

Aus dem  
Department für Frauengesundheit Tübingen  
Universitäts-Frauenklinik

**Histopathologisches Ultrastaging zur Detektion  
positiver Sentinel-Lymphknoten in der Therapie des  
Endometriumkarzinoms**

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

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

**vorgelegt von**

**Moltenbrey, Lara Marie geb. Baudoux**

**2023**



Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Kommos

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Schürch

Tag der Disputation: 20.6.2023

Für Matthias. Und für meine Familie.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Endometriumkarzinom .....	1
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Histologie .....	1
1.1.3	Grading .....	2
1.1.4	Stadieneinteilung .....	2
1.1.5	Risikoklassifikation .....	3
1.1.6	Klinik und Diagnostik .....	5
1.1.7	Therapie und Prognose .....	6
1.2	Sentinel-Lymphknoten-Biopsie .....	6
1.2.1	Hintergrund .....	6
1.2.2	SNB beim Endometriumkarzinom .....	8
1.3	Ultrastaging .....	9
1.3.1	Hintergrund .....	9
1.3.2	Ultrastaging in der Therapie des Endometriumkarzinoms .....	11
1.4	Fragestellung .....	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1	Studienkollektiv .....	14
2.1.1	Ethikvotum .....	14
2.1.2	Ein- und Ausschlusskriterien .....	14
2.1.3	Datenmanagement .....	15
2.2	Lymphknotenaufarbeitung – histopathologisches Ultrastaging .....	15
2.2.1	Vorarbeiten .....	15
2.2.2	Anfertigen von Stufenschnitten .....	16
2.2.3	HE-Färbung .....	18
2.2.4	Immunhistochemische Färbung .....	19
2.2.4.1	Allgemeine Vorbemerkung .....	19
2.2.4.2	Färbeprotokoll .....	20
2.3	Auswertung .....	21
2.3.1	mikroskopische Begutachtung .....	21
2.3.2	IHC-Färbung .....	22
2.3.3	Statistische Methoden .....	23

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>24</b>
3.1	Studienkollektiv .....	24
3.1.1	Zusammenstellung des Studienkollektivs .....	24
3.1.2	Charakteristika des Studienkollektivs.....	25
3.1.3	Ergebnis nach primärer LK-Diagnostik .....	27
3.2	Histopathologisches Ultrastaging.....	28
3.2.1	Ergebnis der Akten- und Archivrecherche .....	28
3.2.2	Gruppe A: Zweitbegutachtung.....	29
3.2.3	Gruppe B: Stufenschnitte und Immunhistochemie.....	30
3.3	Korrelation von Lymphknoten-Status und klinischen Parametern.....	34
3.3.1	Klinische Verläufe mit sekundär positiven SLN .....	36
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>40</b>
4.1	Fragestellung.....	40
4.2	Studienkollektiv .....	41
4.3	Ultrastaging .....	41
4.4	Limitationen .....	42
4.5	Auswertung .....	45
4.6	Praktische Implikation .....	48
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>61</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>62</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Sentinel-Lymphknoten schematisch.....	8
Abbildung 2: SLN - unterschiedliche Ansichten .....	9
Abbildung 3: Schema der Lymphknotenaufarbeitung mit Ultrastaging.....	17
Abbildung 4: Arbeitsschritte bei der Zusammenstellung des Studienkollektivs	25
Abbildung 5: zusätzliche pelvine und paraaortale Lymphonodektomie.....	27
Abbildung 6: Interventionsgruppen .....	29
Abbildung 7: mit Ultrastaging gestufter tumorfreier SLN.....	30
Abbildung 8: verschiedene Stufen und Färbungen eines SLN mit Mikrometastase .....	32
Abbildung 9: positive SLN nach Ultrastaging .....	34
Abbildung 10: Beispiel einer Verunreinigung.....	44

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: TNM- und FIGO-Klassifikation.....	3
Tabelle 2: ESMO-ESGO Risikoklassifikation Endometriumkarzinom 2021 .....	4
Tabelle 3: Risikoklassifikation mit bekannten molekularen Eigenschaften .....	5
Tabelle 4: Ultrastaging Protokolle .....	12
Tabelle 5: Ultrastaging Stufenprotokoll.....	16
Tabelle 6: AJCC-Kriterien für LK-Metastasen .....	22
Tabelle 7: Patientencharakteristika nach Aktenrecherche .....	26
Tabelle 8: Charakteristika der Patientinnen mit primär positivem SLN .....	28
Tabelle 9: Metastase in SLN nach Stufendiagnostik.....	29
Tabelle 10: Metastasen in SLN nach Ultrastaging .....	33
Tabelle 11: Histopathologische Kriterien und Risikoklassifikation aller Fälle mit primär und sekundär positiven SLN.....	35
Tabelle 12: Charakteristika der Fälle mit sekundär positiver SNB nach Ultrastaging.....	36
Tabelle 13: Übersicht klinische Verläufe mit den wichtigsten Parametern.....	39

## Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ESGO	European Society of Gynaecological Oncology
ESMO	European Society for Medical Oncology
ESTRO	European Society for Radiotherapy and Oncology
FFPE	formalin-fixed, paraffin-embedded
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IHC	immunhistochemisch/Immunhistochemie
ITC	isolierte Tumorzellen
LK	Lymphknoten
LNE	Lymphonodektomie
LVSI	Lymph vascular space invasion (dt.: Lymphgefäßinvasion)
MM	Mikrometastase
neg.	negativ
NSMP	no specific molecular profile
SLN	Sentinel-Lymphknoten
SNB	Sentinel-Lymphknoten-Biopsie
SNB+	positive Sentinel-Lymphknoten-Biopsie
US	Ultrastaging

# **1 Einleitung**

## **1.1 Endometriumkarzinom**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Das Endometriumkarzinom ist das häufigste Malignom der weiblichen Genitalorgane und die vierthäufigste Krebserkrankung der Frau in Industrieländern.

Die höchste Inzidenz besteht in Nordamerika und Westeuropa mit 9,9 bis 15,0 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen im Jahr. Über 90 % der Frauen sind bei der Erstdiagnose älter als 50 Jahre, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren. Betroffen sind demnach vor allem Frauen in der Postmenopause und im Senium (Colombo et al., 2016). In Deutschland erkrankt eine von 50 Frauen im Laufe ihres Lebens an Gebärmutterkrebs, 2019 lag die Inzidenz bei 11.000 Neuerkrankungen (Krebs in Deutschland für 2017/2018).

### **1.1.2 Histologie**

Beim Endometriumkarzinom können verschiedene histologische Typen unterschieden werden. Am häufigsten, in etwa 85 % der Fälle, handelt es sich um ein endometrioides Adenokarzinom des Corpus uteri. Es zeigt sich mikroskopisch mit der typischen Drüsenstruktur des Endometriums und ist in den meisten Fällen gut differenziert. Die Zellen erscheinen größer als gewöhnliche Endometriumzellen und mit teilweise sichtbaren Mitosen. Andere histologische Typen sind klarzellige, seröse, adenosquamöse und muzinöse Karzinome (Creasman et al., 2006). Bisher wurden die verschiedenen histologischen Gruppen in zwei Typen eingeteilt: Typ 1 bezeichnet Adenokarzinome, die histologisch entweder als endometrioid oder muzinös eingeordnet werden. Typ 2 umfasst andere histologische Typen wie serös oder klarzellig. Diese wachsen meist auf dem Boden des atrophen Endometriums (Bokhman, 1983). Die Histologie spielt eine wichtige Rolle bei der Risikoklassifikation. Das dualistische

Modell mit Typ 1 und Typ 2 wird aktuell immer mehr von einer multifaktoriellen Einteilung abgelöst, die Histologie, Immunhistochemie und Molekularbiologie integriert (Concin et al., 2021). Bei der bloßen Einteilung in Typ 1 und 2 gibt es Diskrepanzen bei der Korrelation von Histopathologischer Diagnostik und Verlauf der Erkrankung, besonders bei hochgradigen Endometriumkarzinomen (Vermij et al., 2020, de Boer et al., 2018, Gilks et al., 2013).

### **1.1.3 Grading**

Der Differenzierungsgrad eines Tumors gibt an in welchem Ausmaß das Tumorgewebe vom gesunden Gewebe abweicht. Je schlechter differenziert das Gewebe, umso bösartiger ist der Tumor. Das Grading steht in Zusammenhang mit der Histologie des Tumors. Endometrioiden und muzinöse Karzinome werden nach dem Anteil des soliden Tumorstadiums mit nicht-plattenepithelialen Strukturen eingeteilt: G1 ist definiert mit weniger als 5 %, G2 wird bis 50 % vergeben, bei G3 sind über 50 % des Tumorstadiums solide. Liegen hochgradige Atypien vor, wird die Graduierung um einen Grad erhöht. Seröse und klarzellige Karzinome werden definitionsgemäß mit G3 eingestuft (Horn et al., 2016).

### **1.1.4 Stadieneinteilung**

Das Endometriumkarzinom wird durch ein Staging nach FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) in verschiedene Tumorstadien eingeteilt, wie in Tabelle 1 dargestellt. Die Klassifikation geht auf das für Krebserkrankungen allgemein gültige TNM-System zurück (Wittekind, 2004). Damit werden lokale Ausbreitung, Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung mit verschiedenen Methoden beurteilt, wie zum Beispiel Probeentnahmen, Bildgebung, histologische Untersuchungen und immunologische Verfahren (Denschlag et al., 2010). Standard ist ein operatives Staging.

Wird eine fertilitätserhaltende Operation angestrebt, kann das Staging mittels transvaginalen Ultraschalls und MRT erfolgen (Andreano et al., 2014).

Existieren Metastasen in pelvinen oder paraaortalen Lymphknoten, befindet sich der Tumor im FIGO-Stadium IIIC – unabhängig von seiner lokalen Ausbreitung.

Tabelle 1: TNM- und FIGO-Klassifikation

TNM	FIGO	Definition
TX		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0		Kein Anhalt für Primärtumor
T1	I	Tumor begrenzt auf Corpus uteri
T1a	IA	Tumor begrenzt auf Endometrium oder infiltriert weniger als die Hälfte des Myometriums
T1b	IB	Tumor infiltriert die Hälfte oder mehr des Myometriums
T2	II	Tumor infiltriert das Stroma der Zervix, breitet sich aber nicht jenseits des Uterus aus
T3 bzw. N1	III	Lokale/regionale Ausbreitung des Tumors
T3a	IIIA	Tumor befällt Serosa und/oder Adnexe (direkt oder Metastasen)
T3b	IIIB	Vaginal- oder Parametriumbefall (direkt oder Metastasen)
N1	IIIC	Metastasen in Becken- bzw. paraaortalen Lymphknoten
	IIIC1	Metastasen in Beckenlymphknoten
	IIIC2	Metastasen in paraaortalen Lymphknoten
T4	IVA	Tumor infiltriert Blasen- bzw. Rektumschleimhaut
M1	IVB	Fernmetastasen

(Wittekind, 2004)

### 1.1.5 Risikoklassifikation

Grundlagen für die Risikoklassifikation sind Stadium (FIGO), Grading, Tumorhistologie und Lymphgefäßinvasion (LVSI). Die Tumore werden in die Varianten niedriges (low-risk), intermediäres (intermediate-risk), hoch-intermediäres (high-intermediate-risk) und hohes Risiko (high-risk) eingeteilt, um die Radikalität des operativen Vorgehens und die adjuvante Therapie zu planen.

Gezeigt wird in Tabelle 2 die Klassifikation basierend auf dem Konsens der ESMO und ESGO von 2021.

*Tabelle 2: ESMO-ESGO Risikoklassifikation Endometriumkarzinom 2021  
molekulare Eigenschaften unbekannt*

<b>Low</b>	<b>Intermediate</b>	<b>High-intermediate</b>	<b>High</b>
Endometrioid FIGO IA – G1/G2 LVSI neg.	Endometrioid FIGO IB – G1/G2 LVSI neg.	Endometrioid LVSI substantial	FIGO III - IVa tumorfrei
	Endometrioid FIGO IA – G3 LVSI neg.	Endometrioid FIGO IB – G3	serös/klar/MMMT Myoinvasion
	serös/klar/MMMT keine Myoinvasion	FIGO II	

modifiziert nach Concin et al. (Concin et al., 2021)

Die aktuelle Version berücksichtigt auch molekulare Marker basierend auf dem Cancer Genome Atlas-Projekt (TCGA) (Kandoth et al., 2013, Levine et al., 2013). Es werden vier molekulare Subtypen unterschieden: „POLE mutiert“, „MMR-defizient“, „p53-mutiert“ und eine Gruppe ohne spezifisches Profil (NSMP) (Talhok et al., 2015). Während ein POLE-mutiertes Karzinom grundsätzlich ein niedriges Risiko und eine sehr gute Prognose hat, gehen p53-mutierte Karzinome mit einem hohen Risiko einher, unabhängig von histologischem Typ und Stadium (Marnitz et al., 2020).

Die klinisch-therapeutische Relevanz der molekularen Klassifikation ist Gegenstand aktueller Forschung. Für die Therapieentscheidung wird in der aktuellen AWMF-S3-Leitlinie-Endometriumkarzinom die Risikoeinteilung mit Berücksichtigung der molekularen Subgruppen verwendet, siehe Tabelle 3 (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Tabelle 3: Risikoklassifikation mit bekannten molekularen Eigenschaften

Low	Intermediate	High-intermediate	High
<b>POLE-mutiert</b> FIGO I - III	Endometrioid FIGO IB – G1/G2 LVSI neg. <b>MMRd oder NSMP</b>	Endometrioid LVSI substantial <b>MMRd oder NSMP</b>	<b>p53abn</b>
Endometrioid FIGO IA – G1/G2 LVSI neg.	Endometrioid FIGO IA – G3 LVSI neg. <b>MMRd oder NSMP</b>	Endometrioid FIGO IB – G3 <b>MMRd oder NSMP</b>	FIGO III - IVa tumorfrei <b>MMRd oder NSMP</b>
	serös/klar/MMMT keine Myoinvasion	FIGO II <b>MMRd oder NSMP</b>	serös/klar/MMMT Myoinvasion

modifiziert nach Concin et al. (Concin et al., 2021)

### 1.1.6 Klinik und Diagnostik

Das Endometriumkarzinom wird in 80 % der Fälle im Frühstadium der Erkrankung erkannt. Das wichtigste Warnsignal ist eine uterine Blutung bei Frauen in der Postmenopause. Ein sonografisch hoch aufgebautes Endometrium über 5 mm gilt postmenopausal als suspekt. Auch prämenopausale Hypermenorrhoe und Metrorrhagien können auf ein Endometriumkarzinom hindeuten. Im fortgeschrittenen Stadium kann sich ein Endometriumkarzinom selten auch durch Unterbauchschmerzen, einen tumorbedingt vergrößerten Bauchumfang und in einigen Fällen mit Aszites und Gewichtsverlust äußern. Rund 10 % der Postmenopausenblutungen gehen auf ein Endometriumkarzinom zurück (Diedrich, 2007).

Das Endometriumkarzinom breitet sich zunächst lokal aus. Erst spät folgt eine Fernmetastasierung. Diese erfolgt zuerst lymphogen über die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten und später hämatogen (Diedrich, 2007).

Jede Blutung in der Postmenopause und jede Blutungsstörung in der Prä- und Perimenopause sollte histologisch abgeklärt werden, aufgrund des hohen Risikos für ein Endometriumkarzinom. Dies geschieht im Rahmen einer diagnostischen Gebärmutterspiegelung mit fraktionierter Abrasio, bei der

Gewebe aus der Schleimhaut, dem Endometrium, gewonnen wird. Die entnommene Gewebeprobe wird anschließend histologisch untersucht. Handelt es sich um ein Endometriumkarzinom, wird es anhand des histologischen Typs und seines Differenzierungsgrades weiter klassifiziert. Ergänzend kann ein CT erfolgen, um eine Fernmetastasierung oder befallene Lymphknoten zu diagnostizieren.

### **1.1.7 Therapie und Prognose**

Die Therapie des Endometriumkarzinoms erfolgt risikoadaptiert. Gemäß den aktuell gültigen Kriterien wird eine Operation mit totaler Hysterektomie und einer beidseitigen Adnexektomie durchgeführt. Dieser Eingriff erfolgt in der Regel per Laparoskopie, wodurch in den meisten Fällen bereits eine komplette Tumoresektion möglich ist (Creasman et al., 2006). In Ausnahmefällen wie bei einem erweiterten Staging oder vorhandener Peritonealkarzinose kann eine Laparotomie notwendig sein. Je nach Risiko folgt eine adjuvante Brachy- oder Chemotherapie (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Die Mehrzahl aller Endometriumkarzinome wird in einem frühen Stadium diagnostiziert (FIGO I). Insgesamt ist die Prognose sehr gut, sodass in vielen Fällen lediglich eine Hysterektomie als Therapie genügt mit gegebenenfalls risikoadaptierter Ausdehnung der Lymphonodektomie beziehungsweise Operation. Gut differenzierte Karzinome in einem frühen Stadium haben eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit für Lymphknotenmetastasen (1-3%) (Mariani et al., 2008, Holloway et al., 2017, Colombo et al., 2016).

## **1.2 Sentinel-Lymphknoten-Biopsie**

### **1.2.1 Hintergrund**

Die Sentinel-Lymphknoten-Biopsie (SNB) ist ein Diagnose- und Therapiekonzept, das seit Ende des 20. Jahrhunderts Anwendung findet. Der Sentinel (dt. Wächter) ist der erste Lymphknoten im Lymphabstromgebiet des Tumors. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 1 gezeigt.

Zu Beginn wurde das Sentinel-Konzept in der Therapie des malignen Melanoms eingesetzt (Morton et al., 1992) und kurz darauf auch in der Therapie des Mammakarzinoms (Apple, 2016, Yared et al., 2002). Der Sentinel-Lymphknoten (SLN) gibt Auskunft darüber, ob bereits Lymphknotenmetastasen vorliegen. Ein tumorfreier Sentinel-Lymphknoten macht einen Tumorzellbefall weiterer Lymphknoten sehr unwahrscheinlich. Eine Übersichtsarbeit von Hsueh et al. beschrieb 1999 in mehreren Studien insgesamt einen negativ prädiktiven Wert von 95 % für die SNB beim Mammakarzinom (Hsueh et al., 1999). Damit ermöglicht das SLN-Konzept eine sichere Lymphknotenbeurteilung ohne eine ausgedehnte operative Entfernung aller Lymphknoten im Abstromgebiet des Tumors. So können postoperative Morbiditäten wie zum Beispiel Lymphödeme reduziert oder ganz vermieden werden. Beim Mammakarzinom werden bereits vielen Patientinnen durch Einsatz dieses Verfahrens eine komplette Dissektion axillärer Lymphknoten und die damit verbundenen Folgeprobleme erspart (Tanis et al., 2001). Hier hat das Sentinel-Konzept zu einer wesentlichen Reduktion der peri- und postoperativen Morbiditätsrate geführt (Apple, 2016).

Um den SLN intraoperativ detektieren zu können, muss er vorher markiert werden. Dies geschieht in den meisten Fällen, indem radioaktives Technetium (Tc99) in das tumorbefallene Organ gespritzt wird. So kann der SLN im SPECT/CT visualisiert werden (Sahbai et al., 2017). Oft wird eine kombinierte Markierung durchgeführt, indem präoperativ die Injektion mit Patentblau ergänzt wird. Sowohl der Farbstoff als auch das Technetium reichern sich in der den Tumor drainierenden Lymphknotenregion an und markieren den SLN. Dieser kann anschließend visuell (Patentblau) oder mit einer Gammasonde (Tc) detektiert werden. Eine Kombination aus Technetium und Patentblau scheint nach aktueller Studienlage die beste Detektionsrate für den SLN beim Endometriumkarzinom hervorzubringen (Abu-Rustum, 2014).

Eine alternative Markierungsmethode ist die Markierung durch Indocyaningrün, einen fluoreszierenden Farbstoff, der ebenfalls in das entsprechende Organ injiziert wird. Diese Methode hat eine ähnlich gute Detektionsrate wie die Kombination aus Tc- und Blaumarkierung (Tanner et al., 2015). Intraoperativ

kann der SLN durch Nahinfrarotspektroskopie sichtbar gemacht werden (Papadia et al., 2016).

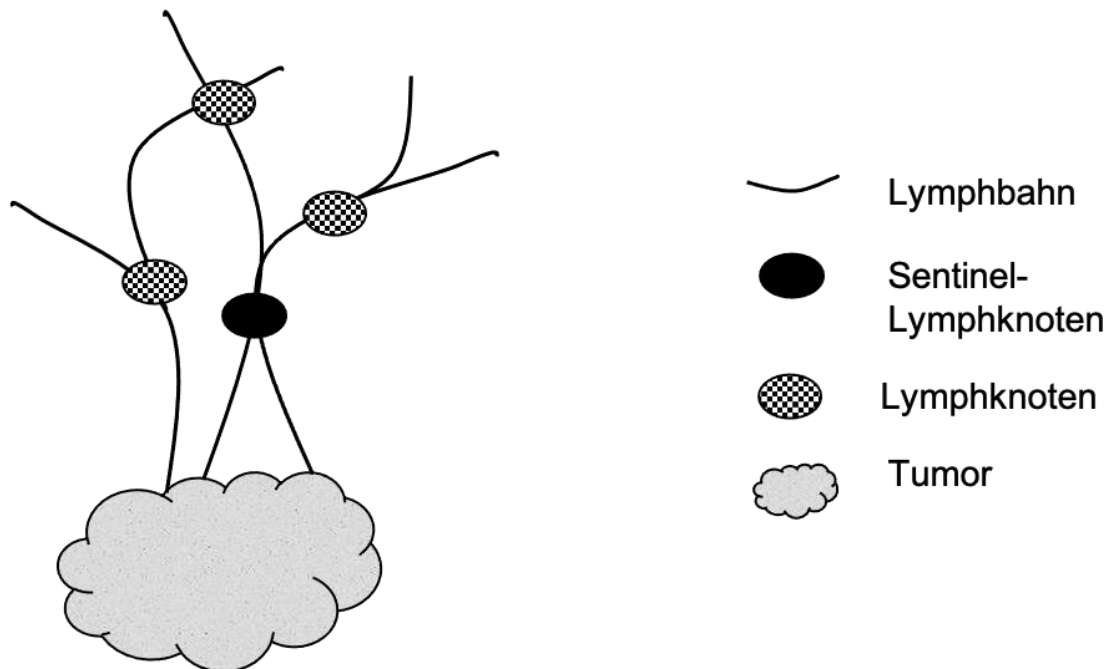


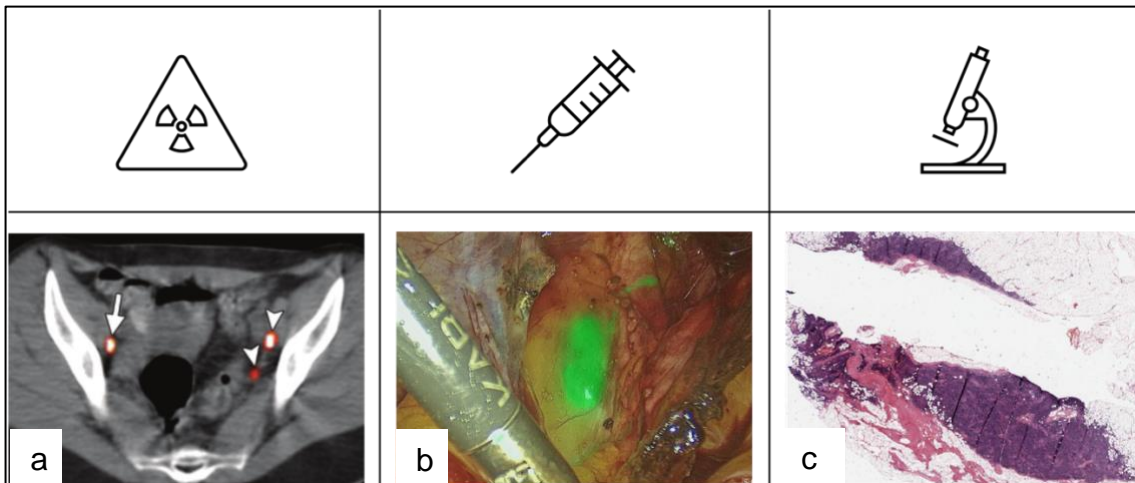
Abbildung 1: Sentinel-Lymphknoten schematisch

### 1.2.2 SNB beim Endometriumkarzinom

In den letzten Jahren wurde international an der Integration des Sentinel-Konzepts in die Therapie des Endometriumkarzinoms gearbeitet und es wird bereits im Rahmen von Studien vereinzelt durchgeführt. Eine klare Empfehlung für die SNB beim Endometriumkarzinom ist aktuell Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Diskussion. In der aktuellen AWMF-S3-Leitlinie-Endometriumkarzinom von 2022 wird empfohlen, das operative Lymphknoten-Staging je nach Risikokonstellation entweder als alleinige SNB oder als sentinel-gestützte systematische LNE durchzuführen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Technisch zeigen sich bereits sehr gute Ergebnisse, Markierung und Detektion des SLN betreffend, und zudem einen hohen negativ prädiktiven Wert für die SNB beim Endometriumkarzinom (Rossi et al., 2017). Khoury-Collado et al. beschrieben bereits 2009 eine mögliche Detektionsrate des SLN von über 90% (Khoury-Collado et al., 2009). Diese kann entweder durch eine

Kombinationsmarkierung mit Patentblau und Technetium erreicht werden oder durch die alleinige Markierung mit ICG (Ballester et al., 2011). Abbildung 2 zeigt einen pelvinen SLN zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Lymphknoten-Stagings.



*Abbildung 2: SLN - unterschiedliche Ansichten*

**a)** im SPECT/CT (Sahbai et al., 2017)

**b)** intraoperativ mit ICG (Bildokumentation Universitätsfrauenklinik Tübingen)

**c)** HE-Färbung, unter dem Mikroskop (Archiv Institut für Pathologie Tübingen)

## 1.3 Ultrastaging

### 1.3.1 Hintergrund

Bei konventioneller Lymphknoten aufarbeitung – ein operativ entnommener Lymphknoten wird in zwei Hälften geschnitten, in Paraffin eingebettet und von jedem Teil ein einziges Schnittpräparat angefertigt und HE-gefärbt – gibt es einen gewissen Anteil falsch negativer Befunde. Das heißt, dass Tumorzellen im LK übersehen werden, weil sie nicht in der Schnittebene liegen. Ziel der histologischen Untersuchung muss sein, Tumorzellen mit hoher Sensitivität zu detektieren. Je höher die Sensitivität, umso sicherer werden positive LK erkannt. Ein negatives Ergebnis bei einer Untersuchung mit hoher Sensitivität kann somit einen Nodalbefall mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen.

Das Lymphknotenstaging wird bei Anwendung des SLN-Konzepts auf wenige Lymphknoten kondensiert (Holloway et al., 2017). Damit spielt die histopathologische Aufarbeitung des SLN eine besonders wichtige Rolle (Zusterzeel et al., 2020). Durch das Ultrastaging können mit Anfertigung zusätzlicher Stufenschnitte und immunhistochemischen Färbungen ein größerer Anteil des Lymphknotens auf Objektträgern abgebildet werden und man entdeckt noch sicherer auch einzelne Tumorzellen (Abu-Rustum, 2013).

Beim Mammakarzinom hat sich diese Methode des Ultrastaging bereits durchgesetzt und wird routinemäßig angewandt. Die aktuelle Leitlinie für das Mammakarzinom empfiehlt 500 µm Schnittstufen in HE-Färbung zur Detektion aller Makrometastasen (> 2 mm) (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020). Zwei Arbeiten berichten, dass okkulte Metastasen – das sind isolierte Tumorzellen, die nur in der immunhistochemischen Färbung zu sehen sind – das Überleben beim Mammakarzinom nicht beeinflussen (Weaver et al., 2011, Giuliano et al., 2011). Ähnlich verhält es sich beim Vulvakarzinom. Das SLN-Konzept scheint in Verbindung mit dem Ultrastaging eine sichere Methode für diese Tumorentität zu sein (Van der Zee et al., 2008, Leitlinienprogramm der DGGG, 2018). Es konnte gezeigt werden, dass durch Ultrastaging die Detektionsrate positiver SLN deutlich erhöht werden kann: Oonk et al. fanden 41% der positiven SLN nur mithilfe von Ultrastaging (Oonk et al., 2010). Levenback et al. berichten, dass 23% der positiven SLN übersehen werden, wenn auf die IHC-Färbung verzichtet würde (Levenback et al., 2012).

Auch für das Zervixkarzinom wird bereits ein Ultrastaging der SLN empfohlen (ESGO, 2018). Dies beinhaltet je nach Größe eine Halbierung oder Lamellierung der LK, das Anfertigen von Stufenschnitten sowie immunhistochemischer Färbungen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Technisch umfasst das Ultrastaging die Anfertigung zusätzlicher Stufenschnitte sowie die Durchführung von immunhistochemischen Färbungen. Mit Hilfe von Immunhistochemie können bestimmte Zellstrukturen durch markierte Antikörper sichtbar gemacht werden. Panzytokeratin ist ein diagnostischer Marker, der die Intermediärfilamente in Zellen von Epithelgewebe anfärbt und ein zytoplasmatisches Färbemuster zeigt. Die monoklonalen Antikörper werden aus

Mäusen gewonnen, die mit humanen Kalluskeratinen immunisiert wurden. Zwei dieser Klone sind AE1 und AE3. Der Cocktail aus AE1 und AE3 färbt sowohl basische als auch saure Keratine in einfachem und geschichtetem Epithel. Lymphknoten weisen physiologisch keine Epithelzellen auf, daher eignet sich dieser Antikörper, um Absiedelungen von Zellen epithelialer Tumore in Lymphknoten zu identifizieren (Dako, 2017, Moll et al., 1982).

### **1.3.2 Ultrastaging in der Therapie des Endometriumkarzinoms**

Für die Anwendung des Ultrastaging beim Endometriumkarzinom gibt es noch wenig Daten. Allerdings existieren bereits vielfältige Ansätze, wie das Ultrastaging beim Endometriumkarzinom umgesetzt werden könnte. Verschiedene Autoren beschreiben eine höhere Detektionsrate positiver SLN durch Ultrastaging, insbesondere von Mikrometastasen und isolierten Tumorzellen (St Clair et al., 2016, Holloway et al., 2016, Plante et al., 2017).

Zur praktischen Durchführung besteht noch keine einheitliche Empfehlung. In der bisherigen existenten Literatur ist das gemeinsame Ziel, die falsch-negative Rate so gering wie möglich zu halten.

Es gibt verschiedene Arbeiten mit unterschiedlichen Ultrastaging-Protokollen, die sich in Schnittfolge, Schnittdicke, dem Einsatz von Immunhistochemie und Stufenanzahl unterscheiden. Einige Protokolle beginnen mit einer fragmentalen Einbettung der LK im Rahmen der makroskopischen Aufarbeitung.

Allen gemeinsam ist eine Optimierung der Detektion von positiven SLN. Die genauen Protokolle sind in Tabelle 4 aufgeführt.

*Tabelle 4: Ultrastaging Protokolle*

<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>	<b>Methode</b>
Delpech et al.	2007	3 mm Fragmente, 150 µm Stufen: 4 HE und 4 IHC
Erkanli et al.	2011	2-4 mm Fragmente, 10 Schnitte: 9 HE und 1 IHC
Kim CH et al.	2013	2 Stufen, 50 µm Abstand: jeweils 1 HE und 1 IHC
Ferraioli et al.	2015	3 mm Fragmente, 200 µm Stufen, 1 HE, wenn neg.: 2 IHC
Holloway et al.	2016	50 µm Stufen: 3 HE und 1 IHC
Euscher et al.	2018	2 mm Fragmente: 1HE, wenn neg., dann: - 250 µm Stufen: 5 HE, wenn neg. 5 IHC - bei 250 µm: 1 HE, wenn neg. 1 IHC

## **1.4 Fragestellung**

Ziel dieser retrospektiven Studie war es, zu untersuchen, ob die Durchführung eines zusätzlichen standardisierten Ultrastaging die Detektionsrate positiver Sentinel-Lymphknoten in der Therapie des Endometriumkarzinoms verändert.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studienkollektiv**

#### **2.1.1 Ethikvotum**

Die vorliegende Untersuchung wurde der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und am Universitätsklinikum der Universität Tübingen zur Beurteilung vorgelegt. Entsprechend den ICH-GCP-Richtlinien, der Deklaration von Helsinki und des Geltenden Rechts erging ein positives Votum zur uneingeschränkten Durchführung des geplanten Projekts (387/2019BO2). Es ergaben sich im Verlauf keine der Ethikkommission mitzuteilenden Änderungen im Ablauf der Studie.

#### **2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien**

Für die Etablierung des Studienkollektivs wurden folgende Einschlusskriterien definiert:

- Histologisch gesichertes Endometriumkarzinom
- Primäroperation in der Universitätsfrauenklinik Tübingen im Zeitraum von 2006 bis 2016
- präoperative Markierung, erfolgreiche intraoperative Darstellung und separate Abgabe eines SLN, der als solcher an das Institut für Pathologie, Tübingen übersandt wurde
- vorhandenes Einverständnis der Patientin für die Verwendung ihres Tumorgewebes zum Zweck medizinischer Forschung
- verfügbare Schnittpräparate beziehungsweise in Paraffin eingebettete Sentinel-Lymphknoten

Ausgeschlossen wurden alle Patientinnen mit synchronem Zweitmalignom.

Alle oben genannten Kriterien wurden mittels Aktenrecherche für die Patientinnen überprüft. Die Kombination aus Operationsbericht,

Materialübersendungsschein und histopathologischem Befund ermöglichte die Identifikation aller infrage kommenden Patientinnen.

Für jede Patientin wurden klinische Daten wie Tumorstadium, Grading, histologischer Typ, Lymphgefäßbeteiligung (LVSI) und Risikoklassifikation notiert. Bezüglich der durchgeführten Lymphonodektomie wurde dokumentiert, wie viele Lymphknoten insgesamt entnommen wurden und im Besonderen wie viele SLN zur Untersuchung verfügbar sind. Außerdem wurde vermerkt, in welchen Paraffinblöcken das gesuchte Sentinel-Lymphknotenmaterial enthalten ist.

### **2.1.3 Datenmanagement**

Die Patientinnen wurden pseudonymisiert. Es wurde für diese Arbeit eine intern vergebene Studienidentifikationsnummer (ID) verwendet. Alle zusammengetragenen Daten wurden in umfangreichen Excel-Tabellen auf einem in der Universitätsfrauenklinik Tübingen lokalisierten Server gespeichert. Abbildungen und Tabellen wurden mit den Programmen Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint und Microsoft Word erstellt. Die statistischen Analysen wurden in SPSS durchgeführt.

## **2.2 Lymphknotenaufarbeitung – histopathologisches Ultrastaging**

### **2.2.1 Vorarbeiten**

Aus dem Hauptarchiv des Instituts für Pathologie Tübingen wurden alle Paraffinblöcke mit den enthaltenen Sentinel-Lymphknoten der eingeschlossenen Patientinnen herausgesucht, genauso wie alle bereits angefertigten histologischen Schnittpräparate, die unter anderem auch IHC-Färbungen beinhalteten. Die Schnittpräparate wurden gezählt, geordnet und einer spezialisierten gynäkopathologischen Zweitbegutachtung am Mikroskop unterzogen.

Für alle Fälle, von denen noch Paraffinmaterial verfügbar war, wurde folgendes Prozedere festgelegt:

- Anfertigung von Stufenschnitten nach dem Protokoll aus 2.2.2
- Durchführung von HE- und IHC-Färbungen
- Mikroskopische Auswertung der neuen Schnittpräparate

### 2.2.2 Anfertigen von Stufenschnitten

An allen Paraffinblöcken, die Sentinel-Lymphknoten enthielten, wurde ein sekundäres retrospektives Ultrastaging nach dem für diese Arbeit festgelegten Protokoll durchgeführt. Jeder Lymphknoten lag schließlich in repräsentativen Stufen vor, sodass nach dem Ultrastaging kein Gewebe mehr im Paraffinblock vorhanden war. Es wurden im Abstand von 500-µm-Stufen geschnitten und jeweils eine HE-Färbung und eine immunhistochemische Färbung mit Panzytokeratin von den Schnitten angefertigt. Die erste 500-µm-Stufe wurde zusätzlich in 100-µm-Stufen aufgearbeitet und lediglich HE-gefärbt, siehe Tabelle 5. Die Methode der Lymphknotenaufarbeitung ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

*Tabelle 5: Ultrastaging Stufenprotokoll*

<b>Stufe</b>	<b>Abstand</b>	<b>Färbung</b>
Stufe 1	Anschnitt, 0 µm	HE und IHC Färbung
Stufe 2	100 µm	HE-Färbung
Stufe 3	200 µm	HE-Färbung
Stufe 4	300 µm	HE-Färbung
Stufe 5	400 µm	HE-Färbung
Stufe 6	500 µm	HE und IHC Färbung
Stufe 7	1000 µm	HE und IHC Färbung
Stufe 8	2000 µm	HE und IHC Färbung
Stufe 9	2500 µm	HE und IHC Färbung
Stufe 10	3000 µm	HE und IHC Färbung
ab dann	3500/4000/4500/... µm	HE und IHC Färbung

Von Stufe 10 an wird alle 500  $\mu\text{m}$  eine weitere Stufe geschnitten, bis das gesamte Gewebe des Lymphknotens aufgearbeitet ist.

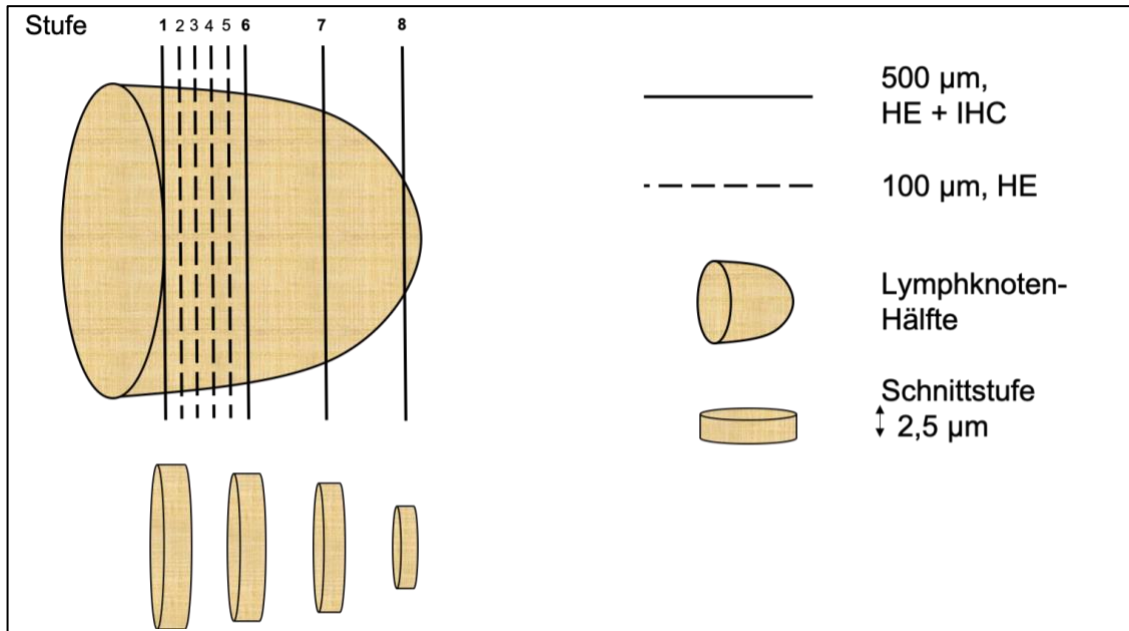


Abbildung 3: Schema der Lymphknotenaufarbeitung mit Ultrastaging

Die Blöcke wurden mit einem handbetriebenen Rotationsmikrotom der Firma Leica geschnitten. Die Rotationsbewegung wird in eine geradlinige Auf- und Abbewegung umgewandelt. Das Messer sitzt unter dem eingespannten Paraffinblock fest und wird bei einer Rotation der Kurbel durch den Block hindurchbewegt. Dabei entsteht ein Paraffinschnitt des eingespannten Blockes, der dann auf dem Messer liegt. Bei der nächsten Rotation wird der Blockhalter automatisch so weit vorbewegt, dass bei der nächsten Abwärtsbewegung der nächste Schnitt in gleicher Schnittdicke abgenommen wird. Die Schnittdicke ist auf 2,5  $\mu\text{m}$  festgelegt, damit nur eine Zellschicht abgebildet wird. Jeder Block muss zunächst angeschnitten werden, damit ein Schnitt des Paraffinblocks dessen gesamte Fläche abbildet. Der erste Anschnitt, der die Fläche des Blockes ganz abbildet, wird verwendet. Das entspricht bei dem hier verwendeten Protokoll der Stufe 1 bei 0  $\mu\text{m}$ . Die Schnitte gelangen vom eingespannten Messer über eine Wasserrutsche in ein Wasserbad mit Raumtemperatur. Dort schwimmen sie auf der Wasseroberfläche und werden auf einen gläsernen

Objektträger aufgezogen. Anschließend werden sie in ein Wasserbad mit 50°C Wassertemperatur getaucht, sodass sich das Gewebe ausdehnt. Von jeder 500-µm-Stufe wurden drei direkt aufeinanderfolgende Schnitte genommen. Ein Schnitt wurde auf einen Glasobjektträger aufgezogen und HE-gefärbt. Für die immunhistochemische Färbung wurden zwei Schnitte auf Superfrost-Objektträger aufgezogen, von denen einer direkt gefärbt wurde. Der zweite Schnitt wurde als Leerschnitt aufbewahrt, um bei eventuellen Unsicherheiten in der Beurteilung eine zweite Färbung anfertigen zu können.

### 2.2.3 HE-Färbung

Die HE-Färbung ist eine Routinefärbung bei der histopathologischen Befundung. Sie ist eine Kombination aus zwei Färbungen, die unterschiedliche Strukturen unter dem Mikroskop sichtbar macht und dient der Übersicht. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff und wird als Alaunhämatoxylin in der Pathologie verwendet. Er färbt alle sauren und basophilen Strukturen wie Zellkern, DNS und raues endoplasmatisches Retikulum an.

Eosin ist ein synthetisch hergestellter Farbstoff, der basische und azidophile Strukturen wie beispielsweise Plasmaproteine, Mitochondrien, Kollagen und Keratin färbt.

Die HE-Färbung im Institut für Pathologie Tübingen läuft nach folgendem Protokoll ab:

1. Entparaffinieren	Xylol	15 min
2. Rehydrierung	Ethanol 100%	1 min
	Ethanol 100%	1 min
	Ethanol 96%	1 min
	Ethanol 96%	1 min
	Ethanol 70%	1 min
	Ethanol 70%	1 min
3. Spülen	Aqua dest.	1 min
4. Färbung	Mayers-Hämatoxylin	4 min
5. Waschen	Leitungswasser	10 min

6. Spülen	Aqua dest.	2 min
7. Gegenfärbung	Eosin	2 min
8. Dehydrierung	Ethanol 70%	1 min
	Ethanol 96%	1 min
	Ethanol 100%	1 min
	Ethanol 100%	1 min
9. Klären	Xylol	2 min
	Xylol	2 min
10. Eindecken	Eindeckmedium (Entellan®)	2 min

---

Vorgang insgesamt ~ 50 min

Zur Herstellung einer HE-Färbung wird mit Hämatoxylin gefärbt und mit Leitungswasser gespült. Anschließend werden in alkoholischer oder wässriger Lösung mit Eosin die Zytoplasmastrukturen gefärbt. Zum Schluss wird der Schnitt mit Xylol geklärt und mit einem Deckglas versiegelt. Der Vorgang dauert circa 50 Minuten. Diese Schritte erfolgen vollautomatisch im Färbeautomaten Tissue-TEK-Prisma im Hauptlabor des Instituts für Pathologie Tübingen.

Als Übersichtsfärbung wird die HE-Färbung oft zeitgleich mit immunhistochemischen Färbungen angefertigt, um die Präparate im direkten Vergleich besser beurteilen zu können.

## 2.2.4 Immunhistochemische Färbung

### 2.2.4.1 Allgemeine Vorbemerkung

Die Immunhistochemie ist eine Methode zur Untersuchung von Gewebe und ergänzt die konventionelle histopathologische Diagnostik. Sie ermöglicht mithilfe von Antikörpern, die an Proteine im Zielgewebe binden, die spezifische Anfärbung bestimmter Strukturen. Durch die Antigen-Antikörper-Reaktion werden die Antikörper fest gebunden und die Antigene der Zielstruktur können mit einer Nachweisreaktion unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Zielstruktur könne beispielsweise Rezeptoren, Immunglobuline, Zytokeratine oder andere Zellbestandteile sein.

Im Grunde besteht der Ablauf dieser Technik aus zwei Schritten: erst bindet der Antikörper an die Zielstruktur und die Antigen-Antikörper-Bindung wird mit einem Farbstoff sichtbar gemacht. Darauf folgt eine Gegenfärbung, um das übrige Zellgewebe sichtbar zu machen. Dies ist essenziell für die Beurteilung des Schnittpräparates, um den positiven immunhistochemisch angefärbten Anteil darauf richtig einordnen und lokalisieren zu können.

#### **2.2.4.2 Färbeprotokoll**

Für das Experiment dieser Arbeit wurde jede 500 µm-Stufe zusätzlich zur HE-Färbung immunhistochemisch (IHC) mit Panzytokeratin (Klone AE1 und AE3) gefärbt. Panzytokeratin ist ein epithelialer Marker und zeigt ein zytoplasmatisches Färbemuster (siehe 1.3.1). Der Cocktail aus AE1 und AE3 färbt ein breites Spektrum unterschiedlicher Zytokeratine. Die Färbung ist für Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe geeignet. Hierfür wird ein Gewebeschnitt auf einen Superfrost-Objektträger aufgezogen. Die Färbung wird in einem Vollautomaten für die Immunhistochemie, dem Ventana Benchmark Ultra (Ventana Medical Systems), durchgeführt. Die Paraffinschnitte werden 4 Minuten auf 60°C erhitzt, um das Gewebe auf dem Objektträger zu fixieren und das Paraffin zu schmelzen. Mit der EZ-Prep-Lösung (Ventana) werden die Schnitte entparaffiniert und anschließend mit einem EDTA-basierten Puffer 60 Minuten hitzevorbehandelt. So wird die Formalinfixierung des Gewebes aufgehoben. Der Primärantikörper wird von Hand aufgetragen und eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wird das OptiView-Detektionskit hinzugegeben und dreimal für 8 Minuten inkubiert. Dazwischen werden die Schnitte jeweils nach jeder Inkubation mit einem Spülpuffer gereinigt. Zum Schluss wird mit Hämatoxylin gegengefärbt und die Färbung mit Bluing-Reagenz abgeschwächt, damit die IHC-Färbung sich von dem umliegenden Gewebe abhebt. Abschließend werden die Schnitte mit einem Deckglas fixiert.

1. Objektträger erwärmen auf 60 °C		4 min
2. Entparaffinierung und Hitzevorbehandlung		64 min
3. Vor-Primärperoxidase-Hemmer		
4. Primärantikörper	AE1/3 auftragen und inkubieren	32 min
5. Detektion/Nachweis	1 Tropfen OptiViewDetektionskit auftragen	8 min
6. Spülen		
7. Detektion/Nachweis	1 Tropfen OptiViewDetektionskit auftragen	8 min
8. Spülen		
9. Detektion/Nachweis	1 Tropfen OptiViewDetektionskit auftragen	8 min
10. Spülen		
11. Gegenfärbung	1 Tropfen Hämatoxylin auftragen	8 min
12. Abschwächen	1 Tropfen Bluing-Reagenz	4 min

## 2.3 Auswertung

### 2.3.1 mikroskopische Begutachtung

Bei der Beurteilung wurden alle neu angefertigten Schnittpräparate unter einem Doppelkopf-/Doppelvisier-Mikroskop nach dem Vier-Augen-Prinzip begutachtet. Begonnen wurde mit dem bei Erstdiagnose angefertigte Original-HE-Schnitt, gefolgt von jedem im Rahmen dieser Doktorarbeit zusätzlich angefertigten Schnittpräparat. Zuletzt wurde die immunhistochemische Färbung der jeweiligen Stufe betrachtet. Bei der Beurteilung der Schnitte wurden die AJCC-Kriterien für das Lymphknotenstaging bei Brustkrebs verwendet, die in Tabelle 6 dargestellt sind. Metastasen, die größer als 2,0 mm sind, werden Makrometastasen genannt und der Lymphknotenstatus mit pN1 definiert. Mikrometastasen haben eine Größe von über 0,2 mm und bis 2,0 mm und werden mit „pNmi“ dokumentiert. Bei einem Befund, der kleiner als 0,2 mm ist, handelt es sich um isolierte Tumorzellen (ITC). Sind ITC nur in der immunhistochemischen Färbung sichtbar, ist der Nodalstatus pN0(i+). ITC können auch im Verband vorliegen, ohne die Kriterien einer Mikrometastase zu erfüllen (Compton et al., 2012). Okkulte Mikrometastasen sind definitionsgemäß Tumorzellen, die nur in der IHC-Färbung gesehen werden können.

Tabelle 6: AJCC-Kriterien für LK-Metastasen

Art der Metastase	Größe	Befund
Makrometastase	> 2 mm	pN1
Mikrometastase	0,2 mm - 2 mm	pNmi
Isolierte Tumorzellen (ITC)	< 0,2 mm	pN0(i+)

(Compton et al., 2012)

Für jeden Schnitt wurde dokumentiert, ob er Tumorgewebe enthält und wenn ja, um welche Art von Metastase es sich handelt. Außerdem wurde festgehalten, ob die Tumorzellen zuerst in der HE-Färbung oder im IHC-Schnitt gefunden wurden und auf welchen Stufen sie sichtbar sind. Für die Dokumentation wurde in dieser Arbeit jeglicher Tumorzellbefall im Lymphknoten als positiv, also „N1“ gewertet.

### 2.3.2 IHC-Färbung

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbung ist sicherzustellen, dass der Marker erstens alle relevanten Zellen anfärbt und zweitens keine anderen angefärbten Zellen fälschlicherweise für Tumorzellen gehalten werden. Mit Panzytokeratin werden viele verschiedene Epithelzellen angefärbt, was in unserem Fall nicht nur die Tumorzellen des Endometriumkarzinoms, sondern auch aufgelagerte Hautschuppen oder physiologisch im Lymphknoten lokalisierte Histozyten oder Endosalpingeose sein kann.

Jedes immunhistochemisch gefärbte Schnittpräparat, das Tumorzellen im Lymphknoten enthält, wurde als positiv gewertet.

Bei einem positiven immunhistochemischen Befund wurde die Größe des gefärbten Gewebes gemessen und dementsprechend nach oben genannten AJCC-Kriterien als Makrometastase, Mikrometastase oder isolierte Tumorzellen dokumentiert.

### 2.3.3 Statistische Methoden

Die Anzahl der neu durch Ultrastaging positiven Patientinnen wurde ermittelt und mit der Anzahl der SLN-positiven Patientinnen nach konventioneller Methode verglichen und die Änderung der Detektionsrate berechnet. Ebenso wurden Parameter der Tumorerkrankung der beiden Sentinel-positiven-Gruppen wie Histologie, Stadium und Risikoklasse einander gegenübergestellt.

Auch im Kollektiv der initial Sentinel-negativen Patientinnen wurde die Fallgruppe mit bereits vorliegenden Schnittpräparaten durch primäres nicht-standardisiertes Ultrastaging der Fallgruppe, die das retrospektiv-standardisierte Ultrastaging gemäß dem Protokoll dieser Studie erhalten hatte, nach oben genannten Kriterien gegenübergestellt. Das Verteilungsverhalten der oft ergänzend durchgeführte LNE auf die unterschiedlichen TNM-Tumorstadien wurde mittels Chi-Quadrat-Test geprüft.

Die Sensitivität ist ein relevanter Parameter dieser Arbeit. Sie wird in einer Vierfeldertafel aus der Anzahl der richtig-positiven Fälle geteilt durch die Summe der richtig-positiven und der falsch-negativen Fälle errechnet.

	<b>Test positiv</b>	<b>Test negativ</b>	
<b>krank</b>	richtig-positiv	falsch-negativ	→ <u>Sensitivität</u>
<b>gesund</b>	falsch-positiv	richtig-negativ	→ Spezifität

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{richtig - positive Fälle}}{(\text{richtig - positive Fälle} + \text{falsch - negative Fälle})}$$

Falsch-negativ sind in diesem Kollektiv alle Fälle, die zunächst mit negativer SNB befundet waren und später durch Ultrastaging positiv ermittelt wurden.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Studienkollektiv**

#### **3.1.1 Zusammenstellung des Studienkollektivs**

Im Zeitraum zwischen 2006 und 2016 wurden in der Universitätsfrauenklinik Tübingen insgesamt 806 Patientinnen aufgrund eines Endometriumkarzinoms behandelt.

Im Rahmen der operativen Versorgung war bei 302 Patientinnen eine Entfernung der Wächterlymphknoten vorgesehen und dementsprechend eine Markierung der SLN vorgenommen worden. Gemäß den Informationen der Operationsberichte und histopathologischen Befunde konnte bei 174 Patientinnen die SNB erfolgreich durchgeführt werden.

In Abbildung 4 sind verschiedene Gründe aufgeführt, aus denen Fälle nicht in das Sentinel-Studienkollektiv eingeschlossen werden konnten. Beispielsweise war die SLN-Markierung erfolglos oder intraoperativ konnte kein SLN detektiert werden. Es mussten 12 Patientinnen mit fehlendem Einverständnis ausgeschlossen werden und weitere 3 Patientinnen aufgrund eines synchronen Zweitmalignoms.

Nach erneutem Überprüfen der Einschlusskriterien aus 2.1.2 standen für diese Doktorarbeit abschließend 159 Fälle zur Verfügung.

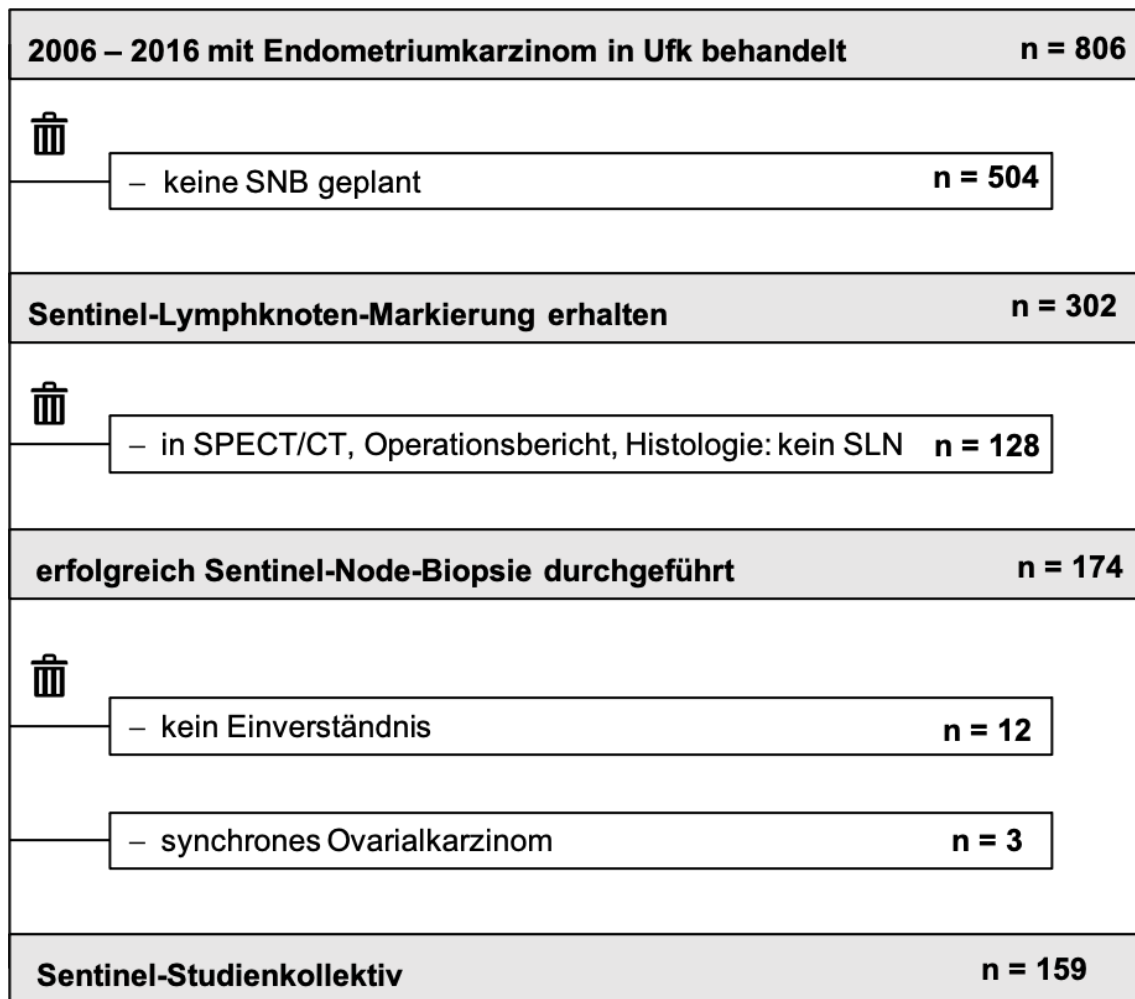


Abbildung 4: Arbeitsschritte bei der Zusammenstellung des Studienkollektivs

### 3.1.2 Charakteristika des Studienkollektivs

Das durchschnittliche Erkrankungsalter betrug 60,6 Jahre (30 – 86 Jahre). Von 159 Patientinnen lag bei 127 ein TNM-Stadium von pT1a vor, bei 27 pT1b, bei 4 Patientinnen pT2 und bei einer Patientin pT3. Das Grading war in den meisten Fällen G1 (n = 112), bei 19 lag ein G2- und bei 28 ein G3-Grading vor. 22 Patientinnen hatten zum Zeitpunkt der Diagnose eine Lymphgefäßinvasion, die verbleibenden 137 nicht.

Der häufigste histologische Typ waren endometrioide Karzinome (137 von 159). Für die Risikoklassifikation wurde die zuletzt nach ESMO/ESGO gültige Klassifikation verwendet (siehe Tabelle 2), ohne dabei den Faktor „Nodalstatus“ zu berücksichtigen. Bei den meisten Patientinnen lag ein niedriges Risikoprofil vor (low-risk bei n = 105). Einen Überblick über die Eigenschaften gibt Tabelle 7.

Tabelle 7: Patientencharakteristika nach Aktenrecherche

Kategorie		Anzahl	SNB+ initial	systematische LNE
T-Stadium (TNM)	pT1a	n = 127 (79,9 %)	1/127 (0,79 %)	61/127
	pT1b	n = 27 (17,0 %)	2/27 (7,4 %)	25/27
	pT2	n = 4 (2,5 %)	2/4 (50 %)	3/4
	pT3	n = 1 (0,6 %)	0/1 (0,0 %)	1/1
Grade	1	n = 112 (70,4 %)	1/112 (0,9 %)	55/112
	2	n = 19 (12,0 %)	1/19 (5,3 %)	10/19
	3	n = 28 (17,6 %)	3/28 (10,7 %)	24/28
LVSI	nein	n = 137 (86,2 %)	2/137 (1,5 %)	73/137
	ja	n = 22 (13,8 %)	3/22 (13,6 %)	16/22
Histologie	endometrioid	n = 138 (86,8 %)	1/138 (0,7 %)	71/138
	serös	n = 9 (5,6 %)	2/9 (22,2 %)	8/9
	gemischt	n = 7 (4,4 %)	1/7 (14,3 %)	6/7
	muzinös	n = 3 (1,9 %)	1/3 (33,3 %)	2/3
	klarzellig	n = 2 (1,3 %)	0/2 (0,0 %)	2/2
Risiko*	low	n = 105 (66,0 %)	0/105 (0,0 %)	45/105
	intermediate	n = 16 (10,1 %)	1/16 (6,25 %)	15/16
	intermediate-high	n = 16 (10,1 %)	0/16 (0,0 %)	9/16
	high	n = 22 (13,8 %)	4/22 (18,2 %)	21/22

Patientenanzahl jeweils für Tumorstadium (TNM), Grade, Lymphgefäßbeteiligung (LVSI), Histologie und Risikoklasse, gesamt n = 159

\*Risikoeinteilung ohne Berücksichtigung des Nodalstatus

Insgesamt haben 90 von 159 Patientinnen ergänzend eine systematische LNE erhalten, davon 57 auch paraaortal. Bei Fällen mit Tumorausdehnung pT1a haben relativ betrachtet die wenigsten Patientinnen eine ergänzende LNE erhalten (61 von 127).

In Abbildung 5 ist die Verteilung von pelviner, pelviner und paraaortaler und keiner weiteren Lymphonodektomie zusätzlich zur SNB dargestellt. Der größte Anteil in diesem Studienkollektiv erhielt lediglich eine SNB und keine weitere LNE (69 von 159). Dennoch gab es mehr Patientinnen mit ergänzender LNE (ausschließlich pelvin oder pelvin und paraaortal, 89 von 159) als Patientinnen ohne weitere LNE.

Der Mittelwert der paraaortalen LNE bezieht sich allein auf die zusätzlich entfernten paraaortalen LK und nicht auf die Gesamtzahl der LK.

Der Chi-Quadrat-Test zur Verteilung der zusätzlichen LNE im Zusammenhang mit der Tumorausdehnung (pT-Stadium) ergab ein signifikantes Ergebnis mit einem p-Wert von 0,01 für die Nullhypothese, dass die LNE-Verteilung unabhängig vom pT-Stadium ist.

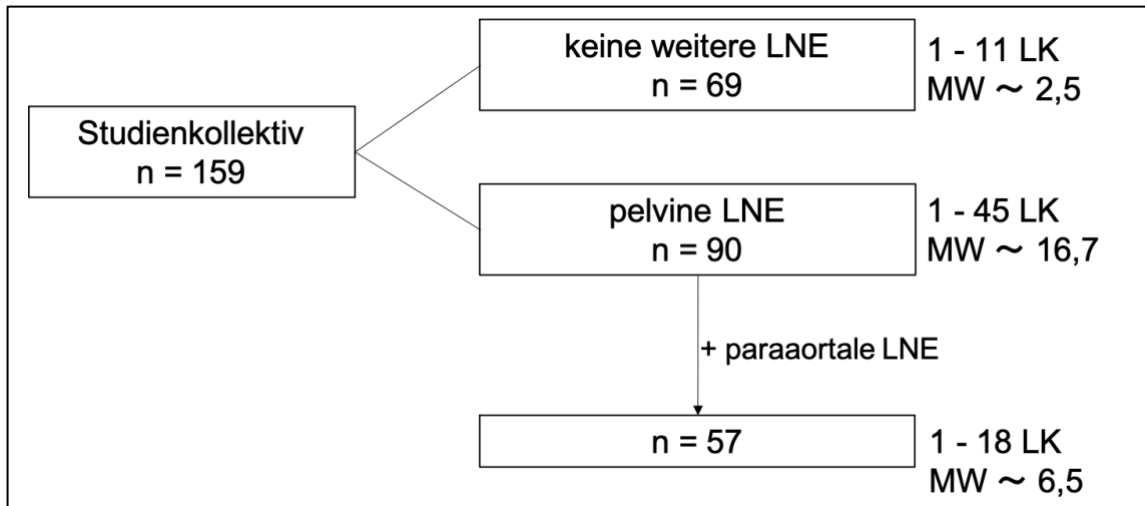


Abbildung 5: zusätzliche pelvine und paraaortale Lymphonodektomie

### 3.1.3 Ergebnis nach primärer LK-Diagnostik

Initial war bei 5 Patientinnen im Rahmen der primären Diagnostik bereits ein positiver SLN beschrieben. Diese Fälle verteilen sich gleichmäßig auf die verschiedenen Kategorien. Am häufigsten kommen bei diesen 5 Fällen ein niedriger Differenzierungsgrad, eine positive Lymphgefäßinvasion und ein seröser histologischer Typ vor.

Für die 5 Patientinnen mit primär positivem Wächterlymphknoten zeigt Tabelle 8 die Tumoreigenschaften Histologie, Tumorausdehnung, Grading, Lymphgefäßinvasion, Risiko und gegebenenfalls weitere positive Lymphknoten.

Tabelle 8: Charakteristika der Patientinnen mit primär positivem SLN

ID	Histologie	Tumor-stadium	Grade	LVSI	Risiko	weitere positive LK
692	muzinös	pT1b	G1	L0	intermediär	SLN+1
696	endometrioid	pT2	G2	L0	hoch	SLN+2
722	serös	pT1b	G3	L1	hoch	SLN
730	serös	pT1a	G3	L1	hoch	SLN
901	gemischt	pT2	G3	L1	hoch	SLN+1

## 3.2 Histopathologisches Ultrastaging

### 3.2.1 Ergebnis der Akten- und Archivrecherche

Im Rahmen der Primärdiagnostik war bei 77 Patientinnen bereits eine Stufendiagnostik durchgeführt worden, sodass hier kein FFPE-Material (formalin-fixed, paraffin-embedded) mehr zu Verfügung stand. Im Durchschnitt wurden pro Lymphknoten 3 Stufenpräparate in einem Abstand von 500 µm angefertigt. Bei 4 von 77 Fällen wurde zusätzlich eine IHC-Färbung durchgeführt.

Diese 77 Fälle werden fortan als „Gruppe A“ bezeichnet und im Rahmen dieser Doktorarbeit lediglich einer spezialisierten Zweitbegutachtung zugeführt.

In 77 Fällen wurde im Rahmen der primären Aufarbeitung auf eine Stufendiagnostik verzichtet, somit stand für diese Doktorarbeit Paraffinmaterial zur Verfügung („Gruppe B“, Abbildung 6). Im Durchschnitt lagen pro Patientin 2,5 SLN vor.

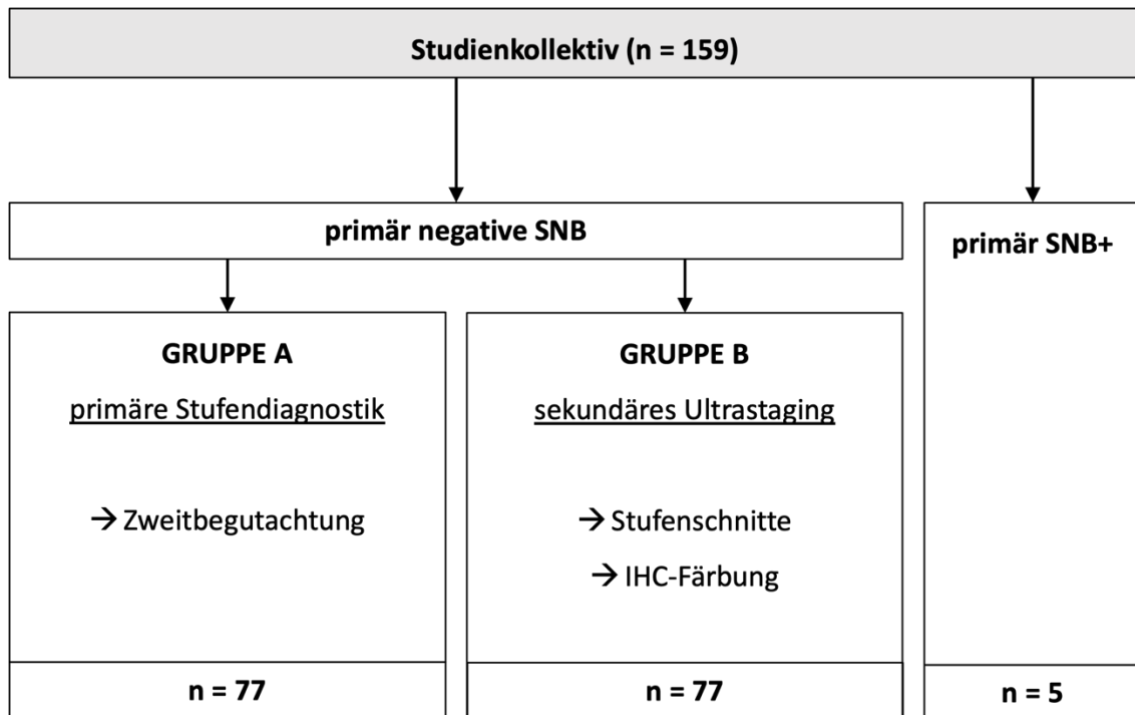


Abbildung 6: Interventionsgruppen

### 3.2.2 Gruppe A: Zweitbegutachtung

In Gruppe A mit bereits vorhandenen Schnittstufenpräparaten von 77 Patientinnen wurde bei der erneuten mikroskopischen Begutachtung eine Makrometastase von 5 mm Größe identifiziert, die zum Zeitpunkt der Primärdiagnose unentdeckt geblieben war (Abbildung 9, links).

Tabelle 10 zeigt, auf welcher Schnittstufen die Metastase aus Gruppe A ausgemacht wurden und auf welchen Stufen sie zu sehen ist.

Tabelle 9: Metastase in SLN nach Stufendiagnostik

ID	Metastasentyp	entdeckt in	sichtbar in
439	5 mm Makrometastase	Stufe 1 HE	Stufe 1,2,3,4 HE

### 3.2.3 Gruppe B: Stufenschnitte und Immunhistochemie

Im Durchschnitt lagen von jedem Fall 2 Blöcke mit in Paraffin eingebetteten Lymphknoten vor von minimal einem Block bis maximal 7 Blöcken pro Fall. Insgesamt lagen 165 Blöcke mit Lymphknotenmaterial vor.

Von jedem Paraffinblock konnten im Mittel 8,5 (6 – 12) Schnittstufenpräparate angefertigt werden. 8,5 Stufen entsprechen einer Schnitttiefe von 1,75 mm und 4 Stufen mit immunhistochemischer Färbung pro Block (bei 0  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 1000  $\mu\text{m}$  und 1500  $\mu\text{m}$ ). Insgesamt wurden von den Fällen von Gruppe B knapp 1.100 neue Schnittpräparate angefertigt, zusätzlich zu den bereits vorhandenen Anschnitten der konventionellen Lymphknotenaufarbeitung.

In Abbildung 7 ist beispielhaft ein tumorfreier Lymphknoten aus Gruppe B mit allen neu angefertigten Schnittstufen und Färbungen dargestellt.

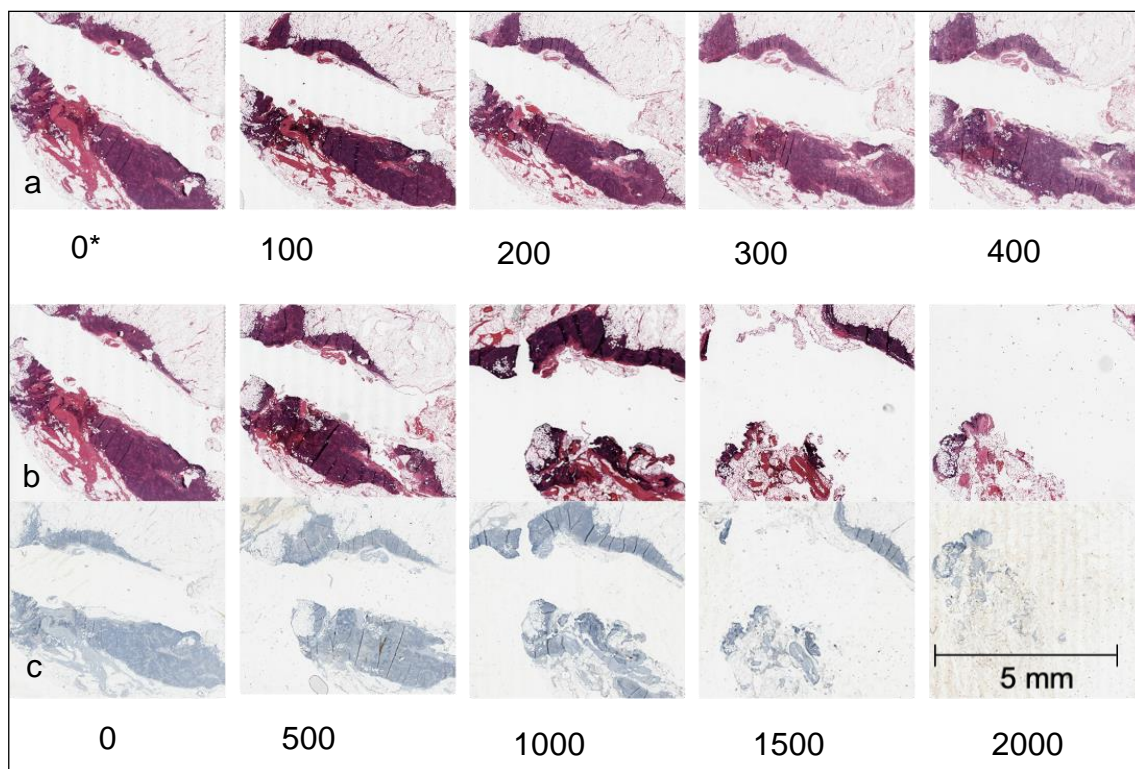


Abbildung 7: mit Ultrastaging gestufter tumorfreier SLN

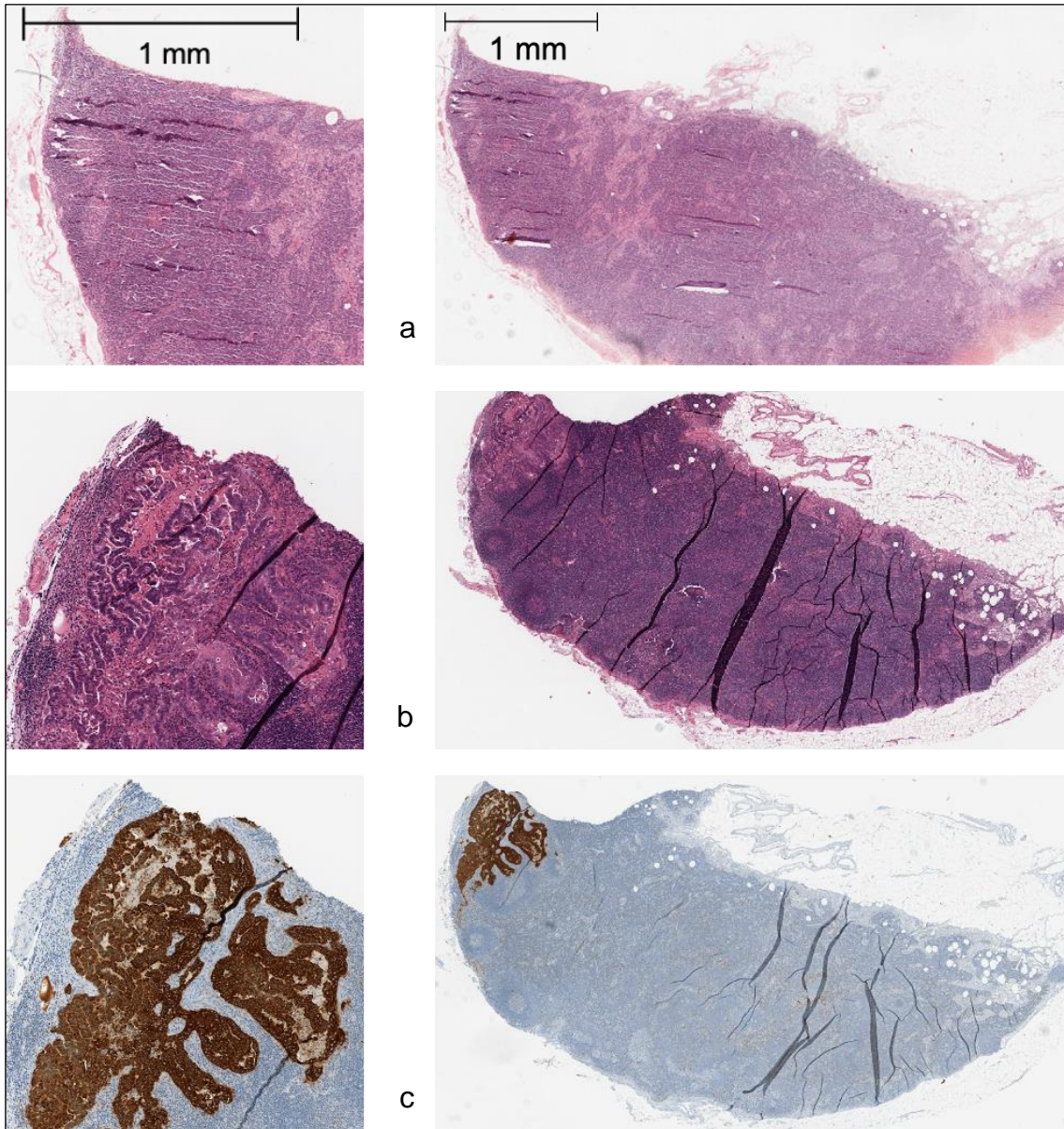
\*Distanz zum Anschnitt in  $\mu\text{m}$

a) Stufe 1 bis 5, 100  $\mu\text{m}$ -Abstände

b) Stufe 6 bis 9, 500  $\mu\text{m}$ -Abstände

c) IHC-Färbung der 500  $\mu\text{m}$ -Stufen

In Abbildung 8 ist der mikroskopische Befund eines SLN gezeigt, bei dem durch das Ultrastaging eine 1-mm-große Mikrometastase identifiziert wurde. Im Anschnitt nach konventioneller Lymphknotenaufarbeitung zum Zeitpunkt der Primäroperation (a) sind keine Tumorzellen sichtbar. Auf dem Schnittpräparat von Stufe 6 in einer Schnitttiefe von 500 µm in der retrospektiven Aufarbeitung mit Ultrastaging (b) ist bereits in der HE-Färbung eindeutig eine 1-mm-große Mikrometastase erkennbar. Noch deutlicher ist diese im korrespondierenden IHC-gefärbten Schnittpräparat von Stufe 6 (c) zu sehen.



*Abbildung 8: verschiedene Stufen und Färbungen eines SLN mit Mikrometastase  
1-mm-Mikrometastase in Stufe 6*

**a) Original-HE-Schnitt    b) HE-Färbung Stufe 6    c) IHC-Färbung Stufe 6**

Durch das standardisierte Ultrastaging der Gruppe B wurden insgesamt 5 weitere positive SLN identifiziert. In 3 Fällen handelt es sich um Mikrometastasen und in 2 Fällen um isolierte Tumorzellen.

Tabelle 10 zeigt auf welchen Schnittstufen, der angefertigten Präparate die Metastasen ausgemacht wurden und auf welchen sie zu sehen sind.

*Tabelle 10: Metastasen in SLN nach Ultrastaging*

**Gruppe B**

<b>ID</b>	<b>Metastasentyp</b>	<b>entdeckt in</b>	<b>sichtbar in</b>
179	1 mm Mikrometastase	Stufe 1 HE	Stufe 1 HE, IHC Stufe 2,3,4 HE
223	1 mm Mikrometastase	Stufe 6 HE	Stufe 6 HE, IHC Stufe 7 ITC in IHC
235	0,3 mm Mikrometastase	Stufe 5 HE	Stufe 5 HE Stufe 6 HE, IHC
437	ITC	Stufe 7 IHC	Stufe 7/8 IHC
535	ITC	Stufe 1 IHC	Stufe 1,6,7 IHC

Eine zusammenfassende Übersicht aller positiver und negativer SLN-Befunde von Gruppe A und B nach Stufendiagnostik beziehungsweise Ultrastaging ist in Abbildung 9 dargestellt.

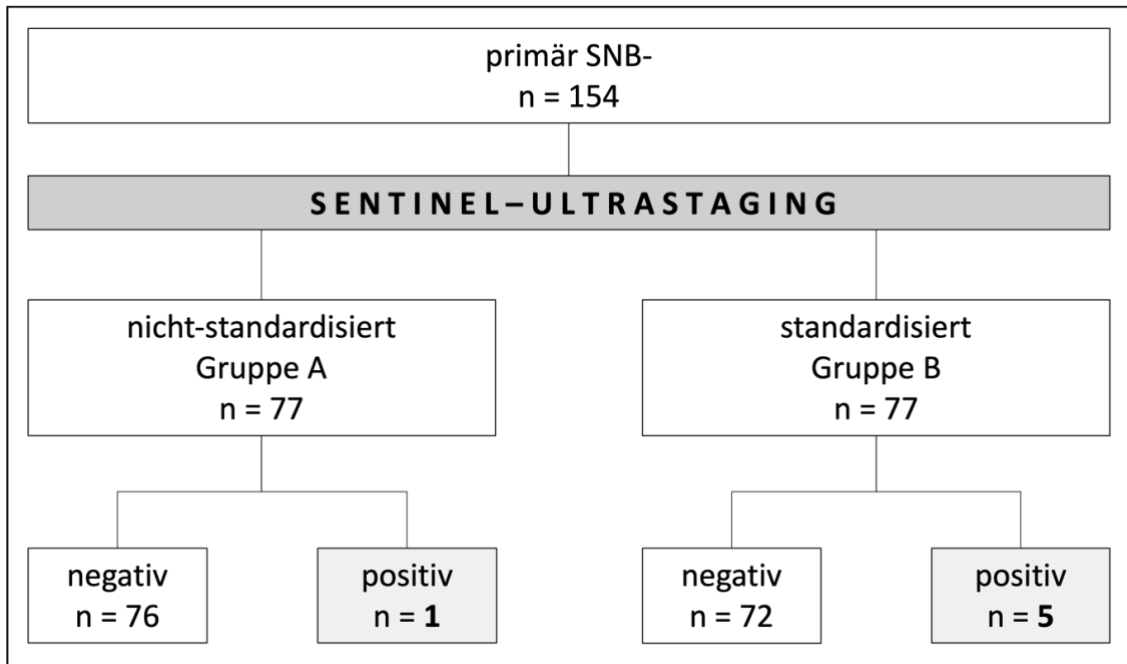


Abbildung 9: positive SLN nach Ultrastaging

### 3.3 Korrelation von Lymphknoten-Status und klinischen Parametern

Alle Fälle mit primär und sekundär positivem SLN werden jeweils nach histopathologischen Eigenschaften und Risikoklasse in Tabelle 11 aufgeführt. Die rechte Spalte zeigt die Änderung der Fallzahl positiver SLN durch das Ultrastaging.

Vier von fünf positiven SLN im frühen Tumorstadium (pT1a) wurden mit Ultrastaging identifiziert, bei den Stadien pT1b und pT2 änderte sich die Fallzahl jeweils von n = 2 auf n = 3. Den Differenzierungsgrad betreffend steigt der Anteil positiver SLN je geringgradiger die Differenzierung ist, wobei sich die positiven SLN bei G1 von n = 1 auf n = 3 änderten. Für Differenzierungsgrad G2 und G3 verdoppelte sich jeweils die Anzahl positiver SLN durch Ultrastaging. Bei positiver und negativer Lymphgefäßbeteiligung kamen durch Ultrastaging jeweils drei positive SLN hinzu. Alle neu diagnostizierten Fälle waren vom endometrioiden histologischen Typ. Durch das Ultrastaging zeigten sich zwei Fälle mit positivem SLN und sonst niedriger Risikokonstellation. Jeweils zwei

zusätzliche Fälle durch Ultrastaging waren es in den Risikoklassen „intermediate-high“ und „high“.

*Tabelle 11: Histopathologische Kriterien und Risikoklassifikation aller Fälle mit primär und sekundär positiven SLN*

Kategorie		SNB+	Änderung durch US
T-Stadium (TNM)	pT1a	5/127 (3,9 %)	+ 4
	pT1b	3/27 (11,1 %)	+ 1
	pT2	3/4 (75,0 %)	+ 1
	pT3	0/1 (0,0 %)	+ 0
Grade	1	3/112 (2,7 %)	+ 2
	2	2/19 (10,5 %)	+ 1
	3	6/28 (21,4 %)	+ 3
LVSI	nein	5/137 (3,6 %)	+ 3
	ja	6/22 (27,3 %)	+ 3
Histologie	endometrioid	7/138 (5,1 %)	+ 6
	serös	2/9 (22,2 %)	+ 0
	gemischt	1/7 (14,3 %)	+ 0
	muzinös	1/3 (33,3 %)	+ 0
	klarzellig	0/2 (0,0 %)	+ 0
Risiko	low	2/105 (1,9 %)	+ 2
	intermediate	1/16 (6,25 %)	+ 0
	intermediate-high	2/16 (12,5 %)	+ 2
	high	6/22 (27,3 %)	+ 2

Ein detaillierter Blick auf die der Risikoklassifikation zugrundeliegenden Parameter aller sekundär positiven SLN ist Tabelle 12 zu entnehmen. Die Kombination der Spalten 4 bis 7 führt zur in Spalte 8 angegebenen Risikoklasse.

*Tabelle 12: Charakteristika der Fälle mit sekundär positiver SNB nach Ultrastaging*

ID	Gruppe	Metastasentyp	Histologie	T-Stadium	Grade	LVS1	Risiko
439	A	makro	endometrioid	pT1b	G3	L0	high
179	B	mikro	endometrioid	pT1a	G1	L1	high-intermediate
223	B	mikro	endometrioid	pT1a	G3	L1	high-intermediate
235	B	mikro	endometrioid	pT1a	G2	L0	low
535	B	ITC	endometrioid	pT2	G3	L1	high
437	B	ITC	endometrioid	pT1a	G1	L0	low

### **3.3.1 Klinische Verläufe mit sekundär positiven SLN**

Im Folgenden werden die 6 Patientinnen, mit retrospektiv diskrepanter SLN-Beurteilung im Vergleich zum Originalbefund vorgestellt. Verwendet wird zu diesem Zweck die Studienidentifikationsnummer (ID).

#### ID 179

Die Patientin ID 179 wurde 2007 operiert. Sie erhielt eine SNB sowie eine pelvine und paraaortale LNE. Histologisch handelte es sich um ein endometrioides G1 Karzinom im Tumorstadium pT1a mit Lymphgefäßinvasion. Damit hatte sie eine mittelhohe Risikoklassifikation. Primär waren 2 SLN und 29 Non-SLN als tumorfrei beschrieben worden. Durch retrospektives Ultrastaging wurde bei ihr eine Mikrometastase mit 1 mm Durchmesser bereits im HE-Schnitt in Stufe 1 gefunden. Auch in der immunhistochemischen Färbung waren die Tumorzellen sichtbar, nicht aber im Originalschnitt zum Zeitpunkt der Operation. Die Patientin erhielt anschließend eine lokale Bestrahlung (Brachytherapie) und lebte 11 Jahre später ohne ein Rezidiv.

### ID 223

Die Patientin ID 223 wurde ebenfalls 2007 erstdiagnostiziert. Bei ihr wurde eine SNB und lediglich eine pelvine LNE durchgeführt. Ein SLN und 10 pelvine LK waren primär tumorfrei. Es handelte sich bei ihr um ein endometrioides Adenokarzinom G3 im Stadium pT1a mit einem hoch-intermediärem Risikoprofil und Lymphgefäßinvasion. Im Ultrastaging fand sich bei ihr eine 1 mm große Mikrometastase auf Stufe 7 im HE-Schnitt. Auch im immunhistochemischen Schnitt war diese sichtbar. In Stufe 6 waren im HE-Schnitt keine Tumorzellen zu sehen und im immunhistochemischen Schnitt von Stufe 6 zeigten sich einzelne isolierte Tumorzellen im Randsinus des LK. Die Patientin erhielt eine adjuvante Radiotherapie und verstarb ein Jahr nach der Behandlung ohne Rezidiv an einer anderen Todesursache.

### ID 235

Die dritte Patientin (ID 235) wurde 2008 operiert. Ihr wurden 2 SLN und 11 pelvine LK entnommen, die primär alle tumorfrei waren. Histologisch war ihre Diagnose ein endometrioides G2 Karzinom pT1a mit einem niedrigen Risikoprofil. Ihr wurden 2 SLN und 11 pelvine LK entnommen. Durch das Ultrastaging konnte man in den HE-Schnitten von Stufe 5 und 6 eines SLN eine 0,3 mm große Mikrometastase erkennen. Der andere SLN war auch im Ultrastaging tumorfrei. Sie erhielt anschließend eine Brachytherapie und lebte auch nach 10 Jahren ohne Rezidiv.

### ID 437

Die Patientin mit der ID 437 wurde 2011 operiert. Sie bekam 2 SLN und 12 pelvine LK entfernt. Es handelte sich bei ihr um ein muzinöses endometrioides G1 Karzinom im Stadium pT1a mit einer niedrigen Risikokonstellation. Durch das Ultrastaging fanden sich bei ihr in einem von zwei SLN ITC in der IHC-Färbung von Stufe 7 und 8. Sie erhielt anschließend keine weitere Therapie und lebte 7 Jahre später rezidivfrei.

### ID 535

Die Patientin ID 535 wurde 2007 behandelt. Ihre Diagnose war ein endometrioides Karzinom und durch ein Tumorstadium von pT2 hatte sie ein hohes Risikoprofil. Ihr wurden bei der Operation ein SLN und 33 pelvine und paraaortale LK entnommen. Im retrospektiven Ultrastaging konnten bei ihr isolierte Tumorzellen in den immunhistochemischen Schnitten von Stufe 1, 6 und 7 gesehen werden im Mark und im Randsinus des Lymphknotens. Sie erhielt eine adjuvante Brachytherapie und starb 4 Jahre später an einem Rezidiv des Endometriumkarzinoms.

### ID 439

Die Patientin wurde 2012 operiert und erhielt kein retrospektives Ultrastaging, sondern nicht-standardisiert von den SLN je drei Schnittstufen im Abstand von 500 µm direkt bei der histopathologischen Erstbefundung. Im Rahmen der Operation wurden ihr 3 SLN und 7 pelvine LK entfernt, die zunächst alle als tumorfrei beschrieben wurden. Im Zuge der histopathologischen Aufarbeitung, wurde anschließend in den Schnittstufen eine 5 mm große Makrometastase detektiert. Ihre Diagnose war primär ein endometrioides G3 Karzinom im Stadium pT1b mit hohem Risiko. Entgegen der damals gültigen Leitlinie erhielt sie lediglich eine Brachytherapie. Sie verstarb zwei Jahre später an einem Rezidiv des Endometriumkarzinoms.

Zusammengefasst sind die klinischen Verläufe in Tabelle 13 abgebildet, jeweils mit der Studienidentifikationsnummer, der Ultrastaging-Interventionsgruppe, dem Jahr der Erstdiagnose (ED), dem letzten bekannten Follow-up-Status der Patientin in der Spalte „Verlauf“, dem Metastasentyp und der Risikogruppe. Zwei von sechs Patientinnen verstarben am Endometriumkarzinom (DSS), eine Patientin starb multimorbide und in hohem Alter und drei Patientinnen lebten ohne Rezidiv nach aktueller Information.

*Tabelle 13: Übersicht klinische Verläufe mit den wichtigsten Parametern*

<b>ID</b>	<b>Gruppe</b>	<b>ED</b>	<b>Verlauf</b>	<b>Typ</b>	<b>Risiko</b>
439	A	2012	DSS 2014	MAC	<b>high</b>
179	B	2007	lebt Stand 2021	MM	intermediate
223	B	2007	verstorben 2008 (multimorbide)	MM	high- intermediate
235	B	2008	lebt Stand 2018	MM	low
437	B	2011	lebt Stand 2018	ITC	low
535	B	2007	DSS 2011	ITC	<b>high</b>

*(MAC = Makrometastase, MM = Mikrometastase, ITC = isolierte Tumorzellen  
DSS = disease specific survival)*

## 4 Diskussion

### 4.1 Fragestellung

Das seit Jahrzehnten fest etablierte chirurgische Staging mittels systematischer LNE in der Therapie des Endometriumkarzinoms wird seit rund dreißig Jahren kontrovers diskutiert. Einerseits liefert es wichtige pathologische Informationen über die Ausbreitung des Tumors, die eine angemessene Entscheidung über die adjuvante Behandlung ermöglichen (Emons, 2020). Andererseits ist die systematische LNE durch eine nicht zu vernachlässigende Morbidität gekennzeichnet und bringt eher einen diagnostischen als einen Überlebensvorteil mit sich (Casarin et al., 2020).

Wie beim Mammakarzinom schon erfolgreich implementiert, kann das Konzept der SNB mit gleicher diagnostischer Aussagekraft lebensbeschränkender Morbiditäten durch eine ausgedehnte LNE vermeiden. In den letzten Jahren gab es Bemühungen, das in der Therapie des Mammakarzinoms so erfolgreiche Konzept der SNB auch für das Endometriumkarzinom zu etablieren.

Ein wesentlicher Punkt ist hierbei die Aufarbeitung der Lymphknoten. Es werden unterschiedliche Methoden angewandt, beispielsweise mit und ohne Ultrastaging.

Die Datenlage zum Ultrastaging beim Endometriumkarzinom ist uneinheitlich. Grundsätzlich wird die Durchführung eines Ultrastaging von mehreren Autoren befürwortet (Kim et al., 2013b, Euscher et al., 2018, Holloway et al., 2016). Problematisch ist, dass bis zum heutigen Tage noch kein standardisiertes Protokoll etabliert ist (Euscher and Malpica, 2020, Malpica et al., 2019). Davon abgesehen ist noch ungeklärt, ob das Ultrastaging eine sinnvolle Ergänzung der Primärdiagnostik im klinischen Alltag darstellt und welche Relevanz im Ultrastaging detektierte MM und ITC für den Krankheitsverlauf haben. Das Risiko der daraus möglicherweise resultierenden Übertherapie zum Schaden der Patientin muss kritisch geprüft werden.

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, inwiefern ein zusätzliches histopathologisches Ultrastaging die Detektionsrate positiver Sentinel-Lymphknoten in der Diagnostik des Endometriumkarzinoms beeinflusst.

Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob ein zusätzliches Ultrastaging sinnvoll ist und wie wichtig die Etablierung von Standards dabei ist.

## **4.2 Studienkollektiv**

In der Literatur sind bislang verschiedene Studienkollektive zum Ultrastaging etabliert. Hinsichtlich der üblichen Charakteristika wie pT-Stadium, Grading und Histologie konnten in unserem Kollektiv keine wesentlichen Abweichungen festgestellt werden (Kim et al., 2013b, Ferraioli et al., 2015, Delpech et al., 2007, Erkanli et al., 2011, Colombo et al., 2016).

Einige wenige Arbeiten begrenzen ihre Ultrastaging-Kollektive auf Karzinome im Frühstadium (FIGO I/II) beziehungsweise mittel- bis gut-differenziert (G1/2) (Kim et al., 2013a, Holloway et al., 2016, Delpech et al., 2007). Hier muss bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden, dass eine selektionierte Patientengruppe mit prognostisch günstigeren Eigenschaften vorliegt.

## **4.3 Ultrastaging**

Besondere Aufmerksamkeit wurde der Etablierung des eigenen Ultrastaging-Protokolls gewidmet. Nach ausführlicher Literaturrecherche war die Integration bislang generierter Evidenz durch bereits publizierte Protokolle essenziell. Drei Leitgedanken für die umfassendste Genauigkeit waren dabei führend:

1. Eine feine Stufung zu Beginn mit Abständen von 100  $\mu\text{m}$ , ausschließlich HE-gefärbt. Dieser Schritt dient der Repräsentation vieler Bereiche des Lymphknotens, die bei der konventionellen LK-Aufarbeitung unterrepräsentiert bleiben wie zum Beispiel der Randsinus.

2. Eine grobe Stufung mit Abständen von 500 µm und HE-Färbung, um den gesamten LK repräsentativ abzubilden.
3. Immunhistochemische Färbung mit Zytokeratin aller 500-µm-Stufen, um auch ITC finden zu können.

Die meisten anderen Protokolle stufen die LK feiner, in Abstände von 50 bis 200 µm. Dafür fertigen sie insgesamt nur wenige Stufen an – 1, 3, 5 oder 10 – und verwenden bei nur 1 - 4 Stufen immunhistochemische Färbung (vgl. 1.3.2).

In einem Punkt unterscheidet sich die hier angewandte Technik relevant von der bisherigen Literatur. Allen anderen hier beschriebenen Studien ist gemeinsam, dass eine fest vorgegebene Anzahl an Schnittstufen angefertigt wird. Nach unserem Protokoll hingegen wurde jeder LK in Stufen geschnitten, bis das gesamte Paraffinmaterial aufgebraucht war. Dadurch soll möglichst repräsentativ der gesamte LK abgebildet werden. So kommt es, dass in unserem Kollektiv eine große Spannweite von Schnittpräparaten pro SLN vorliegt (6 bis 12).

#### **4.4 Limitationen**

Für die Risikoeinteilung des Kollektivs wurde die aktuelle ESMO-ESGO-Klassifikation verwendet in der Variante ohne Kenntnis des molekularen Profils, siehe Tabelle 2 (Concin et al., 2021). Dafür war die Quantifizierung des LVSI-Status notwendig in „L0 – keine LVSI“, „L1 – fokal“ und „L1 – substantial“ (Bosse et al., 2015). Diese Daten waren in unserem Kollektiv nicht verfügbar, sondern lediglich die Information „L0“ oder „L1“. Daher wurde jeder L1-Status als „substantial“ gewertet. Nach der aktuellen LVSI-Bewertungsskala würden möglicherweise einige Fälle in eine andere Risikoklasse eingruppiert werden. Damit könnte die Verteilung auf die Risikoklassen unseres Kollektivs verzerrt sein.

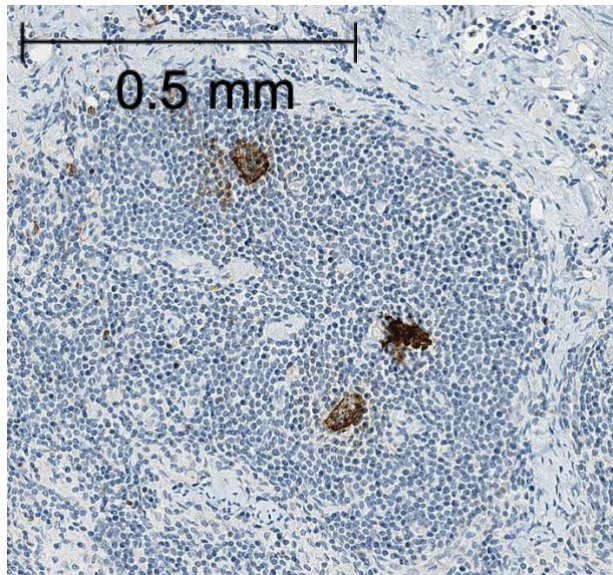
Eine weitere Limitation liegt in der Markierung und Detektion des SLN begründet. Von 302 Patientinnen mit SLN-Markierung, konnte nur in gut der Hälfte der Fälle (52,6 %, n = 159) erfolgreich ein SLN asserviert werden. Grund dafür war zumeist

ein Markierungsproblem: zum Beispiel hatte kein Lymphknoten Technetium beziehungsweise Farbstoff angereichert, oder der betreffende Lymphknoten war intraoperativ nicht sichtbar. In einigen wenigen Fällen konnte der betreffende LK aus anatomischen Gründen intraoperativ nicht entfernt werden. Zuletzt war in einigen Fällen trotz im OP-Bericht vermerkter Entnahme eines SLN dem histologischen Befund dann kein als SLN identifizierter LK zu entnehmen. Wenn das SLN-Konzept perioperativ optimal funktioniert, könnten mit hoher Wahrscheinlichkeit mehr Patientinnen eingeschlossen werden.

Der Vorteil unserer Methode ist, dass der gesamte LK in Schnittstufen abgebildet wird und nicht unterschiedlich große Anteile davon, da die LK in ihrer Größe variieren. Einige Ultrastaging-Protokolle färben erst dann mit Immunhistochemie, wenn der korrespondierende HE-Schnitt einen negativen Befund zeigt (Euscher et al., 2018, Ferraioli et al., 2015). Dieses Vorgehen spart in einigen Fällen eine teure IHC-Färbung, andererseits müssten so im klinischen Alltag viele Fälle erneut herausgesucht, nachgefärbt und noch einmal mikroskopisch beurteilt werden. Gerade das Anfertigen von sehr vielen Schnittpräparaten sowie die aufwendige IHC-Färbung, sind in einem außeruniversitären Setting nicht immer umsetzbar. Es muss kritisch angemerkt werden, dass im Kontext knapper gesundheitlicher Ressourcen auch in der Diagnostik ökonomische Faktoren nicht außer Acht gelassen werden dürfen.

Auch bei der Interpretation der IHC-Färbung gibt es bestimmte Aspekte zu beachten. Sie kann zum Beispiel einen falsch-positiven Befund verursachen. Panzytokeratin färbt nicht nur wie gewünscht die abgesiedelten Tumorzellen des Endometriumkarzinoms im LK, sondern auch andere epitheliale Strukturen wie aufgelagerte Hautschuppen, Endosalpingeose (regelhaftes Tubengewebe, das sich manchmal in den drainierenden LK findet), dendritische Zellen, Histiozyten und Mesothelzellen (physiologische Zellen des Lymphknotens, die Zytokeratine in Intermediärfilamenten produzieren). Abbildung 10 zeigt immunhistochemisch gefärbte Strukturen, die am ehesten einer Verunreinigung durch aufgelagerte Hautschuppen entsprechen. Unter dem Mikroskop ist erkennbar, dass die

bräunlichen Areale nicht in derselben Ebene liegen wie die Zellen im LK. Trotzdem könnte man fälschlicherweise von der Anfärbung isolierter Tumorzellen ausgehen.



*Abbildung 10: Beispiel einer Verunreinigung*

Auch falsch-negative Befunde durch eine fehlerhafte Antikörperreaktion können mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit auftreten.

Des Weiteren ist es möglich, dass das SLN-Konzept nicht erwartungsgemäß funktioniert. In diesem Fall sind trotz negativem SLN-Befund, Metastasen in anderen Lymphknoten vorhanden. Der SLN ist dann falsch-negativ.

Nicht alle Patientinnen des Studienkollektivs haben ergänzend zur SNB eine systematische LNE erhalten. Vor allem in der Gruppe von Patientinnen mit Tumorstadium pT1a (Tabelle 7) erhielt nur knapp die Hälfte eine zusätzliche LNE - die AWMF-S3-Leitlinie für das Endometriumkarzinom empfiehlt in diesem Fall keine systematische Lymphknotenentfernung (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Das bedeutet, dass in der anderen Hälfte möglicherweise falsch-negative SLN aufgetreten sind, was jedoch nicht überprüft werden, da keine anderen Lymphknoten außer dem SLN von den Patientinnen vorliegen.

Der Wunschgedanke ist, dass eine unzureichende LK-Aufarbeitung ursächlich für falsch-negative SLN-Befunde ist und das Ultrastaging dieses Problem

beheben kann. Das Ultrastaging scheint jedoch nicht das Allheilmittel für dieses Phänomen zu sein: Mehrere Studien berichten von falsch-negativen SLN, auch nach der Anwendung des Ultrastaging. In der Arbeit von Kim et al. war dies bei 1,2 % der Patientinnen der Fall, bei Euscher et al. sogar bei 3,5 % (Euscher et al., 2018, Kim et al., 2013b). Generell liegt das Risiko paraaortal-positiver LK bei pelvin-negativen LK bei circa 2-3 % (Mariani et al., 2004, Kumar et al., 2014).

#### **4.5 Auswertung**

In unserem Ultrastaging-Kollektiv wurden 6 von 154 Patientinnen identifiziert, die zuvor mit einem negativen SLN dokumentiert waren und bei denen im Ultrastaging Tumorzellen gefunden wurden. Das sind 6 Fälle, die zuvor falsch-negativ gewertet wurden. Im Verhältnis zu primär 5 bekannten positiven Fällen, hat sich damit die Sensitivität der LK-Aufarbeitung durch das Ultrastaging deutlich verbessert und die Detektionsrate hat sich mehr als verdoppelt, von 3,14 % auf 6,92 %. Als erste Schlussfolgerung bleibt festzuhalten, dass das zusätzliche Ultrastaging die Detektion positiver SLN erhöht.

Unter den 77 primär bereits gestuften Fällen (Gruppe A) gab es einen, bei dem eine Makrometastase in den Schnittstufen identifiziert wurde. Durch den Verzicht auf eine systematische feinere Stufung sowie IHC-Färbung ist daher wahrscheinlich, dass in dieser Gruppe einige weitere positive SLN übersehen wurden. In der gleichgroßen Gruppe B, die nach dem Protokoll dieser Doktorarbeit (2.2.1) bearbeitet wurde, fanden sich fünfmal mehr positive Fälle. Allerdings handelt es sich dabei ausschließlich um kleinvolumige Metastasentypen (MM, ITC).

Möchte man die bestmögliche Detektion von Tumorzellen egal welchen Metastasentyps erreichen, so ist das systematische Vorgehen mit feiner Stufung und zusätzlicher IHC-Färbung unverzichtbar. Viele andere Autoren wenden in ihren Protokollen eine deutlich feinere Stufung an. Dennoch konnten auch sie ihre Detektionsrate lediglich verdoppeln. Durch eine noch feinere Stufenaufarbeitung als die unsere, würden demnach unwahrscheinlich noch

mehr positive SLN entdeckt werden. Zudem war in unserem Kollektiv keine einzige Metastase ausschließlich in den feinen 100- $\mu$ m-HE-Stufen sichtbar. Daraus kann man schließen, dass dieser Teil des Protokolls nicht zwingend erforderlich ist, um auch alle kleinvolumigen Metastasen zu finden. Das spricht für den Verzicht auf eine feine 100- $\mu$ m-HE-Stufung. Sie scheint keinen weiteren Erkenntnisgewinn in der Diagnostik zu bringen.

Die gefundenen ITC hingegen waren nur in der IHC-Färbung zu erkennen. Diese ist somit notwendig, wenn das Ziel ist, möglichst alle ITC zu finden.

Der relative Anteil an Patientinnen mit positiven SLN variiert in anderen Arbeiten. Trotzdem finden durch zusätzliches Ultrastaging auch andere in etwa doppelt so viele positive SLN, wie es auch in dieser Studie der Fall ist. Kim et al. dokumentierten initial 6,9 % positive SNB in ihrem Kollektiv. Durch Ultrastaging wurde die Detektionsrate fast verdoppelt auf 11,4 % (Kim et al., 2013b). Ähnlich verhält es sich bei Holloway et al.: bei ihnen stieg die Detektion von initial 14,7% auf 30,3 % (Holloway et al., 2016). Zum Großteil finden sich durch Ultrastaging Mikrometastasen und ITC und nur selten Makrometastasen (Koskas et al., 2013). Auch das bestätigt das Ergebnis dieser Arbeit.

Betrachtet man die Gesamtheit aller Fälle mit primär und sekundär positivem SLN „in Bezug auf“ deren klinische Parameter, fällt auf, dass vor allem prognostisch günstige Faktoren unter den neu diagnostizierten Fällen vertreten sind (vergleiche Tabelle 11 und Tabelle 12). Der deutlichste Zuwachs ist dabei in frühen Tumorstadien (pT1a/pT1b), einem Differenzierungsgrad von G3 und einer Histologie vom endometrioiden Typ zu verzeichnen. Bei allen anderen histologischen Typen und in T-Stadium pT3 hat sich die Anzahl der positiven SLN nicht verändert. Durch das Ultrastaging wurden überdies zwei Fälle mit positivem SLN und sonst niedrigem Risikoprofil (low-risk) diagnostiziert.

Aus klinischer Sicht drängt sich die Frage auf, welchen Stellenwert den Ultrastaging-Befunden beizumessen ist und ob dies negative Konsequenzen für die Patientinnen haben kann. Es wäre fatal, das Ultrastaging missbräuchlich als Argument für eine möglicherweise nicht notwendige Therapieeskalation zu verwenden. Für Makrometastasen ist das Prozedere unumstritten eindeutig: die

Patientin profitiert von einer weiteren Therapie (Willis et al., 2011). Das unterstreicht der Fall mit positiver SNB aus Gruppe A: der LK-Befall wurde entgegen den schon damals gültigen Prinzipien nicht therapiert (3.3.1). Es ist vorstellbar, dass bei dieser Patientin die adjuvante Therapie einen positiven Beitrag geleistet hätte.

Die klinische Relevanz von im Ultrastaging gefundenen ITC betreffend, besteht wesentliche Einigkeit, dass deren Existenz kein bedeutender Faktor für den Krankheitsverlauf ist (Kim et al., 2013a, St Clair et al., 2016, Bogani et al., 2019, Eriksson et al., 2021, Gill et al., 2021). Auch in der Literatur für das Mammakarzinom gibt es einige Arbeiten, die zeigen, dass die Präsenz von ITC nicht relevant für das Überleben ist (siehe 1.3.1). Daher ist eine Aufarbeitung in feine Stufen und das Anfertigen einer IHC-Färbung beim Mammakarzinom nicht empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020).

Fraglich ist die Rolle der Mikrometastasen. Für das Endometriumkarzinom kommen einige Arbeiten zu dem Schluss, man müsse auch ITC und MM in jedem Fall therapieren (Erkanli et al., 2011, Garcia Pineda et al., 2020, Ignatov et al., 2019, Piedimonte et al., 2018, Todo et al., 2016). Andere warnen vor einer nicht notwendigen Übertherapie und verweisen auf den deutlichen prognostischen Unterschied zwischen der Präsenz von Makrometastasen im Gegensatz zu ITC und MM (St Clair et al., 2016). Bei kleinvolumigem Nodalbefall sinkt das Risiko für weitere LK-Metastasen erheblich (Backes et al., 2019). Das spricht für eine nicht zwingend erforderliche Therapie der Mikrometastasen. Unsere klinischen Verläufe lassen nicht vermuten, dass durch die Unkenntnis der SLN-Mikrometastasen ein Schaden für die Patientinnen entstanden ist: der Großteil lebt Jahre später ohne Rezidiv und ohne adjuvante Therapie, trotz initial okkulten Mikrometastasen. Plante et al. plädieren dafür, dass andere Tumoreigenschaften für die Therapieindikation bedeutsamer seien, wie zum Beispiel Tumorphistologie und Myoinvasion (Plante et al., 2017).

Das Vorliegen einer substanziellen LVSI hat sich als relevanter prognostischer Faktor etabliert und stellt die Indikation für eine adjuvante Strahlen- bzw. Chemotherapie (Bosse et al., 2015). Es ist eine Überlegung wert, ob nicht anstatt

auf die Detektion jeder isolierter Tumorzelle zu achten, eher Faktoren wie der LVSI Beachtung geschenkt werden sollte (McCluggage et al., 2022).

Zu bedenken ist, dass sämtliche Ergebnisse ohne Informationen zur molekularen Klassifikation gewonnen wurden. Zukünftig bedarf es subtypspezifische Studien zu Verhalten und klinischer Relevanz von Lymphknotenmetastasen.

#### **4.6 Praktische Implikation**

In Zusammenfassung der oben aufgeführten Überlegungen ist festzuhalten, dass nach aktuellem Kenntnisstand die Detektion aller Makrometastasen vorrangig ist. Auf die IHC-Färbung kann aus unserer Sicht verzichtet werden. Damit soll in höchstmöglichem Maße diagnostische Genauigkeit erzielt werden und andererseits eine mögliche Übertherapie vermieden werden.

Für den praktischen Alltag soll das Ultrastaging des SLN beim Endometriumkarzinom durchgeführt werden mit dem Fokus, möglichst alle Makrometastasen zu identifizieren, wie auch beim Mammakarzinom. Auf feine 100-µm-Stufen mit HE-Färbung kann verzichtet werden, denn es wurden dadurch nicht mehr befallene LK identifiziert. Auf die teure und aufwändige IHC kann ebenso verzichtet werden. Durch sie detektiert man zwar auch ITC, wir glauben allerdings auf Grundlage der aktuellen Literatur und unserer klinischen Verläufe nicht, dass die Therapie dieser den entscheidenden Überlebensvorteil bringt. In Gruppe B sind fünfmal mehr positive SNB gefunden worden als in Gruppe A, was nach den Ergebnissen der klinischen Verläufe für die Prognose nicht notwendig gewesen wäre. Mit der in Gruppe A durch Stufenschnitte detektierten Makrometastase kann angenommen werden, dass auch mit dieser nicht-standardisierten, groben Aufarbeitung kein relevanter Nodalbefall verpasst wurde.

Voraussetzung für das Ultrastaging ist, dass das SLN-Konzept beim Endometriumkarzinom sicher funktioniert. Ob und inwiefern diese Information für die Indikation der adjuvanten Therapie eine Rolle spielt, kann zukünftig geklärt werden.

Letztlich ist die Diagnostik der SLN ein weiterer Faktor in einem multimodalen Behandlungsalgorithmus und das Ultrastaging ein wichtiger Beitrag zur sicheren Bestimmung des Nodalstatus.

## 5 Zusammenfassung

Für die Stadieneinteilung, Prognose und Therapie des Endometriumkarzinoms ist die Kenntnis des Nodalstatus eine wesentliche Information. In der Vergangenheit wurde hierzu oftmals eine systematische pelvine und paraaortale Lymphonodektomie mit potenziell nicht unerheblicher peri- und postoperativer Morbidität durchgeführt. Dieses Verfahren wurde in den meisten Fällen zwischenzeitlich durch eine gezielte Entfernung der Wächterlymphknoten („Sentinel-Lymphknotenbiopsie“) ersetzt. Zum Umfang der histopathologischen Aufarbeitung dieser speziellen Lymphknoten sind derzeit allerdings noch verschiedene Protokolle und zum Teil divergierende Konzepte im Umlauf. Eine abschließende Klärung und Empfehlung seitens Fachgesellschaften hierzu stehen aktuell noch aus.

Ziel dieser Doktorarbeit war es daher an einem großen, retrospektiven Kollektiv der Universitätsfrauenklinik Tübingen zu überprüfen, inwiefern sich die Detektionsrate positiver Sentinel-Lymphknoten (SLN) durch zusätzliche, standardisierte Untersuchungsschritte („Ultrastaging“) verändern würde.

Durch eine spezialisierte Zweitbegutachtung der ursprünglichen histologischen Präparate, Anfertigung zusätzlicher Stufenschnitte und immunhistochemischer Zusatzuntersuchungen, konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl der Patientinnen mit positivem Sentinel-Lymphknoten mehr als verdoppelt. Hierbei wurden neben Makro- und Mikrometastasen auch Lymphknoten mit lediglich isolierten Tumorzellen identifiziert. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit legen somit nahe, dass eine erweiterte histopathologische Aufarbeitung mit einer relevanten Erhöhung nodal-positiver Fälle einhergeht und in Zukunft integrativer Bestandteil entsprechender Protokolle sein sollte.

Kritisch zu hinterfragen bleibt allerdings die klinische Bedeutung der auf diesem Wege zusätzlich identifizierten Lymphknotenmetastasen. Gemäß bislang verfügbarer Daten muss insbesondere der Stellenwert isolierter Tumorzellen kritisch hinterfragt werden. Im ungünstigsten Falle kann sich für betroffene Patientinnen durch ein vermeintliches „Upstaging“ eine möglicherweise folgenschwere Eskalation adjuvanter Therapieverfahren ergeben.

## 6 Literaturverzeichnis

Abu-Rustum, N. R. 2013. The increasing credibility of sentinel lymph node mapping in endometrial cancer. *Ann Surg Oncol*, 20, 353-4.

Abu-Rustum, N. R. 2014. Sentinel lymph node mapping for endometrial cancer: a modern approach to surgical staging. *J Natl Compr Canc Netw*, 12, 288-97.

Andreano, A., Rechichi, G., Rebora, P., Sironi, S., Valsecchi, M. G. & Galimberti, S. 2014. MR diffusion imaging for preoperative staging of myometrial invasion in patients with endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur Radiol*, 24, 1327-38.

Apple, S. K. 2016. Sentinel Lymph Node in Breast Cancer: Review Article from a Pathologist's Point of View. *J Pathol Transl Med*, 50, 83-95.

Backes, F. J., Cohen, D., Salani, R., Cohn, D. E., O'Malley, D. M., Fanning, E., Suarez, A. A. & Fowler, J. M. 2019. Prospective clinical trial of robotic sentinel lymph node assessment with isosulfane blue (ISB) and indocyanine green (ICG) in endometrial cancer and the impact of ultrastaging (NCT01818739). *Gynecol Oncol*, 153, 496-499.

Ballester, M., Dubernard, G., Lecuru, F., Heitz, D., Mathevet, P., Marret, H., Querleu, D., Golfier, F., Leblanc, E., Rouzier, R., et al. 2011. Detection rate and diagnostic accuracy of sentinel-node biopsy in early stage endometrial cancer: a prospective multicentre study (SENTI-ENDO). *Lancet Oncol*, 12, 469-76.

Bogani, G., Mariani, A., Paolini, B., Ditto, A. & Raspagliesi, F. 2019. Low-volume disease in endometrial cancer: The role of micrometastasis and isolated tumor cells. *Gynecol Oncol*, 153, 670-675.

Bokhman, J. V. 1983. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 15, 10-7.

Bosse, T., Peters, E. E., Creutzberg, C. L., Jürgenliemk-Schulz, I. M., Jobsen, J. J., Mens, J. W., Lutgens, L. C., van der Steen-Banasik, E. M., Smit, V. T. & Nout, R. A. 2015. Substantial lymph-vascular space invasion (LVSI) is a significant risk factor for recurrence in endometrial cancer--A pooled analysis of PORTEC 1 and 2 trials. *Eur J Cancer*, 51, 1742-50.

Casarin, J., Bogani, G., Piovano, E., Falcone, F., Ferrari, F., Odicino, F., Puppo, A., Bonfiglio, F., Donadello, N., Pinelli, C., et al. 2020. Survival implication of lymphadenectomy in patients surgically treated for apparent early-stage uterine serous carcinoma. *J Gynecol Oncol*, 31, e64.

Colombo, N., Creutzberg, C., Amant, F., Bosse, T., Gonzalez-Martin, A., Ledermann, J., Marth, C., Nout, R., Querleu, D., Mirza, M. R., et al. 2016. ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: Diagnosis, Treatment and Follow-up. *Int J Gynecol Cancer*, 26, 2-30.

Compton, C. C., Byrd, D. R., Garcia-Aguilar, J., Kurtzman, S. H., Olawaiye, A. & Washington, M. K. 2012. Purposes and principles of cancer staging. *AJCC cancer staging atlas*. Springer.

Concin, N., Matias-Guiu, X., Vergote, I., Cibula, D., Mirza, M. R., Marnitz, S., Ledermann, J., Bosse, T., Chargari, C., Fagotti, A., et al. 2021. ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. *Radiother Oncol*, 154, 327-353.

Creasman, W. T., Odicino, F., Maisonneuve, P., Quinn, M. A., Beller, U., Benedet, J. L., Heintz, A., Ngan, H. & Pecorelli, S. 2006. Carcinoma of the Corpus Uteri. *Int J Gynaecol Obstet*, 95 Suppl 1, S105-S143.

Dako. 2017. *Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin Clones AE1/AE3* [Online]. Available: [https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/303322EFG\\_05.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/303322EFG_05.pdf) [Zugriff 22.06.2022].

de Boer, S. M., Wortman, B. G., Bosse, T., Powell, M. E., Singh, N., Hollema, H., Wilson, G., Chowdhury, M. N., Mileskin, L., Pyman, J., et al. 2018. Clinical consequences of upfront pathology review in the randomised PORTEC-3 trial for high-risk endometrial cancer. *Ann Oncol*, 29, 424-430.

Delpech, Y., Cortez, A., Coutant, C., Callard, P., Uzan, S., Darai, E. & Barranger, E. 2007. The sentinel node concept in endometrial cancer: histopathologic validation by serial section and immunohistochemistry. *Ann Oncol*, 18, 1799-803.

Denschlag, D., Ulrich, U. & Emons, G. 2010. The diagnosis and treatment of endometrial cancer: progress and controversies. *Dtsch Arztebl Int*, 108, 571-7.

Diedrich, K. 2007. *Gynäkologie und Geburtshilfe mit 97 Tabellen ; [völlig neu mit Fallquiz]*, Heidelberg, Springer Medizin Verl.

Emons, G. 2020. Comprehensive pelvic and paraaortic lymphadenectomy in patients with apparently early stage uterine serous carcinoma - an anachronism? *J Gynecol Oncol*, 31, e76.

Eriksson, A. G. Z., Davidson, B., Bjerre Trent, P., Eyjolfsdottir, B., Dahl, G. F., Wang, Y. & Staff, A. C. 2021. Update on Sentinel Lymph Node Biopsy in Surgical Staging of Endometrial Carcinoma. *J Clin Med*, 10.

Erkanli, S., Bolat, F. & Seydaoglu, G. 2011. Detection and importance of micrometastases in histologically negative lymph nodes in endometrial carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol*, 32, 619-25.

ESGO. 2018. *ESGO/ESTRO/ESP - Guidelines for Cervical Carcinoma* [Online]. Available: <https://guidelines.esgo.org/media/2018/04/Cervical-cancer-Guidelines-Complete-report.pdf> [Zugriff 22.06.2022].

Euscher, E., Sui, D., Soliman, P., Westin, S., Ramalingam, P., Bassett, R. & Malpica, A. 2018. Ultrastaging of Sentinel Lymph Nodes in Endometrial Carcinoma According to Use of 2 Different Methods. *Int J Gynecol Pathol*, 37, 242-251.

Euscher, E. D. & Malpica, A. 2020. Gynaecological malignancies and sentinel lymph node mapping: an update. *Histopathology*, 76, 139-150.

Ferraioli, D., Chopin, N., Beurrier, F., Carrabin, N., Buenerd, A. & Mathevet, P. 2015. The incidence and clinical significance of the micrometastases in the sentinel lymph nodes during surgical staging for early endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 25, 673-80.

Garcia Pineda, V., Hernandez Gutierrez, A., Gracia Segovia, M., Siegrist Ridruejo, J., Diestro Tejada, M. D. & Zapardiel, I. 2020. Low-Volume Nodal Metastasis in Endometrial Cancer: Risk Factors and Prognostic Significance. *J Clin Med*, 9.

Gilks, C. B., Oliva, E. & Soslow, R. A. 2013. Poor interobserver reproducibility in the diagnosis of high-grade endometrial carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 37, 874-81.

Gill, S. E., Garzon, S., Multinu, F., Hokenstad, A. N., Casarin, J., Cappuccio, S., McGree, M. E., Weaver, A. L., Cliby, W. A., Keeney, G. L., et al. 2021. Ultrastaging of 'negative' pelvic lymph nodes in patients with low- and intermediate-risk endometrioid endometrial cancer who developed non-vaginal recurrences. *Int J Gynecol Cancer*.

Giuliano, A. E., Hawes, D., Ballman, K. V., Whitworth, P. W., Blumencranz, P. W., Reintgen, D. S., Morrow, M., Leitch, A. M., Hunt, K. K., McCall, L. M., et al. 2011. Association of occult metastases in sentinel lymph nodes and bone marrow with survival among women with early-stage invasive breast cancer. *Jama*, 306, 385-93.

Holloway, R. W., Abu-Rustum, N. R., Backes, F. J., Boggess, J. F., Gotlieb, W. H., Jeffrey Lowery, W., Rossi, E. C., Tanner, E. J. & Wolsky, R. J. 2017. Sentinel lymph node mapping and staging in endometrial cancer: A Society of

Gynecologic Oncology literature review with consensus recommendations. *Gynecol Oncol*, 146, 405-415.

Holloway, R. W., Gupta, S., Stavitzski, N. M., Zhu, X., Takimoto, E. L., Gubbi, A., Bigsby, G. E., Brudie, L. A., Kendrick, J. E. & Ahmad, S. 2016. Sentinel lymph node mapping with staging lymphadenectomy for patients with endometrial cancer increases the detection of metastasis. *Gynecol Oncol*, 141, 206-210.

Horn, L. C., Mayr, D., Brambs, C. E., Eibenkel, J., Sändig, I. & Schierle, K. 2016. Grading gynäkologischer Tumoren. *Der Pathologe*, 37, 337-351.

Hsueh, E. C., Turner, R. R., Glass, E. C., Brenner, R. J., Brennan, M. B. & Giuliano, A. E. 1999. Sentinel node biopsy in breast cancer. *J Am Coll Surg*, 189, 207-13.

Ignatov, A., Lebius, C., Ignatov, T., Ivros, S., Knueppel, R., Papatthemelis, T., Ortman, O. & Eggemann, H. 2019. Lymph node micrometastases and outcome of endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 154, 475-479.

Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J. F., Wyczalkowski, M. A., et al. 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502, 333-339.

Khoury-Collado, F., Glaser, G. E., Zivanovic, O., Sonoda, Y., Levine, D. A., Chi, D. S., Gemignani, M. L., Barakat, R. R. & Abu-Rustum, N. R. 2009. Improving sentinel lymph node detection rates in endometrial cancer: how many cases are needed? *Gynecol Oncol*, 115, 453-5.

Kim, C. H., Khoury-Collado, F., Barber, E. L., Soslow, R. A., Makker, V., Leitao, M. M., Jr., Sonoda, Y., Alektiar, K. M., Barakat, R. R. & Abu-Rustum, N. R. 2013a. Sentinel lymph node mapping with pathologic ultrastaging: a valuable tool for assessing nodal metastasis in low-grade endometrial cancer with superficial myoinvasion. *Gynecol Oncol*, 131, 714-9.

Kim, C. H., Soslow, R. A., Park, K. J., Barber, E. L., Khoury-Collado, F., Barlin, J. N., Sonoda, Y., Hensley, M. L., Barakat, R. R. & Abu-Rustum, N. R. 2013b. Pathologic ultrastaging improves micrometastasis detection in sentinel lymph nodes during endometrial cancer staging. *Int J Gynecol Cancer*, 23, 964-70.

Koskas, M., Chereau, E., Ballester, M., Dubernard, G., Lécuru, F., Heitz, D., Mathevet, P., Marret, H., Querleu, D., Golfier, F., et al. 2013. Accuracy of a nomogram for prediction of lymph-node metastasis detected with conventional histopathology and ultrastaging in endometrial cancer. *Br J Cancer*, 108, 1267-72.

Krebs in Deutschland für 2017/2018 13. Ausgabe. Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2021.

Kumar, S., Podratz, K. C., Bakkum-Gamez, J. N., Dowdy, S. C., Weaver, A. L., McGree, M. E., Cliby, W. A., Keeney, G. L., Thomas, G. & Mariani, A. 2014. Prospective assessment of the prevalence of pelvic, paraaortic and high paraaortic lymph node metastasis in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 132, 38-43.

Leitlinienprogramm der DGGG, O. u. S. 2018. *Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Vulvakarzinoms und seiner Vorstufen, Version 1.0, S2k-Level, AWMF-Registernummer 032/042* [Online]. Available: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-042l\\_S2k\\_Vaginalkarzinom-Vorstufen-Diagnostik-Therapie-Nachsorge\\_2018-11.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-042l_S2k_Vaginalkarzinom-Vorstufen-Diagnostik-Therapie-Nachsorge_2018-11.pdf) [Zugriff 22.06.2022].

Leitlinienprogramm Onkologie, D. K. 2020. *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.4, AWMF Registernummer: 032-045OL* [Online]. Available: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> [Zugriff 22.06.2022].

Leitlinienprogramm Onkologie, D. K. 2021. *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom, Langversion, 2.0, AWMF-Registernummer: 032/033OL* [Online]. Available: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/zervixkarzinom/> [Zugriff 22.06.2022].

Leitlinienprogramm Onkologie, D. K. 2022. *Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientinnen mit Endometriumkarzinom, Langversion 2.01, AWMF-Registernummer: 032/034-OL* [Online]. Available: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/endometriumkarzinom/> [Zugriff 30.06.2022].

Levenback, C. F., Ali, S., Coleman, R. L., Gold, M. A., Fowler, J. M., Judson, P. L., Bell, M. C., De Geest, K., Spirtos, N. M., Potkul, R. K., et al. 2012. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in women with squamous cell carcinoma of the vulva: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol*, 30, 3786-91.

Levine, D. A., Getz, G., Gabriel, S. B., Cibulskis, K., Lander, E., Sivachenko, A., Sougnez, C., Lawrence, M., Kandoth, C., Dooling, D., et al. 2013. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*, 497, 67-73.

Malpica, A., Euscher, E. D., Hecht, J. L., Ali-Fehmi, R., Quick, C. M., Singh, N., Horn, L. C., Alvarado-Cabrero, I., Matias-Guiu, X., Hirschowitz, L., et al. 2019. Endometrial Carcinoma, Grossing and Processing Issues: Recommendations of

the International Society of Gynecologic Pathologists. *Int J Gynecol Pathol*, 38 Suppl 1, S9-s24.

Mariani, A., Dowdy, S. C., Cliby, W. A., Gostout, B. S., Jones, M. B., Wilson, T. O. & Podratz, K. C. 2008. Prospective assessment of lymphatic dissemination in endometrial cancer: a paradigm shift in surgical staging. *Gynecol Oncol*, 109, 11-8.

Mariani, A., Keeney, G. L., Aletti, G., Webb, M. J., Haddock, M. G. & Podratz, K. C. 2004. Endometrial carcinoma: paraaortic dissemination. *Gynecol Oncol*, 92, 833-8.

Marnitz, S., Waltar, T., Köhler, C., Mustea, A. & Schömig-Markiefka, B. 2020. The brave new world of endometrial cancer. *Strahlentherapie und Onkologie*.

McCluggage, W. G., Singh, N. & Gilks, C. B. 2022. Key changes to the World Health Organization (WHO) classification of female genital tumours introduced in the 5th edition (2020). *Histopathology*, 80, 762-778.

Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. & Krepler, R. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31, 11-24.

Morton, D. L., Wen, D. R., Wong, J. H., Economou, J. S., Cagle, L. A., Storm, F. K., Foshag, L. J. & Cochran, A. J. 1992. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*, 127, 392-9.

Oonk, M. H., van Hemel, B. M., Hollema, H., de Hullu, J. A., Ansink, A. C., Vergote, I., Verheijen, R. H., Maggioni, A., Gaarenstroom, K. N., Baldwin, P. J., et al. 2010. Size of sentinel-node metastasis and chances of non-sentinel-node involvement and survival in early stage vulvar cancer: results from GROINSS-V, a multicentre observational study. *Lancet Oncol*, 11, 646-52.

Papadia, A., Imboden, S. & Mueller, M. D. 2016. *Sentinel-Lymphknotenmapping mit NIR/ICG-Fluoreszenzbildgebung bei malignen Tumoren in der Gynäkologie*, Endo Press GmbH.

Piedimonte, S., Richer, L., Souhami, L., Arseneau, J., Fu, L., Gilbert, L., Alfieri, J., Jardon, K. & Zeng, X. Z. 2018. Clinical significance of isolated tumor cells and micrometastasis in low-grade, stage I endometrial cancer. *J Surg Oncol*, 118, 1194-1198.

Plante, M., Stanleigh, J., Renaud, M. C., Sebastianelli, A., Grondin, K. & Grégoire, J. 2017. Isolated tumor cells identified by sentinel lymph node mapping

in endometrial cancer: Does adjuvant treatment matter? *Gynecol Oncol*, 146, 240-246.

Rossi, E. C., Kowalski, L. D., Scalici, J., Cantrell, L., Schuler, K., Hanna, R. K., Method, M., Ade, M., Ivanova, A. & Boggess, J. F. 2017. A comparison of sentinel lymph node biopsy to lymphadenectomy for endometrial cancer staging (FIRES trial): a multicentre, prospective, cohort study. *Lancet Oncol*, 18, 384-392.

Sahbai, S., Taran, F. A., Staebler, A., Wallwiener, D., la Fougere, C., Brucker, S. & Dittmann, H. 2017. Sentinel lymph node mapping using SPECT/CT and gamma probe in endometrial cancer: an analysis of parameters affecting detection rate. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 44, 1511-1519.

St Clair, C. M., Eriksson, A. G., Ducie, J. A., Jewell, E. L., Alektiar, K. M., Hensley, M. L., Soslow, R. A., Abu-Rustum, N. R. & Leitao, M. M., Jr. 2016. Low-Volume Lymph Node Metastasis Discovered During Sentinel Lymph Node Mapping for Endometrial Carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 23, 1653-9.

Talhouk, A., McConechy, M. K., Leung, S., Li-Chang, H. H., Kwon, J. S., Melnyk, N., Yang, W., Senz, J., Boyd, N., Karnezis, A. N., et al. 2015. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Br J Cancer*, 113, 299-310.

Tanis, P. J., Nieweg, O. E., Valdes Olmos, R. A., Th Rutgers, E. J. & Kroon, B. B. 2001. History of sentinel node and validation of the technique. *Breast Cancer Res*, 3, 109-12.

Tanner, E. J., Sinno, A. K., Stone, R. L., Levinson, K. L., Long, K. C. & Fader, A. N. 2015. Factors associated with successful bilateral sentinel lymph node mapping in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 138, 542-7.

Todo, Y., Kato, H., Okamoto, K., Minobe, S., Yamashiro, K. & Sakuragi, N. 2016. Isolated tumor cells and micrometastases in regional lymph nodes in stage I to II endometrial cancer. *J Gynecol Oncol*, 27, e1.

Van der Zee, A. G., Oonk, M. H., De Hullu, J. A., Ansink, A. C., Vergote, I., Verheijen, R. H., Maggioni, A., Gaarenstroom, K. N., Baldwin, P. J., Van Dorst, E. B., et al. 2008. Sentinel node dissection is safe in the treatment of early-stage vulvar cancer. *J Clin Oncol*, 26, 884-9.

Vermij, L., Smit, V., Nout, R. & Bosse, T. 2020. Incorporation of molecular characteristics into endometrial cancer management. *Histopathology*, 76, 52-63.

Weaver, D. L., Ashikaga, T., Krag, D. N., Skelly, J. M., Anderson, S. J., Harlow, S. P., Julian, T. B., Mamounas, E. P. & Wolmark, N. 2011. Effect of occult

metastases on survival in node-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 364, 412-21.

Willis, G., Misas, J. E., Byrne, W. & Podczaski, E. 2011. Nodal metastasis in endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*, 32, 259-63.

Wittekind, C. 2004. *TNM Klassifikation maligner Tumoren*.

Yared, M. A., Middleton, L. P., Smith, T. L., Kim, H. W., Ross, M. I., Hunt, K. K. & Sahin, A. A. 2002. Recommendations for sentinel lymph node processing in breast cancer. *Am J Surg Pathol*, 26, 377-82.

Zusterzeel, P., Aarts, A., Kasiu, J. & Vergeldt, T. 2020. The role of the sentinel node dissection. In: Mirza, M. R. (ed.) *Management of Endometrial Cancer*. Springer.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde am Department für Frauengesundheit der Universitätsklinik Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. Stefan Kommoss durchgeführt.

Prof. Dr. Stefan Kommoss erstellte das Studiendesign, trug die Verantwortung für das Projekt und verfasste mit mir zusammen den Ethikantrag. Er half mir beim Anlegen einer geeigneten Tabelle zur Dokumentation unseres Kollektivs. Die Durchsicht sämtlicher Endometriumkarzinom-Akten der Jahre 2006 bis 2016 (806 insgesamt) zur Etablierung des Studienkollektivs führte ich durch in enger Rücksprache mit Prof. Dr. Stefan Kommoss. Dabei erfolgte die Zusammenschau sämtlicher verfügbarer histologischer Befunde, Operationsberichte, Einsendescheine Patientenakten und Arztbriefe der Patientinnen sowie die RedCap-Datenabfrage.

Alle Paraffinblöcke (165) mit paraffinfixiertem LK-Material wurden nach Anleitung durch MTA Karen Greif von mir aus dem Hauptarchiv des Instituts für Pathologie Tübingen herausgesucht, ebenso wie alle bereits angefertigten Schnittpräparate dieser Blöcke. Dabei handelte es sich sowohl um HE-Färbungen als auch vereinzelt um immunhistochemische Färbungen.

Sämtliche neuen Schnitte (insgesamt ca. 1400) wurden von mir selbst angefertigt und wurden alle im Institut für Pathologie Tübingen gefärbt. Alle immunhistochemischen Färbungen wurden im Institut für Pathologie Tübingen angefertigt.

Die spezialisierte mikroskopische Begutachtung aller verfügbaren Schnittpräparate von SLN der eingeschlossenen Patientinnen wurden von mir gemeinsam mit Frau PD Dr. Annette Staebler am Doppelkopf/Doppelvisiermikroskop nach dem Vier-Augen-Prinzip unter meiner selbständigen Vorbereitung und Dokumentation durchgeführt.

Die deskriptive Statistik der erhobenen Daten wurde von mir durchgeführt in Rücksprache mit Prof. Dr. Stefan Kommoss. Alle Abbildungen (1-10) wurden von mir mit MS Powerpoint erstellt. Die Aufarbeitung der klinischen Verläufe und die erneute Aktenrecherche wurde in Abstimmung mit Prof. Dr. Stefan Kommoss von mir selbst durchgeführt. Alle Ergebnisse der Arbeit wurden nach

selbständiger Literaturrecherche von mir in den Kontext zu aktuellen Forschungsarbeiten gesetzt.

Ich versichere, das Manuskript unter Anleitung von Prof. Dr. Stefan Kommos selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

---

Datum

Lara Baudoux

## 8 Veröffentlichungen

### Abstracts:

**Baudoux L**, Staebler A, Greif K, Krämer B, Hofmann S, Neis F, Andress J, Grube M, Pasternak J, Taran FA, Krämer P, Bachmann C, Oberlechner E, Brucker SY, Kommos S. 267 Histopathologic ultrastaging of sentinel lymph nodes in endometrial carcinoma: A retrospective analysis of the Tuebingen Women's Hospital 2006-16 patient cohort. In: *International Journal of Gynecologic Cancer* 2020;30:A109-A110.

**Baudoux L**, Staebler A, Greif K, Krämer B, Hofmann S, Neis F, Andress J, Grube M, Pasternak J, Krämer P, Taran FA, Brucker SY, Kommos S. (2020). Histopathologisches Ultrastaging zur Identifikation positiver Sentinellymphknoten in der Therapie des Endometriumkarzinoms: Retrospektive Analyse an einem großen Kollektiv der Universitätsfrauenklinik Tübingen. In: *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 80(10): 184 - 185

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gebührt allen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Stefan Kommos für die ausgezeichnete fachliche Betreuung, die unermüdliche Ermutigung weiterzuarbeiten und an jeder neuen Herausforderung zu wachsen, sowie für das großartige Mentoring, das mich fachlich und persönlich weitergebracht hat. Ich durfte viel lernen und hatte großartige Möglichkeiten, danke für alles.

PD Dr. med. Annette Staebler gilt mein Dank für die kompetente Unterstützung, viele lehr- und arbeitsreiche Stunden am Mikroskop, ihre Geduld und gute Anregungen sowie für ihren Support.

Karen Greif und Christine Beschorner haben mich bei meiner Arbeit im Pathologischen Institut jederzeit mit Rat und Tat unterstützt – vielen Dank für die angenehme Zusammenarbeit.

Ich danke Marcel Grube, der mir in unserer Arbeitsgruppe allzeit eine große Hilfe war.

Vielen Dank an Jana Pasternak für ihre Einweisung und Hilfe, viele Tipps und ein stets offenes Ohr – das hat mir den Anfang sehr erleichtert.

Meinen Freunden möchte ich danken für Austausch und Anregungen während unserer gemeinsamen Promotionszeit.

Lieben Dank meiner Familie, besonders meinen Eltern und Großeltern, die mich unterstützt, aufgebaut, bestärkt und immer an mich geglaubt haben. Für ihre Zeit und ihren Zuspruch, bin ich unendlich dankbar.

Die Promotionsphase ist eine herausfordernde Zeit - der größte Dank gebührt in Liebe meinem Mann Matthias, der so viel Verständnis hat, nie die Zuversicht verliert und immer für mich da ist.