

Badanie regionalnych węzłów chłonnych za pomocą biopsji węzła wartowniczego i analizy molekularnej jako nowe narzędzia oceny stopnia zaawansowania pierwotnego czerniaka skóry

Hans-Juergen Blaheta, Ulf Ellwanger, Birgit Schittek, Karl Sotlar,* Evelyn Maczey, Helmut Breuninger, Marcel H. Thelen, † Burkhard Bueltmann,* Gernot Rassner, and Claus Garbe

Klinika Dermatologii, Program Raka Skóry, Uniwersytet Eberhard-Karls, Tuebingen, Niemcy; *Klinika Patologii, Uniwersytet Eberhard-Karls, Tuebingen, Niemcy; † Zakład Medycyny Nuklearnej, Uniwersytet Eberhard-Karls, Tuebingen, Niemcy

Manuscript received 19 October 1999; revised 10 January 2000; accepted for publication 11 January 2000.

Reprints: Dr. Hans-Juergen Blaheta, Department of Dermatology, Skin Cancer Program, Eberhard-Karls-University, Liebermeister Str. 25, 72076 Tuebingen, Germany. Email: hans-juergen.blaheta@med.uni-tuebingen.de

Abbreviations: CDNA, complementary DNA; SLN, sentinel lymph node

Aktualnie podstawę do klasyfikacji prognostycznej pierwotnego czerniaka skóry stanowią parametry histopatologiczne nowotworu pierwotnego takie jak grubość guza wg Breslawa i poziom inwazyjności wg Clarka. W momencie gdy u pacjenta wystąpią przerzuty do węzła regionalnego cechy histopatologiczne czerniaka pierwotnego nie mają już większego znaczenia do predykcji przeżycia. Na tym etapie zaawansowania nowotworu głównym czynnikiem prognostycznym jest stopień zajęcia węzłów chłonnych. Celem tego badania jest zadanie pytania, czy zastosowanie niezwykle precyzyjnego testu molekularnego na obecność submikroskopowych komórek czerniaka w węzłach wartowniczych może być pomocne w przeprowadzaniu oceny stopnia zaawansowania czerniaka. Do badania zakwalifikowanych zostało stu szesnastu pacjentów ze zdiagnozowanym pierwotnym czerniakiem skóry przy łącznej liczbie 214 węzłów wartowniczych. Przeprowadzono badanie histopatologiczne węzłów wartowniczych wraz z reakcją łańcuchową polimerazy z odwrotną transkrypcją tyrozynazy. Podczas 19-miesięcznego (mediana) okresu badań kontrolnych pacjentów przebadano pod kątem ewentualnych nawrotów. Obliczono prawdopodobieństwo przeżycia bezobjawowego i za pomocą analizy wieloczynnikowej określono niezależne czynniki prognostyczne. Dzięki przeprowadzonej histopatologii wykryto obecność mikroprzerzutów do węzłów u 15 pacjentów (15%). Ze 101 pacjentów, którzy uzyskali ujemny wynik badania histopatologicznego węzłów wartowniczych 38 zostało przeklasyfikowanych na podstawie dodatniego wyniku reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną

transkrypcją tyrozynazy a 65 pacjentów nadal miało ujemny wynik reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją. Nawroty odnotowano u 23 (20%) ze 116 pacjentów. Nawroty te u 10 pacjentów (67%) zostały stwierdzone na podstawie dodatniego wyniku badania histopatologicznego węzłów wartowniczych, u dziewięciu pacjentów (25%) submikroskopowe komórki nowotworowe zostały wykryte za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją a u czterech pacjentów (6%) wyniki obydwu metod były ujemne. Różnice w częstości nawrotów były statystycznie istotne ($p=0.01$). W analizie wieloczynnikowej, badaniu histopatologicznym i łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją status węzła wartowniczego okazał się być jedynym istotnym czynnikiem prognostycznym do predykcji przeżycia bezobjawowego. Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją tyrozynazy mająca na celu wykrycie minimalnych pozostałości czerniaka w węzłach wartowniczych jest ważnym narzędziem do określenia grupy pacjentów objętych zwiększonym ryzykiem późniejszych przerzutów. Ponadto ujemny wynik reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją pozwolił na zdefiniowanie grupy pacjentów z nowotworem o dużej grubości u których ryzyko wystąpienia nawrotu choroby było niskie. Dane te mogą w przyszłości mieć wpływ na klasyfikację nowotworową pierwotnego czerniaka skóry. *Słowa kluczowe: czerniak/reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją/węzeł wartowniczy/określanie stopnia zaawansowania nowotworu. J Invest Dermatol 114:637-642, 2000*

W 1969 roku Clark i jego współpracownicy wprowadzili mikrostopniowanie czerniaka skóry klasyfikując nowotwór pierwotny na pięć kategorii w oparciu o stopień zaawansowania (Clark *et al*, 1969). Rok później Breslow zaproponował bardziej dokładny sposób oceny stopnia zaawansowania nowotworu a mianowicie maksymalną pionową grubość guza (Breslow, 1970). Od tej pory klasyfikacja pierwotnego czerniaka skóry (stopnia I i II wg Amerykańskiego Towarzystwa do Walki z Rakiem) opiera się na tych dwóch parametrach histopatologicznych. Przy takim stopniu zaawansowania nowotworu okazało się, że grubość guza wg Breslawa jest najważniejszym czynnikiem prognostycznym (Morton *et al*, 1993; Buttner *et al*, 1995;

Blach *et al*, 1996). W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat udowodniono, że dodatkowo inne zmienne kliniczne (anatomiczna lokalizacja nowotworu pierwotnego, płeć) oraz cechy charakterystyczne guza (typ histologiczny, faza wzrostu guza, owrzodzenie, wskaźnik mitotyczny, naciek z limfocytów, inwazja naczyń) mają wpływ na lub odzwierciedlają potencjał przerzutowy czerniaka złośliwego (Clark *et al*, 1989; Worth *et al*, 1989; Balch, 1992; Gamel *et al*, 1992; Thorn *et al*, 1994; Miliotes *et al*, 1996). W związku z tym proponowano liczne modyfikacje stopniowania czerniaka skóry (Balch, 1992; Garbe *et al*, 1995; Buzaid *et al*, 1997). Wzięcie pod uwagę tych czynników może odrobinę poprawić klasyfikację prognostyczną; jednakże

prognozowanie indywidualnych wyników pacjentów z czerniakiem pierwotnym jest nadal trudne (Balch, 1992; Soong *et al*, 1992).

W momencie wystąpienia u pacjentów przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (Stopień III Amerykańskiego Towarzystwa do Walki z Rakiem) czynniki prognostyczne czerniaka pierwotnego nie mają już dużego znaczenia w predykcji przeżywalności. Na tym etapie zaawansowania nowotworu na niekorzystny współczynnik przeżywalności w największym stopniu mają wpływ stopień zajęcia węzłów chłonnych (średnica największego przerzutu do węzła chłonnego) oraz ilość dodatnich węzłów chłonnych (Balch *et al*, 1992, 1996; Buzaid *et al*, 1995). Jednakże po przeprowadzeniu procedury wybiórczego wycięcia węzłów chłonnych obecność mikroprzerzutów do węzłów chłonnych została stwierdzona jedynie u mniejszości pacjentów (Balch, 1988; Balch *et al*, 1996). W związku z tym Morton *et al* (1992), w celu uzyskania stopniowania guza węzłów chłonnych przy niższej śmiertelności, uznał biopsję węzła wartowniczego (SLN) za alternatywny sposób leczenia chirurgicznego pierwotnego czerniaka skóry. SLN został zdefiniowany jako pierwszy węzeł odbierający chłonkę z okolicy guza nowotworowego. Koncepcja ta została potwierdzona przez kilka prac, które udowodniły, że SLN stanowi dokładne odzwierciedlenie histopatologii pozostałych stacji węzłów, zwłaszcza gdy badanie SLN na mikroprzerzuty daje wynik ujemny (Ross *et al*, 1993; Reintgen *et al*, 1994; Thompson *et al*, 1995; Krag *et al*, 1995).

Jednakże, wartość oceny stopnia zaawansowania nowotworu w węzłach chłonnych jest uzależniona od dokładności identyfikacji komórek czerniaka. Podczas przeprowadzania rutynowego badania histopatologicznego lub immunohistochemicznego identyfikacja pojedynczych lub nielicznych komórek nowotworowych jest utrudniona, w związku z czym liczba pacjentów z fałszywie ujemnym wynikiem limfobiopsji często będzie zaniżona. W ostatnich latach rozwinięto technikę reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (odwrotna transkrypcja-PCR) i udowodniono, że znacząco zwiększa ona dokładność wykrywania komórek nowotworowych. Przy metodzie molekularnej celem charakteryzacji komórek jest ekspresja RNA (mRNA). Tyrozynaza, kluczowy enzym na szlaku syntezy melaniny, jest uważana za główny marker komórek o pochodzeniu melanocytowym (Kwon *et al*, 1987). W związku z tym do wykrywania komórek nowotworowych w regionalnych węzłach chłonnych u pacjentów z czerniakiem pierwotnym stosuje się technikę odwrotnej transkrypcji-PCR. W związku z tym celem tego badania jest ocena znaczenia obecności komórek nowotworowych w sln, wykrytych za pomocą odwrotnej transkrypcji-PCR jako czynnika prognostycznego. Praca ta odpowiada ona na pytanie, czy identyfikacja minimalnych pozostałości zmian chorobowych jest wiarygodnym wskaźnikiem wysokiego ryzyka wystąpienia nawrotu czerniaka oraz czy prognostyczna grupa pacjentów z korzystnymi rokowaniami i niskim ryzykiem nawrotu może zostać określona poprzez uzyskanie ujemnego wyniku reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją.

MATERIAŁY I METODY

Pacjenci

U 116 pacjentów z pierwotnym czerniakiem skóry (grubość guza wg. Breslowa >0.75mm) od stycznia 1996 roku do marca 1998 roku w Klinice Dermatologii Uniwersytetu Tuebingen skutecznie przeprowadzono mapowanie limfatyczne i biopsję SLN. U żadnego z pacjentów badanie przedmiotowe ani ocena stopniowania nie wykazały dowodów na obecność czerniaka przerzutowego w regionalnych węzłach chłonnych lub dalszych piętrach węzłów (badanie ultrasonograficzne węzła chłonnego, prześwietlenie rentgenowskie klatki piersiowej, badanie ultradźwiękowe jamy brzusznej, tomografia komputerowa). Pacjenci wyrazili świadomą zgodę na wszystkie aspekty badania.

Mapowanie limfatyczne i biopsja SLN

Techniki mapowania limfatycznego zostały opisane w innej pracy (Blaheta *et al*, 1999). W skrócie, wykonano limfoscyntyografię przedoperacyjną w celu oszacowania przebiegu kierunku spływu chłonki z nowotworu pierwotnego oraz zidentyfikowania piętra węzłów zagrożonych przerzutem czerniaka. Za pomocą iniekcji śródskórnej w cztery do sześciu miejsc wokół czerniaka pierwotnego lub wokół miejsca biopsji jeśli czerniak został wcześniej wycięty, zaaplikowano łączną dawkę 100 MBq (3mCi) nanokoloidu znakowanego technetem ^{99m}Tc. Bezpośrednio po zabiegu technika mapowania limfatycznego została uzupełniona śródskórnym zaaplikowaniem 1-2ml błękitnego barwnika izosulfanu (błękit patentowy V, Byk Gulden, Konstanz, Niemcy) wokół miejsca lokalizacji czerniaka pierwotnego. Za pomocą sondy ręcznej gamma (C-Trak, Care Wise Medical Products, CA) wykonano śródoperacyjne mapowanie limfatyczne mające na celu dokładne zlokalizowanie obszaru o największej intensywności promieniowania. SLN zostały określone jako węzły o znaczącym stopniu promieniowania *in vivo* w porównaniu z tłem w obrębie odpowiadającej stacji węzła. Węzły chłonne znakowane izotopowo zostały wycięte i określone jako przedstawiające SLN. Łoża węzła została zbadana pod kątem pozostałości promieniowania gamma. Jeśli nadal można było wykryć wysoką aktywność wycięto dodatkowe węzły chłonne znakowane izotopowo. SLN zostały również zlokalizowane po śladach obecności niebieskiego barwnika w naczyniu limfatycznym doprowadzającym SLN lub w SLN. U pacjentów, u których czerniak wystąpił w miejscach, których drenaż występował łącznie w więcej niż jednym piętrze węzła biopsja SLN została przeprowadzona we wszystkich piętrach węzła. Pacjenci z dodatnim wynikiem histopatologii SLN zostali poddani całkowitemu usunięciu węzłów chłonnych. U 57 pacjentów w pierwszej części badania przeprowadzono jednoczasowy zabieg profilaktycznego wycięcia węzłów chłonnych mający na celu określenie dokładności mapowania limfatycznego i biopsji SLN. Bezpośrednio po zabiegu SLN zostały przecięte wzdłuż osi środkowej w celu przeprowadzenia analizy diagnostycznej.

Badania histopatologiczne

Połowa każdego SLN została utrwalona w 5% roztworze formaldehydu i osadzona w parafinie. Rutynowe badanie

histopatologiczne zostało przeprowadzone za pomocą barwienia hematoksyliną i eozyną. We wszystkich przypadkach kolejne wycinki zostały poddane barwieniu immunohistochemicznemu przeciwciałem do identyfikacji czerniaka HBM-45 (Dakopatts, Hamburg, Niemcy) i zlokalizowane za pomocą kompleksu awidyny-biotyny-peryksydazy (Hsu *et al*, 1981). Dla kontroli ujemnych przeciwciała pierwotne zostało zastąpione nieimmunogenną immunoglobuliną myszy. Węzeł chłonny został uznany za histopatologicznie dodatni gdy komórki nowotworowe zostały zidentyfikowane po zabarwieniu hematoksyliną i eozyną lub przy wykorzystaniu metody barwienia immunohistochemicznego HMB-45.

Odwrotna transkrypcja PCR z wykorzystaniem tyrozynazy

Druga połowa każdego SLN została wykorzystana do odwrotnej transkrypcji PCR mającej na celu wykrycie tyrozynazy mRNA jak zostało to opisane w innej pracy (Blaheta *et al*, 1999). W skrócie, próbki węzła chłonnego zostały zamrożone w ciekłym azocie i przechowywane w temperaturze -80°C do momentu izolacji RNA. RNA został wyizolowany za pomocą standardowej metody wykorzystującej tiocyjanin guanidyny i RNA clean (AGS, Heidelberg, Niemcy) (Chomczyński and Sacchi, 1987). Dwa mikrogramy z całego RNA zostały poddane odwrotnej transkrypcji dzięki czemu uzyskano komplementarny DNA (cDNA) wykorzystując przypadkowe primery heksamerowe (Pharmacia, Freiburg, Niemcy). Amplifikacja cDNA była możliwa dzięki wewnętrznej PCR (30 cykli każdy) przy użyciu konkretnych primerów oligonukleotydowych dla tyrozynazy ludzkiej co pozwoliło uzyskać 207 pb produktu (Smith *et al*, 1991). Aby zweryfikować integralność każdej próbki mRNA przeprowadzono wewnętrzną reakcję PCR z odwrotną transkrypcją przy użyciu primerów typowych dla ludzkiego genu dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (Ercolani *et al*, 1988). Izolacja RNA, synteza cDNA i odwrotna transkrypcja PCR zostały przeprowadzone w osobnych pomieszczeniach celem uniknięcia zabrudzenia. Każda analiza odwrotnej transkrypcji PCR objęła trzy kontrole ujemne (najpierw dla cDNA, potem dla PCR) i jedną kontrolę dodatnią (RNA linii komórkowej SKMel-28) co miało na celu weryfikację integralności systemu. Produkty reakcji odwrotnej transkrypcji-PCR zostały rozdzielone elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym i zwizualizowane poprzez barwienie bromkiem etydyny.

Znamiona guzkowe

Melanocyty torebkowe mogą być źródłem wykrywania mRNA dla tyrozynazy za pomocą odwrotnej transkrypcji-PCR. W związku z tym wszystkie wycinki SLN z całkowitym dodatnim wynikiem odwrotnej transkrypcji-PCR z tyrozynazą zostały dokładnie przebadane na obecność łagodnych melanocytów. W celu określenia natury melanocytów znajdujących się w torebce węzła chłonnego cytologia została porównana z czerniakiem pierwotnym. Próbki węzła chłonnego z komórkami zawierającymi komórki znamienia zostały przeklasyfikowane jako ujemne pod względem obecności czerniaka przerzutowego.

Wyniki obserwacji

Pacjenci byli badani przez okres 3 miesięcy pod kątem wystąpienia nawrotu lub przerzutu choroby. Obserwacja

obejmowała badanie przedmiotowe i rutynowe badania krwi. Raz w roku przeprowadzono badanie ultradźwiękowe regionalnych piętra węzła chłonnego oraz jamy brzusznej i badanie rentgenowskie klatki piersiowej. U pacjentów, u których wyniki sugerowały czerniaka przerzutowego przeprowadzono tomografię komputerową i rezonans magnetyczny. Średni okres obserwacji pacjentów wynosił 19 miesięcy (minimalny okres obserwacji wynosił 2 miesiące, maksymalny czas to 35 miesięcy).

Analiza statystyczna

95% przedział ufności dla mediany grubości guza wg Breslowa został obliczony przy użyciu tej samej metody dla małych próbek w oparciu o rozkład dwumianowy (Campbell i Gardner, 1989). Grubość guza została porównana pomiędzy grupami pacjentów określonymi na podstawie statusu SLN za pomocą testu U Mann-Whitneya. Jako czas przeżycia bez objawów choroby określono okres czasu od biopsji do daty ostatniego badania kontrolnego lub do daty wystąpienia pierwszego nawrotu. Przeżycie bezobjawowe zostało oszacowane za pomocą metody Kaplan-Meiera (Kaplan i Meier, 1958). Różnice pomiędzy krzywymi przeżycia zostały przeanalizowane za pomocą statystyk testu log-rank. Wielkość próby pokazała, że spodziewana różnica 25% w przeżyciu bezobjawowym u pacjentów z dodatnim wynikiem odwrotnej transkrypcji-PCR (współczynnik przeżywalności 65%) i u pacjentów z ujemnym wynikiem odwrotnej transkrypcji-PCR (współczynnik przeżywalności 90%) może być odnotowana na poziomie istotności $p < 0.05$ (test dwustronny) o sile 80% jeśli w każdej z dwóch grup znalazło się 48 pacjentów (Machin *et al*, 1997). Do badania przyjęto jeszcze kilku pacjentów dodatkowo ponieważ spodziewano się wystąpienia pewnej nierównowagi pomiędzy obydwoma grupami. Jeden pacjent zmarł w wyniku zawału mięśnia sercowego, jego dane zostały usunięte w momencie śmierci. Aby określić niezależność przydatności przebadaliśmy wpływ statusu histopatologicznego SLN, status odwrotnej transkrypcji-PCR na SLN oraz wpływ grubości guza wg Breslowa na okres przeżycia bezobjawowego na podstawie modelu proporcjonalnego ryzyka regresji Coxa (Cox, 1972). Statystyczna ocena prawdopodobieństwa przeżycia została oszacowana w momencie, w którym u 20% pacjentów nastąpił nawrót choroby. We wszystkich testach statystycznych za istotne uznano $p < 0.05$.

WYNIKI

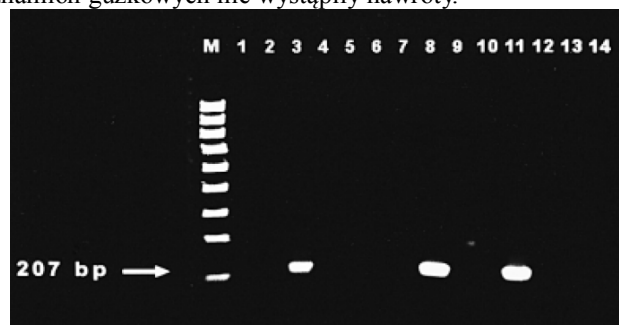
U 116 (96%) ze 122 pacjentów z pierwotnym czerniakiem skóry (grubość guza > 0.75 mm) skutecznie przeprowadzono procedurę mapowania limfatycznego i biopsji SLN. Charakterystyka kliniczna i histopatologiczna wyżej wymienionych 116 pacjentów jest podana w **Tabeli I**. Z tych 116 pacjentów uzyskano i przeanalizowano przy użyciu badań histopatologicznych, w tym badania immunohistochemicznego i odwrotnej transkrypcji-PCR z tyrozynazą, łączną liczbę 214 SLN, wahającą się od 1 do 4 (mediana 2) na pacjenta. Status SLN został sklasyfikowany na podstawie wyników histopatologii oraz odwrotnej transkrypcji-PCR, tworząc trzy grupy pacjentów (**Tabela II**). Grupa A składała się z 15 pacjentów (13%) z mikroprzerzutami do węzłów chłonnych wykrytymi dzięki analizie histopatologicznej. We wszystkich z tych węzłów wykryto obecność tyrozynazy mRNA. W grupie B

Charakterystyka pacjenta	Liczba pacjentów (%)
Płeć	
Męska	63 (54%)
Żeńska	53 (46%)
Średnia wieku (zakres): 54.5 lat (19-84 lat)	
Lokalizacja nowotworu pierwotnego	
Kończyny	77 (66%)
Tułów	36 (31%)
Głowa i szyja	3 (3%)
Typ histologiczny	
Czerniak szerzący się powierzchownie	40 (35%)
Czerniak węzłowy	41 (35%)
Czerniak powierzchni akralnej	17 (15%)
Czerniak z plamy soczewicowatej	1 (1%)
Nieokreślony	16 (14%)
Grubość guza wg Breslowa, średnia (zakres) 2.0 mm (0.9–10.0 mm)	
2.00mm (0.9-10.0mm)	35 (30%)
1.51-4.0mm	59 (51%)
>4.0mm	16 (14%)
Nieokreślony	6 (5%)
Poziom zaawansowania wg Clarka	
III	13 (11%)
IV	73 (63%)
V	3 (3%)
Nieokreślony	27 (23%)

u 36 pacjentów (31%) reakcja odwrotnej transkrypcji-PCR z tyrozynazą pozwoliła na zdiagnozowanie submikroskopowego czerniaka węzłów chłonnych. (Ryc. 1). W końcu grupa C składała się z 65 pacjentów (56%) u których badanie SLN za pomocą obydwu technik diagnostycznych dało wynik ujemny. Żaden z SLN nie został określony jako histopatologicznie dodatni i ujemny w badaniu odwrotną transkrypcją -PCR. Jako że fałszywie dodatnie wyniki odwrotnej transkrypcji-PCR mogą być wynikiem obecności znamion guzkowych ponownie poddano wszystkie ujemne SLN analizie histopatologicznej a dodatnie analizie molekularnej. W obrębie torebki węzła chłonnego (n=5) pięciu pacjentów zidentyfikowano skupiska komórek znamion. Nie stwierdziliśmy żadnej istotnej korelacji status SLN z następującymi charakterystycznymi cechami

klunikopatologicznymi: lokalizacja nowotworu pierwotnego, lokalizacja regionalnego dorzecza węzła, wiek i płeć.

Występowanie nawrotów czerniaka zostało zbadane u każdej z grup pacjentów po średnim okresie obserwacji wynoszącym 19 miesięcy. Podczas tego okresu u 23 (20%) ze 116 pacjentów wystąpił nawrót choroby (Tabela II). U dziesięciu (67%) z 15 pacjentów z histopatologicznie potwierdzoną obecnością mikroprzerzutów węzłowych wystąpił nawrót a pięciu z tych pacjentów zmarło na skutek przerzutów. U dziewięciu (25%) z 36 pacjentów z negatywnym wynikiem histopatologii SLN i pozytywnym wynikiem odwrotnej transkrypcji-PCR wystąpił nawrót nowotworu. Następnie jeden pacjent zmarł z powodu czerniaka przerzutowego. Ostatecznie u czterech (6%) z 65 pacjentów z ujemnym wynikiem obydwu metod diagnostycznych stwierdzono nawrót choroby. Cechy klinikopatologiczne tych czterech pacjentów z ujemnym wynikiem SLN zostały podane w Tabeli III. W tej grupie pacjentów nie odnotowano zgonów. U żadnego z tych pięciu pacjentów z dodatnimi wynikami odwrotnej transkrypcji-PCR przeprowadzonej z powodu znamion guzkowych nie wystąpiły nawroty.



Rycina 1. Produkty odwrotnej transkrypcji_CR zostały zbadane w 2% żelu agarozowym i zwizualizowane poprzez barwienie bromkiem etydyny. Wykrycie tyrozynazy mRNA określa 207pb w dwóch węzłach chłonnych z ujemnym wynikiem histopatologii (ścieżka 3, 8). Ścieżki 1-10, próbki węzłów chłonnych; ścieżka 11, kontrola dodatnia (SKMel-28); ścieżki 12-14, kontrole ujemne (dla syntezy cDNA, dla pierwszej i dla odwrotnej transkrypcji-PCR); ścieżka M, 100bp marker drabinkowy

Miejsca wystąpienia nawrotu pierwszego guza podane są w Tabeli IV. U tych pacjentów z histopatologicznie dodatnim SLN choroba przerzutowa wystąpiła w okolicach miejscowo-regionalnych obejmując nawroty miejscowe, in-transit i regionalne (n=5) jak również w miejscach odległych (n=5). U pacjentów z wyłącznie dodatnim wynikiem SLN metodą odwrotnej transkrypcji-PCR nawroty zaobserwowano w okolicach miejscowo-regionalnych (n=7) oraz w miejscach odległych (n=2). U pacjentów z ujemnym wynikiem obydwu metod nawroty nowotworu zaobserwowano w miejscach in-transit (n=2), w dorzeczu regionalnego węzła chłonnego (n=1) oraz w miejscu odległym (n=1).

Tabela II. Grupy pacjentów wg statusu węzła wartowniczego (+, dodatni; -, ujemny, CI, przedział ufności)

Grupy pacjentów	Status SLN	Liczba pacjentów	Średnia grubość guza (mm) (95% CI)	Liczba nawrotów
A	Histopatologia + Odwrotna transkrypcja-PCR tyrozynazy +	15 (13%)	4.50 (2.2–9.0)	10 (67%)
B	Histopatologia - Odwrotna transkrypcja-PCR tyrozynazy +	36 (31%)	2.30 (2.0–3.0)	9 (25%)
C	Histopatologia - Odwrotna transkrypcja-PCR tyrozynazy -	65 (56%)	1.70 (1.5–1.9)	4 (6%)
	razem	116	2.00 (1.7–2.3)	23 (20%)

Tabela III. Cechy charakterystyczne pacjentów z SLN ujemnym z nawrotami

Płeć, wiek (lat)	Lokalizacja guza pierwotnego	Grubość guza (mm)	Miejsce zlokalizowanego piętra węzła	Okres do pierwszego nawrotu (m-ce)	Miejsce pierwszego nawrotu	Czas badań kontrolnych (m-ce)
M, 61	Tułów	1.8	pacha	9	pachowe	13
F, 69	Łydka	3.3	pachwina	19	odległe	25
F, 65	Stopa	1.3	Pachwina	24	In-transit	25
F, 73	Łydka	2.5	pachwina	7	In-transit	18

Co interesujące, u pacjentów z submikroskopowym czerniakiem zdiagnozowanych za pomocą odwrotnej transkrypcji-PCR grubość guza była znacznie większa niż u pacjentów z ujemnymi wynikami ($p=0.002$; Test Mann-Whitneya). Wyniki te pokazują, że prawdopodobieństwo wykrycia komórek czerniaka w SLN metodą odwrotnej transkrypcji-PCR wzrasta znacząco wraz z grubością guza. U pacjentów z guzem o grubości poniżej 1.5mm, od 1.5 do 4.0mm i powyżej 4.0mm dodatnie wyniki odwrotnej transkrypcji-PCR stwierdzono odpowiednio u 26%, 42% i 81%.

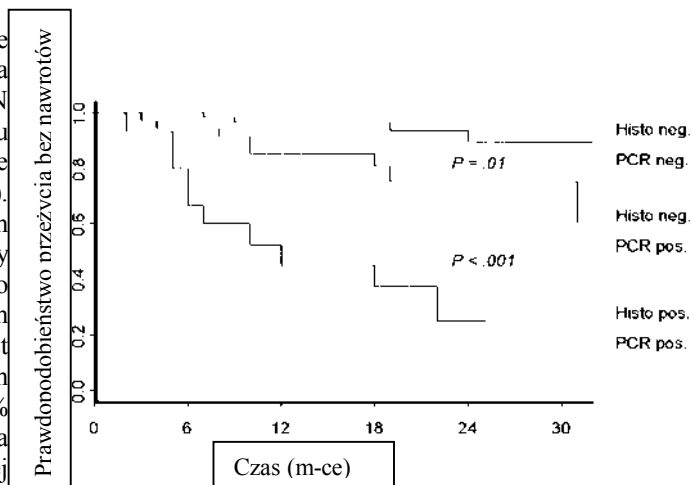
Krzywe Kaplan-Meiera obrazujące przeżycie bezobjawowe były znacząco związane ze statusem SLN (Ryc. 2). Dla pacjentów z dodatnim wynikiem histopatologicznym SLN okres przeżycia bezobjawowego był znacznie niższy niż u pacjentów, z dodatnim wynikiem uzyskany wyłącznie metodą odwrotnej transkrypcji-PCR z tyrozynazą ($p<0.001$). Co najważniejsze, wśród pacjentów z ujemnym wynikiem histopatologii SLN pacjenci z dodatnim wynikiem analizy molekularnej mieli znacząco większe prawdopodobieństwo wystąpienia nawrotu czerniaka niż pacjenci z ujemnym wynikiem odwrotnej transkrypcji-PCR ($p=0.001$). Test Kaplana-Meiera po 24 miesiącach u pacjentów z dodatnim wynikiem histopatologii SLN wykazał 25% prawdopodobieństwo przeżycia bezobjawowego, 75% dla pacjentów z dodatnim wynikiem tylko odwrotnej transkrypcji-PCR i 90% dla pacjentów z ujemnymi wynikami obydwu metod (Ryc 2). Dla określenia czynników prognostycznych mających wpływ na przeżycie bezobjawowe przeprowadzono analizę regresji ryzyka wg Coxa biorąc pod uwagę najważniejsze zmienne czerniaka pierwotnego (grubość guza Breslowa) oraz status SLN (określony za pomocą badania histopatologicznego i metodą odwrotnej transkrypcji-PCR) (Tabela V). W tej wieloczynnikowej analizie status histopatologiczny oraz odwrotnej transkrypcji-PCR węzła wartowniczego to jedyne statystycznie istotne czynniki prognostyczne. W tym modelu grubość guza wg Breslowa nie miała znaczenia do predykcji okresu przeżycia bezobjawowego.

OMÓWIENIE

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie klinicznego znaczenia wykrywania komórek nowotworowych w SLN za pomocą odwrotnej transkrypcji-PCR u pacjentów z pierwotnym czerniakiem skóry. Częstotliwość nawrotów była znacznie wyższa u pacjentów, u których za pomocą odwrotnej transkrypcji-PCR wykryto submikroskopowe skupienia komórek nowotworowych niż u pacjentów z ujemnym wynikiem badania metodą odwrotnej transkrypcji-PCR ($p=0.001$).

Status SLN	Pierwszy nawrót, liczba pacjentów		
Histopatologia + Odwrotna transkrypcja-PCR tyrozynazy +	2	3	5
Histopatologia - Odwrotna transkrypcja-PCR tyrozynazy +	4	3	2
Histopatologia - Odwrotna transkrypcja-PCR tyrozynazy -	2	1	1

+, dodatni; -, ujemny



Znaczenie prognostyczne mikroprzerzutów w regionalnych węzłach chłonnych wykrytych za pomocą konwencjonalnej histopatologii jest dobrze ugruntowane i kojarzone jest z radykalnym spadkiem 5-letniego współczynnika przeżywalności (Balch *et al*, 1992). Zgodnie z tym badanie to potwierdziło wystąpienie nawrotów u 67% pacjentów z dodatnim wynikiem histopatologii SLN. Ponadto u 25% pacjentów z dodatnim wynikiem uzyskany metodą odwrotnej transkrypcji-PCR zaobserwowano nawrót choroby. W związku z tym około 80% wszystkich zaobserwowanych nawrotów wystąpiło u pacjentów z dodatnim SLN uzyskany poprzez badanie histopatologiczne lub za pomocą analizy molekularnej. Wyniki te podkreślają znaczenie prognostyczne badania SLN w celu wykrycia mikroprzerzutów choroby. Jednakże wśród pacjentów z negatywnym wynikiem SLN metodą odwrotnej transkrypcji-PCR nawrót choroby zaobserwowano tylko u 6%. U ponad połowy tych pacjentów grubość nowotworu wyniosła powyżej 1.5mm. Dane te wskazują, że technika odwrotnej transkrypcji-PCR była odpowiednia do określenia grupy

Tabela V. Wieloczynnikowa analiza czynników mających wpływ na przeżycie bezobjawowe.

Czynnik	współczynnik	Ryzyko względne (95% CI)	p-wartość
Status histopatologiczny SLN	1.16	3.21 (1.19—8.69)	0.021
Status SLN odwrotnej transkrypcji-PCR	1.25	3.51 (1.04—11.88)	0.043
Grubość guza	0.001	1.0	0.067

pacjentów niskiego ryzyka pomimo dużej grubości nowotworu. W ostatnich czasach dokonano ewaluacji sposobów występowania nawrotów u pacjentów z czerniakiem I i II stopnia, u których wynik badania histopatologicznego SLN był ujemny (Greshenwald *et al*, 1998). Z 243 pacjentów przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych wystąpiły u 10 (4%). Co interesujące, bardziej szczegółowa analiza histopatologiczna SLN pacjentów z zajętej regionalnymi węzłami chłonnymi u ośmiu pacjentów (80%) wykazała obecność choroby utajonej (Gershenwald *et al*, 1998). Wyniki te podkreślają kliniczne znaczenie określenia statusu SLN poprzez wykrycie utajonych przerzutów przy wykorzystaniu bardziej dokładnych technik diagnostycznych.

Jednakże nie ma nadal odpowiedzi na pytanie, czy obecność komórek nowotworowych w regionalnych węzłach chłonnych wykryta wyłącznie za pomocą odwrotnej transkrypcji-PCR wiarygodnie wskazuje na możliwość wystąpienia nawrotu choroby. Do tej pory przeprowadzono kilka badań mających na celu identyfikację komórek rakowych z nieznanego ogniska w węzłach chłonnych pacjentów z guzem litym (Schoenfeld *et al*, 1996; Noguchi *et al*, 1996; Mori *et al*, 1998). Udowodniono, że analiza molekularna znacząco zwiększa szanse na wykrycie komórek nowotworowych w porównaniu z histopatologią. Ponadto obecność komórek rakowych w węzłach chłonnych wykryta metodą odwrotnej transkrypcji -PCR okazała się być wskaźnikiem pozwalającym na predykcję nawrotu nowotworu (Mori *et al*, 1998). W odniesieniu do czerniaka skóry tylko jedna z ostatnio napisanych prac udowodniła znaczenie kliniczne wykrywania komórek nowotworowych w SLN metodą odwrotnej transkrypcji-PCR u pacjentów z czerniakiem pierwotnym (Shivers *et al*, 1998). Współczynnik nawrotów wyniósł 61% u pacjentów z dodatnim wynikiem histopatologii SLN, 13% u pacjentów z dodatnim wynikiem wyłącznie odwrotnej transkrypcji-PCR i 2% u pacjentów z ujemnym wynikiem odwrotnej transkrypcji-PCR. Wyniki naszego badania potwierdzają znaczące różnice w nawrotach nowotworu u trzech grup pacjentów określonych na podstawie statusu SLN. Badanie to pokazało jeszcze wyższy współczynnik nawrotów u pacjentów, którzy uzyskali dodatni wynik wyłącznie metodą odwrotnej transkrypcji-PCR z naciskiem na kliniczne znaczenie submikroskopowego skupienia komórek nowotworowych. Ponadto niezwykle ważną stała się dokładna ocena stopnia zaawansowania nowotworu poprzez biopsję SLN ponieważ terapia dodatkowa może zwiększyć współczynnik przeżywalności pacjentów z przerzutami do węzłów chłonnych (Kirkwood, 1998).

Zasadniczo jednakże tkanka z tego samego węzła chłonnego nie może być równocześnie zdiagnozowana histopatologicznie i metodą odwrotnej transkrypcji-PCR w celu wykrycia przerzutów czerniaka. W związku z tym istnieje możliwość wystąpienia błędu losowego podczas

przecinania węzła chłonnego na dwie połowy w celu przeprowadzenia odrębnej analizy histopatologicznej i odwrotnej transkrypcji-PCR. W celu wykrycia torebkowych komórek barwnikowych jako źródła fałszywie dodatnich wyników odwrotnej transkrypcji-PCR ponownie przebadano wszystkie wycinki SLN wyłącznie dodatnie po analizie molekularnej. Komórki znamion guzkowych są zazwyczaj zlokalizowane w torebce węzła chłonnego podczas gdy komórki przerzutowe czerniaka zwykle znajdują się w podtorebkowej zatoce węzła chłonnego. Co więcej jednolita postać komórek znamienia pozbawionych nietypowych cech morfologicznych jest dodatkową cechą umożliwiającą odróżnienie ich od czerniaka przerzutowego. Melanocyty w węzłach chłonnych zajętych czerniakiem zostały odnotowane w częstotliwości występowania od 7% do 22% (Bautista *et al*, 1994; Carson *et al*, 1996). W badaniu tym wewnątrztorebkowe komórki znamion zostały wykryte w SLN u pięciu pacjentów. We wszystkich przypadkach torebkowych komórek znamion wyraźnie odróżniały się morfologicznie od komórek czerniaka pierwotnego. Jednakże, brak znamion guzkowych u połowy przebadanych histopatologicznie nie wyklucza obecności melanocytów w części węzła chłonnego wykorzystanej do odwrotnej transkrypcji-PCR. Niemniej jednak takie podejście zmniejszy liczbę fałszywie dodatnich wyników odwrotnej transkrypcji-PCR z tyrozynazą. Z drugiej strony obecność melanocytów węzłowych nie wyklucza minimalnych pozostałości w części węzła chłonnego wykorzystanej do odwrotnej transkrypcji-PCR. Co interesujące, u żadnego z pięciu pacjentów ze znamionami guzkowymi nie wystąpił nawrót choroby. Nie odnotowano żadnych fałszywie ujemnych wyników odwrotnej transkrypcji-PCR ponieważ wszystkie SLN dodatnie histopatologicznie były również dodatnie po badaniu metodą odwrotnej transkrypcji-PCR.

Po przeanalizowaniu ognisk pierwszego nawrotu zaobserwowano inne rozmieszczenie pomiędzy pacjentami z dodatnim wynikiem histopatologii SLN i tymi, którzy zostali przeklasyfikowani na dodatnich metodą odwrotnej transkrypcji-PCR. Odległe przerzuty zaobserwowano u połowy pacjentów z dodatnim wynikiem histopatologii SLN podczas gdy w przybliżeniu u trzech-czwartych pacjentów z minimalną pozostałością choroby wykrytą metodą odwrotnej transkrypcji-PCR wystąpiły przerzuty miejscowo-regionalne. Tak więc identyfikacja mikroprzerzutów za pomocą badania histopatologicznego zdaje się mieć związek z stopniem zaawansowania nowotworu oraz z mniej korzystną prognozą w porównaniu z komórkami czerniaka wykrytymi wyłącznie metodą odwrotnej transkrypcji-PCR. U dwóch pacjentów z ujemnymi wynikami SLN badanych metodą odwrotnej transkrypcji-PCR wystąpiły nawroty miejscowe i in-transit. Tego typu fałszywie ujemne wyniki badania węzłów chłonnych można wyjaśnić założeniem, że komórki nowotworowe jeszcze nie zdążyły przejść do SLN. U jednego pacjenta z ujemnym wynikiem SLN metodą analizy molekularnej wystąpił przerzut do węzła

regionalnego, prawdopodobnie zalicza się on do niewielkiego odsetka pacjentów u których wystąpi pominięcie pierwszej piętra węzłów chłonnych (Morton *et al*, 1992; Reintgen, 1996). U czwartego pacjenta z ujemnym wynikiem badania węzła wystąpił przerzut odległy, w związku z czym może on przedstawiać przypadek hematogenego rozprzestrzeniania się nowotworu.

W oparciu o modele proporcjonalnego ryzyka wg Coxa status histopatologiczny oraz odwrotnej transkrypcji-PCR węzła wartowniczego okazały się jedynymi istotnymi czynnikami prognostycznymi przeżycia bezobjawowego w tej grupie pacjentów z czerniakiem. W momencie gdy do analizy wieloczynnikowej zostało włączone badanie SLN grubość guza wg Breslowa jako najważniejszy parametr prognostyczny czerniaka pierwotnego nie była już istotna w predykcji przeżycia bezobjawowego.

Badanie to pokazuje, że zastosowanie procedur diagnostycznych takich jak biopsja SLN oraz analiza za pomocą odwrotnej transkrypcji-PCR to ważne narzędzia służące do bardziej precyzyjnego określania stopnia zaawansowania nowotworu pacjentów z czerniakiem pierwotnym. W związku z tym status SLN może być odpowiednim czynnikiem służącym do ulepszenia klasyfikacji patologicznej czerniaka pierwotnego skóry gdyż bardziej precyzyjnie odzwierciedla naturalny przebieg czerniaka złośliwego.

Aby lepiej zdefiniować rolę statusu SLN i grubości guza dla przyszłej klasyfikacji TNM czerniaka pierwotnego konieczne jest przeprowadzenie w przyszłości dalszych badań większej ilości pacjentów oraz długoterminowej obserwacji. Obecnie czerniak skóry jest sklasyfikowany zgodnie z systemem Amerykańskiego Towarzystwa do Walki z Rakiem. Stopnie I i II obejmują pacjentów z ujemnym wynikiem histopatologii regionalnych węzłów chłonnych a stopień III obejmuje pacjentów z przerzutami do węzłów chłonnych (Amerykańskie Towarzystwo do Walki z Rakiem, 1992). Jeśli

dalsze badania potwierdzą wnioski zawarte w tej pracy można rozważyć klasyfikowanie pacjentów z ujemną histopatologią SLN i metodą odwrotnej transkrypcji-PCR jako stopień I choroby, tych z wynikiem wyłącznie odwrotnej transkrypcji-PCR jako stopień II choroby a pacjentów z dodatnim wynikiem badania histopatologicznego jako III stopień zaawansowania choroby. Pozostaje niewyjaśnione czy grubość guza wg Breslowa nadal będzie miała znaczenie prognostyczne w nowej klasyfikacji stopnia I i II czerniaka pierwotnego, opartej przede wszystkim na statusie SLN.

Podsumowując, biopsja SLN w połączeniu z badaniem odwrotną transkrypcją-PCR z tyrozynazą jako dodatek do badania histopatologicznego pozwala na identyfikację klinicznie istotnych mikroprzerzutów u pacjentów z pierwotnym czerniakiem skóry. Udowodniono, że status SLN jest decydującym czynnikiem prognostycznym mającym wpływ na przeżycie bezobjawowe. Około 80% wszystkich pacjentów z nawrotem choroby opisanych w tej pracy zostało zdiagnozowanych dodatnim wynikiem SLN przy użyciu badania histopatologicznego i odwrotnej transkrypcji-PCR. Ponadto ujemny wynik odwrotnej transkrypcji-PCR wyłonił grupę pacjentów o dużej grubości nowotworu, z niskim ryzykiem nawrotu choroby. Wierzymy, że takie procedury stopniowania nowotworu stanowią wyjątkowo obiecującą metodę ulepszenia prognozowania i stopniowania nowotworu, w szczególności u pacjentów we wczesnym stadium czerniaka. Dla bardziej precyzyjnej oceny znaczenia statusu SLN służącej opracowaniu kliniczno-patologicznej klasyfikacji czerniaka skóry wymagane są dalsze badania na większej liczbie pacjentów.

Badanie to zostało częściowo sfinansowane grantem z Uniwersytetu Tuebingen w Niemczech (no. 1260065). Autorzy dziękują Dr. S. Kroeberowi za wsparcie udzielone podczas tworzenia tej pracy.

PIŚMIENNICTWO

American Joint Committee on Cancer. Manual for Staging of Cancer. Philadelphia, PA: American Joint Committee on Cancer, 1992, pp. 143±148

Balch CM: The role of elective lymph node dissection in melanoma: rationale, results, and controversies. *J Clin Oncol* 6:163±172, 1988

Balch CM: Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. *Semin Surg Oncol* 8:400±414, 1992

Balch CM, Soong S, Shaw HM, Urist MM, McCarthy SW. An analysis of prognostic factors in 8500 patients with cutaneous melanoma. In: Balch C (eds). *Cutaneous Melanoma*. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1992, pp 165±187

Balch CM, Soong SJ, Bartolucci AA, et al: Efficacy of an elective regional lymph node dissection of 1±4 mm thick melanomas for patients 60 years of age and younger. *Ann Surg* 224:255±263, 1996

Bautista NC, Cohen S, Anders KH: Benign melanocytic nevus cells in axillary lymph nodes. A prospective incidence and immunohistochemical study with literature review. *Am J Clin Pathol* 102:102±108, 1994

Blaheta H-J, Schitteck B, Breuninger H, et al: Lymph node micrometastases of cutaneous melanoma: Increased sensitivity of molecular diagnosis in comparison to immunohistochemistry. *Int J Cancer* 79:318±323, 1998

Blaheta H-J, Schitteck B, Breuninger H, et al: Detection of melanoma micrometastasis in sentinel nodes by RT±PCR correlates with tumor thickness and is predictive for micrometastatic disease in the lymph node basin. *Am J Surg Pathol* 23:822± 828, 1999

Breslow A: Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172:902±908, 1970

Buttner P, Garbe C, Bertz J, et al: Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. *Cancer* 75:2499±2506, 1995

Buzaid AC, Tinoco L, Ross MI, et al: Role of computed tomography in the staging of patients with local-regional metastases of melanoma. *J Clin Oncol* 13:2104± 2108, 1995

Buzaid AC, Ross MI, Balch CM, et al: Critical analysis of the current American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system. *J Clin Oncol* 15:1039±1051, 1997

Campbell MJ, Gardner MJ. Calculating confidence intervals for some nonparametric analyses. In: Gardner MJ, Altman DG (eds). *Statistics with Confidence*. London, British Medical Journal, 1989, pp 71±79

Carson KF, Wen DR, Li PX, Lana AMA, Bailly C, Morton DL, Cochran AJ: Nodal nevi and cutaneous melanomas. *Am*

J Surg Pathol 20:834±840, 1996

Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156±159, 1987

Clark WHJ, From L, Bernardino EA, Mihm MC: The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 29:705±727, 1969

Clark WHJ, Elder DE, Guerry D, et al: Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression [see comments]. *J Natl Cancer Inst* 81:1893±1904, 1989

Cox D: Regression models and lifetables. *J R Stat Soc B* 34:187±201, 1972

Ercolani L, Florence B, Denaro M, Alexander M: Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J Biol Chem* 263:15335±15341, 1988

Gamel JW, George SL, Stanley WE, Seigler HF: Skin melanoma. Cured fraction and survival time as functions of thickness, site, histologic type, age, and sex. *Cancer* 72:1219±1223, 1993

Garbe C, Buttner P, Bertz J et al: Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. *Cancer* 75:2492±2498, 1995

Gershenwald JE, Colome MI, Lee JE, et al: Patterns of recurrence following a negative sentinel lymph node biopsy in 243 patients with stage I or II melanoma. *J Clin Oncol* 16:2253±2260, 1998

Goydos JS, Ravikumar TS, Germino FJ, Yudd A, Bancila E: Minimally invasive staging of patients with melanoma: sentinel lymphadenectomy and detection of the melanoma-specific proteins MART-1 and tyrosinase by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Am Coll Surg* 182:182±190, 1998

Hsu SM, Raine L, Fanger H: The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 75:816± 821, 1981

Kaplan EL, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53:457±481, 1958

Kirkwood JM: Adjuvant IFN α 2 therapy of melanoma. *Lancet* 351:1901±1903, 1998

Krag DN, Meijer SJ, Weaver DL, et al: Minimal-access surgery for staging of malignant melanoma. *Arch Surg* 130:654±658, 1995

Kwon BS, Haq AK, Pomerantz SH, Halaban R: Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 Sep; 85 (17): 6352]. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7473±7477, 1987

Machin D, Campbell M, Fayers P, Pinol A: Comparing two survival curves. In: Machin D, Campbell M, Fayers P, Pinol A (eds). *Sample Size Tables for Clinical Studies*. London: Blackwell Science, 1997, pp 176±177

Miliotes G, Lyman GH, Cruse CW, et al: Evaluation of new putative tumor markers for melanoma. *Ann Surg Oncol* 3:558±563, 1996

Mori M, Mimori K, Ueo H, et al: Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in lymph nodes and peripheral blood by reverse transcription polymerase chain reaction in patients with gastrointestinal or breast carcinomas. *J Clin Oncol* 16:128±132, 1998

Morton DL, Wen DR, Wong JH, et al: Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 127:392±399, 1992

Morton DL, Davtyan DG, Wanek LA, Foshag LJ, Cochran AJ: Multivariate analysis of the relationship between survival and the microstage of primary melanoma by Clark level and Breslow thickness. *Cancer* 71:3737±3743, 1993

Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H: Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction: Comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification. *Am J Pathol* 148:649±656, 1996

Reintgen D: More rational and conservative surgical strategies for malignant melanoma using lymphatic mapping and sentinel node biopsy techniques. *Curr Opin Oncol* 8:152±158, 1996

Reintgen D, Cruse CW, Wells K et al: The orderly progression of melanoma nodal metastases. *Ann Surg* 220:759±767, 1994

Ross MI, Reintgen D, Balch CM: Selective lymphadenectomy: emerging role for lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the management of early stage melanoma. *Semin Surg Oncol* 9:219±223, 1993

Schoenfeld A, Luqmani Y, Sinnott HD, Shousha S, Coombes RC: Keratin 19 mRNA measurement to detect micrometastases in lymph nodes in breast cancer patients. *Br J Cancer* 74:1639±1642, 1996

Schwuerzer-Voit M, Proebstle TM, Sterry W: Identification of lymph node metastases by use of polymerase chain reaction (PCR) in melanoma patients. *Eur J Cancer* 32:264±268, 1996

Shivers SC, Wang XN, Li WG, et al: Molecular staging of malignant melanoma: Correlation with clinical outcome. *JAMA* 280:1410±1415, 1998

Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE: Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 338:1227±1229, 1991

Soong SJ, Shaw HM, Balch CM, McCarthy WH, Urist MM, Lee JY: Predicting survival and recurrence in localized melanoma: a multivariate approach. *World J Surg* 16:191±195, 1992

Thompson JF, McCarthy WH, Bosch CM, et al: Sentinel lymph node status as an indicator of the presence of metastatic melanoma in regional lymph nodes. *Melanoma Res* 5:255±260, 1995

Thorn M, Ponten F, Bergstrom R, Sparen P, Adami HO: Clinical and histopathologic predictors of survival in patient with malignant melanoma: a population-based study in Sweden. *J Natl Cancer Inst* 86:761±769, 1994

Wang X, Heller R, VanVoorhis N, et al: Detection of submicroscopic lymph node metastases with polymerase chain reaction in patients with malignant melanoma. *Ann Surg* 220:768±774, 1994

Worth AJ, Gallagher RP, Elwood JM, et al: Pathologic prognostic factors for cutaneous malignant melanoma: the Western Canada Melanoma Study. *Int J Cancer* 43:370±375, 1989