugehörig gewertet. Als dem Kopf zugehörig wurden alle Melanome der behaarten Kopfhaut gewertet. Als dem Gesicht zugehörig gewertet wurden alle Melanome die zwischen der Stirn, den Ohren, den Kieferwinkeln und der Prominentia laryngea lagen.

Als Endpunkte wurden der Tod sowie jeweils das erste Auftreten eines Lokalrezidivs oder einer Fernmetastasierung und deren jeweiliger zeitlicher Abstand zur SNB erhoben. Zusätzlich wurde das Datum des letzten Patientenkontakts und dessen zeitlicher Abstand zur SNB, also das Follow Up, erhoben.

## 2.6. Auswertung

### 2.6.1. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der kommandozeilenbasierten Statistiksoftware R, Version 3.5.1. (R Core Team, 2018). Zusätzlich wurden die Pakete ‚survival‘, ‚maxstat‘ und ‚survminer‘ zur Erstellung der Überlebenszeitanalysen eingebunden.

Für die univariablen Überlebenszeitanalysen wurde die Kaplan-Meier-Methode mit dem zweiseitigen Log-rank-Test, sowie zur Erstellung der Abbildungen das ‚ggplot‘-Paket verwendet. Die Abbildungen wurden im vektorbasierten WMF-Format gespeichert, um eine verlustfreie Darstellungsqualität zu ermöglichen. Zur multivariablen Analyse von Differentialblutbild, Regression und LDI in Bezug auf das Rückfallfreie bzw. Gesamtüberleben wurde eine Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Zur Berechnung von p-Werten, Hazard Ratio (HR) und 95%-Konfidenzintervall (95% CI) wurde ebenfalls die Cox-Regressionsanalyse herangezogen. Cut-Off-Werte wurden mittels der Funktion ‚maxstat.test‘ errechnet, welche über eine Minimierung des p-Wertes einen idealen Cut-Off-Wert identifiziert. Anhand der errechneten Schwellenwerte wurden die ehemals kontinuierlichen Variablen in zwei Zustände dichotomisiert. In der gesamten Arbeit wurden ausschließlich zweiseitige statistische Tests benutzt und p-Werte  $<0,05$  als signifikant gewertet.

Wird für einen bestimmten Parameter „NA“ (engl. not available) angegeben, bedeutet das, dass der gewünschte Parameter bei diesen Patienten nicht in der Patientenakte ersichtlich war.

Die hier angeführten Überlebenszeitanalysen beziehen sich entweder auf das Rückfallfreie Überleben (RFS) oder das Gesamtüberleben (OS).

In die Cox-Regressionsanalysen wurden jeweils nur diejenigen Patienten mit einbezogen, bei denen für den oder die untersuchten Parameter ein Wert vorhanden war. Somit wurden jene Patienten, bei denen für einen der untersuchten

Parameter ein fehlender Wert angegeben war, aus den Regressionsanalysen ausgeschlossen.

Der Datensatz, die Dissertation und alle in Ihr enthaltenen Tabellen wurden mittels Microsoft Office 365 Version 18.2005.1191.0 erstellt.

## 2.6.2. Geschlechtergerechte Sprache

In der Dissertation wird zur Vereinfachung die gewohnte männliche Sprachform verwendet, wobei selbstverständlich keine Benachteiligung des weiblichen beziehungsweise diversen Geschlechts impliziert werden soll, sondern die gewählte Sprachform im Sinne der sprachlichen Vereinfachung als geschlechtsneutral zu verstehen ist.

## 2.6.3. Zustimmung der Ethikkommission

Diese Arbeit stimmt mit den Bestimmungen der Helsinki-Deklaration vom 1975 und all ihren bisherigen Änderungen überein. Außerdem hat die zuständige Ethikkommission der Universität Tübingen die Durchführung dieser retrospektiven Studie genehmigt (Referenz-Nummer 286/2018B02).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Patientenkollektiv

Tab. 5: Deskriptive Statistik klinisch-pathologischer Hauptmerkmale und Assoziation zum Gesamtüberleben

	n	%	Gesamtüberleben	
			Hazard-Ratio (95% CI)	p-Wert
<b>Alter [Jahren]</b>				
≤ 50	385	26,1	1	
51-60	270	18,3	1,30 (0,72-2,34)	0,39
61-70	339	23,0	1,63 (0,95-2,77)	0,074
> 70	481	32,6	2,96 (1,84-4,74)	<0,0001
<b>Geschlecht</b>				
weiblich	672	45,6	1	
männlich	803	54,4	1,62 (1,15-2,28)	0,0054
<b>Tumordicke [mm]</b>				
≤ 1,00	177	12,0	1	
1,01-2	666	45,2	1,90 (0,58-6,29)	0,29
2,01-4	404	27,4	8,45 (2,65-26,91)	0,00031
> 4,00	225	15,3	15,08 (4,71-48,23)	<0,0001
NA	3	0,2	20,25 (2,10-194,80)	0,0092
<b>Ulzeration</b>				
nein	995	67,5	1	
ja	448	30,4	3,82 (2,74-5,33)	<0,0001
NA	32	2,2	1,43 (0,35-5,86)	0,62
<b>Clark-Level</b>				
I-III	148	10,0	1	
IV	1074	72,8	4,15 (1,32-13,09)	0,015
V	68	4,6	16,1 (4,80-53,98)	<0,0001
NA	185	12,5	5,71 (1,71-19,06)	0,0047
<b>Subtyp</b>				
SSM	727	49,3	1	
NM	413	28,0	1,86 (1,27-2,71)	0,0014
LMM	85	5,8	1,23 (0,59-2,60)	0,58
ALM	88	6,0	2,71 (1,55-4,75)	0,00048
OTH	103	7,0	1,15 (0,57-2,34)	0,69
Fehlend	59	4,0	1,58 (0,72-3,47)	0,26
<b>Lokalisation</b>				
Extremitäten	652	44,2	1	
Körperstamm	580	39,3	1,64 (1,14-2,36)	0,0082
Kopf und Nacken	154	10,4	1,34 (0,77-2,33)	0,30
Gesicht	89	6,0	1,52 (0,79-2,93)	0,21
<b>Lymphknotenstatus</b>				
negativ	1244	84,3	1	
positiv	167	11,3	3,90 (2,71-5,62)	<0,0001
NA	64	4,3	2,58 (1,41-4,71)	0,0020

mm: Millimeter, NA: engl. not available, Daten nicht verfügbar, SSM: superfiziell spreitendes Melanom, NM: noduläres Melanom, LMM: lentigo maligna Melanom, ALM: akrolentiginöses Melanom, OTH: andere Subtypen  
vgl. Wagner et al. 2020

Insgesamt wurden 1475 Datensätze analysiert, die im Zeitraum von 01. Januar 2010 bis 31. Dezember 2015 in Tübingen, aufgrund eines Stadium I-II Melanoms, eine SNB erhalten haben. Hiervon waren 54,4% männlichen Geschlechts und 45,6% weiblichen Geschlechts (Tab. 5). Das mediane Erkrankungsalter lag bei 63 Jahren (Altersspanne: 5 bis 92 Jahre, Tab. 7)).

### 3.1.1. Geschlecht

Von den 1475 Patienten waren 803 männlich und 672 weiblich, es wurden also mit 54,4% etwas mehr Männer als Frauen erfasst. In Bezug auf die Letalität der untersuchten Patienten, zeigte sich, dass männliche Patienten mit einer Letalitätsrate von 6,5% über den beobachteten Zeitraum, häufiger verstarben als weibliche Patienten mit etwa 3,5%. Auch in der Häufigkeit des Auftretens von lokalen Rückfällen und Fernmetastasen waren Männer prozentual häufiger betroffen. Außerdem liegt das mediane Erkrankungsalter bei Männern mit 65 Jahren höher als bei Frauen mit 61 Jahren. (Tab. 6)

Des Weiteren zeigte sich, dass die Melanome von Männern im Mittel eine höhere Tumordicke aufwiesen, als die der Frauen (2,67 mm vs. 2,47 mm).

**Tab. 6: Einfluss des Geschlechts auf das Auftreten von Tod, Fernmetastase und Rückfall**

	<b>Gesamt (%)</b>	<b>Männlich (%)</b>	<b>Weiblich (%)</b>
<b>Gesamt</b>	1475 (100%)	803 (54,4%)	672 (45,6%)
<b>Gestorben</b>	147 (10,0%)	96 (6,5%)	51 (3,5%)
<b>Fernmetastase</b>	229 (15,5%)	144 (9,8%)	85 (5,8%)
<b>Rückfall</b>	329 (22,3%)	197 (13,4%)	132 (8,9%)

### 3.1.2. Alter

Das mediane Alter der Patienten betrug 63 Jahre, wobei der jüngste Patient zum Zeitpunkt der SNB 5 Jahre und der älteste 92 Jahre alt war (Tab. 7). Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Patienten, in Bezug auf das Alter in 4 Gruppen eingeteilt ( $\leq 50$  Jahre, 51-60 Jahre, 61-70 Jahre,  $>70$  Jahre), wobei mit  $n=481$  (32,6%) die größte Anzahl an Patienten zum Zeitpunkt der SNB über 70 Jahre alt war (Tab. 5).

**Tab. 7: Deskriptive Statistik der Altersverteilung**

	<b>MW</b>	<b>SEM</b>	<b>Min.</b>	<b>25%</b>	<b>Median</b>	<b>75%</b>	<b>Max.</b>
<b>Alter [Jahre]</b>	60,9	0,4	5	50	63	73	92

MW: Mittelwert, SEM: standard error of the mean, Min.: Minimum, Max.: Maximum

### 3.2. Dauer der Beobachtung

Insgesamt wurden Patienten erfasst, die zwischen Anfang 2010 und Ende 2015 eine SNB an der Dermatologie des Universitätsklinikums Tübingen erhalten haben. Ihr Krankheitsverlauf wurde bis zum Stichdatum 12. Juli 2018 nachbeobachtet. Dieser Krankheitsverlauf, also die Zeit zwischen SNB und dem letzten dokumentierten Patientenkontakt wird im Folgenden als „Follow Up“ bezeichnet.

Das mediane Follow Up betrug 40 Monate, also 3 Jahre und 4 Monate. Mit 26,1% ( $n=385$ ) konnte bei den meisten Patienten ein Zeitraum zwischen 2-3 Jahren nach SNB beobachtet werden. (Tab. 8)

Insgesamt sind über den Beobachtungszeitraum 147 (10%) Patienten verstorben. Hierbei lag das mediane Überleben bei knapp 27 Monaten (2 Jahre und 3 Monate). Die minimale Zeit bis zum Tode betrug dabei knapp über einen Monat und die maximale Zeit 87,5 Monate. (Tab. 8)

Über den gesamten Beobachtungszeitraum erlitten 329 Patienten (22,3%) einen Rückfall. Im Mittel betrug die Zeit bis zu einem Rückfall etwas mehr als 15 Monate. (Tab. 8)

Tab. 8: Deskriptive Statistik der Endpunkte dieser Studie

	n (%)	MW	SEM	Min.	25%	Median	75%	Max.
<b>Follow Up [Monate]</b>								
0-12	102 (6,9)							
13-24	97 (6,6)							
25-36	385 (26,1)							
37-48	259 (17,6)	45,4	0,6	0	30,9	40,0	62,0	98,3
49-60	210 (14,2)							
61-72	187 (12,7)							
73-84	168 (11,4)							
85-96	60 (4,1)							
97-108	7 (0,5)							
<b>Gesamtüberleben [Monate]</b>								
0-12	25 (1,7)							
13-24	39 (2,6)							
25-36	35 (2,4)							
37-48	22 (1,5)	29,9	1,5	1,2	14,6	26,9	41,3	87,5
49-60	17 (1,2)							
61-72	4 (0,3)							
73-84	3 (0,3)							
85-96	2 (0,1)							
97-108	0 (0,0)							
<b>Nicht gestorben</b>	1328 (90,0)							
<b>Rückfallfreies Überleben [Monate]</b>								
0-12	132 (8,9)							
13-24	85 (5,8)							
25-36	60 (4,1)							
37-48	24 (1,6)	20,2	0,9	0,5	7,8	15,4	27,8	85,0
49-60	19 (1,3)							
61-72	7 (0,5)							
73-84	1 (0,1)							
85-96	1 (0,1)							
97-108	0 (0,0)							
<b>Kein Rückfall</b>	1146 (77,7)							
MW: Mittelwert, SEM: standard error of the mean, Min.: Minimum, Max.: Maximum								

Bei 229 Patienten (16%) wurde über den Beobachtungszeitraum eine Fernmetastase diagnostiziert. Im Median dauerte es über 20 Monate bis Fernmetastasen auftraten.

### 3.3. Allgemeine Tumoreigenschaften

#### 3.3.1. Lokalisation der Primärmelanome

Auch die Lokalisation des Primärmelanoms wurde in dieser Studie erhoben. Es wurden 4 verschiedene Lokalisationen unterschieden: Der Körperstamm, die Extremitäten, Kopf und Nacken, sowie das Gesicht. Die häufigste Lokalisation des primären Melanoms waren mit 44,2% die Extremitäten, gefolgt von Körperstamm (39,3%) und Kopf und Nacken (10,4%). Am seltensten traten Melanome im Gesicht auf (6,0%). (Tab. 5)

#### 3.3.2. Histologischer Subtyp

Unterschieden wurden die fünf häufigsten histologischen Subtypen des malignen Melanoms: superfiziell spreitendes Melanom (SSM), noduläres Melanom (NM), akrolentiginöses Melanom (ALM), lentigo maligna Melanom (LMM) und andere histologische Subtypen (OTH). Der histologische Subtyp der Melanome, bei denen die Histologie keine oder keine klare Aussage über die Zugehörigkeit des Primarius zu einer dieser Gruppen machen konnte, wurde als fehlend gewertet. Das superfiziell spreitende Melanom trat mit n=727 (49,3%) am häufigsten auf. Die restlichen histologischen Subtypen traten mit folgender Häufigkeit auf: NM n=413 (28%), ALM n=88 (6,0%), LMM n=84 (5,7%). 103 primäre Melanome (7%) wurden anderen Subtypen (OTH), wie beispielsweise dem naevoiden oder spitzoiden Melanom, zugeordnet. Bei 59 Melanomen (4,0%) konnte kein Subtyp eruiert werden. (Tab. 5)

### 3.3.3. Tumordicke nach Breslow

Die Tumordicke nach Breslow ist definiert als die maximale vertikale Ausbreitung eines Primärmelanoms in Millimetern und wird im Rahmen des histologischen Befundes erhoben. Das T-Stadium innerhalb der TNM-Klassifikation wird maßgeblich durch die Tumordicke nach Breslow definiert. In der Datenauswertung wurde die Tumordicke nach Breslow entsprechend der TNM-Klassifikation in 4 Untergruppen eingeteilt:  $\leq 1,00$  mm; 1,01–2,00 mm; 2,01–4,00 mm und  $>4,00$  mm. Mit 45,2% (n=666) konnte ein Großteil der Patienten der Gruppe von 1,01–2,00 mm zugeordnet werden. Die mediane Tumordicke nach Breslow für alle 1475 Patienten betrug 1,8 mm, die minimale 0,26 mm und die maximale erfasste Tumordicke nach Breslow betrug 30 mm (Tab. 9). Bei drei Patienten (0,2%) konnte keine genaue Angabe zur Tumordicke ermittelt werden (Tab. 5).

Tab. 9: Deskriptive Statistik der Tumordicke nach Breslow

	<b>MW</b>	<b>SEM</b>	<b>Min.</b>	<b>25%</b>	<b>Median</b>	<b>75%</b>	<b>Max.</b>
<b>Tumordicke [mm]</b>	2,57	0,06	0,26	1,20	1,80	3,10	30,00
MW: Mittelwert, SEM: standard error of the mean, Min.: Minimum, Max.: Maximum							

### 3.3.4. Invasionslevel nach Clark

Das Invasionslevel nach Clark beschreibt die vertikale Ausdehnung des Melanoms und teilt diese nach dem Maß der kutanen Infiltration in fünf Level (I-V) ein. In dieser Studie wiesen mit 72,8% (n=1074) ein Großteil der Melanome das Clark-Level IV auf. Level III wurde 148 mal (10,0%) und Level V, also eine Infiltration der Subkutis, wurde bei 68 Patienten (4,6%) festgestellt. Ein Clark-Level I oder II wies keines der hier untersuchten Melanome auf. Bei 185 Patienten (12,5%) konnte das Clark-Level nicht bestimmt werden. (Tab. 5)

### 3.3.5. Histopathologische Merkmale

Wie bereits in der Einleitung beschrieben weisen Melanome unter Umständen histopathologische Besonderheiten auf, die ebenfalls Einfluss auf die Prognose der Patienten haben können. Der Einfluss einer Ulzeration des Primärmelanoms als prognostischer Faktor ist gut belegt und wird sogar zur AJCC-Stadieneinteilung genutzt. Bezüglich histologischer Auffälligkeiten in der Untersuchung der Primärmelanome wurde in dieser Studie bei 448 Melanomen (30,4%) eine Ulzeration, bei 219 (14,8%) eine Regression und bei 181 Melanomen (12,3%) eine Nävusassoziation festgestellt (Tab. 10).

Tab. 10: Prävalenz histologischer Besonderheiten

	n	%
<b>Ulzeration</b>		
Nein	995	67,5
Ja	448	30,4
NA	32	2,2
<b>Regression</b>		
Nein	902	61,2
Ja	219	14,8
NA	354	24,0
<b>Nävusassoziation</b>		
Nein	872	59,1
Ja	181	12,3
NA	422	28,6

NA: engl. not available, Daten nicht verfügbar

Der Einfluss der histopathologische Regression auf die Prognose des Melanoms wird in dieser Arbeit gesondert untersucht (siehe Kapitel 3.5.).

### 3.3.6. AJCC-Stadium

Insgesamt wurden von den 1475 Patienten nach der SNB 678 (46,0%) dem AJCC-Stadium I, 611 (41,4%) dem Stadium II, und 186 (12,6%) dem Stadium III zugeordnet. Das bedeutet, dass kurz nach der Erstdiagnose, bereits bei 12,6%

der erfassten Melanompatienten Tumorzellen in den angrenzenden Lymphknoten nachgewiesen werden konnten, sprich Lymphknotenmetastasen vorlagen. Auf der anderen Seite konnte bei dem größten Teil der Patienten (46,0%) das Melanom bereits im Stadium I entdeckt werden. Die Verteilung dieser Kohorte auf Stadium I und II erwies sich als ausgeglichen. (Tab. 11)

**Tab. 11: Deskriptive Statistik des AJCC-Stadiums**

	n	%
<b>AJCC-Stadium</b>		
<b>I A</b>	66	4,5
<b>I B</b>	612	41,5
<b>II A</b>	310	21,0
<b>II B</b>	207	14,0
<b>II C</b>	94	6,4
<b>III A</b>	70	4,7
<b>III B</b>	92	6,2
<b>III C</b>	24	1,6

AJCC: American Joint Committee on Cancer

### 3.4. Zellen des Differentialblutbilds

Patienten, die in Tübingen aufgrund eines primären Melanoms behandelt werden, wird in der Regel am ersten postoperativen Morgen nach der lokalen Tumorexzision Blut entnommen, um die wichtigsten Parameter der Blutchemie, das Differentialblutbild, sowie den Tumormarker S100B zu bestimmen. Das Differentialblutbild umfasst unter anderem den Hämoglobinwert, die Gesamtleukozytenzahl (WBC), sowie den relativen Anteil der jeweiligen Granulozyten (neutrophile (RNC), eosinophile (REC), basophile (RBC), Lymphozyten (RLC) und Monozyten (RMC)) an der Gesamtleukozytenzahl in Prozent. Die absoluten Zahlen der Granulozyten waren ebenfalls in der Patientenakte ersichtlich, wurden in dieser Arbeit jedoch zur Vermeidung von Übertragungsfehlern aus den relativen Anteilen errechnet. Zusätzlich wurde die NLR (Neutrophile-zu-Lymphozyten-Ratio) als Quotient aus absoluter Neutrophilen- zu Lymphozytenzahl und die LMR (Lymphozyten-zu-Monozyten-Ratio) als Quotient aus absoluter Lymphozyten- zu

Monozytenzahl gebildet und ausgewertet. 1412 der 1475 Patienten (95,7%) hatten ein, in der digitalen Krankenakte vollständig dokumentiertes Differentialblutbild. Die Verteilung und deskriptive Statistik des Differentialblutbildes ist in Tabelle 12 dargestellt.

**Tab. 12: Deskriptive Statistik des Differentialblutbildes**

	<b>MW</b>	<b>SEM</b>	<b>Min.</b>	<b>25%</b>	<b>Median</b>	<b>75%</b>	<b>Max.</b>
<b>WBC [/<math>\mu</math>l]</b>	7568	0,10	2680	6128	7175	8512	129.210
<b>ANC [/<math>\mu</math>l]</b>	4850	0,04	450	3777	4620	5710	12.990
<b>ALC [/<math>\mu</math>l]</b>	1953	0,09	320	1360	1710	2120	121.460
<b>AMC [/<math>\mu</math>l]</b>	599	0,006	90	450	560	710	3620
<b>AEC [/<math>\mu</math>l]</b>	136	0,003	0,0	60	110	170	2190
<b>ABC [/<math>\mu</math>l]</b>	36	0,0007	0,0	20	30	50	520
<b>NLR</b>	3,04	0,05	0,0	2,0	2,7	3,6	26,6
<b>LMR</b>	3,56	0,16	0,3	2,3	3,1	4,0	218,3
<b>Hb [g/dl]</b>	14,4	0,035	8,1	13,5	14,4	15,3	19,0

WBC: Leukozytenzahl, ANC: Neutrophilenzahl, ALC: Lymphozytenzahl, AMC: Monozytenzahl, AEC: Eosinophilenzahl, ABC: Basophilenzahl, NLR: Neutrophile-zu-Lymphozyten-Ratio, LMR: Lymphozyten-zu-Monozyten-Ratio, Hb: Hämoglobin-Wert, MW: Mittelwert, SEM: standard error of the mean, Min.: Minimum, Max.: Maximum

Zur Analyse der Zellen des Differentialblutbildes wurden zunächst für jeden erhobenen Differentialblutbild-Wert Cut-Offs basierend auf einer Methode der p-Wert-Minimierung berechnet. Anschließend wurden jeweils die Werte oberhalb (>) und unterhalb ( $\leq$ ) dieser Cut-Offs auf ihren Einfluss auf das Gesamtüberleben überprüft.

Tab. 13: Univariable Analyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom Differentialblutbild

	n (%)	Gesamtüberleben	
		Hazard-Ratio (95% CI)	p-Wert
<b>WBC</b>			
≤ 7400/μl	767 (54,3)	1	
> 7400/μl	645 (45,7)	1,72 (1,23-2,41)	0,0015
<b>RNC</b>			
≤ 69,7%	1028 (72,8)	1	
> 69,7%	384 (27,2)	2,12 (1,52-2,96)	<0,0001
<b>ANC</b>			
≤ 5800/μl	1087 (77,0)	1	
> 5800/μl	325 (23,0)	2,00 (1,42-2,81)	<0,0001
<b>RLC</b>			
> 17,5 %	1172 (83,0)	1	
≤ 17,5 %	240 (17,0)	2,44 (1,71-3,50)	<0,0001
<b>ALC</b>			
> 1220/μl	1184 (83,9)	1	
≤ 1220/μl	228 (16,1)	1,80 (1,23-2,65)	0,0028
<b>RMC</b>			
≤ 6,6 %	381 (27,0)	1	
> 6,6 %	1031 (73,0)	1,59 (1,05-2,41)	0,028
<b>AMC</b>			
≤ 810/μl	1216 (86,1)	1	
> 810/μl	196 (13,9)	1,85 (1,24-2,76)	0,0025
<b>REC</b>			
> 2,7 %	270 (19,1)	1	
≤ 2,7 %	1142 (80,9)	2,33 (1,32-4,13)	0,0036
<b>AEC</b>			
> 200/μl	278 (19,7)	1	
≤ 200/μl	1134 (80,3)	2,19 (1,26-3,80)	0,0055
<b>RBC</b>			
> 0,6 %	312 (22,1)	1	
≤ 0,6%	1100 (77,9)	2,00 (1,20-3,32)	0,0075
<b>ABC</b>			
> 40/μl	357 (25,3)	1	
≤ 40/μl	1055 (74,7)	0,85 (0,59-1,24)	0,40
<b>NLR</b>			
≤ 4,26	1200 (85,0)	1	
> 4,26	212 (15,0)	1,20 (1,12-1,28)	<0,0001
<b>ADBC-Score</b>		1,88 (1,54-2,30)	<0,0001
<b>RDBC-Score</b>		2,26 (1,75-2,92)	<0,0001

WBC: Leukozytenzahl, ANC: Neutrophilenzahl, ALC: Lymphozytenzahl, AMC: Monozytenzahl, AEC: Eosinophilenzahl, ABC: Basophilenzahl, RNC: Relativer Neutrophilenanteil, RLC: Relativer Lymphozytenanteil, RMC: Relativer Monozytenanteil, REC: Relativer Eosinophilenanteil, RBC: Relativer Basophilenanteil, NLR: Neutrophile-zu-Lymphozyten-Ratio, ADBC: absolute differential blood count, RDBC: relative differential blood count

In der univariablen Analyse des Gesamtüberlebens in Bezug auf die relativen und absoluten Differentialblutbild-Werte stellte sich heraus, dass ein ANC

>5800/ $\mu$ l (p-Wert <0,0001), ein ALC  $\leq$ 1220/ $\mu$ l (p-Wert 0,0028), ein AMC >810/ $\mu$ l (p-Wert 0,0025), und ein AEC  $\leq$ 200/ $\mu$ l (p-Wert 0,0055), sowie ein RNC >69,7% (p-Wert <0,0001), ein RLC  $\leq$ 17,5% (p-Wert <0,0001), ein RMC >6,6% (p-Wert 0,028), ein REC  $\leq$ 2,7% (p-Wert 0,0036) und ein RBC  $\leq$ 0,6% (p-Wert 0,0075) jeweils signifikante Risikofaktoren für ein verkürztes Gesamtüberleben darstellten (Tab. 13).

Anschließend wurde für die absoluten und die relativen Zellzahlen jeweils ein kombinierter Score berechnet, der als ADBC- (engl. absolute differential blood count) bzw. RDBC-Score (engl. relative differential blood count) bezeichnet wurde. In die Scores wurden die oben genannten signifikanten Einzelwerte inkludiert, also ANC, ALC, AMC und AEC (ADBC-Score) bzw. RNC, RLC, RMC, REC und RBC (RDBC-Score). Für jeden vorhandenen Risikofaktor, also zum Beispiel RNC >69,7%, wird ein Punkt addiert. Beim ADBC-Score lag die mögliche Spannweite der erreichbaren Werte folglich bei 0-4, beim RDBC-Score bei 0-5.

Auch eine Neutrophile-zu-Lymphozyten-Ratio von über 4,26 stellte sich univariabel als signifikanter Risikofaktor für ein verkürztes Gesamtüberleben der Patienten heraus (Tab. 13: p-Wert <0,0001; HR 1,20 (1,12-1,28)).

Die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen des ADBC- und RDBC-Scores (Abb. 1 und 2) zeigen, dass ein klarer Zusammenhang zwischen der Höhe bestimmter Differentialblutbild-Parameter und dem Gesamtüberleben von Stadium I-III Melanompatienten besteht. So sank das Gesamtüberleben der Patienten zunehmend durch Hinzukommen weiterer hämatologischer Risikofaktoren (univariable Analyse (Tab. 13): ADBC-Score: p-Wert <0,0001, HR 1,88 (1,54-2,30) und RDBC-Score: p-Wert <0,0001, HR 2,26 (1,75-2,92)).

Dies zeigt sich auch bei Betrachtung der 5-Jahres-Überlebensraten. So lebten von den Patienten mit einem ADBC-Score=0 nach 5 Jahren noch 95,3% (95% CI: 91,1%-99,7%), von denen mit ADBC-Score=1 noch 89,2% (86,4%-92,1%) und von denen mit ADBC-Score=2 noch 84,3% (79,8%-89,2%). Bei einem ADBC-Score von 3-4 sank die 5-Jahres-Überlebensrate sogar auf 68,3% (58,4%-79,8%). Bei den 5-Jahres-Überlebensraten nach RDBC-Score ist der Zusammenhang zwischen Differentialblutbild und Überleben der Patienten ebenfalls

klar zu erkennen. So lebten nach 5 Jahren noch 100% der Patienten mit einem RDBC-Score=0, 91,8% (88,9%-94,9%) mit einem Score von 1-2, 85,7% (82,5%-89,0%) mit einem Score von 3-4 und nur noch 68,9% (59,4%-79,9%) mit allen fünf errechneten Risikofaktoren bezüglich des relativen Differentialblutbildes.

Die multivariable Analyse wurde analog zur bereits erfolgten Publikation dieser Daten von Wagner et al. 2020 per Cox-Regressionsanalyse für das Gesamtüberleben in Bezug auf den ADBC-Score durchgeführt.

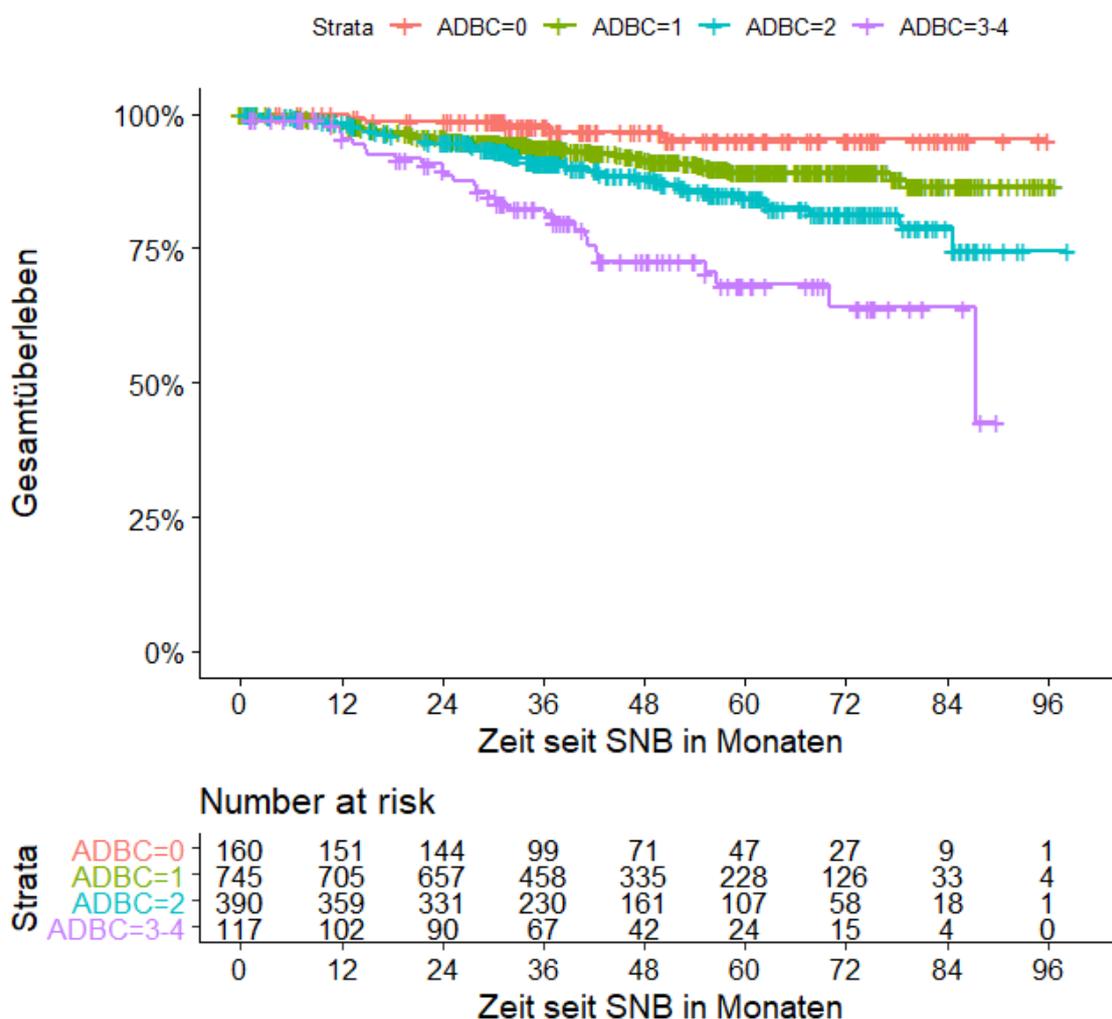
**Tab. 14: Multivariable Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom ADBC-Score**

	n (%)	Gesamtüberleben	
		Hazard Ratio (95% CI)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>			
weiblich	595 (45,1)	1	
männlich	723 (54,9)	1,20 (0,81-1,76)	0,36
<b>Alter*</b>		1,03 (1,01-1,04)	0,0002
<b>Breslow Tumordicke*</b>		1,11 (1,07-1,16)	<0,0001
<b>Ulzeration</b>			
Nein	906 (68,7)	1	<0,0001
Ja	412 (31,3)	2,50 (1,71-3,65)	
<b>Lymphknotenstatus</b>			
negativ	1161 (88,1)	1	<0,0001
positiv	157 (11,9)	3,50 (2,34-5,21)	
<b>ADBC-Score</b>			
0 Risikofaktoren	152 (11,5)	1	
1 Risikofaktor	697 (52,9)	2,13 (0,85-5,37)	0,11
2 Risikofaktoren	562 (27,5)	2,82 (1,11-7,16)	0,029
3-4 Risikofaktoren	107 (8,1)	7,10 (2,69-18,77)	<0,0001
94 Patientendaten ausgeschlossen, bei denen mindestens einer der ausgewerteten Faktoren nicht angegeben war. *Auswertung als kontinuierliche Variablen. ADBC: absolute differential blood count vgl. Wagner et al. 2020			

In der multivariablen Analyse (Tab. 14) wird ersichtlich, dass neben den bekannten Risikofaktoren zunehmendes Alter (p-Wert 0,0002; HR 1,03 (1,01-1,04)), zunehmende Breslow Tumordicke (p-Wert <0,0001; HR 1,11 (1,07-1,16)), Vorhandensein einer Ulzeration (p-Wert <0,0001; HR 2,50 (1,71-3,65)) und positive pathologische Lymphknotenuntersuchung (p-Wert <0,0001; HR 3,50 (2,34-5,21)) auch ein ADBC-Score >1 signifikant mit einem verkürzten Gesamtüberleben der 1475 Patienten korrelierte (2 Risikofaktoren: p-Wert 0,029; HR 2,82 (1,11-7,16))

und 3-4 Risikofaktoren: p-Wert <0,0001; HR 7,10 (2,69-18,77)). Bei Vorhandensein lediglich eines Risikofaktors ließ sich keine unabhängige Signifikanz bezüglich des Gesamtüberlebens nachweisen (p-Wert 0,11; HR 2,13 (0,85-5,37)). (Tab.14)

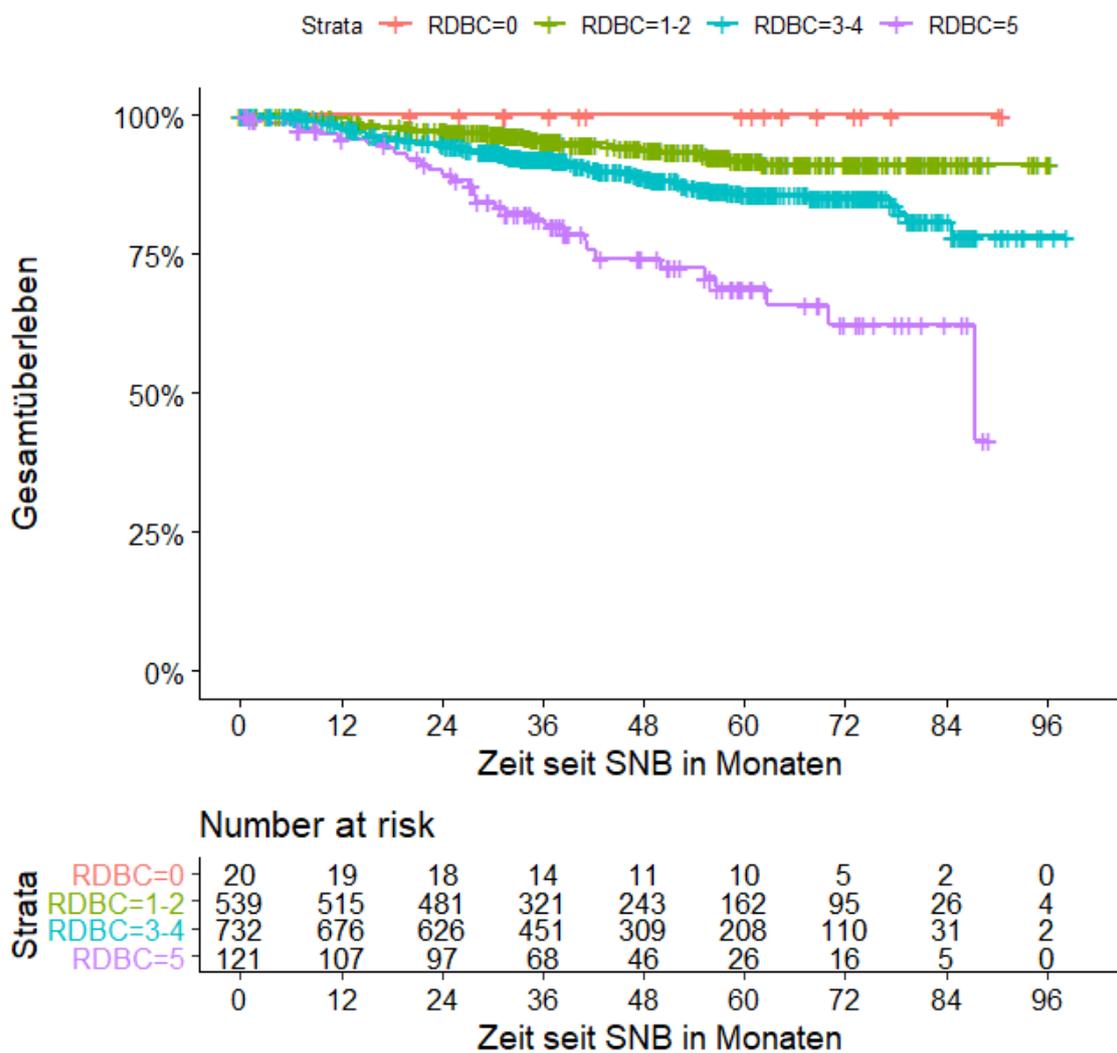
Es bestand also ein deutlich signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben der 1475 Stadium I-III Melanompatienten dieser Studie und den relativen und absoluten Werten des Differentialblutbilds, wobei sich hohe Neutrophile und Monozyten sowie niedrige Lymphozyten, Eosinophile und Basophile univariat als ungünstige prognostische Faktoren identifizieren ließen.



Legende: SNB: sentinel node biopsy, ADBC: absolute differential blood count score

Abb. 1: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom ADBC-Score

Fasst man diese einzelnen Blutwerte in Scores zusammen, die mit jedem vorhandenen Risikofaktor steigen, zeigte sich in der multivariablen Cox-Regressionsanalyse (Tab. 14) sogar, dass der ADBC-Score, auch unabhängig von den anerkannten histopathologischen und allgemeinen Risikofaktoren, einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten hatte und somit einen signifikanten Prädiktor für den Tod von Melanompatienten im Stadium I-III darstellte.



Legende: SNB: sentinel node biopsy, RDBC: relative differential blood count score

Abb. 2: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom RDBC-Score

### 3.5. Histopathologische Regression

Besondere Beachtung sollte in dieser Studie dem Verhalten und der Prognose von regressiven Melanomen zukommen. Dazu wurde zunächst überprüft, welche Cofaktoren mit dem Auftreten einer Regression assoziiert waren (Tab. 15).

Tab. 15: Cofaktoren der histopathologischen Regression

	Regression n(%)		p-Wert
	Nicht Vorhanden	Vorhanden	
<b>Geschlecht</b>			
weiblich	435 (48,2)	77 (35,2)	0,00066
männlich	467 (51,8)	142 (64,8)	
<b>Alter [Jahren]</b>			
≤40	102 (11,3)	8 (3,7)	0,047
41-50	144 (16,0)	31 (14,2)	
51-60	167 (18,5)	42 (19,2)	
61-70	188 (20,8)	61 (27,9)	
>70	301 (33,4)	77 (35,2)	
<b>Subtyp</b>			
SSM	436 (48,3)	179 (81,7)	<0,0001
Kein SSM	466 (51,7)	40 (18,3)	
<b>Axiale Lokalisation</b>			
Nein	418 (46,3)	66 (30,1)	<0,0001
Ja	484 (53,7)	153 (69,9)	
<b>Tumordicke [mm]</b>			
≤1,00	99 (11,0)	40 (18,3)	<0,0001
1,01-2,00	393 (43,6)	128 (58,4)	
2,01-4,00	270 (29,9)	40 (18,3)	
>4,00	140 (15,5)	11 (5,0)	
<b>Clark-Level</b>			
I	0 (0,0)	0 (0,0)	0,053
II	0 (0,0)	0 (0,0)	
III	85 (10,5)	26 (12,4)	
IV	680 (83,6)	179 (85,6)	
V	48 (5,9)	4 (1,9)	
<b>Ulzeration</b>			
Nein	613 (68,2)	168 (77,4)	0,0099
Ja	286 (31,8)	49 (22,6)	
<b>Nävusassoziation</b>			
Nein	716 (87,2)	142 (74,0)	<0,0001
Ja	105 (12,8)	50 (26,0)	
<b>Lymphknotenstatus</b>			
negativ	753 (87,6)	194 (92,8)	0,043
positiv	107 (12,4)	15 (7,2)	

SSM: superfiziell spreitendes Melanom, mm: Millimeter

Als solche Cofaktoren konnten männliches Geschlecht (64,8% der Patienten mit Regression sind männlich vs. 51,8% der Patienten ohne Regression, p-Wert 0,00066), niedriges Alter (p-Wert 0,047), Melanome vom superfiziell spreitenden Typ (81,7% vs. 48,3%, p-Wert <0,0001), eine axiale Lokalisation (69,9% vs. 53,7%, p-Wert <0,0001), eine niedrige Tumordicke nach Breslow (p-Wert <0,0001), das Fehlen einer Ulzeration (77,4% vs. 68,2%, p-Wert 0,0099) sowie das Vorliegen einer Nävusassoziation (26,0% vs. 12,8%, p-Wert <0,0001) identifiziert werden. Als axiale Lokalisation wurde hier das Vorliegen eines Melanoms an Körperstamm, Kopf und Nacken oder Gesicht definiert. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass bei Patienten mit regressiven Melanomen seltener eine Lymphknotenmetastasierung vorlag, als bei Patienten deren Melanome keine Zeichen der Regression aufwiesen (7,2% vs. 12,4%, p-Wert 0,043). (Tab. 15)

Für die Analyse des prognostischen Einflusses der histopathologischen Regression wurden lediglich die Patienten berücksichtigt, bei denen ein histopathologischer Befund inklusive Angabe des Regressionsstatus vorlag (n=1121).

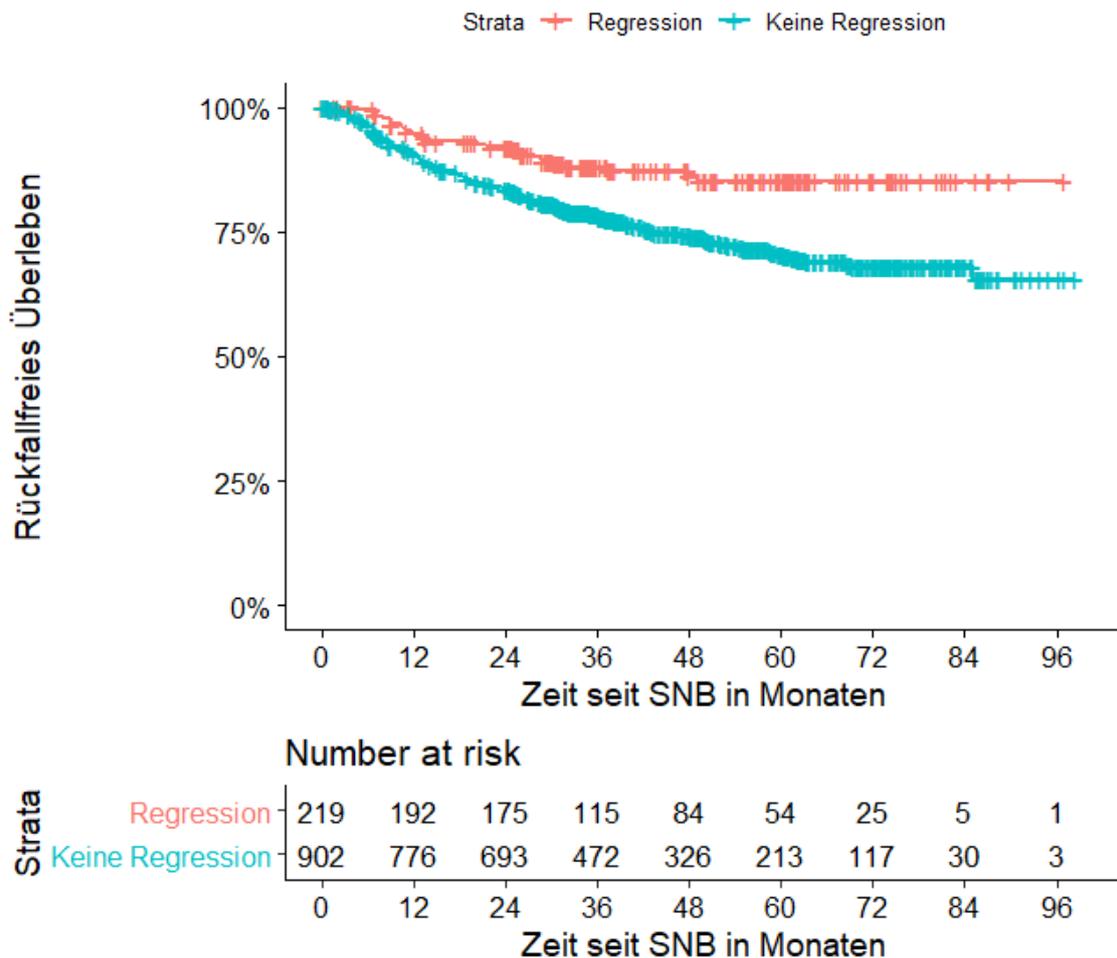
In der multivariablen Analyse der Regression (Tab. 17) wurden zusätzlich jene Patienten ausgeschlossen, bei denen zu einem der analysierten Parameter kein Befund vorlag (n=5).

**Tab. 16: Univariable Analyse des Rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Regression**

	n (%)	Rückfallfreies Überleben	
		Hazard-Ratio (95% CI)	p-Wert
<b>Regression</b>			
<b>Nein</b>	902 (80,5)	1	
<b>Ja</b>	219 (19,5)	0,47 (0,31-0,71)	0,00029

Wie in Abbildung 3 dargestellt, konnte in der univariablen Regressionsanalyse eine positive Assoziation zwischen dem Vorhandensein einer Regression und einem verlängerten RFS festgestellt werden (Tab. 16: p-Wert 0,00029; HR 0,47 (0,31-0,71)).

Die 5-Jahres-Rückfallfreie-Überlebensrate betrug 85,2% (95% CI: 79,9%-90,9%) in der Gruppe, deren Melanome eine Regression aufwiesen im Vergleich zu 70,6% (67,1%-74,3%) in der Gruppe, deren Melanome keine Regression aufwiesen.



Legende: SNB: sentinel node biopsy

**Abb. 3: Kaplan-Meier-Analyse des rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Regression**

Dieser Zusammenhang war in der univariablen Analyse (Abb. 3, Tab. 16) deutlich statistisch signifikant und hielt auch in der multivariablen Analyse der Signifikanzprüfung stand (p-Wert 0,0078; HR 0,57 (0,38-0,86)). Hierbei wurden neben der Regression die bekannten Risikofaktoren zunehmendes Alter (p-Wert 0,0001;

HR 1,02 (1,01-1,03)), männliches Geschlecht (p-Wert 0,19; HR 1,18 (0,92-1,53)), zunehmende Tumordicke nach Breslow (p-Wert <0,0001; HR 1,18 (1,14-1,22)) und Vorhandensein einer Ulzeration (p-Wert <0,0001; HR 2,18 (1,68-2,84)) in die Analyse mit eingeschlossen. (Tab. 17)

Zur weiteren Untersuchung der prognostischen Aussagekraft der histopathologischen Regression wurde eine multivariable Analyse angefertigt, wobei zwischen Melanomen im Stadium T1-T2 und T3-T4 unterschieden wurde. Hier zeigte sich, dass das Vorliegen einer Regression im Stadium T1-T2 signifikant mit einem verlängerten RFS assoziiert war (p-Wert 0,030; HR 0,45 (0,55-0,92)), während im Stadium T3-T4 kein signifikanter Einfluss auf das RFS festgestellt werden konnte. (Tab. 18)

**Tab. 17: Multivariable Regressionsanalyse des Rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Regression**

	n (%)	Rückfallfreies Überleben	
		Hazard Ratio (95% CI)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>			
weiblich	510 (45,7)	1	
männlich	606 (54,3)	1,18 (0,92-1,53)	0,19
<b>Alter*</b>		1,02 (1,01-1,03)	0,0001
<b>Breslow Tumordicke*</b>		1,18 (1,14-1,22)	<0,0001
<b>Ulzeration</b>			
Nein	781 (70,0)	1	
Ja	335 (30,0)	2,18 (1,68-2,84)	<0,0001
<b>Regression</b>			
Nein	899 (80,6)	1	
Ja	217 (19,4)	0,57 (0,38-0,86)	0,0078

5 Patientendaten ausgeschlossen, bei denen mindestens einer der ausgewerteten Faktoren nicht angegeben war.  
\*Auswertung als kontinuierliche Variablen.

Das Vorliegen einer histopathologischen Regression stellte in dieser Kohorte also einen unabhängigen signifikanten prognostischen Vorteil in Bezug auf das Rückfallfreie Überleben dar, der sich sowohl in der Gesamtkohorte als auch bei Begrenzung auf Melanome im Stadium T1-T2 nachweisen ließ. Bei Melanomen

im Stadium T3-T4 ließ sich kein Einfluss der Regression auf die Prognose nachweisen. Hier erwiesen sich die Tumordicke und das Vorliegen einer Ulzeration als deutlich bessere Prädiktoren für ein verkürztes RFS (p-Werte <0,0001). (Tab. 17 und 18)

**Tab. 18: Multivariable Regressionsanalyse des Rückfallfreien Überlebens nach T-Stadium in Abhängigkeit von der Regression**

	Rückfallfreies Überleben					
	Stadium T1-T2			Stadium T3-T4		
	n	Hazard Ratio (95% CI)	p-Wert	n	Hazard Ratio (95% CI)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>						
weiblich	302	1	0,44	208	1	0,36
männlich	355	1,21 (0,74-1,98)		251	1,15 (0,85-1,55)	
<b>Alter*</b>		1,01 (0,99-1,03)	0,38		1,02 (1,00-1,03)	0,0022
<b>Breslow Tumordicke*</b>		4,40 (2,11-9,17)	<0,0001		1,10 (1,05-1,15)	<0,0001
<b>Ulzeration</b>						
Nein	552	1	0,80	229	1	<0,0001
Ja	105	1,08 (0,60-1,92)		230	1,96 (1,44-2,67)	
<b>Regression</b>						
Nein	491	1	0,030	408	1	0,87
Ja	166	0,45 (0,55-0,92)		51	0,96 (0,58-1,58)	

5 Patientendaten ausgeschlossen, bei denen mindestens einer der ausgewerteten Faktoren nicht angegeben war.  
\*Auswertung als kontinuierliche Variablen.

### 3.6. Wächterlymphknotenstatus

Von den 1475 durchgeführten Wächterlymphknotenexstirpationen, konnte in 64 Fällen (4,3%) kein Wächterlymphknoten detektiert werden oder der detektierte Wächterlymphknoten war zu nah an Gefäß- oder Nervenstrukturen, um ihn im Rahmen dieses diagnostischen Eingriffs gefahrlos entfernen zu können. Mit 84,3% (1244) war im Großteil der untersuchten Wächterlymphknoten in der histopathologischen Untersuchung kein Hinweis auf eine Metastasierung zu

erkennen. Bei 167 Patienten (11,3%) konnte hingegen eine Aussaat des Tumors in den, beziehungsweise die, entnommenen Wächterlymphknoten festgestellt werden. (Tab. 5)

Von den 1411 erfolgreich durchgeführten Wächterlymphknotenentnahmen wurde in 1090 Fällen eine Probe des Resektats mittels Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie (LDI) untersucht. In 321 Fällen (22,7% von 1411) wurde keine LDI durchgeführt. Der Grund war in den meisten Fällen ein für die Zerteilung zu kleiner Wächterlymphknoten.

Von den durchgeführten 1090 LDI sind 284 (26,1 %) positiv ausgefallen, wobei eine DCCD >0/Mio. als positiv gewertet wurde. 806 (73,9 %) der 1090 untersuchten Lymphknoten wurden in der LDI negativ getestet, also eine DCCD von 0/Mio. festgestellt. Eine DCCD von über 1000/Mio. konnte bei insgesamt 56 Patienten (3,8 %) festgestellt werden. Der höchste DCCD-Wert lag bei 900.000/Mio. Die mediane DCCD über alle Patienten betrug 0/Mio. Die mediane DCCD aller Patienten mit positiver LDI (DCCD >0/Mio.) lag bei 11/Mio. Der Mittelwert der DCCD über alle Patienten, bei denen eine LDI durchgeführt wurde, lag bei 2123/Mio. (Tab. 19)

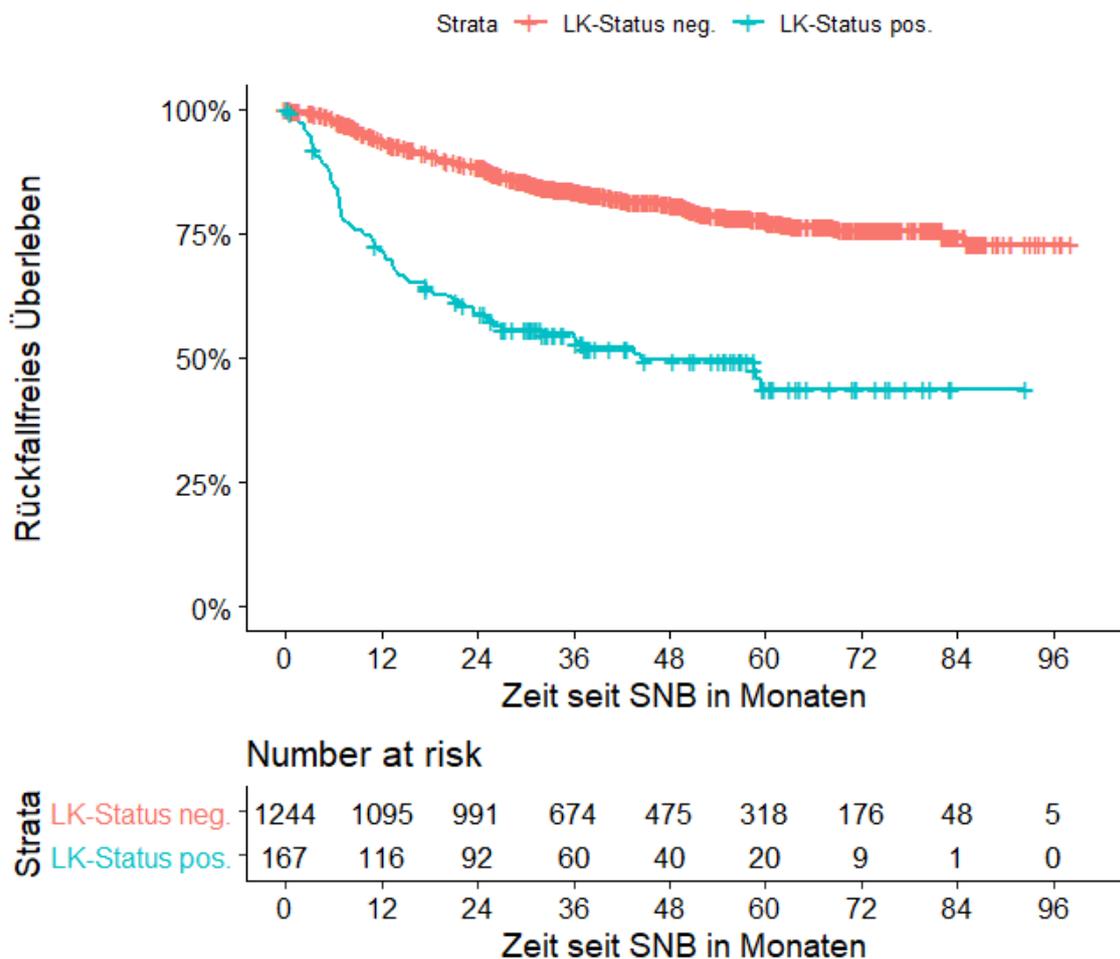
**Tab. 19: Deskriptive Statistik der Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie**

	n (%)	MW	SEM	Min.	25%	Median	75%	Max.
<b>DCCD [/Mio.]</b>								
<b>0</b>	806 (54,6)							
<b>1-10</b>	138 (9,4)							
<b>11-100</b>	48 (3,3)	2123	1116	0	0	0	1	900.000
<b>101-1000</b>	42 (2,8)							
<b>&gt;1000</b>	56 (3,8)							
<b>NA</b>	385 (26,1)							

DCCD: disseminated cancer cell density, Mio.: Millionen, MW: Mittelwert, SEM: standard error of the mean, Min.: Minimum, Max.: Maximum, NA: engl. not available, Daten nicht verfügbar

### 3.6.1. Die konventionelle SNB

Die Entnahme und histopathologische Untersuchung des Wächterlymphknotens ist in Deutschland bei Melanomen ab 1 mm Tumordicke, bzw. ab 0,75 mm Tumordicke bei Vorhandensein von Risikofaktoren, Standard.



Legende: SNB: sentinel node biopsy, LK: Lymphknoten, neg.: negativ, pos.: positiv

**Abb. 4: Kaplan-Meier-Analyse des rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit vom histopathologischen Lymphknotenstatus**

Wie in der univariaten Kaplan-Meier-Analyse des RFS in Abbildung 4 dargestellt, hatte ein positiver Wächterlymphknoten, wie zu erwarten, großen Einfluss auf die Prognose der beobachteten Patienten (Tab. 20: p-Wert <0,0001; HR 3,54 (2,74-

4,56)). So betrug die 5-Jahres-Rückfallfreie-Überlebensrate bei Patienten mit negativem konventionell-pathologischem Lymphknotenstatus noch 77,9% (75,1%-80,7%), während sie bei Patienten mit positivem konventionell-pathologischem Lymphknotenstatus lediglich 43,7% (35,1%-54,4%) betrug.

Tab. 20: Univariable Analyse des Rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit vom histopathologischen Lymphknotenstatus

	n (%)	Rückfallfreies Überleben	
		Hazard Ratio (95% CI)	p-Wert
<b>Lymphknotenstatus</b>			
<b>Negativ</b>	1244 (88,2)	1	
<b>Positiv</b>	167 (11,8)	3,54 (2,74-4,56)	<0,0001

### 3.6.2. Die Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie (LDI)

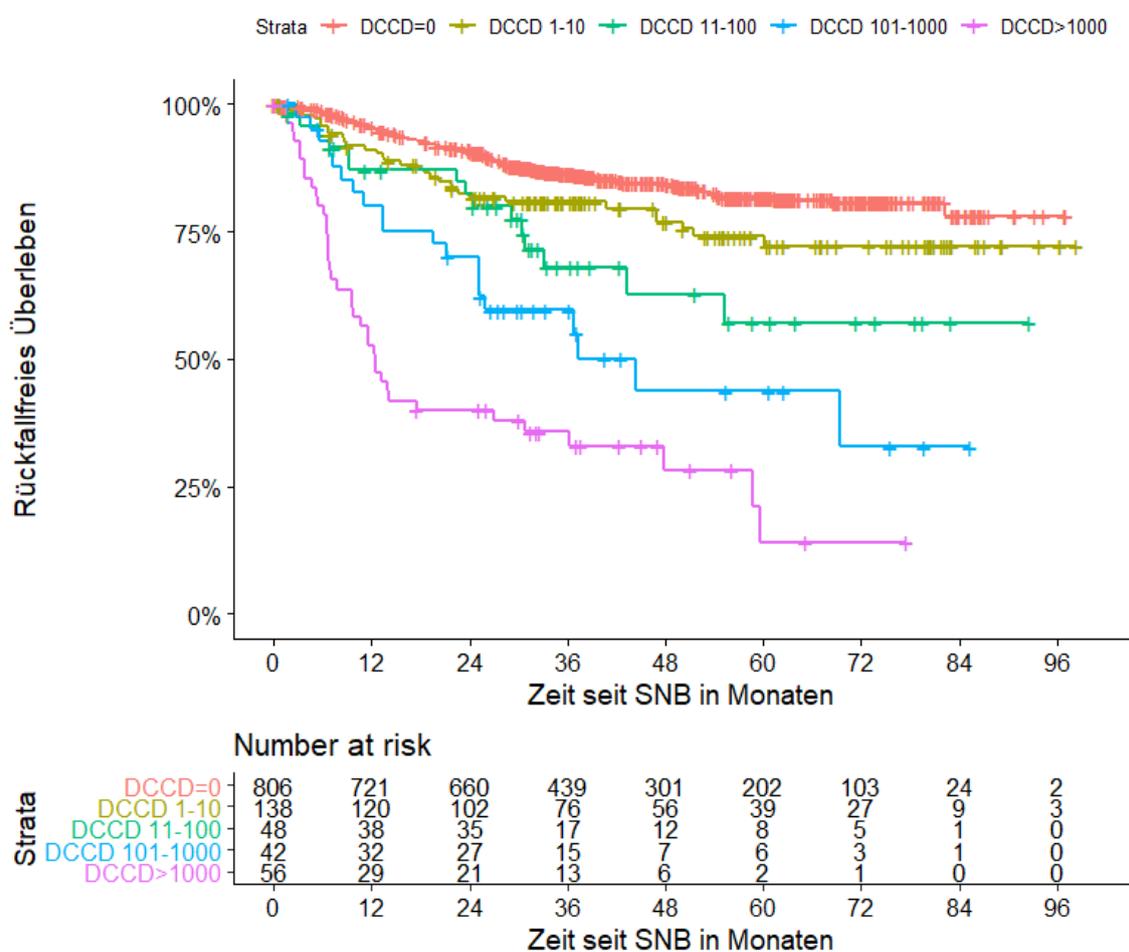
Anders verhält es sich mit der Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie. Dieses in Tübingen entwickelte Verfahren ist noch sehr jung und wird bisher nur in Tübingen regelmäßig angewandt.

Tab. 21: Univariable Analyse des Rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit von der DCCD

	n (%)	Rückfallfreies Überleben	
		Hazard Ratio (95% CI)	p-Wert
<b>DCCD [Mio.]</b>			
<b>0</b>	806 (73,9)	1	
<b>1-10</b>	138 (12,7)	1,54 (1,04-2,30)	0,031
<b>11-100</b>	48 (4,4)	2,47 (1,44-4,22)	0,001
<b>101-1000</b>	42 (3,9)	4,21 (2,62-6,76)	<0,0001
<b>&gt;1000</b>	56 (5,1)	8,77 (6,09-12,63)	<0,0001

DCCD: disseminated cancer cell density, Mio.: Millionen

Ein Großteil (n=1090 (77,3%)) der 1411 in der SNB eindeutig detektierbaren SN konnten geteilt und anschließend per LDI untersucht werden. Davon fielen 26,1% der Untersuchungen (n=284) positiv und 73,9% (n=806) negativ aus.



Legende: SNB: sentinel node biopsy, DCCD: disseminated cancer cell density [/Millionen]

**Abb. 5: Kaplan-Meier-Analyse des rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit von der DCCD**

In Abbildung 5 ist dargestellt, welchen Einfluss die LDI, bzw. die Höhe der DCCD, auf das RFS hatte. Dazu wurden alle 1090 Patienten, bei denen die LDI durchgeführt wurde, nach der Höhe der DCCD logarithmisch in fünf Gruppen eingeteilt und anschließend analysiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass das RFS mit jeder zunehmende Zehnerpotenz der DCCD sank (Abb. 5, Tab. 21: DCCD 0-10/Mio.: p-Wert 0,031; DCCD 11-100/Mio.: p-Wert 0,001; DCCD 101-1000/Mio.: p-Wert <0,0001 und DCCD >1000/Mio.: p-Wert <0,0001).

Tabelle 22 zeigt die multivariable Cox-Regressionsanalyse des rückfallfreien Überlebens in Bezug auf die LDI, wobei das LDI-Ergebnis wie in der univariablen Analyse (Tab. 21) in 5 logarithmischen Gruppen ausgewertet wurde.

Tab. 22: Multivariable Regressionsanalyse des Rückfallfreien Überlebens in Abhängigkeit von der DCCD

	n (%)	Rückfallfreies Überleben	
		Hazard Ratio (95% CI)	p-Wert
<b>Geschlecht</b>			
weiblich	482 (45,3)	1	
männlich	582 (54,7)	1,17 (0,88-1,54)	0,27
<b>Alter*</b>		1,02 (1,01-1,03)	<0,0001
<b>Breslow Tumordicke*</b>		1,14 (1,10-1,18)	<0,0001
<b>Ulzeration</b>			
Nein	739 (69,5)	1	
Ja	325 (30,5)	1,95 (1,46-2,59)	<0,0001
<b>Lymphknotenstatus</b>			
negativ	941 (88,4)	1	
positiv	123 (11,6)	1,39 (0,91-2,12)	0,13
<b>DCCD [Mio.]</b>			
0	784 (73,7)	1	
1-10	136 (12,8)	1,36 (0,91-2,05)	0,14
11-100	48 (4,5)	2,12 (1,18-3,79)	0,012
101-1000	41 (3,9)	3,28 (1,90-5,67)	<0,0001
>1000	55 (5,2)	3,96 (2,38-6,58)	<0,0001

26 Patientendaten ausgeschlossen, bei denen mindestens einer der ausgewerteten Faktoren nicht angegeben war.  
 \*Auswertung als kontinuierliche Variablen.  
 DCCD: disseminated cancer cell density, Mio.: Millionen

Außerdem wurden in dieser multivariablen Analyse die wichtigsten allgemeinen Tumor- und Patientenparameter wie Geschlecht, Alter, Tumordicke nach Breslow, der histopathologische Ulzerationsstatus sowie das Ergebnis der konventionellen pathologischen Lymphknotenuntersuchung miteinbezogen, wobei das Patientenalter und die Tumordicke als kontinuierliche Variablen in die Analyse einfließen. Es zeigte sich, dass zunehmendes Patientenalter (p-Wert <0,0001; HR 1,02 (1,01-1,03)), zunehmende Tumordicke (p-Wert <0,0001; HR (1,14 (1,10-1,18)) und das Vorhandensein einer Ulzeration (p-Wert <0,0001; HR 1,39 (0,91-2,12)), wie erwartet, signifikante prognostische Einflussfaktoren für das Rückfallfreie Überleben darstellten. Dass dem Ergebnis der konventionell-pathologischen Lymphknotenuntersuchung in dieser multivariablen Analyse keine unabhängige Signifikanz nachgewiesen werden konnte ist wenig überraschend, da dieser Analyse mit der LDI eine sehr ähnliche Variable hinzugefügt wurde und das pathologische SNB-Ergebnis damit einen abhängigen Faktor darstellte. Trotz Einbezug des konventionell-pathologischen SNB-Ergebnisses ist ersichtlich, dass in dieser multivariablen Regressionsanalyse ein, auch vom pathologischen SNB-

Ergebnis, unabhängiger Zusammenhang zwischen steigender DCCD und verkürztem RFS bestand (Tab. 22: DCCD 1-10/Mio.: p-Wert 0,14; DCCD 11-100/Mio.: p-Wert 0,012; DCCD 100-1000/Mio.: p-Wert <0,0001; DCCD >1000/Mio.: p-Wert <0,0001).

Die Betrachtung der 5-Jahres-Rückfallfreie-Überlebensrate verdeutlicht diesen Zusammenhang. So waren nach 5 Jahren noch 81,75% (95% CI: 78,6%-85,1%) der Patienten mit negativer LDI rückfallfrei. Lag die DCCD bei 1-10/Mio. waren es noch 74,1% (66,1%-83,0%), bei 11-100/Mio. noch 57,1% (41,1%-79,2%), bei 101-1000/Mio. noch 43,8% (28,2%-68,0%) und bei einer DCCD von >1000/Mio. waren nach 5 Jahren nur noch 14,1% (4,7%-42,3%) der Patienten rückfallfrei.

In der multivariablen Cox-Regressionsanalyse der anerkannten Risikofaktoren des malignen Melanoms und der LDI zeigte sich also, dass die konventionell-pathologische Untersuchung des Wächterlymphknotens bei Mitbetrachtung der LDI keinen unabhängigen Prädiktor für das Rückfallfreie Überleben mehr darstellte, wohingegen die LDI ab einer DCCD von >10/Mio. einen von den bekannten Risikofaktoren, unabhängiger Faktor für die Prognose von Melanompatienten im Stadium I-III darstellte und signifikant mit dem Rückfallfreien Überleben dieser Patienten korrelierte. (Tab. 22)

### 3.6.3. Positive LDI bei negativer konventioneller SNB

Zur weiteren Überprüfung der prognostischen Signifikanz der LDI gegenüber der konventionell-pathologischen Lymphknoten-Untersuchung, wurden zusätzliche Analysen durchgeführt. Zuerst wurde eine deskriptive Statistik bezüglich konventioneller Pathologie und LDI-Untersuchung der SN erstellt (Tab. 23).

Dort ist ersichtlich, dass von den 1475 Patienten 64 Mal (4,3%) keine pathologische Untersuchung und 385 Mal (26,1%) keine LDI durchgeführt, beziehungsweise das jeweilige Ergebnis nicht übermittelt wurde. Gründe für fehlende Daten bezüglich der SNB wurden in Kapitel 3.6. erörtert.

Tab. 23: Deskriptive Statistik der Wächterlymphknotenuntersuchung

	LK-Status negativ	LK-Status positiv	LK-Status NA	Gesamt
DCCD =0/Mio.	783	21	2	806
DCCD >0/Mio.	180	104	0	284
DCCD NA	281	42	62	385
<b>Gesamt</b>	<b>1244</b>	<b>167</b>	<b>64</b>	<b>1475</b>

LK: Lymphknoten, DCCD: disseminated cancer cell density, Mio.: Millionen, NA: engl. not available, Daten nicht verfügbar

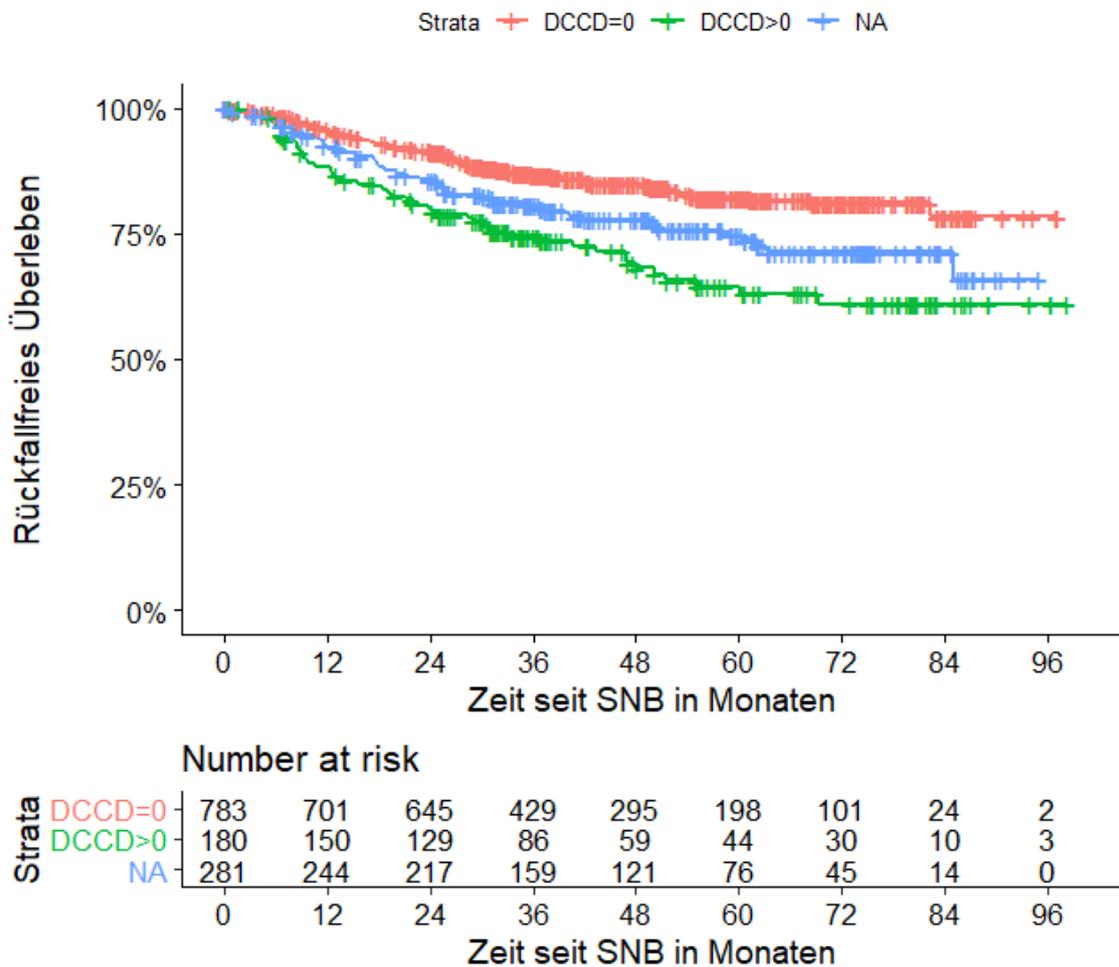
Außerdem ist auffällig, dass von den 1244 konventionell-pathologisch negativ getesteten Wächterlymphknotenhälften in 180 Fällen in der anderen Hälfte eine DCCD über 0/Mio. festgestellt wurde. Das bedeutet, dass in 14,5% der konventionell-pathologisch negativ getesteten SN-Hälften in der LDI der anderen Hälfte Tumorzellen festgestellt werden konnten. Andererseits konnte von den 806 SN-Hälften mit einer negativen LDI nur in 2,6% (n=21) der Fälle in der anderen Hälfte konventionell-pathologisch eine Metastasierung nachgewiesen werden. Unter der Annahme, dass die LDI zuverlässig Tumorzellen detektiert, bedeutet das also, dass die konventionell-pathologische Untersuchung in dieser Studie in 14,5% der Fälle falsch negative Ergebnisse lieferte, während es bei der LDI nur 2,6% falsch negative Ergebnisse gab. (Tab. 23)

Zur genaueren Betrachtung dieser Ergebnisse wurde in Abbildung 6 eine Kaplan-Meier-Analyse des RFS aller Patienten mit negativem konventionell-pathologischem SNB-Ergebnis bezüglich des LDI-Ergebnisses dargestellt.

Tab. 24: Univariable Analyse des Rückfallfreien Überlebens aller konventionell-pathologisch negativen SNB in Abhängigkeit von der DCCD

	n (%)	Rückfallfreies Überleben	
		Hazard-Ratio (95% CI)	p-Wert
<b>DCCD [Mio.]</b>			
<b>0</b>	783 (62,9)	1	
<b>&gt;0</b>	180 (14,5)	2,24 (1,62-3,11)	<0,0001
<b>NA</b>	281 (22,6)	1,59 (1,16-2,16)	0,0035

SNB: sentinel node biopsy, DCCD: disseminated cancer cell density, NA: engl. not available, Daten nicht verfügbar, Mio.: Millionen



Legende: SNB: sentinel node biopsy, DCCD: disseminated cancer cell density [/Millionen], NA: not available, Daten nicht verfügbar

**Abb. 6: Kaplan-Meier-Analyse des Rückfallfreien Überlebens aller konventionell-pathologisch negativen SNB in Abhängigkeit von der DCCD**

In dieser Überlebenszeitanalyse wurden lediglich jene Patienten betrachtet, deren pathologisches Ergebnis der SNB negativ war (n=1244). Anschließend wurde bei diesen 1244 Patienten eine Regressionsanalyse in Bezug auf das Ergebnis der LDI durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine positive LDI, auch bei negativer konventioneller Pathologie, einen prognostisch relevanten Faktor darstellt. Die Regressionsanalyse konnte diese Annahme bestätigen. Bei Patienten mit einer DCCD >0/Mio. war ein deutlich verkürztes RFS zu beobachten, gegenüber den Patienten deren LDI ebenfalls negativ ausfiel (DCCD 0/Mio.). Der p-Wert von <0,0001 und die HR von 2,24 (1,62-3,11) bestätigten diese Signifikanz (Tab. 24).

Mithilfe der Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie konnte also bei 180 der 1244 Patienten, bei denen in der konventionell-pathologischen SN-Untersuchung keine Metastasierung festgestellt wurde, Tumorzellen detektiert werden. Es zeigte sich, dass diese 180 durch die LDI detektierten Patienten ein signifikant höheres Risiko für einen Rückfall im Untersuchungszeitraum und somit eine reduzierte Prognose gegenüber Patienten mit einer negativen LDI hatten.

## 4. Diskussion

### 4.1. Qualität der Daten

Es handelt sich bei dieser Studie um eine große retrospektive, monozentrische Kohortenstudie, in der 1475 Melanompatienten des Universitätsklinikums Tübingen (UKT) zum Zeitpunkt der SNB erfasst und ihr Krankheitsverlauf über mehrere Jahre dokumentiert wurde. Hierbei wurden alle Patienten einbezogen, die zwischen Januar 2010 und Dezember 2015 am UKT eine SNB aufgrund eines malignen Melanoms absolvierten und ihr Krankheitsverlauf bis Juli 2018 beobachtet. Von der Erfassung ausgeschlossen wurden lediglich Patienten, die aufgrund eines Zweitmelanoms oder eines Tumors anderer Entität eine SNB bekamen. So konnten Melanompatienten der AJCC-Stadien I-III (bezogen auf das Stadium nach Analyse des Wächterlymphknotens) erhoben werden, wobei sich die Verteilung auf die Stadien I und II als ausgewogen herausstellte (Stadium I: 46 %, Stadium II: 41,4%). Alle Patienten wurden nach der AJCC Klassifikation Version 7 von 2009 (Balch et al. 2009) klassifiziert und nach den standardisierten Vorgaben der nationalen Melanom-Leitlinie der AWMF Version 1.0 (Leitlinienprogramm Onkologie 2013) nachgesorgt und behandelt. Zudem wurden alle histopathologischen und laborchemischen Untersuchungen nach einheitlichen Standards durchgeführt.

Die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 89,9% (95% CI: 87,0%-92,8%) für weibliche Patienten und bei 84,3% (81,2%-87,6%) für männliche Patienten. Die mediane Tumordicke lag bei 1,80 mm und eine Ulzeration konnte in 30,4% der Fälle festgestellt werden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen anderer großer Studien zum malignen Melanom, weshalb von einer Repräsentativität dieser Daten auszugehen ist (Balch et al. 2001, Balch et al. 2009, Amin et al. 2017, Gershenwald et al. 2017).

## 4.2. Prognostischer Einfluss des Differentialblutbildes

Neben den allgemeinen Tumorparametern wurde in dieser Studie auch das postoperative Differentialblutbild der Patienten, zum Zeitpunkt der Melanom-Exzision, erfasst. Auch diese Daten wurden statistisch aufgearbeitet und auf ihre prognostische Relevanz überprüft, um festzustellen ob das Differentialblutbild von Melanompatienten Einfluss auf die Prognose ihrer Erkrankung hat.

In den univariablen Regressionsanalysen stellten sich, bezüglich der absoluten Differentialblutbild-Werte, ein ANC  $>5800/\mu\text{l}$  (p-Wert  $<0,0001$ ), ein ALC  $\leq 1220/\mu\text{l}$  (p-Wert 0,0028), ein AMC  $>810/\mu\text{l}$  (p-Wert 0,0025) und ein AEC  $\leq 200/\mu\text{l}$  (p-Wert 0,0055) als prognostisch relevant für das Gesamtüberleben der Patienten heraus. Für die relativen Werte des Differentialblutbildes, stellten sich ein RNC  $>69,7\%$  (p-Wert  $<0,0001$ ), ein RLC  $\leq 17,5\%$  (p-Wert  $<0,0001$ ), ein RMC  $>6,6\%$  (p-Wert 0,028), ein REC  $\leq 2,7\%$  (p-Wert 0,0036) und ein RBC  $\leq 0,6\%$  (p-Wert 0,0075) als signifikante prognostische Merkmale für das Gesamtüberleben heraus. (Tab. 13)

Ein Zusammenhang zwischen Entstehung, Wachstum und Prognose solider Tumoren und den Zellen des Immunsystems ist seit einigen Jahren bekannt. So können systemische und lokale Inflammation die Tumorgenese, Metastasierung und Prognose von Tumorerkrankungen beeinflussen (Coussens und Werb 2002, Hanahan und Weinberg 2011, Gabrilovich et al. 2012, Diakos et al. 2014). Insbesondere die Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Monozyten (Leitch et al. 2007, Kumagai et al. 2014), sowie deren Verhältnis zur Lymphozyten-Anzahl (NLR, LMR) im peripheren Blut, haben sich in früheren Studien als signifikante Prognosefaktoren solider Tumoren erwiesen (Templeton et al. 2014, Nishijima et al. 2015).

Auch bezüglich des malignen Melanoms wurde vielfach versucht, Merkmale des Differentialblutbildes nachzuweisen, die Einfluss auf die Prognose der Patienten haben. Bisher konnte ein solcher Zusammenhang jedoch nur bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung, nachgewiesen werden (Schmidt et al. 2005,

Donskov 2013, Cananzi et al. 2014, Rochet et al. 2015, Ferrucci et al. 2015, Valpione et al. 2015, Gandini et al. 2016, Ferrucci et al. 2016).

Bisherige Studien konnten zeigen, dass sowohl die Gesamtanzahl der Leukozyten (Donskov 2013, Gandini et al. 2016), als auch jeweils die Höhe der neutrophilen Granulozyten (Donskov 2013, Valpione et al. 2015, Ferrucci et al. 2016, Gandini et al. 2016), der Monozyten (Schmidt et al. 2005, Rochet et al. 2015) und deren jeweiliges Verhältnis zur Lymphozytenzahl (NLR, LMR) (Donskov 2013, Cananzi et al. 2014, Ferrucci et al. 2015) signifikante Prognosefaktoren des malignen Melanoms im Stadium IV darstellen.

Kürzlich wurden jedoch auch Studien veröffentlicht, die zeigen konnten, dass die Zellen des Differentialblutbildes auch im Stadium III und bei Hochrisiko-Patienten im Stadium II eine prognostische Rolle für Melanompatienten spielt. Dabei stellten sich die NLR und der AMC als signifikante Risikofaktoren heraus (Gandini et al. 2016, Lino-Silva et al. 2017, Davis et al. 2017). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass mit 45,2%, 36,5% bzw. 49,3% jeweils die Gruppe der Stadium-III Melanompatienten überrepräsentiert war und die Studien entweder eine hohe Anzahl an Hoch-Risiko-Patienten mit einer medianen Tumordicke von 3,0 mm enthielten (Lino-Silva et al. 2017) oder Patienten mit einem TNM-Stadium von T2a oder niedriger ausschlossen wurden (Davis et al. 2017). Im Gegensatz zu bisherigen Studien konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Höhe der neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten sowie der NLR, auch in einer unselektierten Kohorte von Stadium I-III Patienten, Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten hat, und das obwohl sich ein Großteil der Patienten (46,0%) im Stadium I befand.

Trotz ihres vielfach nachgewiesenen Einflusses auf die Immuncheckpoint-Inhibition mit CTLA-4 oder PD1-Antikörpern (Delyon et al. 2013, Gebhardt et al. 2015, Weide et al. 2016, Martens et al. 2016, Moreira et al. 2017), wurde der Einfluss der eosinophilen Granulozyten auf die Prognose von Melanompatienten, im Gegensatz zu dieser Studie, in aktuellen Studien nicht dargelegt (Gandini et al. 2016, Lino-Silva et al. 2017, Davis et al. 2017). Dabei wurde ihr aktiver Einfluss auf die körpereigene Immunantwort gegen Malignome, durch chemotaktische

Führung von CD8(+) T-Zellen in den Tumor, bereits nachgewiesen (Carretero et al. 2015). Diese Annahme konnte in dieser Kohorte bekräftigt werden, da gezeigt werden konnte, dass eine hohe absolute Zahl bzw. ein hoher relativer Anteil an eosinophilen Granulozyten mit einem verbesserten Gesamtüberleben der Patienten einherging.

Auch über den Einfluss von basophilen Granulozyten auf die immunologischen Prozesse rund um einen malignen Tumor war lange wenig bekannt, bis kürzlich festgestellt wurde, dass basophile Granulozyten, ebenfalls durch Chemotaxis, die Infiltration von CD8(+) T-Zellen in den Tumor, und damit die körpereigene Tumorabwehr, unterstützen (Sekioglu et al. 2017). Das verbesserte Gesamtüberleben dieser Kohorte bei einem hohen relativen Anteil an Basophilen im peripheren Blut steht mit dieser Erkenntnis in Einklang.

Aus den signifikanten Risikofaktoren in Bezug auf das Differentialblutbild, wurde jeweils ein Score für die vier Risikofaktoren der absoluten Differentialblutbildwerte (ADBC-Score) und ein Score für die fünf Risikofaktoren der relativen Blutbildwerte (RDBC-Score) errechnet.

In der multivariablen Cox-Regressionsanalyse zeigte sich, dass der ADBC-Score ab dem Vorliegen von >1 Risikofaktor, auch bei Mitbetrachtung der anerkannten prognostischen Faktoren des malignen Melanoms, einen unabhängigen signifikanten prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben der hier betrachteten Melanompatienten der Stadien I-III darstellte. (Tab. 14)

In dieser Kohorte konnte erstmals nachgewiesen werden, dass bestimmte Werte des Differentialblutbildes, nicht nur bei Hochrisiko-Patienten in fortgeschrittenem Tumorstadium, sondern auch bei einer breiten unselektierten Kohorte kurz nach Diagnose eines primären kutanen Melanoms, signifikanten Einfluss auf die Prognose hat. Außerdem zeigte sich, dass diese Differentialblutbild-Werte vor allem in Form eines Scores aller Risikowerte, auch unabhängig von gängigen Risikofaktoren, mit einem signifikant verringerten Gesamtüberleben von Melanompatienten in den AJCC Stadien I-III assoziiert sind.

Diese Studie ist somit die erste, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen verschiedenen Leukozyten-Typen und dem Gesamtüberleben von Melanompatienten der AJCC-Stadien I-III beschreibt. Vor allem die eosinophilen und basophilen Granulozyten sollten in weiteren Studien auf ihren immunologischen und prognostischen Einfluss auf das maligne Melanom untersucht werden. Auch die Relevanz von Risiko-Scores des Differentialblutbildes in Bezug auf die Prognose von Melanompatienten sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Neue Erkenntnisse legen nahe, dass Veränderungen im peripheren Blutbild Folge einer, möglicherweise noch unerkannten, Metastasierung sein könnten und interessanterweise sogar ein, von der Tumorlast unabhängiger, Ausdruck einer systemisch relevanten tumorinduzierten Immunsuppression darstellen könnten (Lee et al. 2020, Yu et al. 2021). Diese Erkenntnisse bergen langfristig die Chance Melanompatienten bereits bei Diagnosestellung genauer bezüglich ihres individuellen Risikos einzuteilen, gegebenenfalls früher zu behandeln und die immunologischen Prozesse rund um das Melanom besser zu verstehen, um eventuell weitere therapeutische Konzepte zu entwickeln und letztlich die Sterblichkeit des malignen Melanoms zu verringern.

### 4.3. Prognostischer Einfluss der Regression

Die vertikale Tumordicke des Primärmelanoms nach Breslow und das Vorhandensein einer Ulzeration sind in der aktuellen AJCC-Klassifikation die Hauptkriterien zur Graduierung des nicht-metastasierten (Stadium I-II) Melanoms (Gershenwald et al. 2017). Die prognostische Relevanz dieser histopathologischen Merkmale konnte in einer Vielzahl unabhängiger Studien nachgewiesen werden (Balch et al. 2001, McMasters et al. 2001, Elder et al. 2005, Barlett et al. 2015, Kibrite et al. 2016, Haenssle et al. 2016). Auch in dieser Arbeit, konnten die etablierten prognostischen Merkmale des malignen Melanoms, bezüglich ihres Einflusses auf das Gesamt- bzw. Rückfallfreie Überleben von Melanompatienten, bestätigt werden (Tab. 14, 17 und 22: p-Werte  $<0,0001$ ). Eine Ulzeration trat in 30,4% der Fälle ( $n=448$ ) auf, die mediane vertikale Tumordicke nach Breslow betrug 1,80 mm.

Bei der histopathologischen Untersuchung von resezierten Primärmelanomen wird seit einiger Zeit ebenfalls untersucht, ob das vorliegende Melanom eine Regression aufweist (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). In dieser Studie wurde unter anderem der prognostische Einfluss dieser Größe auf das Outcome der Patienten überprüft.

Bei dieser Analyse lag der Anteil der regressiven Melanome bei 14,8%, in früheren Studien lag dieser bei etwa 10-35% (Blessing et al. 1990, Ribero et al. 2016). Eine Erklärung für diesen vergleichsweise niedrigen Anteil an regressiven Melanomen könnte die in dieser Kohorte, gegenüber früheren Untersuchungen (Garbe et al. 2000), erhöhte mediane Tumordicke von 1,80 mm darstellen. Diese lässt sich dadurch erklären, dass in dieser Studie lediglich Patienten erfasst wurden, die eine SNB erhalten haben, deren Tumordicke also in der Regel mindestens 0,75 mm betrug. Außerdem wurden diejenigen Melanome mit einer Tumordicke <1,00 mm meist im niedergelassenen Bereich reseziert und sind daher nicht in diesen Datensatz vom UKT mit eingeflossen. Dass eine zunehmende Tumordicke mit einer abnehmenden Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Regression einhergeht, deutete sich bereits in früheren Studien an (Morris et al. 2008, Burton et al. 2011). Die hier präsentierten Daten stehen in Einklang mit dieser Annahme.

Dass die Ergebnisse der relativen Häufigkeit von Regression in Melanomen von Studie zu Studie ein großes Intervall aufweisen, ist vermutlich darin begründet, dass es bisher keine verbindlichen Standards zur histopathologischen Definition der Regression gibt (Aung et al. 2017). Besonders in der frühen Phase der Regression, in der es nur kleine T-Zell-Nester und Nekroseherde gibt, wurde weder national noch international ein Standard etabliert, ab wann von einer Regression zu sprechen ist (Requena et al. 2009, Botella-Estrada et al. 2014,). An der Universitätsklinik Tübingen und damit in dieser Studie wurden alle Melanome, bezüglich des Vorliegens einer Regression, analog zu Aung et al., welcher erst ab einem späten Regressionsstadium von einer Regression spricht, bewertet (Aung et al. 2017). Auch das bietet eine Erklärung, warum regressive Melanome in dieser Studie gegenüber früheren Beobachtungen unterrepräsentiert sind.

Die ermittelten Prädiktoren für das Auftreten einer Regression von Melanomen (Tab. 15), nämlich männliches Geschlecht, zunehmendes Patientenalter, superfiziell spreitender Subtyp, axiale Lokalisation und fehlende Ulzeration, decken sich mit den Erkenntnissen vorhergegangener Studien (Kelly et al. 1985, Morris et al. 2008, Ribero et al. 2013, Botella-Estrada et al. 2014). Des Weiteren hat sich in dieser Arbeit gezeigt, dass das Vorliegen einer Regression, in Kongruenz zum aktuellen Kenntnisstand der Forschung (Kaur et al. 2008, Morris et al. 2008, Ribero et al. 2013, 2015 und 2019, Aung et al. 2017), einen signifikanten Faktor für das Vorliegen eines metastasenfremen Wächterlymphknotens darstellt (Tab. 15: p-Wert 0,043).

Außerdem ist diese Arbeit die erste, die einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Regression und einer Nävusassoziation beschreibt (Tab. 15: p-Wert  $<0,0001$ ). Eine mögliche Erklärung für diese interessante Beobachtung könnte die jeweilige Korrelation von Regression und Nävusassoziation mit geringer Tumordicke sowie superfiziell spreitenden Melanomen sein (Blessing und McLaren 1992, Sagebiel 1993, Skender-Kalnenas et al. 1995, Bevona et al. 2003, Haenssle et al. 2016, Pampena et al. 2017). Es ist also weitere Forschung zur Assoziation von Regression und Nävusassoziation notwendig, um einen statistischen Zufall, aufgrund der Korrelation beider Faktoren mit superfiziell spreitendem Subtyp und geringer Tumordicke, auszuschließen und um die Unterschiede zwischen nävusassoziierten regressiven Melanomen und nicht regressiven de-novo-Melanomen zu ergründen. Da ein Zusammenhang zwischen häufigen Sonnenbränden und nävusassoziierten Melanomen besteht (Carli et al. 1999) und vermutet wird, dass eine UV-bedingte Mutationsneigung der DNA mit einer erhöhten Immunogenität von Melanomen einhergehen und somit zu Regression führen könnte (Danilova et al. 2016, Lauss et al. 2017, Dodds et al. 2019), wäre also denkbar, dass ein Zusammenhang zwischen häufigen Sonnenbränden und der Regression von Melanomen besteht. Diese Hypothese bietet ein neues Konzept und könnte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

Ob und welche Rolle das Vorhandensein einer histopathologischen Regression des primären Melanoms für die Prognose des Patienten spielt, wird seit Jahrzehnten kontrovers diskutiert (Kelly et al. 1985, Aung et al. 2017).

So gibt es Studien, wonach das Vorkommen von Melanom-Metastasen bei vollständig regressiven Melanomen oder „melanoma of unknown primary“ (MUP) als Evidenz für die negativen Auswirkungen der Regression angenommen wurde (Pack und Miller 1961, Smith und Stehlin 1965, Bottger et al. 1992, Shai et al. 1994, High et al. 2005, Emanuel et al. 2008). Als Gründe für die vermeintlich schlechtere Prognose, wurden eine verspätete Diagnose und/oder eine Verfälschung der Tumordickenmessung durch Vorliegen einer Regression vermutet (Slingluff et al. 1988, Blessing et al. 1990). Einige Autoren schlugen das Vorliegen einer Regression sogar als Indikation für eine Wächterlymphknotenexstirpation vor (Shaw et al. 1989, McMasters et al. 2001, McClain et al. 2012, Botella-Estrada et al. 2014). So wurde bis ins Jahr 2008 bei Melanompatienten bereits ab einer Tumordicke <1,0 mm eine SNB durchgeführt, wenn das Melanom eine Regression aufwies. Diese Vorgehensweise wurde nicht weiter verfolgt, da es an Daten fehlte, die den Nutzen dieser Behandlung bei diesen Patienten nachweisen konnten (Morris et al. 2008, Testori et al. 2009).

Insgesamt gilt es zu beachten, dass ein Großteil der Studien, die der histopathologischen Regression einen negativen Einfluss auf die Prognose bescheinigten zwischen 1970 und 1995 entstanden sind (Gromet et al. 1978, Paladugu und Yonemoto 1983, Sondergaard und Hou-Jensen 1985, Naruns et al. 1986, Ronan et al. 1987, Slingluff et al. 1988, Shaw et al. 1989, Clark et al. 1989, Blessing und McLaren 1992). Außerdem ist der Anteil von regressiven Melanomen je nach Studie sehr unterschiedlich, was darauf schließen lässt, dass nicht immer dieselbe histopathologische Definition für Regression verwendet wurde. So berichten zum Beispiel Shaw et al. 1989 sogar von einer Regressionsquote von 61% (Shaw et al. 1989). Des Weiteren war man damals gezielt auf der Suche nach einem negativen prognostischen Merkmal dünner Melanome, weil es die Hypothese gab, dass es ein histopathologisches Merkmal geben müsse, welches dazu führt, dass auch dünne Melanome schnell metastasieren können (Slingluff et al. 1988). Es gilt jedoch zu beachten, dass damals die Diagnose von dünnen malignen Melanoms häufig erst durch die Metastasierung gestellt wurde. Das Auftreten von Metastasierung bei dünnen regressiven Melanomen, auf die sich die oben genannten Studien beziehen, könnte also eine statistische Koinzidenz und

die Metastasierung eigentlich auf dem Boden eines okkulten Melanoms geschehen sein. Wenn die Autoren nur diejenigen Melanome betrachtet haben, die bisher noch nicht metastasiert waren, ließ sich keine Prognoseverschlechterung durch Vorhandensein einer Regression des Primärmelanoms nachweisen (Slingluff et al. 1988, Shaw et al. 1989, McClain et al. 2012). Trotzdem kommen auch neuere Analysen zu dem Schluss, dass das Vorliegen einer Regression keinen oder sogar einen negativen Einfluss auf die Prognose von Melanompatienten haben könnte (Guitart et al. 2002, Morton et al. 2005, Kruper et al. 2006, Mandala et al. 2009, Burton et al. 2011).

Mitte der 1990er Jahre entstand die Überlegung, dass eine Regression als Indikator für das Vorliegen einer funktionierenden Immunreaktion des Körpers gedeutet werden könnte (Ferradini et al. 1993, Mackensen et al. 1993 und 1994, Wagner et al. 1998). Auch aktuellere Studien unterstützen diese These, indem sie eine Assoziation zwischen der histopathologischen Regression und einem negativen LK-Status, sowie einer verbesserten Prognose von Melanompatienten nachweisen konnten (Kaur et al. 2008, Morris et al. 2008, Ribero et al. 2013, 2015 und 2019, Aung et al. 2017).

Aufgrund der, trotz jahrzehntelanger Forschung, immer noch unklaren Signifikanz der histopathologischen Regression von Melanomen für die Prognose der Patienten, liefert diese Analyse von mehr als 1100 Patienten weitere interessante Daten, basierend auf einer institutsspezifisch einheitlichen und klaren Definition der histopathologischen Regression, die sich an den von Aung und Kollegen definierten Kriterien orientiert (Aung et al. 2017).

Bezüglich der Langzeitprognose dieser Kohorte ergab sich in der univariablen Analyse ein signifikant längeres Rückfallfreies Überleben bei Patienten, deren Melanom eine Regression aufwies, gegenüber Patienten, deren Melanom keine Regression aufwies (Tab. 16: p-Wert 0,00029; HR 0,47 (0,31-0,71)). Dieser Trend zeigte sich auch in der Analyse der 5-Jahres-Rückfallfreie-Überlebensraten. Selbst in der multivariablen Analyse stellte sich die Regression, unter Hinzunahme der anerkannten prognostischen Faktoren, als unabhängiger signifikanter prognostischer Vorteil in Bezug auf das RFS heraus (Tab. 17: p-Wert 0,0078, HR

0,57 (0,38-0,86)), wobei sich dieser Vorteil insbesondere bei dünnen Melanomen nachweisen ließ (Tab. 18). Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Erkenntnissen einer Studie von Ribero et al., in der ein signifikanter Einfluss der Tumordicke auf die histopathologische Regression nachgewiesen werden konnte, woraus eine abnehmende prognostische Aussagekraft der Regression mit zunehmender Tumordicke resultiert (Ribero et al. 2013).

Das Vorhandensein einer Regression spielt bisher keine Rolle in den Empfehlungen der AJCC und der nationalen S3-Leitlinie. Ihre Erhebung wird lediglich empfohlen, hat jedoch keine Auswirkung auf die Klassifikation der Patienten. Dennoch gibt diese Arbeit Hinweise darauf, dass das Vorhandensein einer Regression einen, von den etablierten Risikofaktoren unabhängigen, Prognosefaktor für ein signifikant verlängertes rückfallfreies Überleben von Melanompatienten im Stadium I-III darstellt und unter Umständen in die AJCC-Klassifikation, insbesondere dünner Melanome, einfließen sollte.

Außerdem konnte diese Studie weitere Evidenz generieren, die zeigt, dass Regression hinsichtlich Pathogenese und zur Identifikation immunvermittelter Prozesse im primären kutanen Melanom weiter untersucht werden sollte.

#### 4.4. Prognostischer Einfluss der LDI im Vergleich zur konventionell-pathologischen Aufarbeitung des SN

Des Weiteren hängt die Prognose von Melanompatienten sehr stark von ihrem Lymphknotenstatus ab (Balch et al. 2009, Gershenwald et al. 2017). Eine ungenaue Untersuchung des Wächterlymphknotens kann eine Unterschätzung der Erkrankung des Patienten und das Ausbleiben wichtiger Therapieschritte bedeuten. Deshalb wurde in dieser Studie ein innovatives Verfahren zur quantitativen Untersuchung des Wächterlymphknotens von Melanompatienten untersucht, welches in Tübingen entwickelt wurde.

Die sogenannte Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie, kurz LDI, wird seit 2008 regelhaft in der Dermatologie der Universitätsklinik Tübingen

angewandt, insofern bei der SNB ein SN identifiziert werden kann und dieser groß genug für eine Längsteilung ist, um ihn im Anschluss sowohl konventionell-pathologisch als auch per LDI auf Tumorzellen zu untersuchen. Zuvor wurde das Verfahren von 2000 bis 2008 bei über 1000 Melanompatienten der Universitäts-Hautklinik Tübingen prospektiv erprobt und verifiziert (Ulmer et al. 2014). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Anzahl der auf diese Art identifizierten Tumorzellen (DCCD: engl. disseminated cancer cell density) einen quantitativen unabhängigen Risikofaktor für den Tod darstellt (Ulmer et al. 2014, 2018) und dass ein positives Ergebnis der LDI signifikant mit einem verringerten Gesamtüberleben einhergeht (Ulmer et al. 2005, 2014). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die LDI einen stärkeren Prädiktor für den Tod darstellt, als die konventionell-pathologische Wächterlymphknotenuntersuchung (Ulmer et al. 2005, 2014). Zudem korreliert die Höhe der DCCD mit der Tumordicke des Primarius (Ulmer et al. 2005).

Seit 2008 wurde die LDI in der Universitätsklinik Tübingen, sofern möglich, bei jedem Melanompatienten durchgeführt, dem ein oder mehrere Wächterlymphknoten entnommen wurden. In dieser Dissertation sollte nun die Genauigkeit und prognostische Relevanz der LDI, anhand noch nicht wissenschaftlich analysierter Patientendaten, erneut validiert werden.

Insgesamt konnte in dieser Studie bei 95,7% (n=1411) der durchgeführten SNB ein Wächterlymphknoten identifiziert, gefahrlos entnommen und konventionell-pathologisch untersucht werden, wobei in 11,8% (n=167) der Fälle eine Lymphknotenmetastase nachgewiesen werden konnte. Von den 1411 erfolgreich entnommenen Lymphknoten waren 77,2% groß genug, um geteilt und zusätzlich per LDI untersucht zu werden, wobei in 26,1% der Fälle Tumorzellen, also eine DCCD >0/Mio., nachgewiesen werden konnten.

In der multivariablen Analyse der LDI zusammen Geschlecht, Alter, Tumordicke, Ulzerationsstatus und konventionell-pathologischem Lymphknotenstatus konnte gezeigt werden, dass eine DCCD >10/Mio. einen signifikanten, unabhängigen, prognostischen Faktor in Bezug auf das rückfallfreie Überleben der Patienten darstellte und dass die LDI auch in dieser Kohorte von über 1000

Melanompatienten einen stärkeren Prädiktor für einen Rückfall darstellte, als die konventionelle Untersuchung des SN. (Tab. 22)

Interessanterweise konnte von den 1244 konventionell-pathologisch negativ getesteten Lymphknoten in 180 Fällen (14,5%) in der LDI eine DCCD  $>0/\text{Mio.}$ , also zumindest einzelne Tumorzellen, nachgewiesen werden (Tab. 23). Zur Aufarbeitung dieser Beobachtung wurde im Anschluss eine univariable Analyse aller Patienten, deren Wächterlymphknoten primär negativ getestet wurde, in Bezug auf die DCCD durchgeführt (Tab. 24, Abb. 6). Es zeigte sich, dass jene Patienten mit einer DCCD  $>0/\text{Mio.}$  ein signifikant verkürztes rückfallfreies Überleben (Tab 24: p-Wert  $<0,0001$ ) und eine deutlich reduzierte 5-Jahres-Rückfallfreie-Überlebensrate, gegenüber den Patienten deren LDI ebenfalls negativ ausfiel, aufwiesen (85,1% vs. 91,6%).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie eine sinnvolle Ergänzung zur konventionell-pathologischen Wächterlymphknotenuntersuchung darstellt, da sie 180 Patienten detektieren konnte, deren SN Tumorzellen enthielt, die mit der singulären Verwendung der konventionell-pathologischen Untersuchung nicht detektiert wurden. Außerdem konnte in der multivariablen Cox-Regressionsanalyse gezeigt werden, dass die LDI in dieser Kohorte einen, von der konventionell-pathologischen Lymphknoten-Untersuchung und anderen bekannten Risikofaktoren, unabhängigen signifikanten Risikofaktor für einen Melanom-Rückfall darstellte.

Die LDI ist also ein interessantes Verfahren zur Lymphknotenuntersuchung bei Melanompatienten, das eine Ergänzung zur konventionell-pathologischen SNB darstellt, um mehr Lymphknotenmetastasen, bereits in einem frühen Stadium der Melanom-Erkrankung, zu detektieren, die Tumorlast zu quantifizieren und die Patienten so frühestmöglich optimal einschätzen und behandeln zu können. Sie sollte also zunehmend angewandt werden, um ihre Vorteile gegenüber der konventionellen Untersuchung des SN weiter untersuchen zu können.

## 4.5. Limitationen dieser Studie

Eine potentielle Limitation dieser Studie liegt in ihrem retrospektiven Charakter. Allerdings wurden alle hier erfassten Patienten anhand der gleichen TNM-Klassifikation von 2009 (Balch et al. 2009) klassifiziert und einheitlich behandelt. Die Auswahl der Patienten erfolgte systematisch und unwillkürlich, um Selektionsfehler zu vermeiden. Auch die Tatsache, dass alle hier erfassten Patienten zu Beginn am selben Zeitpunkt ihrer Melanom-Erkrankung, nämlich der SNB, standen und danach nach denselben Richtlinien weiterbehandelt und nachuntersucht wurden, verringert die Fehleranfälligkeit dieser Studie (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Eine weitere potentielle Limitation dieser Studie besteht darin, dass nur Patienten erfasst wurden, die für eine SNB geplant waren, deren Melanom also aufgrund einer erhöhten Tumordicke oder des Vorliegens besonderer Risikofaktoren eine Diagnostik der ableitenden Lymphbahnen notwendig machte. Hierdurch zeigt sich eine, gegenüber dem zentraleuropäischen Mittel von 0,8 mm (Garbe et al. 2000), deutlich erhöhte mediane Tumordicke von 1,80 mm in dieser Kohorte. Außerdem werden Melanome <1 mm Tumordicke häufig im niedergelassenen Bereich rezeziert, konnten also nicht in diesen Datensatz des Universitätsklinikum Tübingen einfließen. Trotzdem wurden in dieser Kohorte 177 Melanome (12%) mit einer Tumordicke  $\leq 1$  mm erfasst und untersucht.

Bezüglich der histopathologischen Untersuchung wurden sowohl die Proben des Primärmelanoms, als auch die Proben der SNB standardisiert nach den gleichen Kriterien befundet und der Befund danach unverändert statistisch erfasst, was einen histopathologischen Bias reduziert.

Bei der Untersuchung des Differentialblutbildes wurden alle Blutproben am Morgen nach der chirurgischen Exzision des Primärmelanoms entnommen und im selben zertifizierten Routinelabor analysiert. Zusätzlich zur Abhängigkeit der Blutbild-Ergebnisse von der Qualität der Blutentnahme, stellt sich die Frage, ob der vorangegangene chirurgische Eingriff Einfluss auf das Differentialblutbild der Patienten gehabt haben könnte. Es ist bekannt, dass nach großen invasiven

Operationen, wie z.B. der Whipple-OP, bereits am Folgetag erhöhte Leukozytenwerte festgestellt werden können (Welsch et al. 2008, Deitmar et al. 2009). Im Gegensatz zu diesen Operationen, mit hoher Morbidität und signifikanter Mortalität, ist die Invasivität einer lokalen Melanom-Exzision auch bei gleichzeitiger Wächterlymphknotenoperation sehr gering (Wagner et al. 2020). Der postoperative mediane Leukozytenwert dieser Patientenkohorte (7175 / $\mu$ l) ist zudem vergleichbar mit dem präoperativer Kohorten, was ebenfalls gegen eine Erhöhung der Leukozyten am ersten postoperativen Tag nach lokaler Tumorexzision spricht (Welsch et al. 2008, Deitmar et al. 2009). Lediglich bei 75 der 1475 Patienten (5,1%) konnte ein erhöhter Leukozytenwert  $>11.000/\mu$ l festgestellt werden. Außerdem wurde die lokale Melanom-Exzision bei allen Patienten in lokaler Tumoreszenanästhesie durchgeführt. Keiner der Patienten erhielt eine Vollnarkose, die zu einer Verschiebung des Differentialblutbildes hätte führen können. Es ist also davon auszugehen, dass die perioperativ entnommenen Blutbildwerte nicht signifikant von der vorausgegangenen Melanom-Exzision beeinflusst wurden. (Wagner et al. 2020)

Die doppelte Untersuchung des Wächterlymphknotens per konventioneller histopathologischer Aufbereitung und zusätzlich per LDI birgt einen Schwachpunkt, da der Lymphknoten hierzu immer geteilt werden muss um beide Untersuchungsmethoden zu ermöglichen. Es ist durchaus denkbar, dass sich zum Beispiel nur in einer Hälfte des Lymphknotens Tumorzellen befinden und die konventionell-pathologische Untersuchung, in den zuvor genannten 180 Fällen, keine SN-Metastase erkennen konnte, da in dieser Hälfte des SN zufällig keine Tumorzellen vorhanden waren. Es wäre allerdings davon auszugehen, dass sich solch unglückliche Lymphknotenteilungen bei 1411 untersuchten Lymphknoten statistisch gleichförmig auf beide Untersuchungen verteilten. Somit müssten auch bei negativer LDI ein zweistelliger Prozentsatz der Lymphknoten konventionell-pathologisch positiv ausgefallen sein. Diese Annahme war jedoch nicht nachzuweisen (Tab. 23: 14,5% vs. 2,6%). Damit ist eine zufällige Mehrzuteilung von tumorzell-haltigen Lymphknoten-Hälften zur LDI-Gruppe als unwahrscheinlich zu erachten.

## 5. Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist einer der häufigsten bösartigen Tumoren in Deutschland, welcher durch seine Neigung früh zu metastasieren und seine steigende Inzidenz eine unberechenbare Gefahr darstellt (Robert-Koch-Institut 2019). Deshalb ist es wichtig, diese Erkrankung anhand von prognostischen Risikofaktoren früh einschätzen und stratifizieren zu können. Nur so können besonders gefährdete Patienten rechtzeitig identifiziert und dementsprechend engmaschig kontrolliert und behandelt werden. Ziel dieser retrospektiven Studie war die Detektion genau solcher Risikofaktoren, die bisher nicht fest in den geltenden Leitlinien verankert sind. Hierzu wurden 1475 Melanompatienten der Stadien I-III analysiert, bei denen in den Jahren 2010 bis 2015 eine SNB in Tübingen erfolgte und deren Krankheitsverlauf bis Juli 2018 beobachtet, wobei sich die Verteilung auf Stadium I (46%) und II (41,4%) als ausgeglichen erwies.

Zunächst wurde der Einfluss der Differentialblutbild-Werte, am Morgen nach der Melanom-Exzision, auf das Outcome der Patienten untersucht. Hierbei stellten sich ein hoher absoluter Neutrophilen- sowie Monozyten-Wert und ein niedriger absoluter Lymphozyten- sowie Eosinophilen-Wert als signifikante Risikofaktoren für ein verkürztes Gesamtüberleben heraus. Anschließend wurde aus diesen Risikofaktoren ein kombinierter Risiko-Score (ADBC-Score) gebildet, der mit jedem vorhandenen Risikofaktor um einen Punkt steigt. Es konnte gezeigt werden, dass in dieser Kohorte ein ADBC-Score  $>1$ , unabhängig von den bekannten Risikofaktoren des Melanoms, signifikant mit einem verkürzten Gesamtüberleben assoziiert war (ADBC-Score =2: p-Wert 0,029; ADBC-Score 3-4: p-Wert  $<0,0001$ ). Bisher konnte eine Korrelation zwischen Patienten-Prognose und dem Differentialblutbild lediglich für Patienten in fortgeschrittenem Tumorstadium nachgewiesen werden. Diese Studie zeigt zum ersten Mal, dass die Höhe bestimmter Differentialblutwerte, insbesondere in Form von Risiko-Scores, signifikant mit dem Gesamtüberleben von Melanompatienten im Stadium I-III korreliert.

Neben dem Differentialblutbild wurde der Einfluss der histopathologischen Regression auf die Prognose der Patienten betrachtet, da dieser seit Jahrzehnten

kontrovers diskutiert wird. Die hier präsentierten Daten zeigen, dass das Vorhandensein einer histopathologischen Regression in den AJCC-Stadien I-III mit einem negativen SN assoziiert ist (p-Wert 0,043) und dass die Regression insbesondere bei dünnen Melanomen ( $\leq 2$  mm) einen signifikanten, von den bekannten Risikofaktoren unabhängigen, Risikofaktor für einen Rückfall im Sinne einer erneuten lokalen oder metastatischen Tumormanifestation darstellt (p-Wert 0,0078). Außerdem konnte in dieser Kohorte erstmals nachgewiesen werden, dass eine Korrelation zwischen Regression und Nävusassoziation von Melanomen besteht (p-Wert  $< 0,0001$ ).

Des Weiteren wurde die LDI als innovatives quantitatives Verfahren zur Untersuchung des SN validiert und auf mögliche Vorteile gegenüber der konventionellen Vorgehensweise überprüft. Zunächst konnte festgestellt werden, dass eine positive LDI einen stärkeren unabhängigen Prädiktor für einen Rückfall im Rahmen der Melanom-Erkrankung darstellt, als ein mittels konventioneller Pathologie untersuchter positiver Wächterlymphknoten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in der konventionellen Lymphknoten-Untersuchung 180 Lymphknoten-Hälften als negativ gewertet wurden, in deren anderer Hälfte jedoch in der LDI Tumorzellen detektiert wurden. Diese 180 Patienten hatten gegenüber den Patienten mit sowohl negativer Pathologie als auch negativer LDI ein signifikant erhöhtes Risiko für einen Rückfall (p-Wert  $< 0,0001$ ), wobei sich eine zufällige Mehrzuteilung von tumorzell-haltigen LK-Hälften zur LDI-Gruppe als unwahrscheinlich herausstellte.

Diese Arbeit hat wichtige klinische, histopathologische und hämatologische Faktoren von Melanomen, früh nach Diagnosestellung, untersucht und konnte einige Faktoren als prognostisch relevant für den Krankheitsverlauf der Patienten identifizieren, die bisher noch nicht Teil der geltenden Klassifikations- bzw. Behandlungsleitlinien sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die LDI eine sinnvolle Ergänzung zur konventionellen histopathologischen SN-Diagnostik darstellt, um auch geringfügige LK-Metastasierungen zuverlässig detektieren bzw. quantifizieren und somit besonders gefährdete Patienten früh identifizieren und behandeln zu können.

## 6. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Wagner NB, Luttermann F, Gassenmaier M, Forschner A, Leiter U, Garbe C, Eigentler TK (2020) Absolute and relative differential blood count predicts survival of AJCC stage I-II melanoma patients scheduled for sentinel lymph node biopsy. *Australas J Dermatol* 61: e310-e318.

Alle beteiligten Autoren haben einer erneuten Veröffentlichung der Daten im Rahmen dieser Dissertation schriftlich zugestimmt.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1) Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch, David CM, Winchester P, Asare EA, Madera M, Gress DM, Meyer LR (2017) AJCC cancer staging manual, Springer International Publishing: New York. 563-585
- 2) Aung PP, Nagarajan P, Prieto VG (2017) Regression in primary cutaneous melanoma: etiopathogenesis and clinical significance. *Lab Invest* 97: 657–668.
- 3) Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF, Soong SJ, Scolyer RA, Watson GF, Colman MH, Zhang Y (2003) Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer* 97: 1488-1498.
- 4) Baisden BL, Askin FB, Lange JR, Westra WH (2000) HMB-45 immunohistochemical staining of sentinel lymph nodes: a specific method for enhancing detection of micrometastases in patients with melanoma. *Am J Surg Pathol* 24: 1140-1146
- 5) Balch CM, Wilkerson JA, Murad TM, Soong S-J, Ingalls AL, Maddox WA (1980) The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. *Cancer* 45(12): 3012-3017.
- 6) Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A (2001) Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 19: 3622-34.
- 7) Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-J, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak CK (2009) Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J Clin Oncol.* 27(36): 6199–6206.
- 8) Bartlett EK, Karakousis GC (2015) Current staging and prognostic factors in melanoma. *Surg Oncol Clin N Am* 24(2): 215–227.
- 9) Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H (2003) Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol* 139(12): 1620-1624.
- 10) Blessing K, McLaren KM, McLean A, Davidson P (1990) Thin malignant melanomas (less than 1.5 mm) with metastasis: a histological study and survival analysis. *Histopathology* 17(5): 389-395.
- 11) Blessing K, McLaren KM (1992) Histological regression in primary cutaneous melanoma: recognition, prevalence and significance. *Histopathology* 20(4): 315-322.
- 12) Botella-Estrada R, Traves V, Requena C, Guillen-Barona C, Nagore E (2014) Correlation of histologic regression in primary melanoma with sentinel node status. *JAMA Dermatol* 150(8): 828-835.

- 13) Bottger D, Dowden RV, Kay PP (1992) Complete spontaneous regression of cutaneous primary malignant melanoma. *Plast Reconstr Surg* 89(3): 548-553.
- 14) Breslow RA (1970) Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172(5): 902–908
- 15) Breslow RA, Alberg AJ, Helzlsouer KJ, Bush TL, Norkus EP, Morris JS, Spate VE, Comstock GW (1995) Serological precursors of cancer: malignant melanoma, basal and squamous cell skin cancer, and prediagnostic levels of retinol, beta- carotene, lycopene, alpha-tocopherol, and selenium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4: 837-42.
- 16) Burton AL, Gilbert J, Farmer RW, Stromberg AJ (2011) Regression does not predict nodal metastasis or survival in patients with cutaneous Melanoma. *Am Surg* 77(8): 1009-1013.
- 17) Cananzi FCM, Dalgleish A, Mudan S (2014) Surgical management of intraabdominal metastases from melanoma: role of the neutrophil to lymphocyte ratio as a potential prognostic factor. *World J Surg.* 38(6): 1542-1550.
- 18) Carli P, Massi D, Santucci M, Biggeri A, Giannotti B. (1999) Cutaneous melanoma histologically associated with a nevus and melanoma de novo have a different profile of risk: results from a case-control study. *J Am Acad Dermatol* 40(4): 549-557
- 19) Carretero R, Sektioglu IM, Garbi N, Salgado OC, Beckhove P, Hammerling GJ (2015) Eosinophils orchestrate cancer rejection by normalizing tumor vessels and enhancing infiltration of CD8(+) T cells. *Nat Immunol* 16(6): 609-617.
- 20) Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC (1969) The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 29: 705-27.
- 21) Clark WH Jr., Elder DE, Guerry D, Braitman LE, Trock J, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC (1989) Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 81(24): 1893-1904.
- 22) Cochran AJ, Wen DR, Herschman HR (1984) Occult melanoma in lymph nodes detected by antiserum to S100 protein. *Int J Cancer* 34: 159-163
- 23) Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917): 860-867.
- 24) Danilova L, Wang H, Sunshine J, Kaunitz GJ, Cottrell TR, Xu H, Esandrio J, Anders RA, Cope L, Pardoll DM, Drake CG, Taube JM (2016) Association of PD-1/PD-L axis expression with cytolytic activity, mutational load, and prognosis in melanoma and other solid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(48): e7769-e7777.
- 25) Davis JL, Langan RC, Panageas KS, Zheng J, Postow MA, Brady MS, Ariyan C, Coit DG (2017) Elevated blood neutrophil-to-lymphocyte ratio: a readily available biomarker associated with death due to disease in high risk nonmetastatic melanoma. *Ann Surg Oncol* 24(7): 1989-1996.

- 26) Deitmar S, Anthoni C, Palmes D, Haier J, Senninger N, Brüwer M (2009) Are leukocytes and CRP early indicators for anastomotic leakage after esophageal resection? *Zentralbl Chir* 134: 83-89.
- 27) Delyon J, Mateus C, Lefeuvre D, Lanoy E, Zitvogel L, Chaput N, Roy S, Eggermont AM, Routier E, Robert C (2013) Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: an early increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. *Ann Oncol* 24(6): 1697-1703.
- 28) Di Giacomo AM, Calabrò L, Danielli R, Fonsatti E, Bertocci E, Pesce I, Fazio C, Cutaia O, Giannarelli D, Miracco C, Biagioli M, Altomonte M, Maio M (2013) Long-term survival and immunological parameters in metastatic melanoma patients who responded to ipilimumab 10 mg/kg within an expanded access programme. *Cancer Immunol Immunother.* 62(6): 1021-1028.
- 29) Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ (2014) Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol* 15(11): e493-503.
- 30) Dodds TJ, Wilmott JS, Jakkett LA, Lo SN, Long GV, Thomson JF, Scolyer RA (2019) Primary anorectal melanoma: clinical, immunohistology and DNA analysis of 43 cases. *Pathology* 51(1): 39-45.
- 31) Donskov F (2013) Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. *Semin Cancer Biol* 23: 200–207.
- 32) Eigentler TK, Mühlenbein C, Follmann M, Schadendorf D, Garbe C (2017) S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms - Update 2015/2016, Kurzversion 2.0. *J. Dtsch Dermatol Ges* 15: e1–41.
- 33) Elder DE, Gimotty PA, Guerry D (2005) Cutaneous melanoma: estimating survival and recurrence risk based on histopathologic features. *Dermatol Ther* 18(5): 369-385.
- 34) Emanuel PO, Mannion M, Phelps RG (2008) Complete regression of primary malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 30(2): 178-181.
- 35) Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, Andtbacka RH, Mozzillo N, Zager JS, et al. (2017) Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med* 376(23): 2211-2222
- 36) Ferradini L, Mackensen A, Genevee C, Bosq J, Duvillard P, Avril MF, Hercend T (1993) Analysis of T cell receptor variability in tumor-infiltrating lymphocytes from a human regressive melanoma. Evidence for in situ T cell clonal expansion. *J Clin Invest* 91(3): 1183-1190.
- 37) Ferrucci PF, Gandini S, Battaglia A, Alfieri S, Di Giacomo AM, Giannarelli D, Cappellini GC, De Galitiis F, Marchetti P, Amato G, LAzzeri A, Pala L, Cocorocchio E, Martinoli C (2015) Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with outcome of ipilimumab-treated metastatic melanoma patients. *Br J Cancer* 112(12): 1904-1910.
- 38) Ferrucci PF, Ascierto PA, Pigozzo J, Del Vecchio M, Maio M, Antonini Cappellini GC, Guidoboni M, Queirolo P, Savoia P, Mandala M, Simeone E, Valpione S, Altomonte M, Spagnolo F, Cocorocchio E,

- Gandini S, Giannarelli D, Martinoli C (2016) Baseline neutrophils and derived neutrophil-to-lymphocyte ratio: prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab. *Ann Oncol* 27(4): 732-738.
- 39) Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12(4): 253-68.
- 40) Gandini S, Ferrucci PF, Botteri E, Tosti G, Barberis M, Pala L, Battaglia A, Spadola G, Coccorocchio E, Martinoli C (2016) Prognostic significance of hematological profiles in melanoma patients. *Int J Cancer* 139(7): 1618-1625.
- 41) Garbe C, Schaumburg-Lever G (1997) Klinik und Histologie des malignen Melanoms, In: Garbe, C., Dummer, R., Kaufmann, R., Tilgen, W.: *Dermatologische Onkologie*, 1. Auflage, Springer: Berlin, Heidelberg, New York. 247-270
- 42) Garbe C, McLeod GR, Buettner PG (2000) Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer* 89: 1269–1278.
- 43) Gebhardt C, Sevko A, Jiang H, Lichtenberger R, Reith M, Tarnanidis K, Holland-Letz T, Umansky L, Beckhove P, Sucker A, Schadendorf D, Utikal J, Umansky V (2015) Myeloid cells and related chronic inflammatory factors as novel predictive markers in melanoma treatment with Ipilimumab. *Clin Cancer Res* 21(24): 5453-5459.
- 44) Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, Lazar AJ, Faries MB, Kirkwood JM, McArthur GA, Haydu LE, Eggermont AMM, Flaherty KT, Balch CM, Thompson JF (2017) Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin* 67: 472-492.
- 45) Gromet MA, Epstein WL, Blois MS (1978) The regressing thin malignant melanoma: a distinctive lesion with metastatic potential. *Cancer* 42(5): 2282-2292.
- 46) Guitart J, Lowe L, Piepkorn M, Prieto M, Rapkin MS, Ronan SG, Shea CR, Tron VA, White W, Barnhill RL (2002) Histological characteristics of metastasizing thin melanomas: a case–control study of 43 cases. *Arch Dermatol* 138: 603–608.
- 47) Haenssle HA, Mograby N, Ngassa A, Buhl T, Emmert S, Schön MP, Rosenberger A, Bertsch HP (2016) Association of Patient Risk Factors and Frequency of Nevus-Associated Cutaneous Melanomas. *JAMA Dermatology* 152(3):291-298.
- 48) Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-674.
- 49) High WA, Stewart D, Wilbers CR, Cockerell CJ, Hoang MP, Fitzpatrick JE (2005) Completely regressed primary cutaneous malignant melanoma with nodal and/or visceral metastases: a report of 5 cases and assessment of the literature and diagnostic criteria. *J Am Acad Dermatol* 53(1): 89-100.
- 50) Kaddu S, Smolle J, Zenahlik P, Hofmann-Wellenhof R, Kerl H (2002) Melanoma with benign melanocytic naevus components: reappraisal of

- clinicopathological features and prognosis. *Melanoma Res* 12(3): 271-278.
- 51) Karakousis GC, Gimotty PA, Botbyl JD, Kesmodel SB, Elder DE, Elenitsas R, Ming ME, Guerry D, Fraker DL, Czerniecki BJ, Spitz FR (2006) Predictors of regional nodal disease in patients with thin melanomas. *Ann Surg Oncol* 13: 533-541.
  - 52) Kaur C, Thomas RJ, Desai N, Green MA, Lovell D, Powell BW, Cook MG (2008) The correlation of regression in primary melanoma with sentinel lymph node status. *J Clin Pathol* 61: 297-300.
  - 53) Kelly JW, Sagebiel RW, Blois MS (1985) Regression in malignant melanoma. A histologic feature without independent prognostic significance. *Cancer* 56(9): 2287-2291.
  - 54) Kesmodel SB, Karakousis GC, Botbyl JD, Canter RJ, Lewis RT, Wahl PM, Terhune KP, Alavi A, Elder DE, Ming ME, Guerry D, Gimotty PA, Fraker DL, Czerniecki BJ, Spitz FR (2005) Mitotic rate as a predictor of sentinel lymph node positivity in patients with thin melanomas. *Ann Surg Oncol*, 12: 449-58.
  - 55) Kibrite A, Milot H, Douville P, Gagne EJ, Labonte S, Friede J, Morin F, Ouellet JF, Claveau J (2016) Predictive factors for sentinel lymph nodes and non-sentinel lymph nodes metastatic involvement: a database study of 1,041 melanoma patients. *Am J Surg* 211(1): 89-94.
  - 56) Kleine TO, Benes L, Zöfel P (2003) Studies of the brain specificity of S100B and neuro-specific enolase (NSE) in blood serum of care patients. *Brain Res Bull* 61:265–279
  - 57) Kruper LL, Spitz FR, Czerniecki BJ, Fraker DL, Blackwood-Chirchir A, Ming ME, Elder DE, Elenitsas R, Guerry D, Gimotty PA (2006) Predicting sentinel node status in AJCC stage I/II primary cutaneous melanoma. *Cancer* 107(10): 2436-2445.
  - 58) Kumagai S, Marumo S, Shoji T, Sakuramoto M, Hirai T, Nishimura T, Arima N, Fukui M, Huang C-I (2014) Prognostic Impact of Preoperative Monocyte Counts in Patients with Resected Lung Adenocarcinoma. *Lung Cancer* 85: 457-464.
  - 59) Kunte C, Geimer T, Baumert J, Konz B, Volkenandt M, Flaig M, Ruzicka T, Berking C, Schmid-Wendtner M-H (2010) Prognostic factors associated with sentinel lymph node positivity and effect of sentinel status on survival: an analysis of 1049 patients with cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 20(4): 330-337
  - 60) Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CJ, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, Carlino MS, Haanen JB, Maio M, Marquez-Rodas I, McArthur GA, Ascierto PA, Long GV, Callahan MK, Postow MA, Grossmann K, Sznol M, Dreno B, Bastholt L, Yang A, Rollin LM, Horak C, Hodi FS, Wolchok JD (2015) Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 373(1): 23-34.
  - 61) Lauss M, Donia M, Harbst K, Andersen R, Mitra S, Rosengren F, Salim M, Vallon-Christersson J, Törngren T, Kvist A, Ringnér M, Svane IM, Jönsson G (2017) Mutational and putative neoantigen load predict

- clinical benefit of adoptive T cell therapy in melanoma. *Nat Commun* 8(1): 1738.
- 62) LeBoit, PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A (2006) *Pathology and Genetics of Skin Tumours*. 3rd Edition, Volume 6, Lyon: IARC Press - WHO. 14-100.
  - 63) Lee JC, Mehdizadeh S, Smith J, Young A, Mufazalov IA, Mowery CT, Daud A, Bluestone JA (2020) Regulatory T cell control of systemic immunity and immunotherapy response in liver metastasis. *Science Immunology* 5(52).
  - 64) Leitch EF, Chakrabarti M, Crozier JE, McKee RF, Anderson JH, Horgan PG, McMillan DC (2007) Comparison of the prognostic value of selected markers of the systemic inflammatory response in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 97(9): 1266-1270.
  - 65) Leiter U, Stadler R, Mauch C, Hohenberger W, Brockmeyer N, Berking C, et al. (2016) Complete lymph node dissection versus no dissection in patients with sentinel lymph node biopsy positive melanoma (DeCOG-SLT): a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 17(6): 757-767.
  - 66) Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 1.0 (2013) AWMF Registernummer: 032-024OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/melanom/> (abgerufen am: 19.04.2021)
  - 67) Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.3 (2020) AWMF Registernummer: 032/024OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/melanom/> (abgerufen am: 19.04.2021)
  - 68) Lino-Silva LS, Salcedo-Hernandez RA, Garcia-Perez L, Meneses-Garcia A, Zepeda-Najar C (2017) Basal neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with overall survival in melanoma. *Melanoma Res* 27(2): 140-144.
  - 69) Ma MW, Medicherla RC, Qian M, de Miera EV, Friedman E, Berman RS, Shapiro RL, Pavlick AC, Ott PA, Bhardwaj N, Shao Y, Osman I, Darvishian F (2012) Immune response in melanoma: an in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymph node. *Mod Pathol* 25: 1000–1010.
  - 70) Mackensen A, Ferradini L, Carcelain G, Triebel F, Faure F, Viel S, Hercend T (1993) Evidence for in situ amplification of cytotoxic T-lymphocytes with antitumor activity in a human regressive melanoma. *Cancer Res* 53(15): 3569-3573.
  - 71) Mackensen A, Carcelain G, Viel S, Raynal MC, Michalaki H, Triebel F, Bosq J, Hercend T (1994) Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma. *J Clin Invest* 93(4): 1397-1402.
  - 72) Mandala M, Imberti GL, Piazzalunga D, Belfiglio M, Labianca R, Barberis L, Marchesi L, Poletti P, Bonomi L, Novellino L, Di Biagio K, Guerra U, Tondini C (2009) Clinical and histopathological risk factors to

- predict sentinel lymph node positivity, disease-free and overall survival in clinical stages I-II AJCC skin melanoma: outcome analysis from a single-institution prospectively collected database. *Eur J Cancer* 45(14): 2537-2545.
- 73) Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Geukes Foppen M, Yuan J, Postow MA, Wong P, Romano E, Khammari A, Dreno B, Capone M, Ascierto PA, Di Giacomo AM, Maio M, Schilling B, Sucker A, Schadendorf D, Hassel JC, Eigentler TK, Martus P, Wolchok JD, Blank C, Pawelec G, Garbe C, Weide B (2016) Baseline peripheral blood biomarkers associated with clinical outcome of advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Clin Cancer Res* 22(12): 2908-2918.
  - 74) Massi D, Carli P, Franchi A, Santucci M (1999) Naevus-associated melanomas: cause or chance? *Melanoma research* 9(1): 85-91.
  - 75) McClain SE, Shada AL, Barry M, Patterson JW, Slingluff CL Jr (2012) Outcome of sentinel lymph node biopsy and prognostic implications of regression in thin malignant melanoma. *Melanoma Res* 22(4): 302-309.
  - 76) McMasters KM, Wong SL, Edwards MJ, Ross MI, Chao C, Noyes RD, Viar V, Cerrito PB, Reintgen DS (2001) Factors that predict the presence of sentinel lymph node metastasis in patients with melanoma. *Surgery* 130(2): 151-156.
  - 77) Messina JL, Glass LF, Cruse CW, Berman C, Ku NK, Reintgen DS (1999) Pathologic examination of the sentinel lymph node in malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 23: 686-690
  - 78) Moreira A, Leisgang W, Schuler G, Heinzerlinger L (2017) Eosinophilic count as a biomarker for prognosis of melanoma patients and its importance in the response to immunotherapy. *Immunotherapy* 9: 115-121.
  - 79) Morris KT, Busam KJ, Bero S, Patel A, Brady MS (2008) Primary cutaneous melanoma with regression does not require a lower threshold for sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg Oncol* 15(1): 316-322
  - 80) Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm K, Fosshag LJ, Cochran AJ (1992) Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 127: 392-399
  - 81) Morton DL, Thompson JF, Essner R, Elashoff R, Sern SL, Nieweg OE, Roses DF, Karakousis CP, Mozzillo N, Reintgen D, Wang HJ, Glass EC, Cochran AJ (1999) Validation of the accuracy of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early-stage melanoma. *Ann Surg* 230: 453-465
  - 82) Morton DL, Cochran AJ, Thompson JF, Elashoff R, Essner R, Glass EC, Mozzillo N, Nieweg OE, Roses DF, Hoekstra HJ, Karakousis CP, Reintgen DS, Coventry BJ, Wang H-J (2005) Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. *Ann Surg* 242: 302-311.
  - 83) Naruns PL, Nizze JA, Cochran AJ, Lee MB, Morton DL (1986) Recurrence potential of thin primary melanomas. *Cancer* 57(3): 545-548.

- 84) Nishijima TF, Muss HB, Shachar SS, Tamura K, Takamatsu Y (2015) Prognostic value of Lymphozyten-zu-Monozyten-Ratio-monocyte ratio in patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 41(10): 971-978.
- 85) Pack GT, Miller TR (1961) Metastatic melanoma with indeterminate primary site. Report of two instances of long-term survival. *JAMA* 176: 55-56.
- 86) Paladugu RR, Yonemoto RH (1983) Biologic behavior of thin malignant melanomas with regressive changes. *Arch Surg* 118(1): 41-44.
- 87) Pampena R, Kyrgidis A, Lallas A, Moscarella E, Argenziano G, Longo C (2017) A meta-analysis of nevus-associated melanoma: Prevalence and practical implications. *J Am Acad Dermatol.* 77(5): 938-945 e934.
- 88) R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/> (abgerufen am: 19.04.2021)
- 89) Requena C, Botella-Estrada R, Traves V, Nagore E, Almenar S, Guillen C. (2009) Problems in defining melanoma regression and prognostic implication. *Actas Dermosifiliogr* 100(9): 759-766.
- 90) Rhodes AR, Harrist TJ, Day CL, Mihm Jr MC, Fitzpatrick TB, Sober AJ (1983) Dysplastic melanocytic nevi in histologic association with 234 primary cutaneous melanomas. *J Am Acad Dermatol* 9(4): 563-574.
- 91) Ribero S, Quaglino P, Osella-Abate S, Sanlorenzo M, Senetta R, Macri L, Savoia P, Macripo G, Sapino A, Bernego MG (2012) Relevance of multiple basin drainage and primary histologic regression in prognosis of trunk melanoma patients with negative sentinel lymph nodes. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 27: 1132–1137.
- 92) Ribero S, Osella-Abate S, Sanlorenzo M, Savoia P, Astrua C, Cavaliere G, Tomasini C, Senetta R, Macripo G, Bernengo MG, Quaglino P (2013) Favourable prognostic role of regression of primary melanoma in AJCC stage I-II patients. *Br J Dermatol* 169: 1240-1245.
- 93) Ribero S, Gualano MR, Osella-Abate S, Scaioli G, Bert F, Sanlorenzo M, Balagna E, Fierro MT, Macripo G, Sapino A, Siliquini R, Quaglino P (2015) Association of Histologic Regression in Primary Melanoma With Sentinel Lymph Node Status: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol* 151(12): 1301-1307.
- 94) Ribero S, Moscarella E, Ferrara G, Piana S, Argenziano G, Longo C (2016) Regression in cutaneous melanoma: a comprehensive review from diagnosis to prognosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 30(12): 2030-2037.
- 95) Ribero S, Galli F, Osella-Abate S, Bertero L, Cattaneo L, Merelli B, Tondini C, Ghilardi L, De Giorgi V, Occelli M, Quaglino P, Cassoni P, Palmieri G, Massi D, Mandala M (2019) Prognostic impact of regression in patients with primary cutaneous melanoma >1 mm in thickness. *J Am Acad Dermatol* 80(1): 99-105.
- 96) Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2019) Krebs in Deutschland 2015/2016. 64-67. DOI: 10.25646/5977.2

- 97) Rochet NM, Kottschade LA, Grotz TE, Porrata LF, Markovic SN (2015) The prognostic role of the preoperative absolute lymphocyte count and absolute monocyte count in patients with resected advanced melanoma. *Am J Clin Oncol.* 38(3): 252-258.
- 98) Ronan SG, Eng AM, Briele HA, Shioura NN, Das Gupta TK (1987) Thin malignant melanomas with regression and metastases. *Arch Dermatol* 123(10): 1326-1330.
- 99) Sagebiel RW (1993) Melanocytic nevi in histologic association with primary cutaneous melanoma of superficial spreading and nodular types: effect of tumor thickness. *J Invest Dermatol.* 100(3): 322-325.
- 100) Savoia P, Fava P, Caliendo V, Osella-Abate S, Ribero S, Quaglino P, Macripo G, Bernengo MG (2012) Disease progression in melanoma patients with negative sentinel lymph node: does false-negative specimens entirely account for this phenomenon? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 26: 242–248.
- 101) Schmidt H, Bastholt L, Geertsen P, Christensen IJ, Larsen S, Gehl J, von der Maase H (2005) Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. *Br J Cancer* 93: 273–278.
- 102) Schmidt H, Suci S, Punt CJ, Gore M, Kruit W, Patel P, Lienard D, von der Maase H, Eggermont AM, Keilholz U (2007) Pretreatment levels of peripheral neutrophils and leukocytes as independent predictors of overall survival in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV Melanoma: results of the EORTC 18951 Biochemotherapy Trial. *J Clin Oncol* 25(12): 1562-1569.
- 103) Shai A, Avinoach I, Sagi A (1994) Metastatic malignant melanoma with spontaneous and complete regression of the primary lesion. Case report and review of the literature. *J Dermatol Surg Oncol* 20(5): 342-345.
- 104) Shaw HM, McCarthy SW, McCarthy WH, Thompson JF, Milton GW (1989) Thin regressing malignant melanoma: significance of concurrent regional lymph node metastases. *Histopathology* 15: 257–65.
- 105) Skender-Kalnenas TM, English DR, Heenan PJ (1995) Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma? *Journal of the American Academy of Dermatology* 33(6): 1000-1007.
- 106) Slingluff CL Jr, Vollmer RT, Reintgen DS, Seigler HF (1988) Lethal "thin" malignant melanoma. Identifying patients at risk. *Ann Surg* 208(2): 150-161.
- 107) Smith JL Jr, Stehlin JS Jr (1965) Spontaneous regression of primary malignant melanomas with regional metastases. *Cancer* 18(11): 1399-1415.
- 108) Sondergaard K, Hou-Jensen K (1985) Partial regression in thin primary cutaneous malignant melanomas clinical stage I. A study of 486 cases. *Virchows Arch* 408(2-3): 241-247.
- 109) Stolz W, Schmoeckel C, Landthaler M, Braun-Falco O (1989) Association of early malignant melanoma with nevocytic nevi. *Cancer* 63(3): 550-555.

- 110) Suciú S, Eggermont AMM, Lorigan P, Kirkwood JM, Markovic SN, Garbe C, Cameron D, Kotapati S, Chen TT, Wheatley K, Ives N, De Schaetzen G, Efendi A, Buyse M (2018) Relapse-Free Survival as a Surrogate for Overall Survival in the Evaluation of Stage II-III Melanoma Adjuvant Therapy. *J Natl Cancer Inst* 110(1).
- 111) Templeton AJ, Ace O, McNamara MG, Al-Mubarak M, Vera-Badillo FE, Hermanns T, Seruga B, Ocana A, Tannock IF, Amir E (2014) Prognostic role of platelet to lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23(7): 1204-1212.
- 112) Testori A, De Salvo GL, Montesco MC, Trifiro G, Mocellin S, Landi G, Macripo G, Carcoforo P, Ricotti G, Giudice G, Picciotto F, Donner D, Di Filippo F, Soteldo J, Casara D, Schiavon M, Vecchiato A, Pasquali S, Baldini F, Mazzarol G, Rossi CR (2009) Clinical considerations on sentinel node biopsy in melanoma from an Italian multicentric study on 1313 patients (SOLISM-IMI). *Ann Surg Oncol* 16: 2018–2027.
- 113) Ulmer A, Fischer JR, Schanz S, Sotlar K, Breuninger H, Fierlbeck G, Klein CA (2005) Detection of melanoma cells displaying multiple genomic changes in histopathologically negative sentinel lymph nodes. *Clin Cancer Res* 11: 5425–5432.
- 114) Ulmer A, Dietz K, Hodak I, Polzer B, Scheitler S, Yildiz M, Czyz Z, Lehnert P, Fehm T, Hafner C, Schanz S, Röcken M, Garbe C, Breuninger H, Fierlbeck G, Klein CA (2014) Quantitative Measurement of Melanoma Spread in Sentinel Lymph Nodes and Survival. *PLoS Med* 11(2): e1001604.
- 115) Ulmer A, Dietz K, Werner-Klein M, Hafner HM, Schulz C, Renner P, Weber F, Breuninger H, Röcken M, Garbe C, Fierlbeck G, Klein CA (2018) The sentinel lymph node spread determines quantitatively melanoma seeding to non-sentinel lymph nodes and survival. *Eur J Cancer* 91: 1-10.
- 116) Valpione S, Martinoli C, Fava P, Mocellin S, Campana LG, Quaglino P, Ferrucci PF, Pigozzo J, Testori A, Chiarion-Sileni V (2015) Personalised medicine: Development and external validation of a prognostic model for metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Eur J Cancer* 51(14): 2086-2094.
- 117) Wagner NB, Luttermann F, Gassenmaier M, Forschner A, Leiter U, Garbe C, Eigentler TK (2020) Absolute and relative differential blood count predicts survival of AJCC stage I-II melanoma patients scheduled for sentinel lymph node biopsy. *Australas J Dermatol* 61: e310-e318.
- 118) Wagner SN, Schultewolter T, Wagner C, Briedigkeit L, Becker JC, Kwasnicka HM, Goos M (1998) Immune response against human primary malignant melanoma: a distinct cytokine mRNA profile associated with spontaneous regression. *Lab Invest* 78(5): 541-550.
- 119) Weide B, Martens A, Hassel JC, Berking C, Postow MA, Bisschop K, Simeone E, Mangana J, Schilling B, Di Giacomo AM, Brenner N, Kähler K, Heinzerling L, Gutzmer R, Bender A, Gebhardt C, Romano E, Meier F, Martus P, Maio M, Blank C, Schadendorf D, Dummer R, Ascierto PA, Hossers G, Garbe C, Wolchok JD (2016) Baseline biomarkers for

- outcome of melanoma patients treated with pembrolizumab. *Clin. Cancer Res.* 22: 5487-5496.
- 120) Welsch T, Frommhold K, Hinz U, Weigand MA, Kleeff J, Friess H, Büchler MW, Schmidt J (2008) Persisting elevation of C-reactive protein after pancreatic resections can indicate developing inflammatory complications. *Surgery* 143: 20-28.
- 121) White RL Jr, Ayers GD, Stell VH, Ding S, Gershenwald JE, Salo JC, Pockaj BA, Essner R, Faries M, Charney KJ, Avisar E, Hauschild A, Egberts F, Averbook BJ, Garberoglio CA, Vetto JT, Ross MI, Chu D, Trisal V, Hoekstra H, Whitman E, Wanebo HJ, Debonis D, Vezeridis M, Chevinsky A, Kashani-Sabet M, Shyr Y, Berry L, Zhao Z, Soong S-J, Leong SP (2011) Factors predictive of the status of sentinel lymph nodes in melanoma patients from a large multicenter database. *Ann Surg Oncol* 18: 3593–3600.
- 122) World Health Organization (2017) Ultraviolet (UV) Radiation and skin cancer: Q&A, URL: [https://www.who.int/news-room/q-a-detail/ultraviolet-\(uv\)-radiation-and-skin-cancer](https://www.who.int/news-room/q-a-detail/ultraviolet-(uv)-radiation-and-skin-cancer) (abgerufen am: 19.04.2021)
- 123) Yonick DV, Ballo RM, Kahn E, Dahiya M, Yao K, Godellas C, Shoup M, Aranha GV (2011) Predictors of positive sentinel lymph node in thin melanoma. *Am J Surg* 201: 324-7; discussion 327-8.
- 124) Yu J, Green MD, Li S, Sun Y, Journey SN, Choi JE, Rizvi SM, Qin A, Waninger JJ, Lang X, Chopra Z, El Nagga I, Zhou J, Bian Y, Rosen BS, Su F, Narayanan SP, Cao X, Wie S, Szeliga W, Vatan L, Mayo C, Morgan MA, Schonewolf CA, Cuneo K, Kryczek I, MA VT, Lao CD, Lawrence TS, Ramnath N, Wen F, Chinnaiyan AM, Cieslik M, Alva A, Zou W (2021) Liver metastasis restrains immunotherapy efficacy via macrophage-mediated T cell elimination. *Nat Med* 27(1): 152-164.
- 125) Zaragoza J, Caille A, Beneton N, Bens G, Christiann F, Maillard H, Machet L (2016) High neutrophil to lymphocyte ratio measured before starting ipilimumab treatment is associated with reduced overall survival in patients with melanoma. *Br J Dermatol* 174(1): 146-151.
- 126) Zubovits J, Buzney E, Yu L, Duncan LM (2004) HMB-45, S-100, NK1/C3 and MART-1 in metastatic melanoma. *Hum Pathol* 35(2): 217-223

## 8. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Zentrum für Dermatoonkologie des Universitätsklinikum Tübingen, unter Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Thomas Kurt Eigentler und Herrn Dr. Nikolaus Benjamin Wagner, durchgeführt.

Alle Patienten denen zwischen 2010 und 2015 an der Universitätsklinik Tübingen, aufgrund eines malignen Melanoms, der Wächterlymphknoten entnommen wurde, wurden hinsichtlich ihrer klinischen und epidemiologischen Daten durch Auswertung der digitalen Patientenakten erhoben und anonymisiert in einer Datenbank zusammengetragen. Hierbei wurden 665 der 1475 Datensätze aus Vorarbeiten von Herrn Dr. Nikolaus Wagner übernommen.

Die Konzeption dieser Studie erfolgte von mir in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Nikolaus Benjamin Wagner.

Die statistische Auswertung wurde selbstständig von mir, unter Anleitung von Herrn Dr. Nikolaus Benjamin Wagner, durchgeführt.

Teile dieser Dissertation sind zusätzlich Teil einer Publikation im Australasian Journal of Dermatology: Wagner NB, Luttermann F, Gassenmaier M, Forscher A, Leiter U, Garbe C, Eigentler TK (2020) Absolute and relative differential blood count predicts survival of AJCC stage I-II melanoma patients scheduled for sentinel lymph node biopsy. Australas J Dermatol 61: e310-e318.

Aufgrund meines Beitrages in der Sammlung und Auswertung der Patientendaten wurde mir die Zweitautorenschaft zugestanden.

Ich versichere, dieses Manuskript selbstständig, nach Anleitung durch meinen Doktorvater Prof. Dr. Thomas Kurt Eigentler und meinen Betreuer Dr. Nikolaus Benjamin Wagner, verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den 13.05.2021

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen und Institutionen bedanken, die mir mein Studium und die Vollendung dieser Dissertation ermöglicht haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Thomas Eigentler für die Möglichkeit der Promotion an der Dermatookologie des Universitätsklinikums Tübingen und die kollegiale Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation bedanken.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Nikolaus Wagner für die interessante Promotions-Thematik, die hervorragend zuverlässige Betreuung meiner Promotion und die Unterstützung in der Anfertigung der statistischen Berechnungen sowie der Dissertationsschrift bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Koautoren der aus diesen Daten hervorgegangenen Publikation bedanken, die einer erneuten Veröffentlichung im Rahmen dieser Dissertation freundlicherweise zugestimmt haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Universitäts-Hautklinik Tübingen für ihre Freundlichkeit und den kollegialen Umgang in der Zeit der Datenakquise.

Auch der Universität Tübingen möchte ich danken, für die schöne Zeit und tolle Ausbildung sowie für die Bereitstellung der vielen Ressourcen, die für die reibungslose Anfertigung einer solchen Arbeit unerlässlich sind.

Besonderer Dank gilt natürlich meiner tollen Familie, die mir mein Studium überhaupt erst ermöglicht hat und die mich schon mein ganzes Leben in der Erfüllung all meiner Wünsche unterstützt. Auch bei diesem Wunsch fungierte sie als stete Quelle der Unterstützung, Motivation sowie Innovation und nicht zuletzt als seelischer Beistand.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Lebensgefährtin Elisabeth für die Zuneigung, Geduld, Unterstützung und gelegentliche Aufmunterung bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Bettina und Robert bedanken, die durch ihre Unterstützung seelischer, grammatischer und nicht zuletzt kulinarischer Art ebenfalls großen Anteil an dem Gelingen dieses Projekts hatten.