

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. W.T. Knoefel

**Inzidenz und prognostische Relevanz von disseminierten epithelialen
Einzelzellen in zervikalen Lymphknoten von Patienten mit papillärem
Schilddrüsenkarzinom im Stadium pN0**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

vorgelegt von
Ilona Barbara Daumer

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Alexander Rehders

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Is minimal residual lymph node disease in papillary thyroid cancer of prognostic impact? An analysis of the epithelial cell adhesion molecule EpCAM in lymph nodes of 40 pNO patients [169].

Rehders A1, Anlauf M, Adamowsky I, Ghadimi MH, Klein S, Antke C, Cupisti K, Stoecklein NH, Knoefel WT. *Pathol Oncol Res.* 2014 Jan;20(1):185-90. doi: 10.1007/s12253-013-9682-5. Epub 2013 Aug 6.

Inzidenz und prognostische Relevanz von disseminierten epithelialen Einzelzellen in zervikalen Lymphknoten von Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom im Stadium pN0 [169].

Ilona Daumer, geb. Adamowsky

Das Ziel dieser Studie ist ein immunhistochemischer Nachweis disseminierter Tumoreinzelzellen in zervikalen Lymphknoten bei Patienten im histopathologischen Stadium pN0 mittels verfeinerten immunhistochemischen Analysen. Im Frühstadium der papillären Schilddrüsenkarzinome wird sowohl eine systematische Lymphadenektomie als auch eine adjuvante Behandlung mit Radiojod zur Eliminierung von okkulten Tumorzellen kontrovers diskutiert, da wenig über das Ausmaß der lymphatischen Mikrodissemination bei diesen Patientenkollektiv bekannt ist.

In dieser Arbeit wurden in Formalin eingebettete Schnitte der resezierten, cervikalen Lymphknoten systematisch mittels einer immunhistochemischen Analyse (monoklonaler Antikörper BER-EP4) auf das Vorhandensein disseminierter Tumoreinzelzellen untersucht. Dabei wurden klinische und histopathologische Parameter sowie der postoperative Verlauf dokumentiert. Die erhobenen Daten wurden nach der Kaplan-Meier-Methode und dem Log-Rank-Test analysiert. Insgesamt wurden 321 Lymphknoten von 40 Patienten immunhistochemisch aufgearbeitet. Bei 12,5% der Patienten wurden disseminierte okkulte Tumoreinzelzellen diagnostiziert. Zusätzlich zur Tumoresektion erhielten 90% der Patienten eine adjuvante Radiojodbehandlung. Der mittlere Beobachtungszeitraum in unserem Kollektiv betrug 72 Monate.

In der Studie konnte gezeigt werden, dass der Nachweis disseminierter Tumoreinzelzellen nicht mit den klinisch-pathologischen Risikoparametern korrelierte und keinen signifikanten Einfluss auf die Prognose dieser Patienten hatte.

Die immunhistochemische Analyse ermöglicht jedoch den Nachweis disseminierter Tumoreinzelzellen bei Patienten mit einem papillären Schilddrüsenkarzinom im pN0 Stadium. In Anbetracht der langjährigen und kontroversen Diskussion über die Indikation zur prophylaktischen Lymphadenektomie und zur adjuvanten Radiojodtherapie können diese Ergebnisse möglicherweise wertvolle Hinweise liefern und die wissenschaftliche Basis für weitere experimentelle Studien darstellen.

Incidence and prognostic relevance of disseminated epithelial single cells in cervical lymph nodes of patients with papillary thyroid carcinoma in stage pN0 [169].

Ilona Daumer, geb. Adamowsky

This study was aimed to assess the extend of nodal microdissemination in patients with pN0 papillary thyroid carcinoma (PTC) using immunohistochemical analysis. In early stage PTC both, systematic lymphadenectomy as well as radio iodine treatment, aimed to eliminate occult nodal tumor involvement, are under controversial debate, since little is known about the extend of lymphatic microdissemination in these patients. Formalin embedded samples of the resected lymph nodes were systematically screened for the presence of disseminated tumor cells using immunohistochemistry (monoclonal antibody Ber-EP4). Clinical and histopathological parameters as well as the post-operative course were recorded. Survival data were analyzed by the Kaplan-Meier method and the log rank test.

Overall 321 lymph nodes of 40 patients were screened immunohistochemically. In 12.5 % of the patients disseminated occult tumor cells were diagnosed. In addition to tumor resection 90 % of the patients underwent adjuvant radio-iodine treatment. The mean observation period in our collective was 72 months.

The detection of disseminated tumor cells did not correlate with clinic pathologic risk parameters and did not have significant influence on the prognosis of these patients.

Immunohistochemically analysis enables the detection of disseminated tumor cells in patients with pN0 PTC. This finding seems to support the application of adjuvant radio iodine, even in early tumor stages.

Inhaltsverzeichnis

1	EINFÜHRUNG	8
1.1	DAS PAPILLÄRE SCHILDDRÜSENKARZINOM	9
1.1.1	INZIDENZ	11
1.1.2	ÄTIOLOGIE	12
1.1.3	MORPHOLOGIE	14
1.1.4	SYMPTOMATIK	15
1.1.5	DIAGNOSTIK	16
1.1.6	METASTASIERUNG	18
1.1.7	STAGING	19
1.2	THERAPIE	21
1.2.1	EINLEITUNG	21
1.2.2	THYREOIDEKTOMIE	26
1.2.3	LYMPHADENEKTOMIE	27
1.2.4	RADIOJODTHERAPIE (RJT)	29
1.3	PROGNOSE	31
1.4	ZIEL DER STUDIE	35
2	STUDIENDESIGN	36
2.1	EINSCHLUSSKRITERIEN	36
2.2	PATIENTENKOLLEKTIV	37
2.3	THERAPIE	40
2.4	DATENERFASSUNG	43
3	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBEMETHODE	44
3.1	PRINZIP DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG	44
3.2	AVIDIN-BIOTIN-METHODE	45
3.3	PRIMÄRANTIKÖRPER, BER-EP4	47
3.4	MOPC-21- MOUSE IGG	48
4	MATERIALIEN UND METHODEN	49
4.1	AUFARBEITUNG DES GEWEBES	49
4.1.1	PARAFFINSCHNITTE	50
4.1.2	ENTPARAFFINIEREN	50
4.1.3	DEMASKIERUNG	52
4.1.4	PEROXIDASE-REAKTION	53
4.1.5	PRIMÄRANTIKÖRPER	54
4.1.6	SEKUNDÄRANTIKÖRPER	55
4.1.7	SCHNITTKONSERVIERUNG	56
5	AUSWERTUNG	58
5.1	LICHTMIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG	58
5.2	IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION VON BER-EP4 POSITIVEN ZELLEN	58
5.3	STATISTISCHE ANALYSE	60

6	ERGEBNISSE	62
7	FOLLOW-UP	69
8	DISKUSSION	71
9	LITERATURVERZEICHNIS	75
10	DANKSAGUNG	90

1 Einführung

Patienten, welche an einem papillärem Schilddrüsenkarzinom erkranken, weisen überwiegend eine sehr gute Prognose auf. Dennoch kommt es bei einem nicht unerheblichen, prozentualen Teil der Patienten zur weiteren Tumorprogression, so dass von der Existenz okkulten Tumorresiduen auszugehen ist, die jedoch mit einem konventionellen Staging-Verfahren nicht zu detektieren sind. Aufgrund dessen wird vielfach eine prophylaktische Lymphadenektomie ebenso wie eine adjuvante Radiojodtherapie durchgeführt. Allerdings wird dieses Vorgehen insbesondere bei Patienten ohne einen klinischen Verdacht auf eine Lymphknotenbeteiligung kontrovers diskutiert, da sowohl eine prophylaktische Lymphadenektomie wie auch die Radiojodtherapie behandlungsspezifische Risiken aufweisen.

Zwischenzeitlich konnten bei einer Vielzahl von Tumorentitäten okkulte Tumoreinzellen in Lymphknoten und Knochenmark nachgewiesen werden, welche eine ungünstige Prognose aufzeigten [12-14]. Beim papillären Schilddrüsenkarzinom liegen diesbezüglich noch keine publizierten Ergebnisse vor. Um das Ausmaß minimaler Tumorresiduen zu bestimmen, haben wir die Lymphknoten von Patienten im histopathologischen Stadium pN0 einer verfeinerten immunhistochemischen Analyse unterzogen.

Diese Ergebnisse könnten weitere Hinweise darauf ergeben, in welchem Ausmaß eine Lymphadenektomie, bzw. eine Radiojodtherapie bei diesen Patienten durchgeführt werden sollte.

1.1 Das papilläre Schilddrüsenkarzinom

Das papilläre Schilddrüsenkarzinom (PTC) ist die häufigste endokrine, epitheliale maligne Neoplasie und hat insgesamt einen günstigen Verlauf mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von mehr als 90% [31, 45, 46]. Es ist ein von den schilddrüsenhormonproduzierenden Thyreozyten ausgehender Tumor. Der Tumor weist papilläre und/oder kombiniert follikuläre Anteile auf.

Alle papillären Tumore haben einen papillären Anteil, ganz gleich der prozentualen Gesamtmasse. Davon ausgeschlossen sind aber Tumore mit einem undifferenzierten Anteil, diese werden dann als anaplastische Karzinome deklariert [15, 16].

Schilddrüsentumore, welche innerhalb der Schilddrüsenkapsel begrenzt liegen werden als intrathyroidale Tumore bezeichnet. Schilddrüsentumore, bei denen bereits ein Kapseldurchbruch vorliegt und die somit bereits über einen extrathyroidalen Anteil verfügen, weisen eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit einer lymphogenen Metastasierung auf. Pathophysiologisch ist in über 50% der Fälle eine Überexpression des ras-Onkogens auszumachen. Auch eine gehäufte Assoziation von papillären Schilddrüsen-Karzinomen mit der familiären adenomatösen Polyposis lässt eine Mutation des APC-Genes (adenomatous polyposis coli) als Auslöser annehmen.

Papilläre Mikrokarzinome werden definiert als kleine Tumorherde (<10 mm), welche im Verlauf der Jahre eine ansteigende Inzidenz aufzeigen. Ein fraglicher Zusammenhang mit Umwelteinflüssen wird diskutiert [46].

In der Literatur werden unterschiedliche Subtypen des PTC's differenziert. Die Subtypen können auch kombiniert vorkommen.

Papilläres Karzinom (klassischer Typ mit Milchglaskernen, nicht klassischer Typ ohne Milchglaskerne).

- Papilläres Mikrokarzinom (<1 cm)
- Gekapselte Variante
- Follikuläre Variante
- Diffus-sklerosierende Variante (multizentrisches)
- Oxyphiler Zelltyp
- Mischtumoren

Trotz operativer Therapie erleiden etwa 30% der Patienten ein Tumorrezidiv oder weisen Fernmetastasen auf. Die Inzidenz des papillären Schilddrüsenkarzinoms hat sich während des letzten halben Jahrhunderts kontinuierlich erhöht [46].

Da die Schilddrüsenkarzinome eine bevorzugte lymphogene Metastasierung aufweisen besteht die primäre Therapie sowohl aus einer radikalen Thyreoidektomie als kurativem Ziel, als auch aus einer lokoregionären Lymphadenektomie [44].

In klinischen Studien wurde belegt, dass Lymphknotenmetastasen eine prognostische Relevanz aufweisen, bezüglich auf ein erhöhtes Risiko sowohl bei Lokalrezidiven als auch bei Fernmetastasen [47, 48]. Folgerichtig ist ein wesentlicher Bestandteil der Therapie die Lymphadenektomie bei nachweisbaren makroskopischen Lymphknotenmetastasen.

Wenn jedoch in der präoperativen Bildgebung keine suspekten Lymphknoten nachweisbar sind, wird eine prophylaktische Lymphadenektomie kontrovers diskutiert [49, 52], wobei in etwa 50% der Fälle in der histopathologischen Aufarbeitung der zervikalen Lymphknoten mikroskopische Tumoranteile identifiziert werden konnten [51]. Allerdings ist deren prognostische Relevanz bislang nicht eindeutig erwiesen [43, 50, 42].

Andererseits stellt die Identifizierung befallener Lymphknoten im Rahmen der histopathologischen Aufarbeitung einen integralen Bestandteil des Tumorstaging dar. Auf dieser Grundlage kann dann ggf. die Indikation zu weiteren adjuvanten Therapiemaßnahmen gestellt werden [49].

Jedoch wird in diesem Zusammenhang auch die Indikation zur Radiojodtherapie bei nodal negativen Patienten kontrovers diskutiert [Sawka AM].

In Anbetracht der entscheidenden Rolle der residualen Tumorreste in zervikalen Lymphknoten für die Entscheidungsfindung in Bezug auf eine Radio-Jod-Therapie sowie für das Ausmaß der Lymphadenektomie haben wir die Lymphknoten von Patienten im histopathologischen Stadium pN0 einer verfeinerten immunhistochemischen Analyse unterzogen und diese Ergebnisse im Rahmen einer Nachsorgeuntersuchung mit der onkologischen Langzeitprognose korreliert.

1.1.1 Inzidenz

Die Inzidenz des papillären Schilddrüsenkarzinoms liegt im Bereich von 1% aller bösartigen Tumoren. Etwa 3-6 von 100.000 Menschen pro Jahr sind betroffen. Jedoch hat sich die Häufigkeit dieser Tumorentität stetig während des letzten halben Jahrhunderts erhöht [46].

Die Frauen zeigen eine höhere Inzidenz gegenüber dem männlichen Geschlecht auf:

♀ 14,1/100.000/Jahr vs. ♂ 4,9/100.000/Jahr [2, 5, 6, 10, 11, 12]. Insgesamt zählt man pro Jahr ca. 4000 Tumorneuerkrankungen. Das papilläre Schilddrüsenkarzinom erreicht einen Häufigkeitsgipfel zwischen dem vierten und fünften Lebensjahrzehnt, womit das mittlere Erkrankungsjahr bei Frauen bei 58 und bei Männern bei 55 Jahren liegt [17, 73].

Nach der WHO-Konferenz von 2002 werden die Schilddrüsenkarzinome in folgende histologische Subtypen unterteilt, woraus ersichtlich ist, dass das papilläre Schilddrüsenkarzinom den häufigsten histologischen Subtyp darstellt [9].

Grundsätzlich werden die Schilddrüsenkarzinome nach ihrer Histologie und nach dem Ursprungsgewebe eingeteilt:

Karzinom	Häufigkeit
1. Papilläres Karzinom	60-70%
2. Follikuläres Karzinom	15-20%
3. Medulläres Karzinom (C-Zell- Karzinom)	5-10%
4. Anaplastisches Karzinom	<5%
5. Malignes Lymphom, Metastasen anderer Tumore (Melanom, Hypernephrom, Bronchialkarzinom)	5%

Tabelle 1: Histologische Subtypisierung des Schilddrüsenkarzinoms [9]

1.1.2 Ätiologie

Schilddrüsenkarzinome treten meist sporadisch auf, wobei verschiedene kausalgenetische Faktoren in Sinne einer multifaktoriellen Genese diskutiert werden:

- Genetische Disposition
- Allgemeine geographische Unterschiede/Jodmangelgebiete
- Strumainzidenz und Jodversorgung
- Radioaktivität und Strahlenexposition

Zu den gesicherten ätiologischen Faktoren wird ionisierende Strahlung gezählt. Ionisierende Strahlung führt zu interchromosomalen Rearrangements im RET- / PTC-Gen sowie im NTRK1 und BRAF/AKAP9 – Gen, was wiederum zum gehäuften Auftreten von Schilddrüsentumoren, insbesondere des papillären Schilddrüsenkarzinoms führt [41].

Vor allem Röntgenbestrahlung der Kopf-/Hals-Region bei Erkrankungen z.B. Thymus im Kindes- und Jugendalter sowie die Gabe von Radiojod erhöhen das Risiko für die Entwicklung eines papillären Schilddrüsenkarzinoms. Bei Kindern unter 4 Jahren ist die Strahlenexposition besonders kritisch. Mit einer Latenzzeit von 10-15 Jahren nach der Bestrahlung ist die Inzidenz von Schilddrüsentumoren deutlich erhöht [4].

Die Jodversorgung stellt einen weiteren ätiologischen Faktor bei Schilddrüsenkarzinomen dar, insbesondere beim papillären Typ. Ein chronischer Jodmangel führt zu einer permanenten Stimulation der Thyreozyten durch das TSH auf Grund der Mangelsituation, was u.a. eine EGF-induzierte Proliferation fördert und mit dem Entstehen maligner Erkrankungen assoziiert ist [145].

Tatsache ist, dass der Jod-Metabolismus die Entstehung des papillären Schilddrüsenkarzinoms beeinflusst, wobei unklar bleibt, ob ein Jodüberschuss oder ein Jodmangel dafür verantwortlich sind. Bisherige Untersuchungen belegen, dass in Regionen mit normaler Iodversorgung überwiegend prognostisch günstige papilläre Schilddrüsenkarzinome auftreten [146].

Umgekehrt kann eine ausreichende Versorgung mit Jod eine Apoptose in Krebszellen der Schilddrüse induzieren und somit die Umwandlung eines differenzierten Schilddrüsenkarzinoms in einen weniger differenzierten oder in eine anaplastische Form induzieren [53]. Denn es zeigte sich in epidemiologischen Studien, dass eine hohe Jodeinnahme das Auftreten von BRAF-Mutationen in der Schilddrüse begünstigt und somit als ein Risikofaktor für papilläre Schilddrüsenkarzinome gesehen wird [1, 3, 2, 4, 54, 55].

1.1.3 Morphologie

Die papillären Schilddrüsenkarzinome manifestieren sich klinisch meist als solitäre derbe gräulich-weiße gefärbte Knoten. Jedoch ist bei histopathologischer Aufarbeitung in bis zu drei Viertel der Fälle eine Multifokalität beschrieben. So lassen sich multifokale Knoten in einer oder beiden Schilddrüsenlappen (uni-/multifokal) ausmachen.

Papilläre Schilddrüsenkarzinome erscheinen makroskopisch als große, teils solide, teils zystische Strukturen mit grauweißer, blasser Schnittfläche. Im Durchschnitt weisen die papillären Karzinome bei der Diagnosestellung eine Größe von 2,3 cm im Durchschnitt auf. Sie können sowohl mit als auch ohne eine Kapsel auftreten. Jedoch liegt nur in 10% der Fälle eine Kapsel vor. Dabei finden sich in der histopathologischen Aufarbeitung differenzierte papilläre Drüsenformationen. Die Oberfläche ist von einreihigem Epithel überzogen.

Das sogenannte Mikrokarzinom ist eine Sonderform des papillären Schilddrüsenkarzinoms. Zumeist sind es sehr kleine Tumore, welche eine Gesamtgröße unter einem Zentimeter bieten. Typischerweise überschreiten sie nicht die Kapsel. Makroskopisch präsentieren sich Mikrokarzinome oft als grauweiße Narben. Die Mikrokarzinome vom papillären Typ weisen sehr gut Prognose auf.

1.1.4 Symptomatik

Die Symptome der Patienten können sehr verschieden sein, wichtig dabei ist die Erfahrung des Arztes bei der klinischen Untersuchung [18].

Das Leitsymptom bei rund 42,6 % aller Patienten ist ein palpabler intrathyreoidal gelegener Schilddrüsenknoten. Dieser Befund wurde in einer retrospektiv (1960-1980) und in einer prospektiv (1981-1987) durchgeführten Studien mit insgesamt 1116 evaluiert [18]. Als suspekt sollte ein solitärer Knoten klassifiziert werden, welcher trotz Therapie rasch wächst, derb zu tasten ist und nicht verschieblich ist. Szintigraphisch zeigen die meisten Knoten keine Aktivität und werden somit als kalt bezeichnen.

Sämtliche als suspekt eingestuften Knoten sollten weiter mittels einer Punktion sowie einer Zytologie untersucht werden [19,74,75].

Man fand bei 20- bis 40- Jährigen vergrößerte, cervikale Lymphknoten bei insgesamt 24,5 % der Fälle. Die Lymphknotenvergrößerung war oft das erste Symptom. Bei den 50- bis 60- Jährigen lag ein vergrößerter Lymphknoten nur bei ca. 6,9 % vor [20].

Weitere Symptome können sein:

- Derbe, nicht verschiebliche Knoten
- Verfärbte oder fixierte Haut
- Heiserkeit (durch eine Rekurrensparese)
- Horner-Syndrom
- Stridor bzw. Dyspnoe
- Schluckbeschwerden
- Obere Einflusstauung bei großen Tumoren

1.1.5 Diagnostik

Die Diagnostik des papillären Schilddrüsenkarzinoms besteht aus einer Kombination von Untersuchungen, wie der Anamnese und der körperlichen Untersuchung, aus Laboruntersuchungen, einer Sonographie, Szintigraphie und einer Feinnadelpunktion/Biopsie zusammensetzen können [54].

Nach der vom Arzt erhobenen Anamnese folgt eine körperliche Untersuchung, welche eine Palpation der Schilddrüse sowie die Beurteilung der Halslymphknoten umfasst.

Abgesehen von Laboruntersuchungen mit einem durchgeführten (Basis-) Labor (BKS, Blutbild, TSH, fT3, fT4, Thyreoglobulin, Calcitonin, CEA) werden zunächst ein Ultraschall und dann eine Szintigraphie veranlasst.

Mit Hilfe der Ultraschalluntersuchung können Knoten sichtbar werden und in ihrer Morphologie beurteilt werden, ob es sich eher solide oder zystisch veränderte Knoten handelt. Auch kann mittels einer Ultraschalluntersuchung gegebenenfalls die Frage nach einer Multifokalität geklärt werden. Der Ultraschall gehört zur Basisdiagnostik präoperativ als ein Standardverfahren immer dazu. Dabei wird auch die Größe und Ausdehnung des Schilddrüsenknotens ermittelt sowie die Binnenstruktur des Knotens beurteilt. Echoarme, irregulär begrenzte, knotige Schilddrüsen-Areale sind als malignomsuspekte Knoten zu werten, wobei die Differentialdiagnose zu Zysten manchmal schwer sein kann, da insbesondere nicht eingeblutete Zysten echofrei imponieren [85]. Zu weiteren Malignitätskriterien gehören Mikroverkalkungen sowie eine zentrale Hypervaskularisation [86-89].

Eine Szintigraphie ist eine funktionelle Untersuchung des Knotens. Hierbei können kalte Knoten von warmen Knoten differenziert werden. Ein kalter Knoten galt früher als verdächtig und wurde punktiert und zytologisch abgeklärt [20, 24, 38].

Neuere Studien zeigen jedoch auf, dass ein kalter Knoten nur einen geringen positiven prädiktiven Wert hinsichtlich der Malignomwahrscheinlichkeit hat, da in Regionen mit endemischer Struma der Großteil aller Schilddrüsenknoten hypofunktionell sind [90]. Zur weiteren Differenzierung kalter Knoten haben sich MIBI-Szintigraphie und FDG-PET/CT als nicht ausreichend spezifisch erwiesen, sodass ihr Einsatz nur in begründeten Fällen sinnvoll erscheint [91-94].

Bei einem klinisch und/oder sonographisch suspekten Befund kann eine Feinnadelpunktion (FNP) als eine minimal invasive Untersuchungsform und eine zytologische Untersuchung erwogen werden, wobei sich die Materialgewinnung insbesondere bei partiell eingebluteten

oder partiell zystischen Knoten als schwierig erweisen kann um eine repräsentative Probe zu gewinnen. Das Material kann zur weiteren Differenzierung im Rahmen einer histo- bzw. cytopathologischer Aufarbeitung weiterverarbeitet werden. Die charakteristische Kernmorphologie und das immunhistochemisch positive Verhalten für Anti-Thyreoglobulin-Antikörper erlauben es papilläre Schilddrüsenkarzinome zytologisch nachzuweisen [95, 96]. Die Nebenwirkungen einer Feinnadelpunktion sind als gering einzustufen, wie z.B. Nervenschädigung oder Nachblutung. Weitere Folgen einer Punktion wie Punktionskanalmetastasen sind extrem selten und haben wahrscheinlich keinen relevanten Einfluss auf die Prognose [97]. Ein durch die Zytologie gewonnener, malignitätsverdächtiger Befund sollte einer weiteren, histologischen Abklärung unterzogen werden. Bei einem uneindeutigen Ergebnis der Punktionszytologie sollte eine Biopsie angestrebt werden. Auch kann die Biopsie erforderlich sein zur definitiven Indikationsstellung zur Operation. Gegebenenfalls kann auch eine MRT-Untersuchung zur genauen Ausdehnung bei Verdacht auf ein organüberschreitendes Tumorwachstum und zur Beurteilung der anatomischen Verhältnisse präoperativ sinnvoll sein. Auf eine CT-Untersuchung sollte verzichtet werden, da die Gabe des Kontrastmittels eine ggf. indizierte Radiojodtherapie um mehrere Monate verzögert.

Ein Röntgen-Thorax sollte präoperativ erfolgen und kann ggf. pulmonale Fernmetastasen ausschließen.

Zudem ist präoperativ eine Laryngoskopie von enormer forensischer Bedeutung, insbesondere bei symptomatischen Patienten ist diese obligat [98, 99]. Sie dient zur Beurteilung einer möglichen Stimmlippenlähmung (N. recurrens).

Die Bestimmung des Serumthyreoglobulin dient der Rezidivdiagnostik differenzierter Schilddrüsenkarzinome nach totaler Thyreoidektomie [100,101]. Für die Primärdiagnostik differenzierter Schilddrüsenkarzinome hat die Thyreoglobulinbestimmung keinen Stellenwert, da der Wert auch bei benignen Schilddrüsenerkrankungen erhöht sein kann [102].

1.1.6 Metastasierung

Papilläre Schilddrüsenkarzinome metastasieren bevorzugt lymphogen (Abb. 1), so dass es bei einem Großteil der Patienten zum Auftreten zervikaler Lymphknotenmetastasen kommt. Die Inzidenz nachgewiesener Lymphknotenmetastasen in großen chirurgischen Fallstudien liegt bei 39% bis zu 56 % [7, 8]. In progredienten Tumorstadien findet man aufgrund einer hämatogenen Streuung Metastasen im Lungenparenchym, in der Leber sowie ossäre Metastasen.

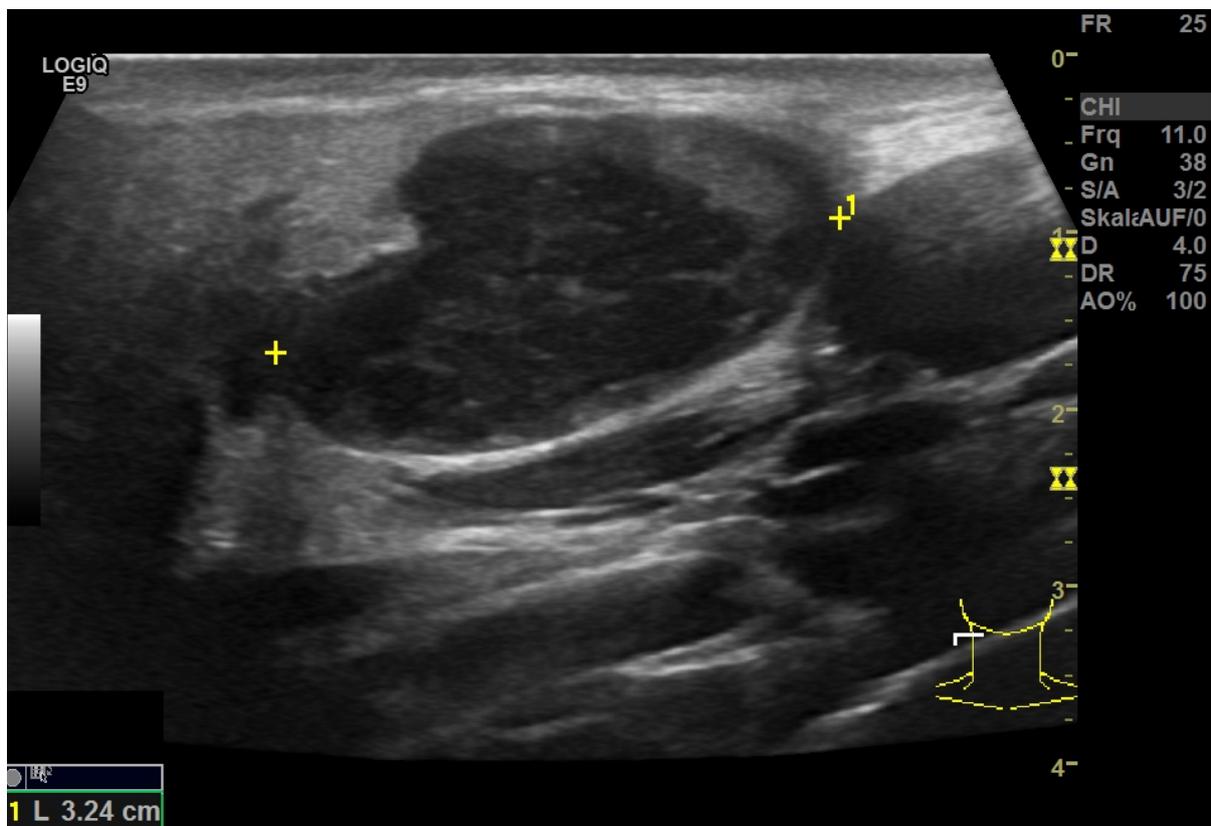


Abb. 1: Sonographisches Beispiel zervikaler Lymphknotenmetastasen (I. Daumer, 2016, Helios Kliniken Krefeld)

1.1.7 Staging

Aus Gründen der Vergleichbarkeit der Tumorstadien wurde das papilläre Schilddrüsenkarzinom nach der 7. Auflage 2009 der TNM-Klassifikation der International Union Against Cancer (UICC) eingestuft.

Das pTNM-System beschreibt die Tumorausbreitung (T), das Ausmaß des Lymphknotenbefalls (N) und die Fernmetastasen (M). Auf dieser Basis wird das papilläre Schilddrüsenkarzinom nach den Kriterien der UICC in vier unterschiedliche Stadien unterteilt. Die Stadieneinteilung dient auch zur Eineintung des Tumors um die Prognose einzustufen.

T1a	a: ≤ 1 cm im größten Durchmesser, beschränkt auf die Schilddrüse (SD)
T1b	> 1 bis ≤ 2 cm im größten Durchmesser, beschränkt auf SD
T2	> 2 bis ≤ 4 cm im größten Durchmesser, beschränkt auf die SD
T3	> 4 cm im größten Durchmesser, beschränkt auf die Schilddrüse sowie alle differenzierten Tumoren mit minimaler extrathyreoidaler Ausbreitung
T4a	differenzierter Tumor jeder Größe mit Ausbreitung über die Schilddrüsenkapsel und Invasion einer oder mehrerer der folgenden Strukturen: subkutanes Weichgewebe, Larynx, Trachea, Ösophagus, N. recurrens
T4b	differenzierter Tumor jeder Größe, infiltriert prävertebrale Faszie, mediastinale Gefäße oder umschließt die A. carotis
Ts/m	solitärer/multifokaler Tumor

N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1a	Metastasen in Lymphknoten des Level VI (prätracheal und paratracheal, eingeschlossen prälaryngeale und Delphi-Lymphknoten)
N1b	Metastasen in anderen unilateralen, bilateralen oder kontralateralen zervikalen oder oberen mediastinalen Lymphknoten

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 2: Tabellarische Aufstellung der TNM-Klassifikation 2009

1.2 Therapie

1.2.1 Einleitung

Das papilläre Schilddrüsenkarzinom wird nach einem multimodalen Konzept therapiert. Die Therapie ist auf das Tumorstadium bezogen und beinhaltet eine operative Sanierung des Primarius [49]. Oft wird postoperativ eine Radiojod-Therapie angeschlossen. Dabei ist jedoch die Indikation zur adjuvanten Radiojodtherapie unter anderem abhängig vom primären Lymphknotenstatus.

Die Thyreoidektomie steht an erster Stelle des therapeutischen Algorithmus. Ziel der Operation ist primär ein kurativer Ansatz. Bei zusätzlich vorhandenen, suspekten Lymphknoten ist eine Lymphadenektomie durchzuführen mit dem Ziel die Wahrscheinlichkeit für ein nodales Rezidiv zu reduzieren [103-106].

Die operative Therapie richtet sich nach der Größe des Tumors und dessen Invasivität. Bei kleineren Knoten mit einer Größe bis 1 cm ist zum Teil eine subtotale Resektion der betroffenen Seite ausreichend. Jedoch lassen sich auch bei Mikrokarzinomen (<10 mm) in 31-61% der Fälle Lymphknotenmetastasen detektieren [56]. Der Stellenwert und das Ausmaß einer prophylaktischen Lymphadenektomie bei papillären Mikrokarzinomen werden kontrovers diskutiert [50].

Es werden in der Literatur verschiedene Terminologien zur Beschreibung der operativen Resektionsverfahren beschrieben [107-108]. Hierbei wird vielfach das Resektionsausmaß im Lymphknotenbereich mit demjenigen im Bereich muskulärer, nervaler und vaskulärer Strukturen in unterschiedlicher Weise kombiniert (z.B. radikale oder modifiziert-radikale Lymphadenektomie). Das operative Verfahren der Schilddrüsenkarzinome wurde von den Kopf-Hals-Tumoren entlehnt, sodass die Leitlinien in Bezug auf die operative Therapie auf einer Kompartmentklassifikation basiert.

Eine prophylaktische Kompartmentresektion bedeutet eine Lymphadenektomie, wobei initial Lymphknotenmetastasen klinisch nicht nachgewiesen werden konnten. Eine therapeutische Kompartmentresektion bedeutet die Lymphknotendissektion bei klinisch bzw. bildgebend oder bioptisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen.

Bei jeder Hemi-/Thyreoidektomie sollte das Ziel sein, dass der Tumorbezirk in toto mit einer Sicherheitszone zum gesunden Parenchym exstirpiert wird.

Bei der ipsilateralen Hemithyreoidektomie erfolgt gleichzeitig die Entfernung des Isthmus. Bei einem invasiven Wachstum des Tumors mit einer Tumorausdehnung im Stadium T3, T4 oder dem Verdacht auf einen Lymphknotenbefall wird die totale Thyreoidektomie mit einer vollständigen Entfernung des gesamten Schilddrüsengewebes durchgeführt. Erst die komplette Entfernung auch des funktionsfähigen Schilddrüsengewebes schafft die Voraussetzung für die Radiojod-Therapie.

Bei einem Lymphknotenbefall erfolgt zusätzlich eine ipsilaterale modifizierte Lymphadenektomie, ggf. eine kontralaterale Lymphadenektomie. Dabei werden die A. carotis, V. jugularis interna und der M. sternocleidomastoideus sowie der N. vagus erhalten. Die angrenzenden Lymphknoten perithyreoidal, präalaryngeal und prätracheal sowie die isthmusnahen Lymphknoten werden ausgeräumt [21, 23, 22]. Die mediastinale Lymphadenektomie (anteriore mediastinale Lymphknoten) wird nur bei in der Computertomographie, Magnetresonanztomographie oder im Szintigramm positiv nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen durchgeführt.

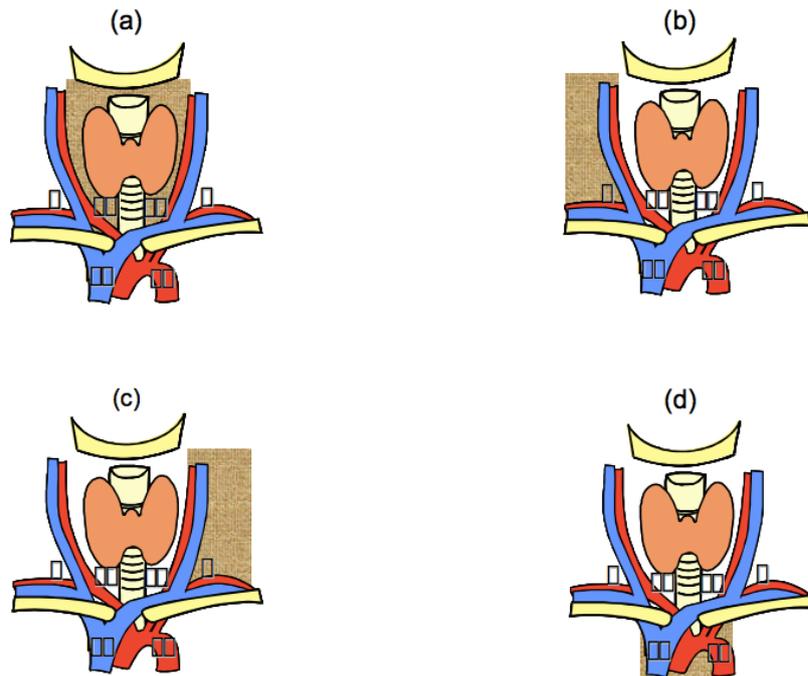
Die cervikalen Lymphknoten bei Schilddrüsentumoren werden in 4 Kompartimente eingeteilt [109-111]:

1. Zentral
2. Ipsilateral zervikolateral
3. Kontralateral zervikolateral
4. Infrabrachiozephal mediastinal

International sind derzeit vier Klassifikationen der lokoregionären Lymphknoten beim Schilddrüsenkarzinom gebräuchlich [112-117]. Die Unterschiede dieser Klassifikation beziehen sich auf die anatomische Seitenzuordnung, die anatomischen Subgruppen und die Berücksichtigung des infrabrachiozephalen oberen Mediastinums (Abb. 2).

Kompartiment-Klassifikation ^[156] (Kompartement)	US-amerikanische Klassifikation ^[157] (Level)	UICC-Klassifikation ^[158] (LK-Gruppen)	Japanische Klassifikation ^[159] (LK-Gruppen)
1a: rechts cervical zentral 1b: links cervical zentral	L 1 submandibulär sowie submental L 6 central L 7 kaudal central	1 und 2 submental und submandibulär 8 Mitte	Regionale LK-Gruppen 1 – 4
2: rechts cervical lateral 3: links cervical lateral	L 2A und 2B kranial und jugulär L 3 median jugulär L 4 kaudal jugulär L 5A und 5B seitlich jugulär	2, 3 jugulär cranial 4 median jugulär 5 jugulär caudal 6 dorsal seitlich 7 seitlich supraclaviculär	Regionale LK-Gruppen 5 – 7
4a: rechtsseitiges, oberes Mediastinum infrabrachiocephal 4b: linksseitig			

Tabelle 3: Klassifikationen der lokoregionären Lymphknoten beim Schilddrüsenkarzinom



(a) Zentrales (K1a, rechts; K1b, links), (b) rechts-zervikolaterales (K2), (c) links-zervikolaterales (K3), und (d) infrabrachiocephales Kompartiment des oberen Mediastinums (K4a, rechts; K4b, links) (55 - 60).

Abb. 2: Kompartimentklassifikation der lokoregionären Lymphknoten beim Schilddrüsenkarzinom [168].

Zentrales Kompartiment:

Dieses Areal verläuft lateral durch die Karotiden und kranial durch das Zungenbein begrenzt wird. Caudal wird das Kompartiment durch den Truncus brachiocephalicus und den Abgang der A. carotis communis begrenzt. Die V. brachiocephalica sinistra grenzt den zervikalen vom mediastinalen Lymphknotenraum ab. Der suprabrachiozephale Anteil des oberen Mediastinums ist daher Bestandteil des zervikozentralen Kompartiment [160].

Der rechte Anteil des zentralen Kompartiments wird linksseitig durch die Trachea begrenzt.

Innerhalb des zentralen Kompartiments unterteilt der N. recurrens das rechte und linke zentrale Kompartiment in einen antenervalen (Level 6) und einen retronervalen Anteil (Level 7).

Die praelaryngealen Lymphknoten im zentralen Kompartiment werden auch Delphi genannt.

Laterales Kompartiment:

Das laterale Kompartiment erstreckt sich auf beiden Seiten der A. carotis communis nach lateral bis zum M. trapezius, nach kranial zum N. hypoglossus, und nach kaudal bis zur V. subclavia. Die dorsale Begrenzung bildet die dorsale Halsfaszie [161,162].

Mediastinales Kompartiment:

Das mediastinale Kompartiment erstreckt sich von der V. brachiocephalica sinistra (kraniale Begrenzung) in bidirektionaler Richtung ventral in das vordere obere Mediastinum zum Thymus und den präaortalen Lymphknoten und nach dorsal zu den paratrachealen Lymphknoten in das hintere obere Mediastinum. Die lateralen Begrenzungen sind auf beiden Seiten die mediastinalen Pleurablätter, kaudal das Pericard (ventral) bzw. die Bifurkation der Trachea.

1.2.2 Thyreoidektomie

Typischerweise erfolgt bei Schilddrüsenkarzinomen eine totale Thyreoidektomie.

Als OP- Zugang wird ein Koch'scher Kragenschnitt verwendet. Anschließend erfolgen die schrittweise Durchtrennung und Ligatur der oberen Polgefäße unter sorgfältiger Schonung der apikalen Epithelkörperchen. Entscheidend ist die frühzeitige Visualisierung und Neurostimulation des Nervus laryngeus recurrens. Nachfolgend wird die Vasa thyroidea inferior durchtrennt, die unteren Epithelkörperchen unter ausreichender Perfusion in situ belassen und die Schilddrüse sukzessive von der Trachea-Vorderfläche abgelöst. Unter Mitnahme eines eventuell vorhandenen Lobus pyramidalis erfolgt die Durchtrennung des Isthmus und anschließend die Entfernung des kontralateralen Schilddrüsenlappens.

Voraussetzung hierfür ist aber ein regelrechtes und reproduzierbares Stimulationssignal des Nervus laryngeus recurrens.

Bei papillärem Mikrokarzinom liegt eine Sonderform vor. Diese werden zumeist als Zufallsbefund nach Thyreoidektomie aus anderen Gründen bei der histopathologischen Untersuchung festgestellt.

1.2.3 Lymphadenektomie

Zentrale Kompartimentresektion

Unabhängig von der Tumorgröße sollte bei vorliegenden Lymphknotenmetastasen im zentralen Kompartiment eine Lymphadenektomie durchgeführt werden. Es konnte aufgezeigt werden, dass es zur Reduktion des Rezidivrisikos kommt und die Überlebenswahrscheinlichkeit dadurch steigt [139].

Die Durchführung einer prophylaktischen Lymphadenektomie im zentralen Kompartiment ohne Anhalt für Lymphknotenmetastasen (cN0) wird kontrovers diskutiert. Ein Vorteil der prophylaktischen Lymphadenektomie liegt im exakten histopathologischen Staging sowie darin potentiell vorhande Mikrolymphknotenmetastasen zu eliminieren. Hingegen sollten dabei die postoperativen Komplikationen wie Recurrensparese, Hypoparathyreoidismus, Verletzung von Ösophagus oder Trachea sowie das Auftreten von Lymphfisteln bedacht werden [134-139].

Laterale Kompartimentresektion

Bei Verdacht auf cervikale Lymphknotenmetastasen wird primär die betroffene Seite reseziert. Bei einem ausgedehnten zentralen Lymphknotenbefall kann unter Umständen auch die kontralaterale Seite reseziert werden [140, 141].

Transsternale mediastinale Kompartimentresektion

Bei einem Hinweis auf Lymphknotenmetastasen mediastinal ist die transsternale mediastinale Kompartimentresektion durchgeführt.

Zervikoviszeralresektion bei organüberschreitendem Wachstum

Bei Vorliegen entsprechender Voraussetzungen (Allgemeinzustand, Fehlen progredienter Fernmetastasen, resektable Läsion, chirurgische Erfahrung mit operativem und perioperativem Management) ist die Indikation zur Resektion zervikoviszeraler Tumorinfiltrationen im Allgemeinen gegeben. Als Alternativen kommen nicht-operative Palliativverfahren in Frage [147-152].

Lymphadenektomie beim papillären Mikrokarzinom

Bei einem papillären Mikrokarzinom < 10 mm ist nach mehrheitlicher Einschätzung eine prophylaktische Lymphadenektomie in Form einer zentralen Kompartimentresektion nicht erforderlich [132,133]. Denn aktuell liegen keine Hinweise auf ein Benefit in Bezug auf die Langzeitprognose vor. Zudem ist zu berücksichtigen, dass postoperative Risiken der zentralen Lymphknotendissektion wie die Recurrensparese und insbesondere der Hypoparathyreoidismus [134-138] oder Lymphfistel, Verletzung des Ösophagus und der Trachea bei einer nicht durchgeführten Lymphadenektomie somit nicht auftreten.

Komplettierungsoperation beim postoperativen Zufallsbefund

Beim papillären Schilddrüsenkarzinom wird die sogenannte Komplettierungsoperation durchgeführt, wenn in der Primäroperation entweder eine R1-Situation besteht oder der Primarius größer als 10 mm ist und somit nicht mehr als Mikrokarzinom einzustufen ist [153-155].

Eine Komplettierungsoperation sollte aufgrund postoperativer Verwachsungen so früh wie möglich erfolgen. Hierbei sind die ersten vier Tage nach der Operation am sinnvollsten. Bei einer deutlichen Verzögerung der histopathologischen Diagnosestellung sollte die Komplettierungsoperation dann erst wieder drei Monate nach der Primäroperation durchgeführt werden, da sich innerhalb dieses Zeitraums die postoperativen entzündlichen Veränderungen des Operationssitus weitgehend konsolidiert haben [153-155].

1.2.4 Radiojodtherapie (RJT)

Bei dieser Therapieoption ist das Ziel eine vollständige Beseitigung des möglicherweise postoperativ verbliebenen Schilddrüsengewebes, sowie die Behandlung radiojodspeichernder Lymphknoten- und Fernmetastasen. Beim papillären Schilddrüsenkarzinom ist die sogenannte ablative Radioiodtherapie eine Standardtherapie, wobei diese beim papillären Mikrokarzinom < 10 mm nicht routinemäßig indiziert ist. Somit bleibt der Stellenwert einer adjuvanten Radiojodtherapie bei papillären Mikrokarzinomen umstritten [57, 25, 27, 26].

Sofern Jod aufnehmendes Tumorgewebe vorliegt, besteht zudem die Option eine Radiojodtherapie bei Lokalrezidiven, Lymphknoten- und Fernmetastasen durchzuführen. Dabei erfolgt eine systemische Applikation von I-131 als Natrium-Iodid zur selektiven Bestrahlung von iod-speicherndem Schilddrüsenkarzinomgewebe.

4-6 Wochen postoperativ können im Regelgall keine Schilddrüsenhormone im Blut mehr nachweisen. Auf dieser Grundlage kann dann eine maximale Radiojodaufnahme gewährleistet sein. Sie erfolgt postoperativ in Form der Gabe einer Kapsel. Diese enthält eine Aktivität zwischen 2,8 und 5,6 GBq ¹³¹I im Kontrollbereich und erfolgt über einer Dauer von 4-8 d. Sie kann auch als eine individuelle Aktivitätsabschätzung für eine Herddosis >300 Gy verabreicht werden [143].

Vor einer geplanten Radiojodtherapie sollten nach einer Anamnese sowie der Kontrolle der Schilddrüsenwerte eine Sonographie des Halses erfolgen und ein Radiojodtest (¹³¹I: 10-20 MBq) mit einer Uptake-Messung nach 24 Stunden durchgeführt werden. Bei einer Uptake-Messung >20% sollte über eine Re-Operation reevaluiert werden [141].

Drei bis sechs Monate später folgt die Überprüfung des Erfolgs der Radiojodtherapie mittels einer I-131-Ganzkörper-Szinigraphie, kombiniert mit einer Stimulation des Thyreoglobulin. Der Erfolg der Therapie wird über einen fehlenden oder minimalen Iod-Uptake im restlichen Schilddrüsengewebe (<0,1%) definiert [141, 143, 144].

Unter Durchführung des standardisierten interdisziplinären Therapieschemas mit einer Thyreoidektomie, ablativen Radioiodtherapie sowie einer supportiven TSH-suppressiven Hormontherapie [144] ist dann die Prognose bei diesen Patienten insgesamt sehr gut.

Auch im Falle einer Inoperabilität sowie eines R1- Lokalrezidivs oder bei Lymphknoten-, Fernmetastasen verbessert die Radiojodthrapie die Prognose.

1.3 Prognose

Unter den histologischen Subtypen der Schilddrüsenkarzinome hat das papilläre Schilddrüsenkarzinom die beste Prognose. Die mittlere 10-Jahres-Überlebensrate des papillären Karzinoms liegt bei 80–90% (Abb. 4). Die Prognose hängt sowohl vom Alter des Patienten ab als auch vom Tumorstadium [2, 5, 83].

Unter 40 Jahre alte Patienten weisen eine deutlich bessere Prognose auf als ältere Patienten. Die Prognose wird aber auch vom Differenzierungsgrad und der Metastasierung des Tumors beeinflusst. Zu einem weiteren Prognosefaktor zählen das Geschlecht, wobei das weibliche Geschlecht eine bessere Prognose hat [33, 34].

Das follikuläre Karzinom hat aufgrund des Ausbreitungsverhaltens und den histologischen Varianten eine deutlich schlechtere Prognose als das papilläre Schilddrüsenkarzinomen.

Das anaplastische Schilddrüsenkarzinom ist eine der aggressivsten Neoplasie überhaupt. 60% der Patienten mit diesem Tumor sterben innerhalb der ersten 6 Monate nach der Diagnosestellung [15,16].

Die statistisch ermittelten 10-Jahres Überlebensraten (Abb. 3) des Schilddrüsenkarzinoms, welches entsprechend der Histologie in verschiedene Subtypen eingeteilt werden kann, sind in Tabelle 4 zusammengefasst [15,16].

Jedoch werden auch Verläufe mit einer erhöhten Rezidiv- und Mortalitätshäufigkeit beobachtet, welche aus dem Tumorstadium, dem Grading, der Metastasierung und der Gesamtkonstellation des Patienten resultieren. Bislang gibt es noch kontroverse Diskussionen über den Einfluss von Lymphknotenmetastasen auf das Gesamtüberleben [35, 36, 42, 78,79].

Karzinom	10-Jahresüberlebensrate (Cancer Data Base, USA) [15,16]
Papilläres:	95 %
Follikuläres:	85 %
Medulläres:	75 %
Anaplastisches:	14 %

Tabelle 4: 10-Jahresüberlebensrate der histologischen Subtypen des Schilddrüsenkarzinoms

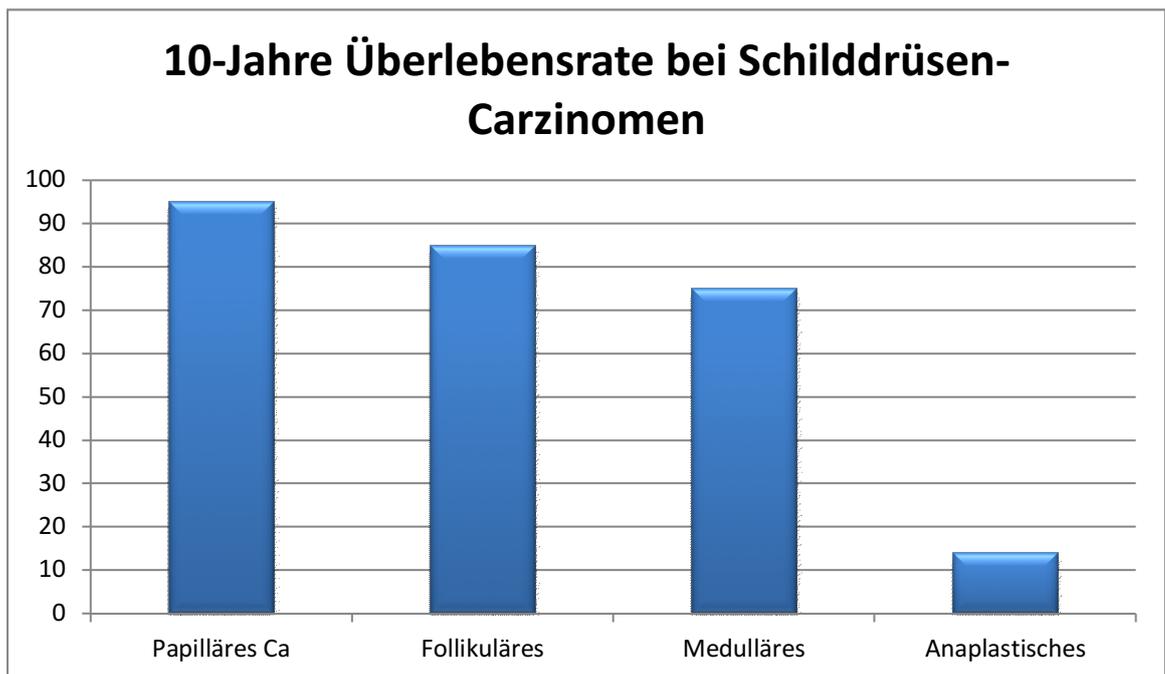
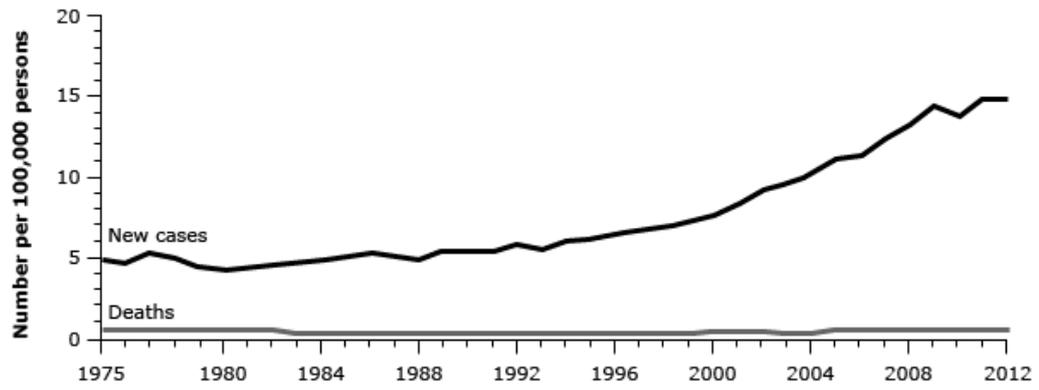


Abb. 3: Diagramm-Darstellung der 10-Jahres Überlebensrate bei Schilddrüsen-Karzinom [15,16].

Aufgrund der unterschiedlichen klinischen Verläufe der verschiedenen Subtypen, die die Identifikation prognostischer Risikofaktoren erschwert, fokussiert sich die vorliegende Arbeit ausschließlich auf Patienten mit einem papillären Schilddrüsenkarzinomen, da diese Entität die höchste Inzidenz aufweist und somit klinisch einen relevanten Subtyp darstellt.



Year	1975	1980	1985	1990	1995	1999	2003	2007
5-year relative survival	92.3%	92.8%	92.5%	95.5%	95.8%	96.8%	97.3%	97.9%

Abb. 4: SEER: New cases, deaths, and 5-year relative survival, Surveillance, Epidemiology, and End Results [163]

1.4 Ziel der Studie

Das Ziel dieser Studie ist ein immunhistochemischer Nachweis disseminierter Tumoreinzellen in zervikalen Lymphknoten bei Patienten im histopathologischen Stadium pN0 mittels verfeinerten immunhistochemischen Analysen. Diese Ergebnisse sollen mit der onkologischen Langzeitprognose der Patienten korreliert werden.

Der in klinischen Studien beschriebene immunhistochemische Nachweis disseminierter Tumoreinzellen bei einer Vielzahl solider Tumorentitäten [58] weist eine ungünstige prognostische Korrelation auf. Beim papillären Schilddrüsenkarzinom gibt es bislang noch keine Daten zur Detektion lymphogen disseminierter Tumorzellen, so dass deren Inzidenz und prognostische Relevanz noch ungeklärt sind.

In Anbetracht der langjährigen und kontroversen Diskussion über die Indikation zur prophylaktischen Lymphadenektomie und zur adjuvanten Radiojodtherapie können diese Ergebnisse möglicherweise wertvolle Hinweise liefern und die wissenschaftliche Basis für neue Untersuchungen darstellen.

2 Studiendesign

2.1 Einschlusskriterien

Alle Patienten, welche an einem Schilddrüsenkarzinom vom papillären Typ im Stadium pT 1-4 erkrankten, konnten in diese Studie aufgenommen werden. Sämtliche Betroffene wurden primär einer Operation in der Allgemeinchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zugeführt.

Dabei wurden lediglich alle Patienten eingeschlossen, die tumorfreie Resektionsränder in der histopathologischen Analyse zeigten.

Bei allen untersuchten Patienten wurde zusätzlich eine zervikale Lymphadenektomie durchgeführt.

2.2 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 40 Patienten in einem Zeitraum von September 1995 bis Juni 2005, welche an einem papillären Schilddrüsenkarzinom erkrankten und sich im Nodalstadium pN0 befanden, im Universitätsklinikum Düsseldorf in kurativer Absicht (R0) operiert (Abb. 5). 9 dieser Patienten waren Männer und 31 waren Frauen. Somit lag das Verhältnis von Frauen zu Männern 3.44 zu 1.0.

Postoperativ wurden die Patienten bezüglich des Tumorstadiums und des Gradings gemäss der Richtlinien der 7. Auflage der TNM-Klassifikation der Union International Contre Cancer (UICC) eingestuft.

Am häufigsten befanden sich die Patienten in einem frühen Tumorstadium. Somit verblieben 40 Patienten (70%) mit einem UICC-Stadium pT1, welche das Kollektiv der Studie darstellten vs. 30% Patienten im pT3-4 Stadium.

Letzendlich überwog das weibliche Geschlecht in der Studie mit 31 Frauen und 9 Männer. Die Altersverteilung bei diesen Patienten lag zwischen 12 und 72 Jahren. Im Durchschnitt betrug das Alter der Patienten 45 Jahre.

Sämtliche resezierte, cervikale Lymphknoten wurden einer immunhistochemischen HE-Färbung unterzogen. Alle in dieser Studie untersuchten Lymphknoten waren metastasenfrem (pN0).

Der Durchmesser des Primarius betrug 10 mm oder sogar weniger bei insgesamt 15 Patienten (37,5%).

Im Durchschnitt betrug die Größe des Tumors bei 17 Patienten (42,5%) 10 mm bis 25 mm. Nur bei 8 Erkrankten lag die Tumorgöße über 25 mm (20%).

Alle Patienten wiesen keine Fernmetastasen auf.

	Patienten	(%)
Geschlecht		
Männlich	9	22,5
Weiblich	31	77,5
Alter		
< 45 Jahre	20	50
> 45 Jahre	20	50
Stadium		
T1	15	37,5
T2	13	32,5
T3	4	10
T4	8	20
Tumordurchmesser		
≤ 10 mm	15	37,5
> 10 mm bis ≤ 25 mm	17	42,5
> 25 mm	8	20

Tabelle 5: Zusammengefasste Charakteristika der Patienten

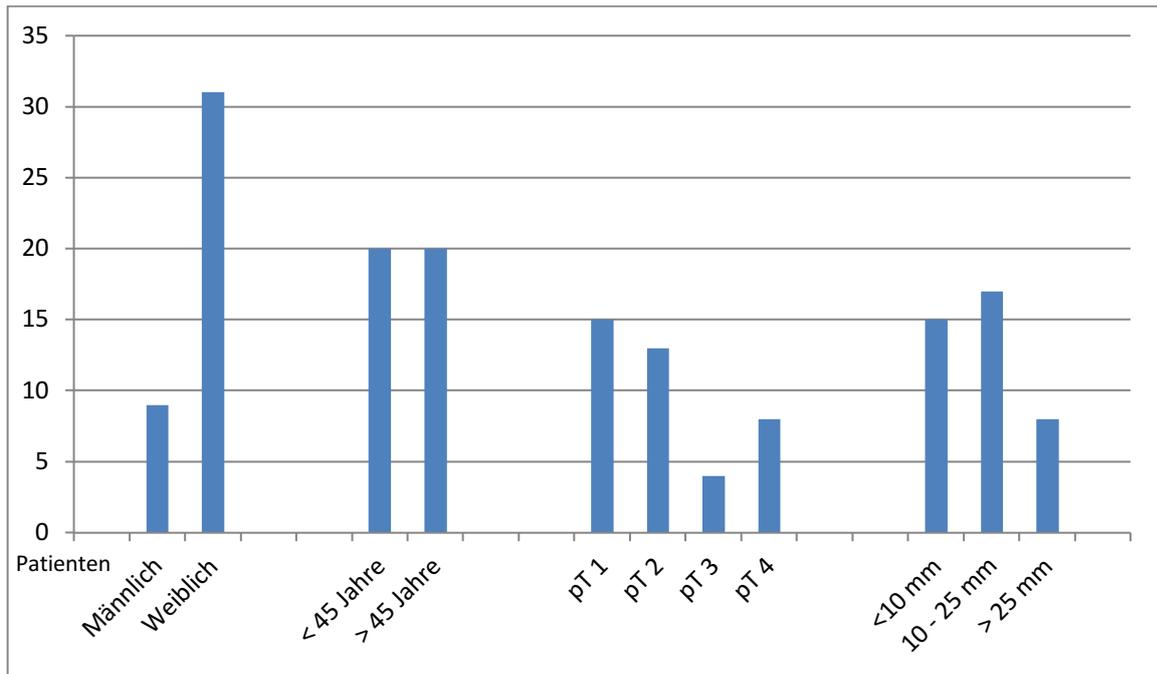


Abb. 5: Ergebnisse als Diagramm

2.3 Therapie

Der Großteil der Patienten wurden einer totalen Thyreoidektomie unterzogen. Diese wurde bei 37 Patienten (92,5 %) durchgeführt. Lediglich drei Patienten (7,5 %) erhielten eine partielle Thyreoidektomie bei Karzinomen, die kleiner als 10 mm waren.

Nach Exzision des Primarius erfolgte zeitgleich bei 30 Patienten (75 %) eine Lymphadenektomie, wohingegen bei 10 Patienten (25 %) eine zweizeitige Lymphknotendissektion nach Erhalt der endgültigen histopathologischen Befunde durchgeführt wurde. 11 Patienten (27,5 %) erhielten eine limitierte zentrale Lymphadenektomie und ebenfalls 11 Patienten (27,5 %) eine standardisierte zentrale Lymphadenektomie. Bei 12 Patienten (30 %) erfolgte eine einseitige modifizierte Lymphadenektomie und bei 6 Patienten (15 %) wurde eine bilaterale modifizierte Lymphadenektomie durchgeführt. Es wurden durchschnittlich 9 Lymphknoten gewonnen, sodass insgesamt 343 Lymphknoten der histopathologischen Standarduntersuchung zugeführt werden konnten.

Die mittlere Dauer des Krankenhausaufenthaltes betrug 6,5 Tage, wobei die Spannweite zwischen 2 bis 20 Tagen lag.

Zu den postoperativen Komplikationen zählte eine dauerhafte Lähmung des N. recurrens, die bei einem Patienten auftrat. Eine transiente postoperative Hypokalzämie wurde bei 11 Patienten (27,5 %) vorgefunden. Einer der Patienten entwickelte postoperativ eine Wundinfektion. Blutungskomplikationen wurden bei keinem verzeichnet.

Postoperativ wurden alle Patienten auf einer regelmäßig stattfindenden, interdisziplinären, endokrinologischen Fallkonferenz vorgestellt. Hierbei wurde insbesondere über die Durchführung einer adjuvanten Radiojodtherapie entschieden. Insgesamt erhielten 36 Patienten postoperativ eine Radiojodtherapie.

Die Radiojodbehandlung wurde nach Niedrig-Dosis-Protokollen mittels 30-50 mCi (Robbins RJ, 2005) ca. 12 Wochen nach der operativen Versorgung angeschlossen.

Periodische Messungen des Serum-Thyreoglobulins (TG) im Blut wurden regelmäßig kontrolliert.

Zu den Tumornachsorgeuntersuchungen zählen ein diagnostischer Ganz-Körperscann (WBS) mit einer Tracing-Dosis von ^{131}I , welcher ein Mal jährlich in den ersten zwei Jahren und nachfolgend jedes zweite bis fünfte Jahr durchgeführt werden.

	n-Patienten	(%)
Thyreoidresektion		
Unilateral Lobektomie	3	7.5
Totale Thyreoidektomie	37	92.5
Lymphadenektomie		
Limitierte zentrale Lymphadenektomie (1)	11	27.5
Standardisierte zentrale Lymphadenektomie (2)	11	27.5
Modifizierte unilaterale Lymphadenektomie (3)	12	30
Modifizierte bilaterale Lymphadenektomie (4)	6	15
R-Status		
R0	33	82.5
R1	7	17.5
Radiojodtheapie ¹³¹I		
Durchgeführt	36	90
Nicht durchgeführt	4	10

Tabelle 6: Die Charakteristika der Therapieformen

(1) Limitierte zentrale Lymphadenektomie:

Entnahme einzelner Lymphknoten des zentralen Kompartiments

(2) Standardisierte zentrale Lymphadenektomie:

Vollständige Lymphknotendissektion im Level VI

(3) ipsilaterale Lymphadenektomie des lateralen Kompartiments Level 2-4:

Dissektion im Level VI und unilateral im Level II-IV unter Erhalt d. M sternocleidomastoideus sowie der Vena jugularis int.

(4) ipsi- und kontralaterale Lymphadenektomie des lateralen Kompartiments:

Dissektion im Level VI und bilateral im Level II-IV.

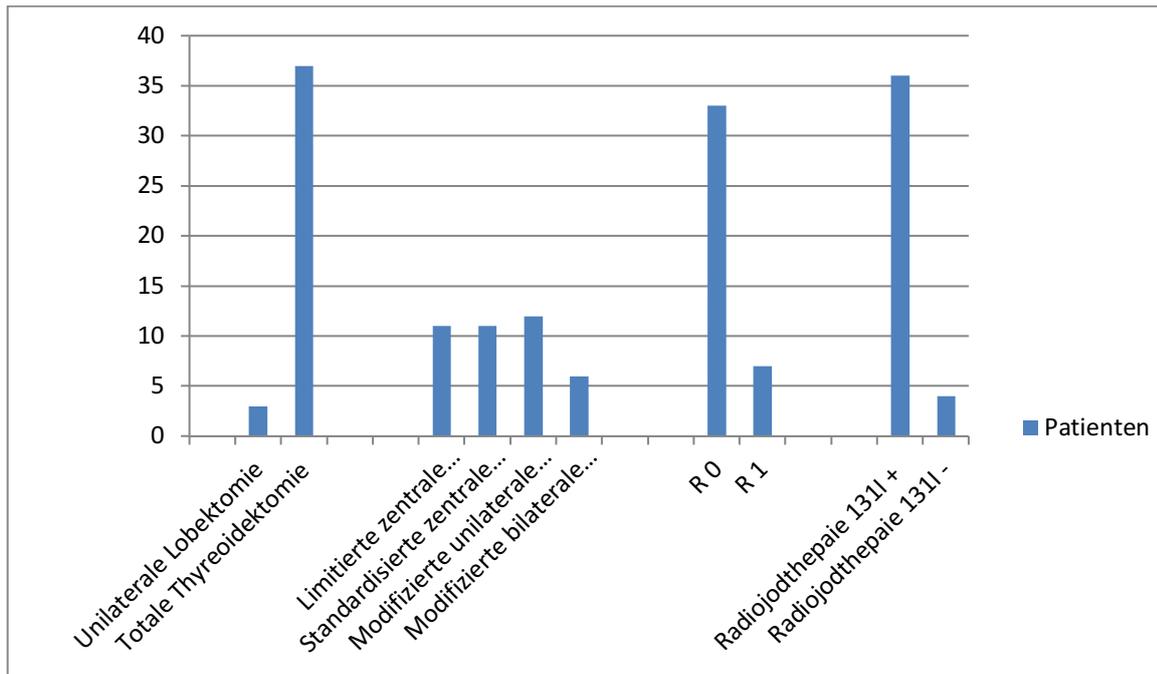


Tabelle 7: Die Charakteristika der Therapieformen als Diagramm

2.4 Erfassung der Daten

Sämtliche Informationen der dieser Studie zugeführten Erkrankten wurden anonym dokumentiert und anschließend zusammengefasst. Die Ergebnisse wurden in einer Excel-Tabelle gespeichert.

Zu Beginn der Studie lag über die Verwendung von histologischen Gewebeproben eine schriftliche Einwilligung der Patienten vor. Zur Erhebung der Tumornachsorgeergebnisse wurden die behandelnden Hausärzte mittels Fragebogen angeschrieben, oder es wurden die Ergebnisse der Nachsorgeuntersuchungen, welche an der Universität Düsseldorf erfolgten herangezogen.

3 Immunhistochemische Färbemethode

3.1 Immunhistochemische Färbung

In dieser Studie wurde eine immunhistochemische Färbung (IHC) verwendet, die auf einer indirekten Methode mittels einer ABC-Färbung (Avidin– Biotin– Methode) beruht.

Das Prinzip beruht darauf, dass Tumorzellen bestimmte Antigene (AG) auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Die bei dieser Methode eingesetzten Antikörper (AK), auch als Primär-Antikörper bezeichnet, besitzen eine starke Affinität zum Antigen, was eine starke AG-AK-Reaktion zur Folge hat [70]. Somit können die Antigene durch spezifische Antikörper erkannt werden. Zuerst wird in diesem Verfahren ein bestimmter Antikörper, auch als Primärantikörper bezeichnet auf die vorbereitete Gewebeprobe aufgetragen. Anschließend wird im zweiten Schritt ein weiterer Antikörper hinzugefügt, welcher sich gegen den Primärantikörper richtet. Dieser wird als Sekundärantikörper bezeichnet. An dem Sekundärantikörper ist ein Enzym konjugiert (biotinyliert), um das Ausgangssignal in der anschließenden Färbung zu verstärken. Um den AG-AK-Komplex sichtbar zu machen, ist der Antikörper an ein zusätzliches Molekül gekoppelt. Der Primär-Antikörper zeichnet sich durch seine hohe Spezifität und Affinität mit dem Antigen aus und weist keine Kreuzreaktionen mit ähnlichen Antigenen auf [59, 63, 70].

3.2 Avidin-Biotin-Methode

Für diese Methode werden drei Reagenzien benötigt:

1. Primärantikörper
2. Sekundärantikörper an Biotin konjugiert
3. Peroxidase konjugierter Avidin-Biotin-Komplex

Das Biotin mit der Summenformel: $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ (Abb. 6), welches auch als Vitamin H oder B7 bezeichnet wird, kommt in sämtlichen Zellen des Organismus vor. Es übernimmt bei multiplen Vorgängen wie z.B. im Protein- und Lipidstoffwechsel sowie im Kohlenhydratstoffwechsel eine zentrale Stellung. An die Seitenkette des Biotin-Moleküls können im Rahmen der immunhistochemischen Färbung andere Moleküle, hier der spezifische Antikörper Avidin, an das Biotin konjugieren [59].

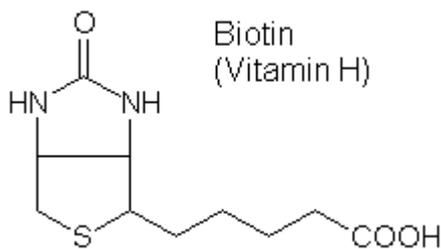


Abb. 6: Biotin als Formel [59]

Bei Avidin handelt es sich um ein aus dem Hühnereiweiß isoliertes Glykoprotein, welches jeweils vier Biotin- Moleküle (Sekundär-Antikörper) gleichzeitig binden kann. Aufgrund der molekularen Konfiguration werden jedoch weniger als vier Biotinmoleküle gleichzeitig konjugiert. Aufgrund dessen bleibt mindestens eine Bindungsstelle für den biotinylierten Sekundärantikörper frei [59, 63-69].

Die hier durchgeführte Avidin-Biotin-Methode führt aufgrund der Affinität von Avidin und Biotin zur Bildung von sehr stabilen und beständigen, großen Avidin-Biotin-Komplexen (Abb. 7) mit biotinylierten Sekundär-Antikörpern. Um den Avidin-Biotin-Komplex sichtbar zu machen wird eine Chromogenlösung benutzt. Als katalysierendes Enzym haben wir biotin-gekoppelte Peroxidase benutzt, welches zusammen mit einer Substrat-Chromogen-Lösung ein Farbprodukt bildet. Die Chromogen- DAB (3,3-Diaminobenzidin- Tetrahydrochlorid) - Lösung führt durch eine enzymatische Umsetzung wie der Oxidation zu Farbprodukten, wodurch das Ziel-Antigen farblich markiert wird.

Vereinfacht → Antigen + unkonjugierter Primärantikörper + biotinylierter Sekundärantikörper + Avidin-Biotin-Enzymkonjugat + Substrat/Chromogen → Farbe [59].

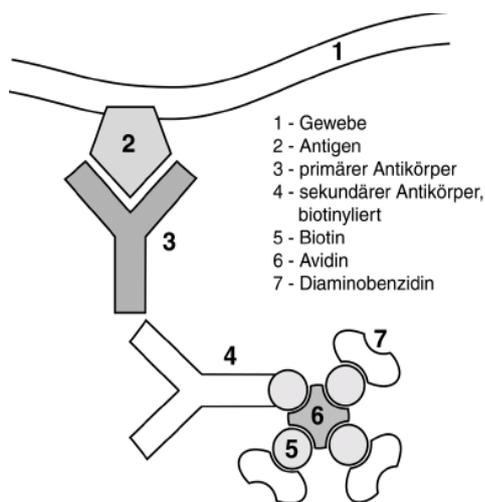


Abb. 7: Bildliche Darstellung der Avidin-Biotin-Methodik [59]

3.3 Primärantikörper, BER-EP4

Der in dieser Studie verwendete Primär-Antikörper BER-EP4 (Anti-Epithelzell-AK BER-EP4) ist ein monoklonaler Antikörper, ein epithelialer Tumorzell-Marker, welches gegen das EpCAM-Zelladhäsionsmolekül gerichtet ist [60, 61, 62, 64].

BER-EP4 ist ein monoklonaler Maus-Antikörper (Anti-Ep-CAM). Der Antikörper richtet sich gegen Ep-CAM-Molekül, welches auf der Zellmembranoberfläche lokalisiert ist und im Zytoplasma fast aller Epithelzellen und auch verstärkt in Lymphknoten exprimiert wird. Jedoch ist keine Expression des EpCAM- Moleküls auf mesenchymalem Gewebe nachzuweisen. Auch davon ausgenommen sind die meisten Plattenepithelien, Hepatozyten, Nierenzellen der proximalen Tubuli, Magenwandzellen und myoepithelialen Zellen [62, 65, 66, 67, 73, 74].

EPCAM wie oben erwähnt ist ein epitheliales Molekül, welches für die Zelladhäsion [60, 70, 71] verantwortlich ist. Das EPCAM wird durch das entsprechende EpCAM-Gen kodiert.

Das EPCAM (epitheliale Zelladhäsionsmolekül) ist ein Glykoprotein. Es besitzt ein epithelisches Antigen. Dieses epitheliale Zelladhäsionsmolekül wird auf der Zelloberfläche gesunder menschlicher Epithelien exprimiert, aber auch in Lymphknoten exprimiert. Es konnte aufgezeigt werden, dass EPCAM ebenfalls auf Tumorzellen exprimiert wird [5, 72, 74]. Die Entstehung einer Neoplasie ist mit einer starken Überexpression des EPCAM's assoziiert [74]. Auch wurde festgestellt, dass die Expressionsrate von EPCAM mit dem aggressiveren Verhalten einiger Tumore korreliert [3, 4].

Bei einer Reihe anti-epithelialer Antikörper kann BER-EP4 oder MOC-31 dazu benutzt werden, die Differenzierung zwischen Epithelzellen aufzuzeigen [70, 71].

Da der anti-epitheliale Antikörper BER-EP4 fähig ist das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EPCAM zu detektieren, wurde dieser zur Detektion lymphogen disseminierter Tumorzellen verwendet unter Zuhilfenahme einer immunhistochemischen Avidin-Biotin-Methode sowie den hochspezifischen anti-epithelialen Antikörper BER-EP4 (IgG1 mouse).

3.4 MOPC-21- Mouse IgG

Als Negativkontrolle benutzen wir den isotypenidentischen, monoklonalen Antikörper MOPC 21 IgG1 (irrelevantes mouse myeloma protein) [68, 69, 75].

MOPC-21 mouse IgG ist ein Immunglobulin der Maus (Myelom-Protein) und wurde als eine Isotopenkontrolle im Anschluss als ein Kontroll-Antikörper benutzt, da der Antikörper gegen unspezifische Antigene gerichtet ist. Es funktioniert als eine Isotypen-Steuerung [75].

4 Materialien und Methoden

Das Ethikvotum zur vorliegenden Dissertation liegt vor (3821).

4.1 Aufarbeitung des Gewebes

In der konventionellen Aufarbeitung des zu untersuchenden Gewebes erfolgt primär eine histologische Untersuchung der einzelnen Schnitte der resezierten Lymphknoten. Und nachfolgend erfolgt eine Hämatoxylin- und Eosin-Färbung des Gewebes.

Inzwischen wurden empfindlichere, immunhistochemische Assays entwickelt. Bei diesen Methoden werden Epithelzellen oder tumorassoziierte Markerproteine sichtbar gemacht.

Die empfindlicheren, immunhistochemischen Assays können einzelne Tumorzellen in Lymphknoten, welche durch herkömmliche histopathologische Analysen [76, 77] als tumorfrei eingestuft wurden, klassifizieren. Die klinische Bedeutung dieser Assays ist jedoch immer noch umstritten. Bisher wurden sie nicht bei Patienten mit einem papillären Schilddrüsenkarzinom eingesetzt [80].

4.1.1 Paraffinschnitte

Es wurden formalinfixierte Paraffinblöcke der resezierten Lymphknoten von 40 Patienten im Stadium pN0 untersucht, insgesamt waren es 343 Lymphknoten. Dabei wurden repräsentative Paraffinschnitte der resezierten Lymphknoten mit einer maximalen Schichtdicke von 3-5 µm angefertigt unter Verwendung eines Schlittenmikrotoms.

Ein Paraffinblock wird in eine Haltevorrichtung, welche den Paraffinblock einspannt unter die Schnittfläche des angeschraubten Messers eingelegt. Der Schnitt schiebt sich dabei auf das Messer und kann mittels eines angefeuchteten Pinsels abgehoben und in ein Wasserbad gelegt werden. Durch das Wasserbad können die gegebenenfalls entstandenen Falten unter Zuhilfenahme eines feinen Pinsels gestreckt werden.

Anschließend werden die mikrodünnen Schnitte auf einen Objektträger-Superfrost übertragen. Bis zur anschließenden Färbung werden die Objektträger in einem warmen Brutschrank gelegt. Im Brutschrank herrscht eine konstante Temperatur von 37° C. Dies erfolgt zum einem zum Trocknen der Schnitte, zum anderen zur besseren Haftung der Schnitte auf dem Objektträger.

4.1.2 Entparaffinieren

Um mikrodünne Schnitte herstellen zu können, ist eine Einbettung der Schnitte im Paraffin notwendig, da ansonsten das Gewebe zu weich und somit nicht schneidbar wäre. So muss also das Einbettungsmedium, hier Paraffin zur Vermeidung von einer Hintergrundfärbung vollständig ausgewaschen werden. Das Paraffin wird also mittels einer Xylol-Lösung aus den Schnitten entfernt. Die Farbstoffe, welche bei einer Färbung verwendet werden, sind entweder alkohol- oder wasserlöslich. Die Farbstoffe würden sich sonst nicht im paraffinierten Gewebe anreichern.

Nachdem die Schnitte im Brutschrank über 20 Minuten getrocknet werden, werden die Schnitte zum Entparaffinieren in Xylol unter einem Dunstabzug jeweils drei Mal a 5 Minuten eingelegt.

Anschließend erfolgt die Entfernung des Xylols, da die Farbstoffe nicht xylollöslich sind. Dies passiert mittels einer absteigenden Alkoholreihe. Der Alkohol entzieht den Schnitten,

also dem Gewebe H_2O_2 . Durch diesen Schritt wird eine Denaturierung des Gewebes verhindert.

Dazu legt man die angefertigten Schnitte in eine absteigende Alkoholreihe jeweils zwei Mal a 2 Minuten zum entwässern. Man beginnt mit einer 99,5 %-igen Ethanol-Lösung, dann mit einer 96%-igen Ethanol-Lösung und einer 80 %-igen Lösung und endet mit einer 70%-igen Ethanol-Lösung. Am Ende der Reihe wird das zu untersuchende Gewebe im destillierten Wasser mindestens fünf Minuten lang gespült.

4.1.3 Demaskierung

Das Entfernen von Epitopen erfolgt mittels einer angefertigten Retrieval Solution (Dako Cytomation, Target Retrieval Solution 10 x Concertante RAF: S1699 LOT 00009719) 1:10 mit destilliertem H₂O₂ (Aqua dest) verdünnt.

Die Retrieval Solution ist ein Tris/EDTA-Puffer, welches einen pH-Wert von 9 aufweist.

Dieser Puffer dient zur wärmeinduzierten Demaskierung bisher nicht reaktiver

Antigene/Antikörper vor einem immunhistochemischen Verfahren.

Die Retrieval-Lösung wird in ein Wasserbad gestellt, welches auf 95 Grad eingestellt wird und auf 90-100 Grad erhitzt. Wenn die Temperatur erreicht ist, werden die Objektträgerracks in die Lösung gestellt und 30 Minuten inkubiert. Nach 30 Minuten werden die Objektträgerbehälter aus dem Wasserbad genommen, in der Lösung belassen und man lässt sie 20 min bei Raumtemperatur abkühlen.

Danach werden die Objektträgerbehälter in einer PBS-Lösung (Phosphate-Buffered Saline PBS, GIBCO 14190) getaucht und in Aqua dest. wieder gespült.

Die PBS-Lösung ist eine phosphatgepufferte Salzlösung bei einem konstanten pH-Wert von 7,4. Die isotonische Salzlösung besitzt den osmotischen Druck, welcher dem physiologisch osmotischen Druck der menschlichen Zellen entspricht.

Die Lösung enthält 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid und 12 mM Gesamt-Phosphat (in Form von HPO₄²⁻ und H₂PO₄⁻). Sie dient zur Rehydrierung der Schnitte.

4.1.4 Peroxidase-Reaktion

Die endogene Peroxidase ist eine in Zellen vorkommende Enzymaktivität, welche vor allem in Granulozyten, Mastzellen, Myoglobin, Hämoglobin nachzuweisen ist.

Da bei der Immunhistochemie die Färbung durch Chromogenumsetzung durch Enzyme erfolgt, müssen zuerst endogene Enzyme blockiert oder inaktiviert werden um falsch positive Resultate zu vermeiden. Somit erfolgt vor der Immunreaktion eine Blockierung der endogenen Peroxidase mit H₂O₂ (MERCK, 85971000304 K19013597).

Die Schnitte werden in 0,3 % H₂O₂ (300 ul mit 300 ml PBS-Lösung) für 30 min in Küvetten in Raumtemperatur inkubiert. Danach lässt man die Objektträgerbehälter abtropfen und spült sie jeweils zwei Mal in der PBS-Lösung.

Mit einem Fettstift (Liquid Blocker) umrandet man die Gewebeschnitte um ein späteres Herauslaufen der Antikörperlösungen zu verhindern. Die Objektträger werden wieder in eine Feuchtkammer mit Aqua dest. gelegt.

Bevor Antikörper gegen Proteine eingesetzt werden können, sollen alle Epitope in den Gewebeschnitten blockiert werden, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Ansonsten können die Antikörper oder andere Nachweisreagenzien der Epitope auf der Probe unabhängig von ihrer Spezifität binden. Das Blocken wird mittels 300 ul eines verdünnten „Blocking Serum“ (ABC-KIT Vectastain BIOZOL, mouse IgG) gemischt mit 10 ml des PBS-Puffer über eine Zeitdauer von 20 Minuten induziert.

4.1.5 Primärantikörper

Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit mit Blocking Serum wird der Primärantikörper BER-EP4 (Dako, Hamburg, Deutschland, monoclonal mouse anti-human, M0804, LOT 00031506) immer in einer spezifischen Verdünnung mit 10 % AB-Serum (DAKO, 48443) verdünnt in PBS-Puffer angesetzt. In Vorversuchen mit Verdünnungsreihen an humanen Kolonmukosaparaffinschnitten wurde eine optimale Primärantikörperkonzentration von 2,7 µg/ml ermittelt. Die Inkubationszeit beträgt genau 30 Minuten.

Positivkontrolle:

Als Positivkontrolle dienten Mikrotomschnitte von humaner Kolonmukosa. Die epithelialen Zellen weisen ein zuverlässig positives Färbeergebnis mit dem monoklonalen anti-epithelialen Antikörper BERE4 auf [76].

Negativkontrolle:

Die Negativkontrolle wird bei jedem Lymphknoten mittels eines unspezifischen isotypgleichen Mausantikörpers (MPOC 21, Sigma, mouse IgG1, kappa, M-9269, LOT 082K44888) durchgeführt. Hier sollte das Gewebe keine Färbung aufweisen, da dieser Antikörper nicht gegen ein spezifisches Antigen gerichtet ist. Diese Schnitte wurden ebenfalls 30 min bei Raumtemperatur in 10%igem AB-Serum verdünnt inkubiert.

Anschließend wurden sowohl die Positivkontrollen sowie die Negativkontrollen fünf min in PBS-Lösung gewaschen.

4.1.6 Sekundärantikörper

Alle Schnitte wurden mit einem biotinyliertem rabbit-anti-mouse Sekundärantikörper in PBS-Puffer für 30 Minuten inkubiert (ABC Kit Vectastain, BIOZOL PK-4002 Burlingame, USA). Dieser Antikörper ist bereits über einen Avidin-Biotin-Komplex mit Peroxidase konjugiert. Nach erneutem Waschen der Schnitte 5 Minuten im PBS-Puffer erfolgte die Zugabe der DAB Chromogenlösung (Dako Cytomation, Glostrup, K3468, LOT 00009199, Dänemark) zur Induktion der Färbereaktion und Visualisierung der Antikörperbindung. Auf jedes Gewebe wurden 300 µl des DAB-Substrats pipettiert und für 10 Minuten inkubiert. Danach hat man die einzelnen Schnitte abtropfen lassen und drei Mal gründlich für 5 Minuten in Leitungswasser ausgewaschen. Schließlich wurden die Schnitte mit einer Gill Hämalaun-Lösung von Mayer (EosinG Certistain, MERCK) für 15 Sekunden gegengefärbt und unter fließendem H₂O₂ mindestens fünfzehn min gespült.

4.1.7 Schnittkonservierung

Alle Objektträger wurden kurz in Aqua dest. gestellt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe je eine Minute eingelegt (70 % Ethanol, 80 % Ethanol und 99 % Ethanol).

Nachdem man die Schnitte hat gut abtropfen lassen, wurden die Racks für jeweils zwei Minuten zwei Mal in einer Xylol-Reihe inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte mittels einer Pinzette aus der Xylol-Lösung entnommen und auf jeden Schnitt wurde ein Tropfen Entellan (MERCK, HX 624397, UN 1866) mit Hilfe einer Plastikpasteurpipette getropft. Ein entsprechendes Deckgläschen wurde luftblasenfrei aufgelegt. Die Schnitte wurden über Nacht luftgetrocknet und konnten anschließend ausgewertet werden.

Die Kryostatschnitte (3-5 µm) wurden wie folgt behandelt:	
Auftauen und Trocknung der Präparate	20 min
Entparaffinieren in Xylol	15 min
Entwässern in absteigender Alkoholreihe	12 min
Spülen der Schnitte in Aqua dest.	5 min
Demaskierung in Retrieval Solution bei 90 Grad	30 min
Abkühlen der Schnitte bei Raumtemperatur	20 min
Rehydrierung der Schnitte in PBS-Lösung	5 min
Spülung in Aqua dest.	
Blockierung der endogenen Peroxidase in 0,3 % H ₂ O ₂ bei Raumtemperatur	
2 x Abspülen mit PBS	
Liquid Blocker	
Schnitte in Feuchtkammer mit Aqua dest. Legen	10 min
Blocking Serum	20 min
Inkubation mit Primär-Antikörper bei Raumtemperatur	30 min
Negativkontrolle mit MOPC 21 bei Raumtemperatur	30 min
Spülung in PBS-Lösung	5 min
Inkubation mit Sekundär-Antikörper (ABC-KIT)	30 min
Waschen in PBS	5 min
DAB-Substrat	10 min
3 x in Leitungswasser ausspülen	15 min
Gegenfärbung (Kernfärbung) mit saurem Hämalaun	15 sec
Abspülen unter fließendem Wasser	15 min
Eintauchen in Aqua dest.	
Aufsteigende Alkoholreihe	2 min
Xylol-Reihe	4 min
Eindeckeln	

Tabelle 8: Schematischer Arbeitsablauf der Färbung

5 Auswertung

5.1 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Schnitte erfolgte an einem Lichtmikroskop bei 200-facher Vergrößerung. Sie wurde durch zwei unabhängige Beobachter durchgeführt, die die Daten unabhängig voneinander erhoben haben. Wurde ein unterschiedliches Ergebnis erzielt, erfolgte eine erneute Untersuchung des Schnittes und es wurde eine Konsensusentscheidung getroffen.

5.2 Immunhistochemische Detektion von BER-EP4 positiven Zellen

Alle Schnitte der Patienten mit papillären Schilddrüsenkarzinomen waren positiv nach immunhistochemischer Färbung mittels BER-EP 4 und alle Isotypen-Kontrollen (MOPC-21) der Proben waren durchweg negativ. Insgesamt wurden 343 Lymphknoten untersucht und immunhistochemisch gefärbt. Bei 5 von 40 Patienten (12,5%) konnten BER-EP4 positive Zellen (Abb. 7) isoliert werden. Die mittlere Zahl der immunhistochemisch aufgearbeiteten Lymphknoten für jeden Patienten betrug 8.

Bei einer Patientin wurden in drei Lymphknotenschnitten BER-EP4 positive Zellen und bei zwei Patienten Cluster von bis zu fünf positiv gefärbten Zellen (Abb. 8) nachgewiesen.

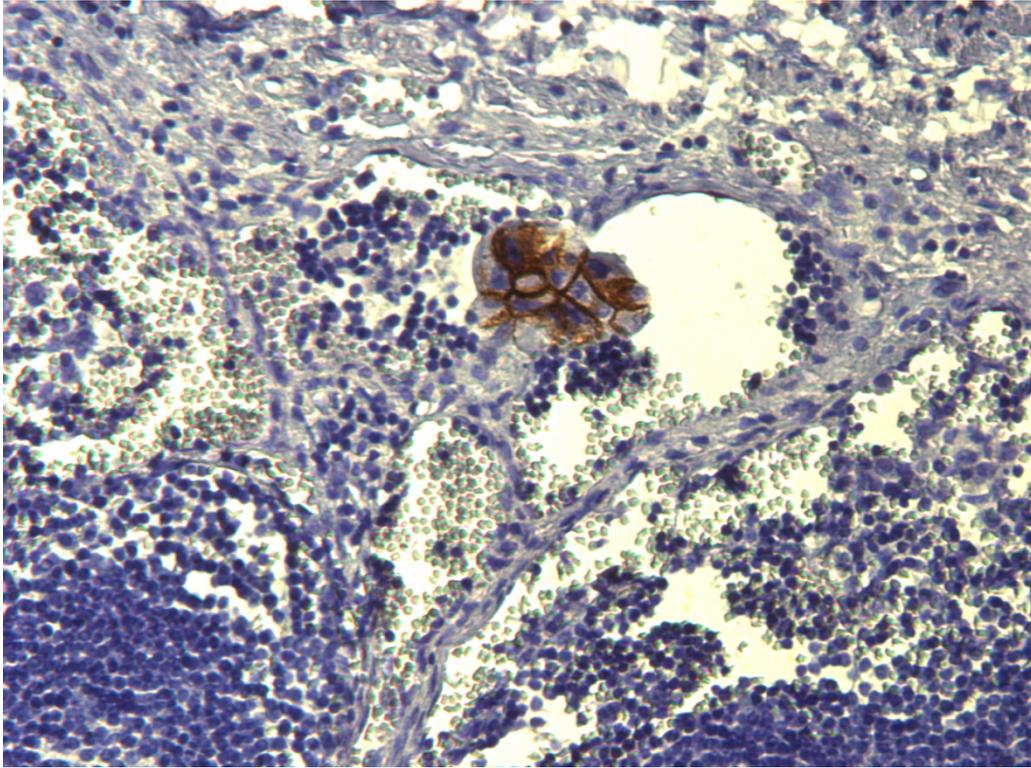


Abb. 8: BER-EP4 positive Zellcluster im Randsinus, Vergrößerung 200x

5.3 Statistische Analyse

Orientierend an früheren Studien [42, 43, 44, 81, 82] spielen klinisch-pathologische Parameter wie das Tumor-Stadium, die Tumorgöße, das Alter, die Lymphadenektomie sowie der Status des Resektionsrandes eine Rolle und erwiesen sich als relevant für die Prognose.

Zudem untersuchten wir die prognostische Bedeutung der immunhistochemisch nachgewiesenen BER-EP4 positiven Zellen in den resezierten zervikalen Lymphknoten. Auch die erfolgte Behandlung sowie das Behandlungsausmaß der zervikalen Lymphadenektomie sowie die Verwendung von Radiojodtherapie waren als prognostisch relevant beschrieben worden.

Alle in die Auswertung eingeflossenen Parameter aus dem Patientenkollektiv wurden anonymisiert erfasst. Die klinisch-pathologischen Parameter wie das T-Stadium, der Tumordurchmesser, das R-Stadium und Alter wurden dabei berücksichtigt.

Um die Korrelation zwischen den klinisch-pathologischen Daten in Zusammenhang mit dem Nachweis von papillären Schilddrüsen-Karzinomen aufzuzeigen, verwendeten wir den Fishers-Test sowie den Chi-Quadrat-Test.

Die Analyse der Follow-up-Daten erfolgte mit Hilfe der Kaplan-Meier-log (Kaplan EL, 1958, Abb. 9), womit die Sterbetafel-Kurven berechnet und die Methode sowie die Überlebensverteilungen mit dem Log-Rank-Test verglichen werden.

$$\hat{S}(t) = \prod_{t_{(i)} \leq t} \frac{n_i - d_i}{n_i} = \prod_{t_{(i)} \leq t} \left(1 - \frac{d_i}{n_i} \right)$$

Abb. 9: Definition der Kaplan-Meier Statistik (Paul Meier in der New York Times)

Die primären Endpunkte waren das krankheitsspezifische Überleben, Todesfälle oder ein Tumorrezidiv.

Herausgefiltert wurden alle Patientendaten, welche am Ende des Beobachtungszeitraums überlebt haben und/oder kein Tumorrezidiv aufwiesen.

Die statistische Datenanalyse wurde mit SPSS [84] durchgeführt.

6 Ergebnisse

Insgesamt wurden 343 Lymphknoten immunhistochemisch analysiert. Hierbei fanden sich bei 12,5% der Patienten minimale Tumorresiduen. Das Durchschnittsalter in unserem Patientenkollektiv betrug 45 Jahre (Zeitraumen von 12 bis 72 Jahre).

Die meisten Patienten wurden in einem frühen Tumorstadium diagnostiziert. 70% der Patienten wiesen ein Tumorstadium von pT1 oder pT2 auf, während 30% der Patienten ein lokal fortgeschrittenes Stadium zeigten, Stadium pT3 oder pT4. Es konnten in der herkömmlichen histopathologischen Untersuchung mittels einer HE-Färbung bei keinem der Patienten Lymphknotenmetastasen detektiert werden (pN0).

Der Durchmesser des Primärtumors von 10 mm oder weniger lag bei 15 Patienten (37,5%) vor, ein Durchmesser über 10 mm bis zu 25 mm war bei 17 Patienten (42,5%) anzufinden und größer als 25 mm bei 8 Patienten (20%) (Tabelle 9).

Die statistische Auswertung der klinisch- pathologischen Risikoparameter zeigte, dass weder der Tumordurchmesser, das Patientenalter noch der Nachweis BER-Ep 4 positiver Zellen einen signifikanten Einfluss auf die onkologische Prognose der Patienten hatten.

Auch behandlungsspezifische Charakteristika wie das Ausmaß der Lymphadenektomie oder die Durchführung einer Radio-Jod-Therapie hatten keinerlei signifikanten Einfluss auf den weiteren Krankheitsverlauf. Lediglich das primäre Tumorstadium pT 1-2 vs. pT 3-4 ließ einen statistischen Trend hin zu einem verkürzten Gesamtüberleben bei lokal fortgeschrittenem Tumor erkennen (Tabelle 10).

Parameter	Gesamtüberleben (Monate)	p*
T-Stage		
pT1-2	126,00	
pT3-4	108,33	0.080
Tumordurchmesser		
≤ 10 mm	126,00	
11 – 25 mm	114,93	
>25 mm	107,00	0.218
Alter		
≤ 45 Jahre	111,75	
> 45 Jahre	126,00	0.202
Radiojodtherapie		
erhalten	108,97	
nicht erhalten	126,00	0.735
Ausmaß der Lymphadenektomie		
Limitierte zentrale Lymphadenektomie	126,00	
Standard zentrale Lymphadenektomie	114,90	
Modifizierte unilaterale Lymphadenektomie	107,00	
Modifizierte bilaterale Lymphadenektomie	126,00	0.697
Nachweis Ber EP4+ Zellen		
Positiv	126,00	
Negativ	112,88	0.701

Tabelle 9: Zusammenstellung der Merkmale bezogen auf das Gesamtüberleben

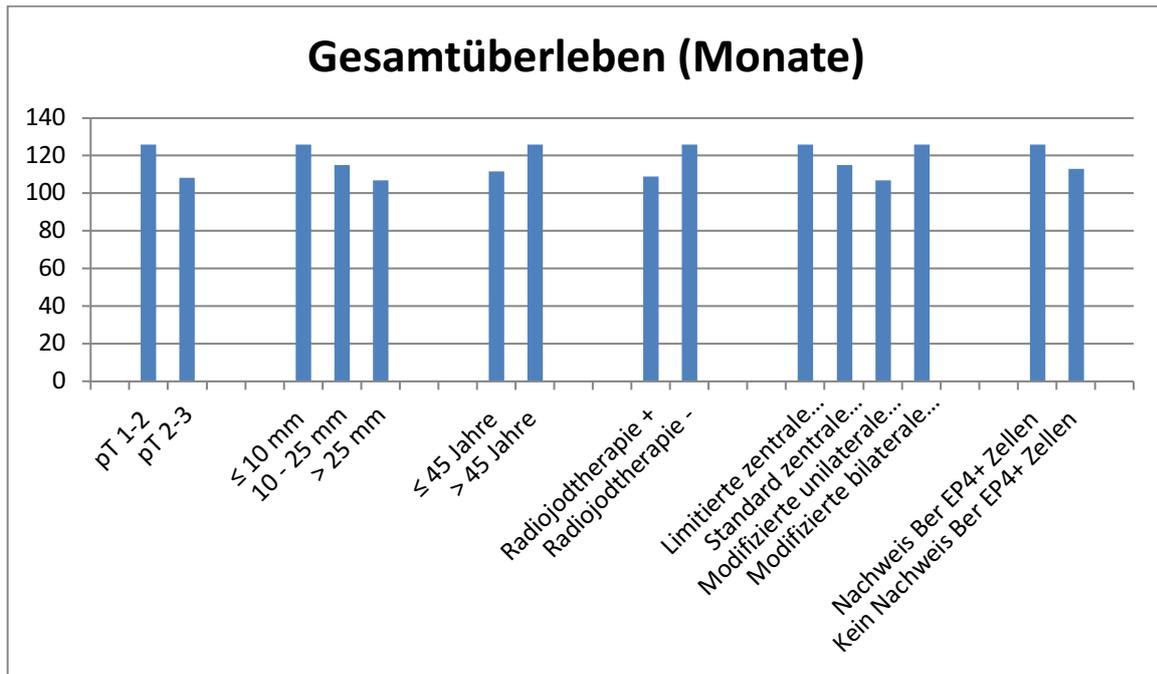


Tabelle 10: Zusammenstellung der Merkmale bezogen auf das Gesamtüberleben

Die Auswertung der Daten legte keine signifikante Korrelation bezogen auf die klinischen Parameter und die prognostischen Daten dar. Ausgeschossen davon ist bekanntermaßen der Status des Resektionsrandes.

Alle Erkrankten und Operierten erhielten postoperativ eine Radiojodbehandlung. Lediglich der am Tumorrezidiv verstorbenen Patienten legen eine Korrelation nah. Diese wiesen in der mikroskopischen Analyse tumorpositive Resektionsränder auf.

In der statistischen Analyse konnte keine Korrelation zwischen der BER-EP4 positiven Zellen in den untersuchten Lymphknoten und den zugezogenen klinisch-pathologischen Parametern wie dem T-Stadium (Abb. 11), Tumordurchmesser (Abb. 12), R-Stadium (Abb. 13) und Alter (Abb. 14) festgestellt werden (Abb. 10).

Überraschenderweise fand man den größten Anteil an mikrometastatisch BER-EP4 positiven Zellen bei Patienten mit Mikrometastasen bei papillären Schilddrüsenkarzinomen, welche kleiner als 10 mm im Durchmesser maßen.

Im Gegensatz dazu wurden bei keinem der Patienten mit einem Stadium pT3 oder pT4 mikrometastatische Zellen in den resezierten, zervikalen Lymphknoten gefunden.

	Patienten (%)	Ber EP4 + cells	no Ber EP4 + cells	p-value*
Tumorstadium				
T1-2	28 (70)	5	23	
T3-4	12 (30)	0	12	0.118
Tumordiameter				
≤ 10 mm	15 (37,5)	3	12	
> 10 mm bis ≤ 25 mm	17 (42,5)	1	16	
> 25 mm	8 (20)	1	7	0.484
R-Stadium				
R0	33 (82,5)	5	28	
R1	7 (17,5)	0	7	0.271
Alter				
≤ 45 Jahre	20 (50)	2	18	
> 45 Jahre	20 (50)	3	17	0.633

* Chi-Quadrat

Tabelle 11: Zusammenstellung der Ergebnisse

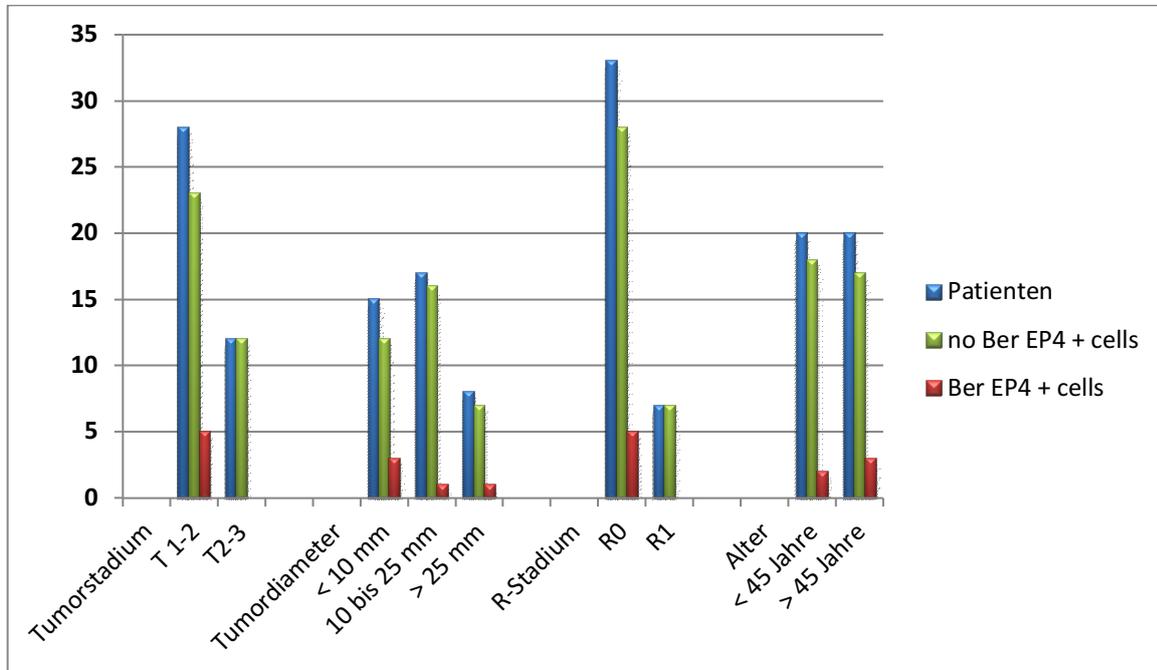


Abb. 10: Ergebnisse als Diagramm

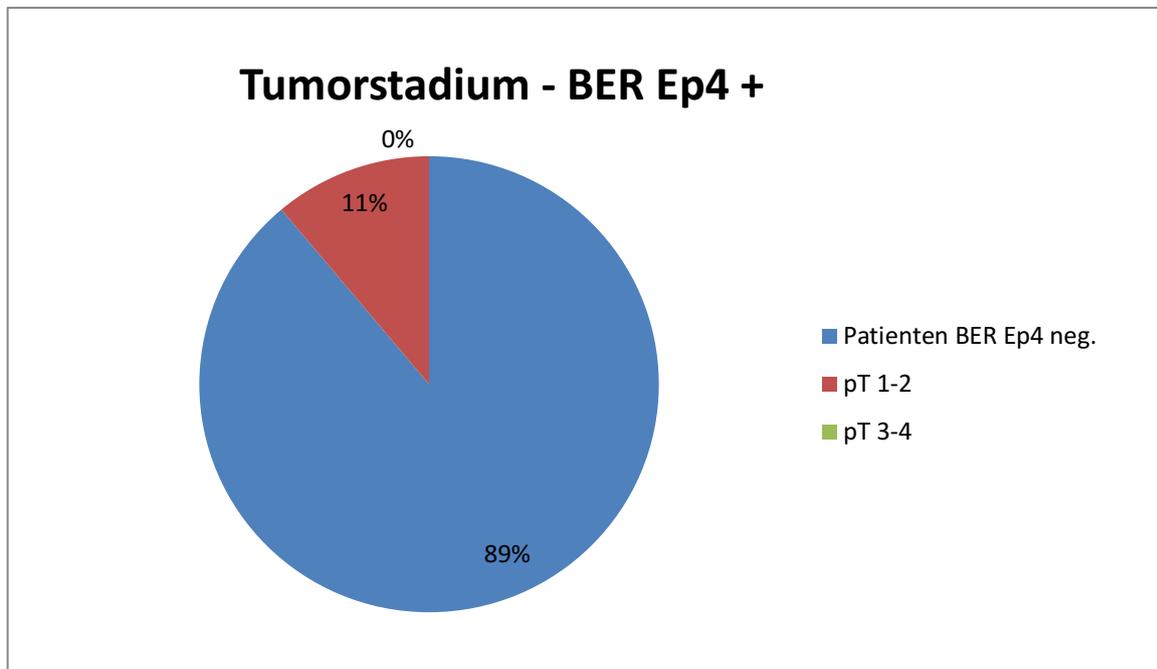


Abb. 11: BER-Ep 4 pos. Zellen und das Tumorstadium

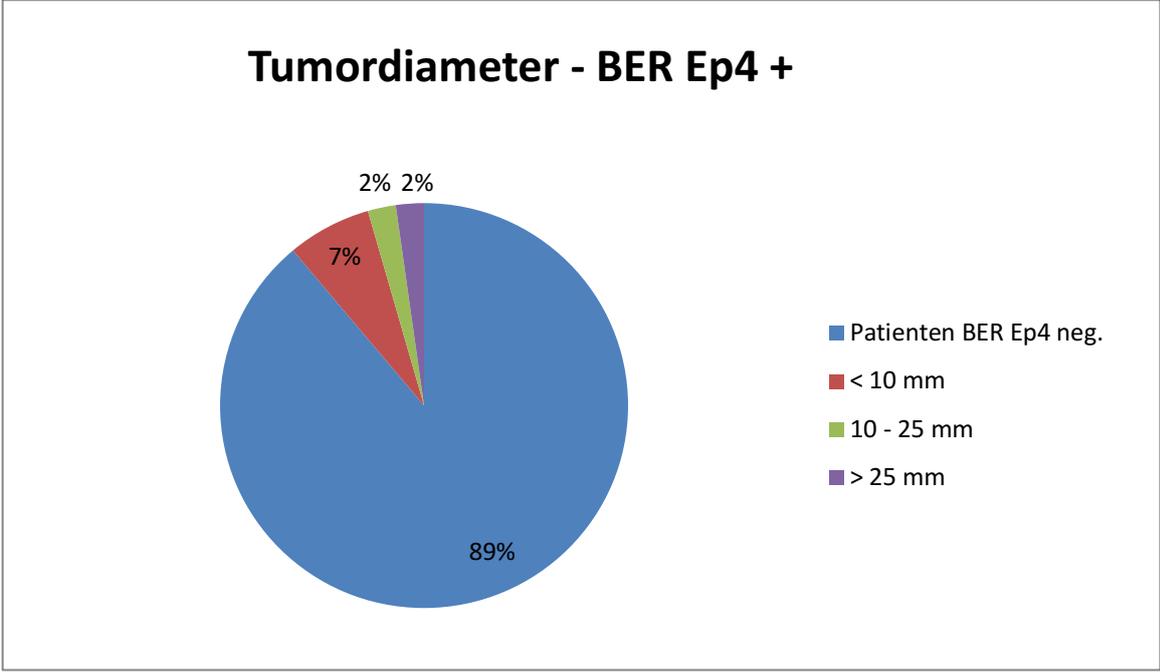


Abb. 12: BER-Ep 4 pos. Zellen bezogen auf den Tumordiameter

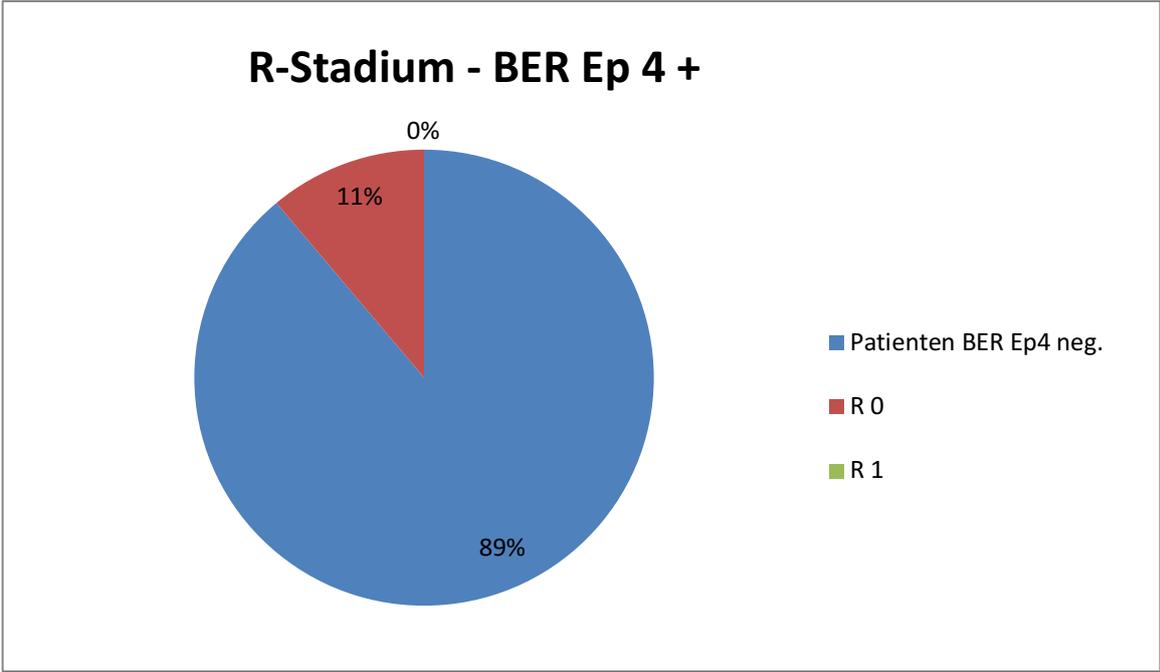


Abb. 13: BER-Ep 4 pos. Zellen bezogen auf das R-Stadium

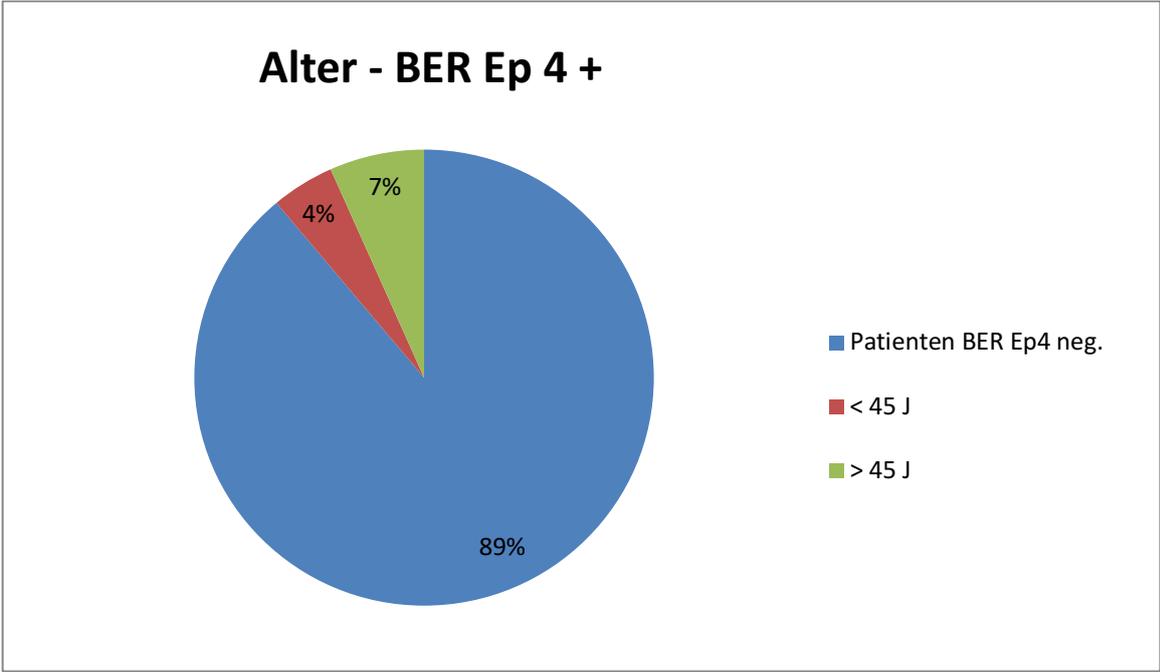


Abb. 14: BER-Ep 4 pos. Zellen bezogen auf das Alter

7 Follow-up

Es wurde eine Follow-up-Analyse mit einer mittleren Beobachtungszeit von 72 Monaten bei 95% der Patienten durchgeführt, wobei die Zeitspanne von 24 bis 126 Monaten reichte.

Eine Metastasierung wurde in 7 von 39 Patienten (7,7%) beobachtet: Ein lokoregionäres Rezidiv trat bei zwei Patienten auf (5,1%) und ein Patient entwickelte Fernmetastasen (2,6%).

Innerhalb des Beobachtungszeitraums starben zwei Patienten aufgrund eines Tumorrezidivs bei bekanntem papillärem Schilddrüsenkarzinom und ein Patient verstarb ohne einen Bezug auf das klinisch bekannte papilläre Schilddrüsenkarzinom. Die errechnete 5-Jahres-Überlebensrate betrug somit 97,5% (Abb. 15).

Bezogen auf die Prognose der immunhistochemisch detektierten, minimalen Tumorresiduen fand sich weder eine Folge auf die Rezidivfreiheit noch auf das Gesamtüberleben. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Detektion BER-EP4 positiver Zellen nicht mit den Risikoparametern (T-Stage, R-Stage, Tumor-Durchmesser, Alter) korreliert und somit war der Unterschied statistisch nicht signifikant.

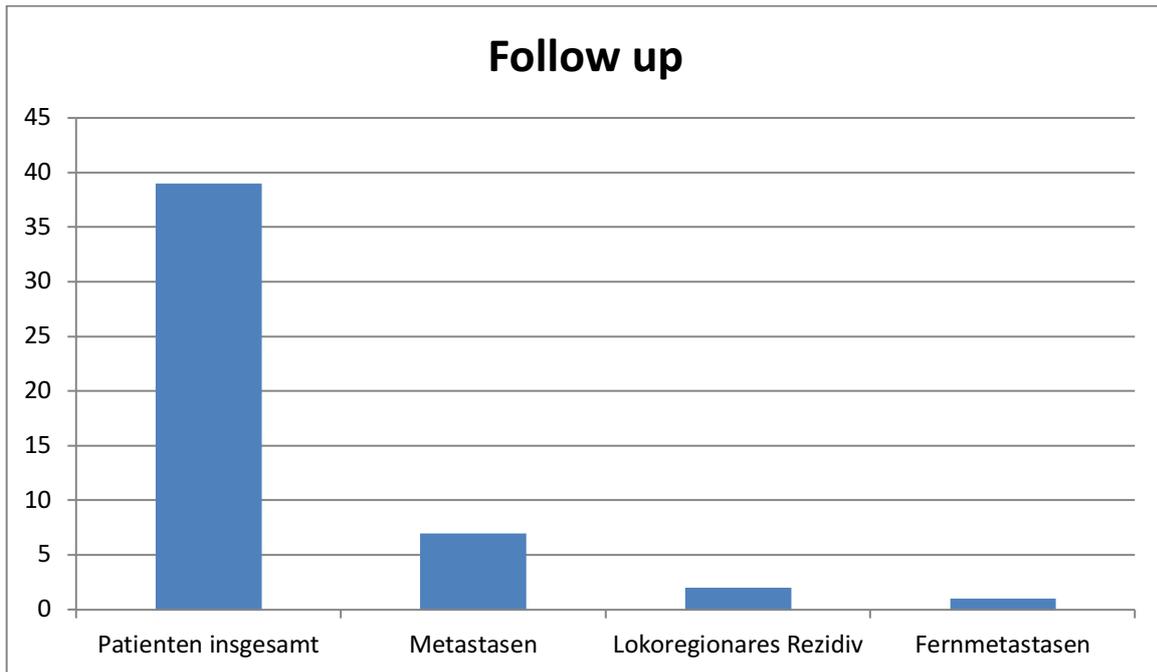


Abb. 15: Follow up

8 Diskussion

Das papilläre Schilddrüsenkarzinom weist bevorzugt eine lymphogene Metastasierung auf. Dementsprechend besteht die primäre Therapie nicht nur aus einer radikalen Thyreoidektomie, sondern auch aus einer radikalen Dissektion der lokoregionären Lymphknoten [44, 42]. Allerdings ist eine radikale Lymphadenektomie bekannterweise mit einer nicht unerheblichen Morbidität assoziiert. Im Vordergrund stehen hier die Rezidivrezidiv sowie der Hypoparathyreoidismus, die in bis zu 4% bzw. 5% beschrieben werden [164] (Abb. 16). Da bislang der Vorteil einer prophylaktischen Lymphadenektomie nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte [165,166] wird der Stellenwert der Lymphadenektomie bei fehlendem Nachweis von Lymphknoten-Filialen in der präoperativen Bildgebung kontrovers diskutiert [49, 52].

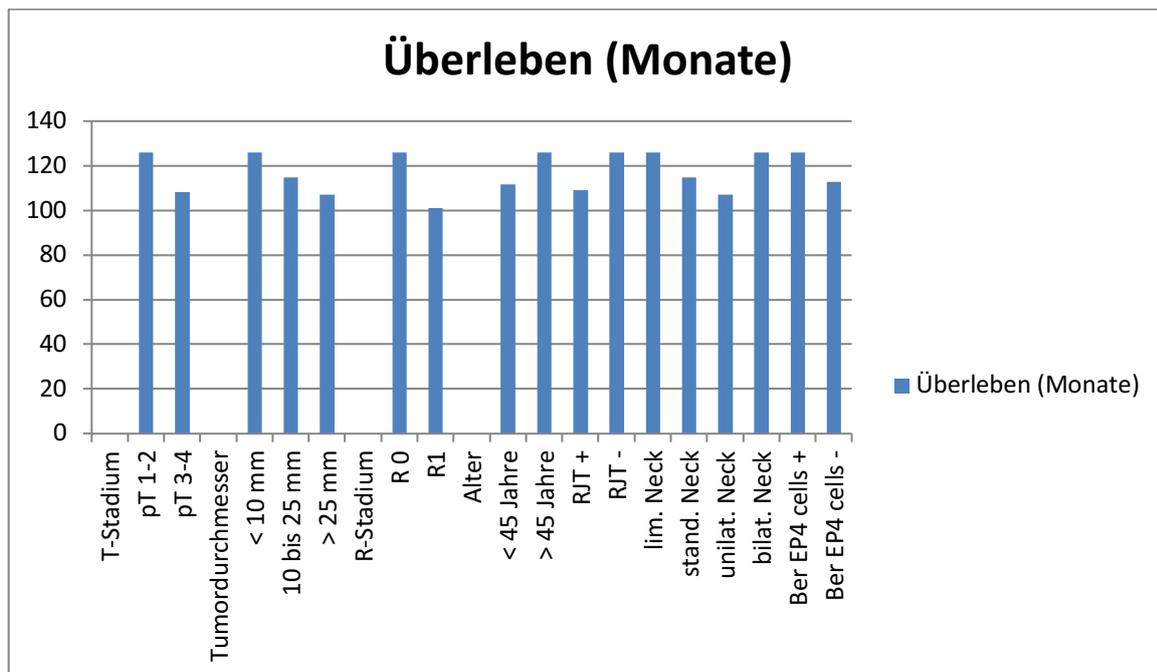


Abb. 16: Überleben

Bei in der Hälfte der Patienten ohne malignitätssuspekte Lymphknoten in der histopathologischen Aufarbeitung der prophylaktisch entnommenen Lymphknoten wurden mikroskopische Tumoranteile identifiziert [51]. Deren prognostische Relevanz ist jedoch bislang nicht eindeutig erwiesen [44, 50, 42].

Die Identifizierung befallener cervicaler Lymphknoten ist in der histopathologischen Aufarbeitung jedoch ein integraler Bestandteil des Tumorstaging, auf dessen Grundlage dann ggf. die Indikation zu weiteren adjuvanten Therapiemaßnahmen gestellt werden [49].

Ähnlich wie die prophylaktische Lymphadenektomie wird auch die Indikation zur adjuvanten Radiojod-Therapie bei nodal negativen Patienten kontrovers diskutiert [57]. Erschwert wird die Diskussion dadurch, dass im Gegensatz zu anderen Karzinomentitäten [12-14], beim papillären Schilddrüsenkarzinom bislang keine Daten zum Nachweis disseminierter Tumorzellen publiziert wurden.

Analog zum immunhistochemischen Nachweis okkult disseminierter Tumorzellen bei Karzinomen des Gastrointestinaltraktes [76] wurde in Präperaten der resezierten Lymphknoten, welche in der konventionell histopathologischen Untersuchung einen negativen Befund hinsichtlich des Befalls als negativ beschrieben wurden, einer verfeinerten immunhistochemischen Untersuchung unterzogen. Hierbei gelang es, disseminierte okkulte Tumorzellen bei Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom mikroskopisch nachzuweisen. Lediglich einer japanischen Arbeitsgruppe gelang ebenfalls der Nachweis malignitätssuspekter Tumorzellen bei 53% der untersuchten Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom [167]. In dieser Studie wurden aber keine postoperativen Überlebensdaten erhoben, so dass eine Aussage zur prognostischen Relevanz nicht möglich war.

Da diese Untersuchung die bislang einzige ist, die die prognostische Relevanz okkult disseminierter Tumorzellen bei nodal negativen Patienten zum Gegenstand hat, stehen keine Vergleichsmöglichkeiten zu anderen Studien zur Verfügung. Sicher ist es erforderlich diese Ergebnisse, die an einem relativ überschaubaren Patientenkollektiv erhoben wurden, in einem größeren Rahmen zu verifizieren.

In dem hier immunhistochemisch untersuchten Kollektiv an ausschließlich nodal negativen Patienten konnten bei 12,5% epiteliäre tumorsuspekte Zellen in den Lymphknoten nachgewiesen werden. Die Korrelation dieser Ergebnisse mit klinisch-pathologischen Risikoparametern wie T-Stadium, Tumordurchmesser, R-Stadium oder Alter ergab allerdings keine signifikanten Zusammenhänge. Anders als erwartet waren okkulte Tumorzellen vornehmlich bei kleinen Primärtumoren bzw. bei Mikrokarzinomen unter einem 10 mm Durchmesser detektierbar. Tatsächlich konnte anhand vieler Studien in der Vergangenheit aufgezeigt werden, dass papilläre Mikrokarzinome, welche eine Größe ≤ 10 mm aufweisen, eine sehr gute Prognose haben [118-120].

Entsprechend werden weitergehende Maßnahmen, wie eine totale Thyreoidektomie oder eine Lymphadenektomie vielfach für nicht erforderlich gehalten [121- 124], [132, 133]. Im Regelfall wird auf eine Radiojodtherapie ebenfalls verzichtet [125- 128].

In dem hier untersuchten Kollektiv wurde bei 36 von 40 Patienten (90%) eine adjuvante RadioJod-Therapie durchgeführt. Somit erhielt auch der weitaus überwiegende Teil der Patienten mit Mikrokarzinomen eine RadioJod-Therapie. Vor dem Hintergrund des vermehrten Nachweises dissemierter Tumorzellen bei Mikrokarzinomen erscheint dieser Therapieansatz somit als gerechtfertigt.

Andererseits können diese Ergebnisse auch dahingehend interpretiert werden, dass die nachgewiesenen Zellen tatsächlich die Langzeitprognose nicht beeinflussen und der Stellenwert der Lymphadenektomie vor diesem Hintergrund eher als gering anzusehen ist. Die Lokalrezidivrate, die in dem hier untersuchten Patientenkollektiv festgestellt wurde spricht aber dafür, dass residuelle okkulte Tumorzellen zurückgeblieben sind, die im Verlauf proliferiert und ein Rezidiv verursacht haben.

Der fehlende Nachweis des prognostischen Einflusses von disseminierten Tumoreinzellzellen kann sowohl auf die niedrige Patientenzahl als auch auf den Effekt der RadioJod-Therapie zurückgeführt werden.

Aussagekräftig wäre theoretisch eine prospektive randomisierte Studie, bei der eine Gruppe eine Radiojodtherapie erhält, während bei der anderen Gruppe keine adjuvante Therapie durchgeführt wird. Bei beiden Patientenkollektiven könnte dann der Einfluss immunhistochemisch nachgewiesener Tumorzellen auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben postoperativ untersucht werden. Allerdings ist die Durchführung eines entsprechenden Forschungsvorhabens in der konkreten Umsetzung schwierig, da die erforderlichen Fallzahlen am ehesten ein multizentrisches Studiendesign erfordern. Hinzu kommen die posttherapeutischen Nachsorgezeiträume, die aufgrund der günstigen Prognose entsprechend lange Beobachtungszeiträume notwendig machen.

Bezogen auf die Langzeitprognose konnte bei einem mittleren Nachbeobachtungszeitraum unserer Patienten von 72 Monaten (24-126 Monate) kein prognostischer Einfluss der immunhistochemisch nachgewiesenen Zellen nachgewiesen werden. Die Frage dabei ist, ob dies auf einen Effekt der durchgeführten RadioJod-Therapie zurückzuführen ist, oder ob diese Beobachtung die Notwendigkeit adjuvanter Therapiemaßnahmen bei nodal negativen Patienten mit Mikrokarzinomen in Frage stellt.

Die hier zugrunde liegende Studie zielte auf eine Untersuchung der prognostischen Relevanz der nodalen Mikrodissemination beim pN0 negativen Patienten mit einem papillären Schilddrüsenkarzinom ab.

Resumierend zeigte die durchgeführte Studie, dass die betroffenen Patienten mit einem vermeintlich vollständig auf das Organ begrenzten Primarius eine minimale, nodale Dissemination immunhistochemisch nachweisbar sein kann. Hiermit ist erstmalig an einem größeren Patientenkollektiv eine minimale, nodale Dissemination immunhistochemisch nachweisbarer Tumoreinzellen dokumentiert. Jedoch sollte die prognostische Relevanz der detektierten Tumorresiduen in größeren Studien weiter überprüft werden.

9 Literaturverzeichnis

- [1] Hedinger Ch, Williams ED, Sobin LH. The WHO histological classification of thyroid tumors: A commentary on the second Edition. *Cancer* 1989; 63: 908- 911.
- [2] Mazzaferri E, Jhian S. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1994; 97: 418- 428.
- [3] Mazzaferri E. Long-term-outcome of patients with differentiated thyroid carcinoma: effect of therapy. *Endocr Pract* 2000; 6: 469- 76.
- [4] Galanti MR, Sparen P, Karlsson A, Grimelius L, Ekblom A. Is residence in areas of endemic goiter a risk factor for thyroid cancer? *Int J Cancer* 1995; 61: 615-621.
- [5] Schelhout LJD, Creutzberg CL, Hamming JF, Fleuren GJ, Smeenk D, Hermanns J, Van de Velde CJH. Multivariate analysis of survival in differentiated thyroid cancer: The Prognostic significance of the age factor. *Eur J Cancer Clin Onco* 1988; 24: 331- 337.
- [6] Hay ID. Papillary thyroid carcinoma. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1990; 19: 545- 576.
- [7] Woolner LB. Thyroid carcinoma: Pathological classification with data on prognosis *Semin Nucl Med* 1971; 1: 481- 502.
- [8] Beahrs OH, American Joint Committee on Cancer. Manual for Staging of cancer. 4th.ed. Philadelphia: JB Lipincott, 1992: 53- 56.
- [9] TNM Klassifikation maligner Tumoren. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 2009. 55- 60.
- [10] Hay ID. Papillary thyroid carcinoma. *Endocrinol Metab.* 1990; 19: 545- 576.
- [11] Schelfout LJD, Creutzberg CL, Hamming JF, Fleuren GJ, Smeenk D, Hermanns J, Van de Velde CJH. Multivariate analysis of survival in differentiated thyroid cancer: The Prognostic significance of the age factor. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1988; 24: 331- 337.
- [12] Mazzaferri E, Jhian S. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1994; 97: 418- 428.
- [13] Tenvall J, Björklund A, Möller T, Ranstam J, Akerman M. Is the EORTC prognostic index of thyroid cancer valid in differentiated thyroid carcinoma? *Cancer* 1986; 57: 1405- 1414.
- [14] Byar DP, Green SB, Dor P, Williams ED, Colon J, van Gilse HA, Mayer M, Sylvester RJ, van Glabbeke M. A prognostic Index for the Thyoid Carcinoma. *Eur J Cancer* 1979; 15: 1033- 41.
- [15] Hay ID, Bergstrahl EJ, Goellner, JR. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779

patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery* 1989; 114: 1050- 1058.

[16] Parkin DM, Muir CS, Whelan SL. Cancer incidence in five continents. Lyon, France: IARC Sci Publ. 1992; (12): 45- 173.

[17] Reinwein D, Benker G, Windeck R, Eigler FW, Leder L-D, Mlynek ML, Creutzig H, Reiners C. Erstsymptome bei Schilddrüsenmalignomen: Einfluß von Alter und Geschlecht in einem Jodmangelgebiet. Erfahrungen an 1116 Patienten. *Dtsch Med Wschr* 1989; 114: 775- 782.

[18] Grant CS, Hay ID, Gough IR, Bergstrahl EJ, Goellner JR, McConahey WM. Local recurrence in papillary thyroid carcinoma: Is extent of surgical resection important? *Surgery* 1988; 104: 954- 962.

[19] E. Moser, A. Barke, W. Digel, N. Freudenberg, J. Räddecke, M. Reinke: Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge -Schilddrüsenkarzinom, 3. Auflage, 2002; Herausgeber: Tumorzentrum Freiburg, Hugstetter Str. 55, 79106 Freiburg.

[20] McHenry Dh R, Rosen LB, Walfish PJ. Prospective management of nodal metastases in differentiated thyroid cancer. *Am J Surg* 1999; 162: 353- 356.

[21] Witte J, Goretzki PE, Röher HD. Chirurgie der differenzierteren Schilddrüsenkarzinome. *Onkologe* 1997; 3: 22- 27.

[22] Röher HD, Simin D, Goretzki PE. Leitlinien onkologische Chirurgie – Maligne Schilddrüsentumoren. *Langenbecks Arch Chir* 1997 Suppl II; 142- 151.

[23] Röher HD, Simon D, Witte J, Goretzki PE. Principals of limited or radical surgery for differentiated Thyroid cancer. *Thyroidol Clin Exp* 1993; 5: 93- 96.

[24] Singer PA, Cooper DS. Treatment guidelines for patients with thyroid nodules and well-differentiated thyroid cancer. *Arch Intern Med* 1996; 156: 2165- 2172.

[25] Georgi P, Emrich D, Heidenreich P, Moser E, Reiners C, Schicha H. Radiojodtherapie des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin 1999; 38: 221- 223.

[26] Samaan NA, Schultz PN, Hickey RC, Goepfert H, Haynie ThP, Johnston DA, Ordonez NG. The result of various modalities of treatment of well differentiated thyroid carcinoma: A retrospective review of 1599 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 714- 720.

[27] Farahati J, Reiners C, Stüben M, Müller SP, Stüben G, Sauerwein W, Sack H. Differentiated thyroid cancer. Impact of adjuvant external radiotherapy in patients with perithyroidal tumor infiltration. *Cancer* 1996; 77: 172- 180.

[28] Witte J, Dieken J, Papathanassiou D, Röher HD. Bedeutung der Lymphknoten- und Fernmetastasen für das Ausmaß der chirurgischen Therapie von papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinomen. *Visceralchirurgie* 2002; 37: 404- 409.

- [29] Dean DS, Hay ID. Prognostic indicators in differentiated thyroid carcinoma. Division of Endocrinology and Internal Medicine, Mayo Clinic, Rochester, USA. *Cancer Control* 2000; 7: 229- 39.
- [30] DeGroot LJ, Kaplan EL, McCormick M, Straus FH. Natural history, treatment and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 414- 424.
- [31] Hay ID, Grant CS, Taylor WF. Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: A retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. *Surgery* 1987; 102: 1088- 1095.
- [32] McConahey WM, Hay ID, Woolner LB, van Heerden JA, Taylor WF. Papillary thyroid cancer treated at the Mayo clinic, 1946 through 1970: initial manifestation, pathologic findings, therapy and outcome. *Mayo Clin Proc* 1986; 61: 978- 996.
- [33] Halnan KE. Influence of age and sex on incidence and prognosis of thyroid cancer. 344 cases followed for 10 years. *Cancer* 1966; 19 (11): 1534- 6.
- [34] Chen H, Udelsmann R. Papillary thyroid carcinoma: justification for total thyroidectomy and management of lymph node metastases. *Surg Oncol Clin N Am.* 1998; 7(4): 645- 63.
- [35] Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP, Mazzaferi E, McKee RF, Rosai J. Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the united states during 1996. U.S. and German Thyroid Cancer Study Group. An American College of Surgeons Commission on Cancer Patient Care Evaluation study. *Cancer* 2000; 89(1): 202- 17.
- [36] Pasiaka JL, Zedenius J, Auer G. Addition of nuclear DANN content to the AMES risk-group classification for papillary thyroid cancer. *Surgery* 1992; 112: 1154- 1160.
- [37] DeGroot LT, Kaplan EL, Shukla MS, Salti G, Straus FH. Morbidity and Mortality in Follicular Thyroid Cancer *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2946- 2953.
- [38] Baloch ZW, LiVolsi VA. Follicular-patterned lesions of the thyroid: The bane of the pathologist. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 143- 50.
- [39] Gerard M D. Thyroid and parathyroid. *Oncology* 2006; 992- 1013.
- [40] Zimmermann D, Hay ID, Gough IR, Goellner Jr, Ryan JJ, Grant CS, McConahay WM. Papillary thyroid carcinoma in children and adults: Long-term follow-up of 1039 patients conservatively treated at one institution during three decades. 1988; *Surgery* 104: 1157- 1166.
- [41] Manoj S Gandhi, James R Stringer, Marina N Nikiforova¹, Mario Medvedovic, Yuri E Nikiforov. Gene position within chromosome territories correlates with their involvement in distinct rearrangement types in thyroid cancer cells. 2008; 48 (3): 222- 8.
- [42] Yasuhiro I, Takuya Higashiyama, Yuuki Takamura, Akihiro Miya, Kaoru Kobayashi, Fumio Matsuzuka, Kanji Kuma, Akira Miyauchi. Risk factors for recurrence to the lymph node in papillary thyroid carcinoma patients without preoperatively detectable lateral node

metastasis: Validity of prophylactic modified radical neck dissection. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; Vol.51 No.5.

[43] Nobuyuki Wada, Quan-Yang Duh, Kiminori Sugino, Hiroyuki Iwasaki, Kaori Kameyama, Takashi Mimura, Koichi Ito, Hiroshi Takami and Yoshinori Takanashi. Lymph node metastasis from 259 papillary thyroid microcarcinomas frequency, pattern of occurrence and recurrence, and optimal strategy for neck dissection. *Ann Surg* 2000; 237 (3): 399- 407.

[44] Yuuki Takamura, Akihiro Miya, Kaoru Kobayashi, Tamotsu Yokozawa, Fumio Matsuzuka, Seiji Kuma, Kanji Kuma, and Akira Miyauchi. An observation trial without surgical treatment in patients with papillary microcarcinoma of the thyroid. *Thyroid* 2003, 13(4): 381- 387.

[45] Leslie J. Degroot, Kaplan E, McCormick, Strauss F. Natural History, Treatment, and Course of Papillary Thyroid Carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1990; 414- 424.

[46] Rebecca M Reynolds, Jennifer Weir, Diane L Stockton, David H Brewster. Changing trends in incidence and mortality of thyroid cancer in Scotland. *Clin Endocrinol* 2005; 62 (2): 156- 62.

[47] Shiro Noguchi, Nobuo Murakami, Hiroto Yamashita. Papillary thyroid carcinoma: Modified radical neck dissection improves prognosis. *Arch Surg* 1998; 133(3): 276- 280.

[48] Isaac M. Cranshaw. Micrometastases in thyroid cancer. An important finding? *Surgical Oncology* 2008; 253- 258.

[49] David S Cooper, Gerard M Doherty, Bryan R Haugen, Richard T Kloos, Stephanie L Lee, Susan J Mandel, Ernest L Mazzaferri, Bryan McIver, Furio Pacini, Martin Schlumberger, Steven I Sherman, David L Steward, R Michael Tuttle. Revised american thyroid association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009; 19 (11): 1167- 214.

[50] Catharina Ihre Lundgren, Per Hall, Paul W Dickman, Jan Zedenius. Clinically significant prognostic factors for differentiated thyroid carcinoma: A population-based, nested case–control study. *Cancer*. 2006;106 (3): 524- 31.

[51] Nobuyuki Wada. Lymph Node Metastasis From 259 papillary thyroid microcarcinomas frequency, pattern of occurrence and recurrence, and optimal strategy for neck dissection. *Ann Surg* 2003; 237(3): 399- 407.

[52] Francoise Borson-Chazot. Predictive factors for recurrence from a series of 74 children and adolescents with differentiated thyroid cancer. *World Journal of Surgery* 2004; 1088- 1092.

[53] Xiao Hong Liu, George G. Chen, Alexander C. Vlantis & C. Andrew van Hasselt. Iodine mediated mechanisms and thyroid carcinoma. *Clin Lab Science* 2009; 302- 318.

[54] Yasuhiro Ito, Nobuyuki Amino, Akira Miyauchi. Thyroid ultrasonography. *World Journal of Surgery* 2010; 1171- 1180.

- [55] Kanji Kasagi. Epidemiology of thyroid tumors: effect of environmental iodine intake. *Nippon Rinsho*. 2007; 65 (11): 1953- 8.
- [56] Zeming Liu, Longqiang Wang, Pengfei Yi, Cong-Yi Wang, Tao Huang. Risk factors for central lymph node metastasis of patients with papillary thyroid microcarcinoma: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(3): 932- 937.
- [57] Luster M, Clarke S E, Dietlein M, Lassmann M, Lind P, Oyen W, Tennvall J, Bombardieri E. Guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2008; 1941- 1959.
- [58] Tracy G. Lugo, Stephan Braun, Richard J. Cote, Klaus Pantel, Valerie Rusch. Detection and measurement of occult disease for the prognosis of solid tumors. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 2609- 2615.
- [59] Lorette C. Javois. Immunocytochemical methods and protocols, methods in molecular biology. Part of the *Methods in Molecular Biology* book series 1995; 175- 184.
- [60] Latza U, Niedobitek G, Schwarting R, Nekarda H, Stein H. Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelial. *J Clin Pathol* 1990; 43: 213- 219.
- [61] Gaffey MJ, Mills SE, Swanson PE, Zarbo RJ, Shah AR, Wick MR. Immunoreactivity for BER-EP4 in adenocarcinomas, adenomatoid tumors, and malignant mesotheliomas. *Am J Surg Pathol* 1992; 16:593- 599.
- [62] Maguire B, Whitaker D. Monoclonal antibody Ber-EP4: its use in the differential diagnosis of malignant mesothelioma and carcinoma in cell blocks of malignant effusions and FNA specimens. *Diagn Cytopathol* 2004; 10 (2): 130- 4.
- [63] Kuenen-Boumeester V, Loenen P. Quality control of immunocytochemical staining of effusions using a standardized method of cell processing. *Acta Cytol* 1996; 40 (3): 475- 9.
- [64] Ordonez NG. Value of the Ber-EP4 antibody in differentiating epithelial pleural mesothelioma from adenocarcinoma. The M.D. Anderson experience and a critical review of the literature. *Am J Clin Pathol* 1998; 109 (1): 85- 9.
- [65] Latza U, Niedobitek G, Schwarting R, Nekarda H, Stein H. Ber-EP4: New monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelia. *J Clin Pathol* 1990; 43: 213- 219.
- [66] Sheiban K, Shin SS, Kezirian J, Weiss LM. Ber-EP4 antibody as a discriminant in the differential diagnosis of malignant mesothelioma versus adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 779- 784.
- [67] Beer TW, Shephard P, Theaker JM. Ber-EP4 and epithelial membrane antigen aid distinction of basal cell, squamous cell and basosquamous carcinomas of the skin. *Histopathology* 2000; 37: 218- 223.
- [68] Kist D, Perkins W, Christ S, Zachary CB. Anti-Human Epithelial Antigen (Ber-EP4) helps define basal cell carcinoma masked by inflammation. *Dermatol Surg* 1997; 23: 1067- 1070.

- [69] Karahan N, Baspinar S, Yildirim M, Barut I. The use of Ber-EP4 antigen in the differential diagnosis of basosquamous carcinoma from squamous and basal cell carcinoma. *Am J Surg* 1991; 15(8): 779- 84.
- [70] Linnenbach AJ, Seng BA, Wu S, Robbins S, Scollon M, Pyrc JJ, Druck T, Huebner K. Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Cell Biol* 1993; 13 (3): 1507- 15.
- [71] Sundberg M, Jansson L, Ketolainen J, Pihlajamäki H, Suuronen R, Skottman H, Hovatta O. CD marker expression profiles of human embryonic stem cells and their neural derivatives, determined using flow-cytometric analysis, reveal a novel CD marker for exclusion of pluripotent stem cells. *Stem cell research* 2004; (2): 113- 24.
- [72] Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med* 1999; 77 (10): 699- 712.
- [73] Franceschi S. Iodine intake and thyroid carcinoma - a potential risk factor. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 1998; 106: 38- 44.
- [74] Naoto Shirasu, Hiromi Yamada, Hirotomo Shibaguchi, Motomu Kuroki, Masahide Kuroki. Molecular characterization of a fully human chimeric T-cell antigen receptor for tumor-associated antigen EpCAM. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 853879.
- [75] Koteliansky VE, Arsenyeva EL, Bogacheva GT, Chernousov MA, Glukhova MA, Ibraghimov AR, Metsis ML, Petrosyan MN, Rokhlin OV. Identification of the species-specific antigenic determinant(s) of human plasma fibronectin by monoclonal antibodies. *FEBS Lett.* 1982; 142(2): 199- 202.
- [76] J. R. Izbicki. Disseminierte Tumorzellen: Diagnostik, prognostische Relevanz, Phänotypisierung und therapeutische Strategien. *Der Chirurg* 1997; 1241- 1250.
- [77] Robert Rosenberg. Prognostic evaluation and review of immunohistochemically detected disseminated tumor cells in peritumoral lymph nodes of patients with pN0 colorectal cancer. *International Journal of Colorectal Disease* 2004; 430- 437.
- [78] Harwood J, Diartek O, Dunphy J. Significance of lymphnode metatasis in differenciated thyroid cancer. *Cancer* 1979; 43: 810- 816.
- [79] Schlumberger MJ. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Eng J Med* 1998; 338: 297- 306.
- [80] Hermanek P, Hutter R, Robin S, Wittekind Ch. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 2000; 2668- 2673.
- [81] Antonio Toniato. Papillary thyroid carcinoma: Factors influencing recurrence and survival. *Annals of Surgical Oncology* 2008; 1518- 1522.

- [82] Cappelli C, Mastellano B, Gandossi E, Pirola I. Aggressiveness and outcome of papillary thyroid carcinoma (PTC) versus microcarcinoma (PMC): A mono-institutional experience. *J Surg Oncol* 2007; 1; 95 (7): 555- 60.
- [83] Grant CS, Hay ID, Gough IR, Bergstrahl EJ, Goellner JR, McConahey WM. Local recurrence in papillary thyroid carcinoma: Is extent of surgical resection important? *Surgery* 1988; 104:954- 962.
- [84] Gouda MA. Common pitfalls in reporting the use of SPSS software. *Med Princ Pract*. 2015; 24 (3): 300.
- [85] Hotvath E, Maylis S, Rossi R. An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 1748-1751.
- [86] Papini E, Guglielmi R, Bianchini A. Risk of malignancy in non palpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-doppler features. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 ;87: 1941- 1946.
- [87] Frates MC, Benson CB, Charboneau JW. Management of thyroid nodules detected at US: Society of Radiologists in Ultrasound consensus conference statement. *Radiology* 2005; 237: 794- 800.
- [88] Hegedus L, Bonnema SJ, Bennedbaek FN. Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives. *Endocr Rev* 2003; 24:102- 132.
- [89] Brauer VF, Brauer WH, Führer D. Iodine nutrition, nodular thyroid disease, and urinary iodine excretion in a German university study population. *Thyroid* 2005; 15: 364- 370.
- [90] Brauer VF, Brauer WH, Führer D. Iodine nutrition, nodular thyroid disease, and urinary iodine excretion in a German university study population. *Thyroid* 2005; 15: 364- 370.
- [91] Theissen P, Schmidt M, Ivanova T. MIBI szintigraphy in hypofunctional thyroid nodules – can it predict the dignity of a lesion? *Nuklearmedizin* 2009; 48: 144- 152.
- [92] Giovanella L, Suriano S, Maffioli M. (99m) Tc- sestamibi scanning in thyroid nodules with nondiagnostic cytology. *Head Neck* 2010; 32: 607- 611.
- [93] D’Souza MM, Marwaha RK, Sharma R. Prospective evaluation of solitary thyroid nodules on 18F- FDG PET/CT and high-resolution ultrasonography. *Ann Nucl Med* 2010; 24: 345- 355.
- [94] Ho Ty, Liou MJ, Lin KJ. Prevalence and significance of thyroid uptake detected by (18)F-FDG PET. *Endocrine* 2011; 40: 297- 302.
- [95] Lundgren Ci, Zedenius J, Skoog L. Fine-needle aspiration biopsy of benign thyroid nodules: an evidence-based review. *World J Surg* 2008; 32: 1247- 1252.
- [96] Ting S, Bockisch A, Führer D, Tötsch M, Schmid KW. Feinnadelbiopsie (FNB) der Schilddrüse. *Nuklearmediziner* 2012; 35: 1- 8.

- [97] Polyzos SA, Anastasilakis AD. A systematic review of cases reporting needle tract seeding following thyroid fine needle biopsy. *World J Surg* 2010; 34: 844- 851.
- [98] Farrag TY, Samlan RA, Lin FR. The utility of evaluating true vocal fold motion before thyroid surgery. *Laryngoscope* 2006; 116: 235- 238.
- [99] Randolph GW, Kamani D. The importance of preoperative laryngoscopy in patients undergoing thyroidectomy: voice, vocal cord function, and the preoperative detection of invasive thyroid malignancy. *Surgery* 2006; 139: 357- 362.
- [100] Kloos R. Thyroid cancer recurrence in patients clinically free of disease with undetectable or very low serum thyroglobulin values. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 5241- 5248.
- [101] Miyauchi A, Kudo T, Miya A. Prognostic impact of serum thyroglobulin doubling-time under thyrotropin suppression in patients with papillary thyroid carcinoma who underwent total thyroidectomy. *Thyroid* 2011; 21: 707- 716.
- [102] Suh I, Vriens MR, Guerrero MA. Serum thyroglobulin is a poor diagnostic biomarker of malignancy in follicular and Hurthle-cell neoplasms of the thyroid. *Am J Surg* 2010; 200: 41- 46.
- [103] Scheumann GF, Gimm O, Wegener G. Prognostic significance and surgical management of locoregional lymph node metastases in papillary thyroid cancer. *World J Surg* 1994; 18: 559- 568.
- [104] Kouvaraki MA, Lee JE, Shapiro SE. Preventable reoperations for persistent and recurrent papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 2004; 136: 1183- 1191.
- [105] Evans DB. Papillary carcinoma of the thyroid: balancing principles of oncology with emerging technology. *Surgery* 2011; 150: 1015- 1022.
- [106] Dralle H, Machens A. Primary surgery for differentiated thyroid cancer in the new millennium. *J Endocrinol Invest* 2012; 35.
- [107] Robbins KT, Shaha AR, Medina JE. Consensus statement on the classification and terminology of neck dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 134: 536- 538.
- [108] Carty SE, Cooper DS, Doherty GM. Consensus statement on the terminology and classification of central neck dissection for thyroid cancer. *Thyroid* 2009; 19: 1153- 1158.
- [109] Dralle H, Machens A. Surgical approaches in thyroid cancer and lymph node metastases. *Best Pract & Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22: 971- 987.
- [110] Dralle H, Lorenz K, Machens A. Chirurgie der Schilddrüsenkarzinome. *Chirurg* 2009; 80: 1069- 1083.
- [111] Dralle H, Damm I, Scheumann GFW. Compartment-oriented microdissection of regional lymph nodes in medullary thyroid carcinoma. *Surg Today* 1994; 24: 112- 121.

- [112] Dralle H, Machens A. Surgical approaches in thyroid cancer and lymph node metastases. *Best Pract & Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22: 971- 987.
- [113] Dralle H, Damm I, Scheumann GFW. Compartment-oriented microdissection of regional lymph nodes in medullary thyroid carcinoma. *Surg Today* 1994; 24: 112- 121.
- [114] Robbins KT, Shaha AR, Medina JE. Consensus statement on the classification and terminologie of neck dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 134: 536- 538.
- [115] Carty SE, Cooper DS, Doherty GM. Consensus statement on the terminology and classification of central neck dissection for thyroid cancer. *Thyroid* 2009; 19: 1153- 1158.
- [116] Wittekind C, Greene FL, Henson DE. *TNM Supplement*. 3rd edn. Wiley-Liss. New York. 2003, 25- 33.
- [117] Qubain SW, Nakano S, Baba M. Distribution of lymph node micrometastasis in pN0 well- differentiated thyroid carcinoma. *Surgery* 2002; 131: 249- 256.
- [118] Passler C, Scheuba C, Asari R. Importance of tumour size in papillary and follicular thyroid cancer. *Br J Surg* 2005; 92: 184- 189.
- [119] Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY. Extent of surgery affects survival for papillary thyroid cancer. *Ann Surg* 2007; 246: 375- 384.
- [120] Rahbar K, Huttenlaub V, Fischer RJ. Risk-profile and outcome of small papillary and follicular thyroid carcinomas (< or 1 cm). *Nuklearmedizin* 2008; 47: 1881- 1893.
- [121] Dralle H. Maligne Schilddrüsentumoren. In: *Kurzgefaßte interdisziplinäre Leitlinien* 2008. Deutsche Krebsgesellschaft 2008; 20.
- [122] Cooper DS, Doherty GM, Haugen, BR. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyorid cancer. *Thyroid* 2009; 19: 1167- 1214.
- [123] Watkinson C. British Thyroid Association. Guidelines for the management of thyroid cancer. *NMC* 2004; 897- 900.
- [124] Pacini F, Schlumberger M, Dralle H. European consensus for the management of the patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 2006; 154: 787- 803.
- [125] Dietlein M, Dressler J, Eschner W. Verfahrensanweisung zur Radioiodtherapie (RIT) beim differenzierten Schilddrüsenkarzinom. *Nuklearmedizin* 2007; 46: 213- 219.
- [126] Vaisman F, Shaha A, Fish S. Initial therapy with either thyroid lobectomy or total thyroidectomy without radioactive iodine remnant ablation is associated with very low rates of structural disease recurrence in properly selected patients with differentiated thyroid cancer. *Clin Endocrinol* 2011; 75: 112- 119.

- [127] Reiners C, Hänscheid H, Luster M. Radioiodine for remnant ablation and therapy of metastatic disease. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7: 589- 595.
- [128] Dralle H, Lorenz K, Machens A. Postoperativer Zufallsbefund Schilddrüsenkarzinom: chirurgisches Konzept. *Dtsch Med Wochenschr* 2009; 134: 2517- 2520.
- [129] Watkinson C. British Thyroid Association. Guidelines for the management of thyroid cancer. *NMC* 2004; 897- 900.
- [130] Pacini F, Schlumberger M, Dralle H. European consensus for the management of the patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* 2006; 154: 787- 803.
- [131] Links TP. Diagnosis and treatment of thyroid cancer. *Klin Chem* 2007; 32: 95- 98.
- [132] Dralle H. Maligne Schilddrüsentumoren: Kurzgefaßte interdisziplinäre Leitlinien 2008. Deutsche Krebsgesellschaft (Hrsg.) 2008, 20.
- [133] Cooper DS, Doherty GM, Haugen. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009; 19: 1167- 1214.
- [134] So YK, Son YI, Hong SD. Subclinical lymph node metastasis in papillary thyroid microcarcinoma: A study of 551 resections. *Surgery* 2010; 148: 526- 531.
- [135] Chisholm EJ, Kulinskaya E, Tolley NS. Systematic review and metaanalysis of the adverse effects of thyroidectomy combined with central neck dissection as compared with thyroidectomy alone. *Laryngoscope* 2009; 119: 1135- 1139.
- [136] Hughes DT, White ML, Miller BS. Influence of prophylactic central lymph node dissection on postoperative thyroglobulin levels and radioiodine treatment in papillary thyroid cancer. *Surgery* 2010; 148: 1100- 1107.
- [137] Moo TA, McGill J, Allendorf J. Impact of prophylactic central neck lymph node dissection on early recurrence in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 2010; 34: 1187- 1191.
- [138] Giordano D, Valcavi R, Thompson GB, Pedroni C, Renna L, Gradoni P, Barbieri V. Complications of central neck dissection in patients with papillary thyroid carcinoma: results of a study on 1087 patients and review of the literature. *Thyroid* 2012; 22: 911- 917.
- [139] Scheumann GF, Gimm O, Wegener G. Prognostic significance and surgical management of locoregional lymph node metastases in papillary thyroid cancer. *World J Surg* 1994; 18: 559- 568.
- [140] Ito Y, Tomoda C, Uruno T. Ultrasonographically and anatomopathologically detectable node metastases in the lateral compartment as indicators of worse relapse-free survival in patients with papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 2005; 29: 917- 920.

- [141] Ito Y, Miyauchi A. Lateral and mediastinal lymph node dissection in differentiated thyroid carcinoma: indications, benefits, and risks. *World J Surg* 2007; 31: 905- 915.
- [142] Lerch H, Schober O, Kuwert T, Saur HB. Survival of differentiated thyroid carcinoma studied in 500 patients. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2067- 2075.
- [143] Meller B, von Hof K, Genina E, Deisting W, Meller J, Richter E, Baehre M. Diagnostic ¹²³I and ¹³¹I activities and radioiodine therapy. *Nuklearmedizin* 2005; 44: 243- 248.
- [144] Reiners C. Radioiodine therapy in patients with pulmonary metastases of thyroid cancer: when to treat, when not to treat? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30: 939- 942.
- [145] Feldt-Rasmussen U. Iodine and cancer. *Thyroid* 2001; 11(5): 483- 6.
- [146] Burgess JR, Swyer T, McArdle K. The changing incidence and spectrum of thyroid carcinoma in Tasmania (1978-1998) during a transition from iodine sufficiency to iodine deficiency. *J Clin Endocrin Metab* 2000; 85: 1513- 7.
- [147] Dralle H, Scheumann GFW, Meyer HU. Zervikale Eingriffe an der Luft- und Speiseröhre beim organüberschreitenden Schilddrüsenkarzinom. *Chirurg* 1992; 63: 282- 290.
- [148] Dralle H, Brauckhoff M, Machens A. Surgical management of advanced thyroid cancer invading the aerodigestive tract. Elsevier Saunders 2005, 318- 333.
- [149] Brauckhoff M, Meinicke A, Bilkenroth U. Long-term results and functional outcome after cervical evisceration in patients with thyroid cancer. *Surgery* 2006; 140: 953- 955.
- [150] Brauckhoff M, Dralle H. Zervikoviszzerale Resektionen beim organüberschreitenden Schilddrüsenkarzinom. *Chirurg* 2009; 80: 88- 98.
- [151] Musholt TJ, Musholt PB, Behrend M. Invasive differentiated thyroid carcinoma: tracheal resection and reconstruction procedures in the hands of the endocrine surgeon. *Surgery* 1999; 126: 1078- 1087.
- [152] Brauckhoff M, Machens A, Nguyen Thanh P. Impact of extent of resection for thyroid cancer invading the aerodigestive tract on surgical morbidity, local recurrence and cancer-specific survival. *Surgery* 2010; 148: 1257- 126.
- [153] Randolph GW, Daniels GH. Radioactive iodine lobe ablation as an alternative to completion thyroidectomy for follicular carcinoma of the thyroid. *Thyroid* 2002; 12: 989- 996.
- [154] Bal CS, Kumar A, Pant GS. Radioiodine lobar ablation as an alternative to completion thyroidectomy in patients with differentiated thyroid cancer. *Nucl Med Commun* 2003; 24: 203- 208.
- [155] Barbesino G, Goldfarb M, Parangi S. Thyroid lobe ablation with radioactive iodine as an alternative to completion thyroidectomy after Hemithyroidectomy in patients with follicular thyroid carcinoma: long- term follow up. *Thyroid* 2012; 22: 369- 376.

- [156] Dralle H, Damm I, Scheumann GFW. Compartment-oriented microdissection of regional lymph nodes in medullary thyroid carcinoma. *Surg Today* 1994; 24: 112- 121.
- [157] Robbins KT, Shaha AR, Medina JE. Consensus statement on the classification and terminology of neck dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 134: 536- 538.
- [158] Wittekind C, Greene FL, Henson DE. *TNM Supplement*. Wiley-Liss 2003; 25- 33.
- [159] Qubain SW, Nakano S, Baba M. Distribution of lymph node micrometastasis in pN0 well- differentiated thyroid carcinoma. *Surgery* 2002; 131: 249- 256.
- [160] Goretzki p, Schwarz K, Lammers B. *Chirurgische Therapie eines verdächtigen Schilddrüsenknotens*. Thieme Verlag 2016; 39 (03): 218- 226.
- [161] Qubain SW, Nakano S, Baba M. Distribution of lymph node micrometastasis in pN0 well- differentiated thyroid carcinoma. *Surgery* 2002; 131: 249- 256.
- [162] Von Lanz T, Wachsmuth W. *Praktische Anatomie, Hals*. Springer Verlag 1955, 243- 244.
- [163] Brito JP, Ito Y, Miauchi A, Tuttle RM. A clinical framework to facilitate risk stratification when considering an active surveillance alternative to immediate biopsie and surgery in papillary microcarcinoma. *Thyroid* 2016; 144- 149.
- [164] Bergamaschi R, Becouarn G, Ronceray J. Morbidity of thyroid surgery. *Am J Surg*. 1998; 176:71- 5.
- [165] Mazzaferi EL, Doherty GM, Steward DL. The pros and cons of prophylactic central compartment lymph node dissection of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2009; 683- 689.
- [166] Bardet S, Malville E, Rame JP. The pros and cons of prophylactic central compartment lymph node dissection of papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 2008; 158: 551- 560.
- [167] Qubain SW, Nakano S, Baba M. Distribution of lymph node micrometastasis in pN0 well-differentiated thyroid carcinoma. *Surgery* 2002; 131: 249- 256.
- [168] Goretzki p, Schwarz K, Lammers B. *Chirurgische Therapie eines verdächtigen Schilddrüsenknotens*. Thieme Verlag 2016; 39 (03): 218- 226.
- [169] Rehders A, Anlauf M, Adamowsky I, Ghadimi MH, Klein S, Antke C, Cupisti K, Stoecklein NH, Knoefel WT. Is minimal residual lymph node disease in papillary thyroid cancer of prognostic impact? An analysis of the epithelial cell adhesion molecule EpCAM in lymph nodes of 40 pNO patients. *Pathol Oncol Res* 2014; 20 (1): 185- 90.

10. Danksagung

Auf diesem Wege möchte ich mich bei Prof. Dr. med. W.T. Knoefel und Prof. Dr. med. A. Rehders für das hervorragende Thema meiner Dissertation bedanken. Ich bekam die Möglichkeit die Laborarbeit kennelernen zu dürfen und konnte mich auf diesem Weg mit der experimentellen Arbeit auseinandersetzen. Diese Arbeit war ein großer Baustein auch für meinen weiteren beruflichen Werdegang, insbesondere für das wissenschaftliche Arbeiten. Vor allem gilt mein Dank Prof. Dr. med. A. Rehders, der all die Jahre mir geduldig und großzügig während der gesamten wissenschaftlichen Arbeit Hilfestellung leistete.