



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

KATEDRA I KLINIKA UROLOGII

Rozprawa doktorska

Wojciech Połom

MAPOWANIE PRZERZUTÓW RAKA PĘCZERZA MOCZOWEGO DO
WĘZŁÓW CHŁONNYCH MIEDNICY Z UŻYCIEM RÓŻNYCH
TECHNIK WSPOMAGAJĄCYCH OBRAZOWANIE DRÓG
CHŁONNYCH.

Promotor: dr hab. Marcin Matuszewski

GDAŃSK 2017

Serdecznie dziękuję mojemu Promotorowi Panu Dr hab. Marcinowi Matuszewskiemu za zaangażowanie, pomoc, wsparcie i za rady, jakich udzielił mi w trakcie powstawania pracy doktorskiej.

Pracę dedykuję rodzinie.

SPIS TREŚCI

Streszczenie w języku polskim	7
Streszczenie w języku angielskim	41
Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	73

Streszczenie

Wstęp

Rak pęcherza moczowego jest dziewiątym najczęściej diagnozowanym nowotworem na świecie. Obecnie stwierdza się około 429,800 zachorowań oraz ponad 165,100 przypadków śmiertelnych rocznie [1]. Usunięcie pęcherza moczowego – radykalna cystektomia (RC) jest preferowaną metodą w przypadku nowotworu naciekającego jego warstwę mięśniową – muscle invasive bladder cancer (MIBC). Metoda ta zapewnia 5-letnie przeżycie tych pacjentów na poziomie około 50 % [2,3]. W przypadku jego nawrotu, zajęcie węzłów chłonnych ma niezależną i znaczącą wartość prognostyczną dla przeżycia pacjentów [4]. Konwencjonalne metody oceny węzłów chłonnych – zarówno – przedoperacyjne jak i w trakcie samego zabiegu – oraz ich standardowe badanie histopatologiczne oferują niesatysfakcjonujące wyniki i mogą skutkować przeoczeniem i nierozpoznaniami przerzutów komórek nowotworowych do tych węzłów. U 25 % pacjentów poddanych RC w stadium klinicznym cN0 przerzuty w węzłach chłonnych są wykrywane w pooperacyjnym badaniu histopatologicznym [5]. U takich pacjentów rekomenduje się wykonanie radykalnej cystektomii oraz obustronnej miedniczej limfadenektomii – pelvic lymph node dissection (PLND), celem usunięcia nowotworu oraz dokładnej oceny stopnia zaawansowania raka pęcherza moczowego [6]. Obecnie brak jest jednomyślności co do zalecanej rozległości limfadenektomii, oraz co do ilości usuwanych węzłów chłonnych w trakcie jej wykonywania. Niektóre badania wykazują, że wykonanie PLND zwiększa długość życia zarówno u pacjentów z przerzutami do węzłów chłonnych, jak i u pacjentów bez przerzutów [7-10]. Z tego też powodu radykalna cystektomia z

obustronną PLND jest rutynową metodą leczenia i stajingu w przypadku MIBC [3]. Dyskusję wzbudza często liczba usuniętych węzłów chłonnych, która co ciekawe, nie zawsze odzwierciedla jakość wykonanej limfadenektomii. Potwierdza to badanie przeprowadzone na zwłokach. Autorzy wskazują duże osobnicze różnice w ilości węzłów chłonnych, które usuwane były w trakcie super - rozszerzonej limfadenektomii a liczba ich różniła się w zakresie od 10 do 53 węzłów [11]. Opisywana liczba usuwanych węzłów chłonnych w zależności od rozległości limfadenektomii przy zabiegu radykalnej cystektomii wynosi od poniżej 5 do powyżej 75 [12]. Przy obecnej debacie dotyczącej zakresu limfadenektomii oraz liczby węzłów chłonnych, które należałoby usunąć w czasie zabiegu, brakuje lepszej oceny statusu węzłów chłonnych usuwanych na podstawie z góry przyjętego schematu anatomicznego. Obiecującą metodą w tym zakresie wydaje się być biopsja węzłów chłonnych wartowniczych – *sentinel lymph node biopsy* (SLNB). Jej zastosowanie przynosi korzyści w ocenie sływu chłonnego z guza w przypadku wielu nowotworów. Dodatkowo, pozwala potencjalnie polepszyć *staging* węzłów chłonnych, skupiając uwagę patomorfologa badającego preparat pooperacyjny na węźle lub węzłach narażonych na ryzyko występowania przerzutowych komórek nowotworowych. Należy jednak podkreślić, iż w nowotworach takich jak rak pęcherza moczowego wykonanie procedury SLNB nie zwalnia ze standardowej oceny pozostałych, niewartowniczych węzłów chłonnych, usuniętych podczas zabiegu operacyjnego.

Koncepcja SLNB opiera się na założeniu, że znalezienie i zbadanie pierwszego węzła lub węzłów chłonnych drenujących chłonkę z guza jest w stanie oddać stan całego regionalnego systemu chłonnego. Metoda ta z powodzeniem została zastosowana w leczeniu raka piersi [13], czerniaka skóry [14], raka jelita grubego [15], raka prącia [16], oraz innych nowotworów [17]. W zależności od rodzaju nowotworu danego organu, sływ

chłonny można podzielić na prosty lub złożony. Schemat spływu prostego spotyka się na przykład w przypadku raka piersi [13], czerniaka skóry [14] i raka prącia [16]. W tych przypadkach spływu chłonki można się spodziewać jednej drogi chłonnej prowadzącej z lokalizacji guza do pierwszego węzła chłonnego. Istnieje jednak szereg nowotworów, w przypadku których spływ chłonny jest znacznie bardziej skomplikowany, gdzie lokalizacja oraz liczba pierwszych węzłów chłonnych spływu chłonnego jest trudna do przewidzenia. Zaliczają się do nich między innymi rak żołądka [18], rak jelita grubego [15] oraz rak pęcherza moczowego [19]. W przypadku każdego z tych nowotworów koncepcja SLNB znajduje zastosowanie kliniczne, różni się jednak tym, że obecnie nie uprawnia do zaniechania wykonywania limfadenektomii w przypadku niewykrycia przerzutów w SLNs jak w przypadku nowotworów o prostym spływie chłonnym, lecz może zapewnić trafniejszą ocenę zaawansowania choroby nowotworowej poprzez dokładniejszą ocenę węzłów chłonnych.

W przypadku MIBC metoda SLNB do oceny przerzutów nowotworu do węzłów chłonnych została po raz pierwszy zastosowana w 2001 roku przez Sherif i wsp. [19]. Autorom udało się wykryć węzły chłonne wartownicze – sentinel lymph nodes (SLNs) u 11/13 pacjentów (85 %). Od tej pory jedynie kilku autorów opisuje zastosowanie techniki SLNB w przypadku MIBC [20,21]. Może być to spowodowane faktem, że odpływ chłonki z organu sferycznego, jakim jest pęcherz moczowy, może być bardzo zróżnicowany – a co za tym idzie, trudny do oceny [21,22].

W swoim doświadczeniu Sherif i wsp. wykonali iniekcję radioznacznika oraz błękitu metylenowego dopęcherzowo, następnie wykonując limfoscyntyografię [19]. Pewien postęp w zastosowaniu tej techniki został później osiągnięty przez Malmström i wsp. Autorzy w swoim badaniu zastosowali hybrydową limfoscyntyografię tomografii

komputerowej pojedynczego fotonu - single-photon emission computed tomography/computed tomography (SPECT/CT) dla lepszego uwidocznienia lokalizacji SLNs. Technika ta z wykorzystaniem obrazowania tomografii komputerowej wraz z wynikiem funkcjonalnej scyntygrafii zwiększyła spektrum metod wykorzystywanych do detekcji SLNs, zwłaszcza tych o niewielkich rozmiarach węzła chłonnego [23].

Kilka lat później również Sherif i wsp. opisują użycie hybrydowej limfoscyntygrafii SPECT/CT jako dodatkowej techniki jeszcze dokładniej opisującej położenie SLNs co udoskonaliło metodę poszukiwania tych węzłów [24]. Dodatkowo, dla lepszej identyfikacji śródoperacyjnej SLNs stosuje się ręczną sondę γ . Liedberg i wsp. udowodnili, że poprzez zastosowanie przedoperacyjnej limfoscyntygrafii w połączeniu ze śródoperacyjną detekcją, ręczną sondą można poprawić *staging* węzłowy w przypadku MIBC [25]. Należy podkreślić jednak, że wszystkie te badania obejmują jedynie relatywnie niewielką grupę badanych pacjentów.

Metody identyfikacji SLNs są cały czas unowocześniane. Zgodnie z jej założeniem anatomiczna lokalizacja węzła wartowniczego jest niemożliwa z powodu znacznego zróżnicowania osobniczego układu limfatycznego. Z tego powodu, każdorazowo konieczna jest wizualizacja SLNs za pomocą znaczników.

Technika wykonywania SLNB różni się w zależności od nowotworu. Do identyfikacji SLNs używane są najczęściej radioznaczniki w połączeniu z nanokoloidem, oraz błękit metylenowy jako substancja wybarwiająca węzły chłonne, polepszająca śródoperacyjną wizualizację węzłów przez chirurga. Znaczniki te podawane są przed zabiegiem operacyjnym.

W przypadku techniki z zastosowaniem radioznaczników używana jest śródoperacyjnie ręczna sonda gamma do lokalizacji węzłów chłonnych, które wychwyciły

podany znacznik. Nową techniką wykorzystywaną coraz częściej jest SLNB z użyciem związku fluorescencyjnego - zieleni indocyjaninowej (ICG), do detekcji której używana jest kamera wykorzystująca światło podczerwone- near infrared fluorescence (NIRF) camera. ICG to bezpieczna substancja, która stosowana jest od wielu lat w okulistyce, transplantologii, hepatologii i kardiochirurgii [12,26]. Przy użyciu ICG możemy uwidocznić nie tylko miejsce podania barwnika, ale także śródoperacyjnie zwizualizować drogę chłonną w czasie rzeczywistym oraz zidentyfikować i zlokalizować interesujący nas pierwszy węzeł chłonny spływu chłonki. Użycie ICG do wizualizacji dróg chłonnych i SLNs po raz pierwszy zaproponowali Kitai i wsp. w operacji raka piersi [15]. Od tego czasu znacznie wzrosło zainteresowanie tą nową techniką. Pojawiły się prace dotyczące jej zastosowania do wykrywania SLNs także w przypadku innych nowotworów [27 – 32].

Stosując ICG w technice SLNB należy mieć też na uwadze wady samego związku oraz techniki [12,26]. Elementem przemawiającym na korzyść użycia ICG jest wizualizacja spływu chłonnego w czasie rzeczywistym oraz optyczna wizualizacja samych SLNs. Ograniczeniem z kolei jest głębokość na jaką możliwa jest detekcja ICG. Obecnie granica ta wynosi około 1cm grubości tkanki, co utrudnia lub uniemożliwia wykrycie SLNs położonych głębiej w tkance tłuszczowej, zwłaszcza u otyłych pacjentów. Możliwe, że zastosowanie związku hybrydowego ICG z innymi substancjami poprawi ten parametr eliminując wady samej substancji [27].

Obecnie leczenie pacjentów z MIBC wciąż ewoluuje. Stosowane nowe techniki operacyjne pozwalają na indywidualizację leczenia oraz (tam, gdzie to możliwe) ograniczenia urazu związanego z zabiegiem chirurgicznym, oraz zmniejszenia

ewentualnych powikłań. Rozwijane są techniki laparoskopowe i robotyczne usuwania pęcherza moczowego, wykonywanie przy ich okazji rozległej limfadenektomii utrudnia znacznie wykonanie zabiegu. Dalsze badania są potrzebne dla udowodnienia skuteczności indywidualizacji leczenia pacjentów z tym nowotworem, jak również możliwości zastosowania bezpieczniejszych sposobów diagnostycznych przed- i śródoperacyjnych. Dzięki temu indywidualizacja leczenia pacjentów może prowadzić do poprawy wyników leczenia chorych zdiagnozowanych z nowotworem pęcherza moczowego.

Wykaz publikacji będących przedmiotem rozprawy doktorskiej.

Prace pogładowe:

1. **Polom W.**, Markuszewski M., Rho YS., Matuszewski M. (2014) Usage of invisible near infrared light (NIR) fluorescence with indocyanine green (ICG) and methylene blue (MB) in urological oncology. Part 1. Cent European J Urol. 67(2):142-8.

IF= 0; MNiSW= 9

Prace oryginalne:

2. **Polom W.**, Markuszewski M., Cytawa W., Lass P., Matuszewski M. (2016) . Radio-Guided Lymph Node Mapping in Bladder Cancer Using SPECT/CT and Intraoperative γ -Probe Methods. Clin Nucl Med. 41(8):e362-7.

IF= 4.278; MNiSW= 35

3. **Polom W.**, Markuszewski M., Cytawa W., Czapiewski P., Lass P., Matuszewski M. Fluorescent versus radioguided lymph node mapping in bladder cancer. Clin Genitourin Cancer. 2016 Nov 30

IF= 2.599; MNiSW= 25

List do redakcji:

4. **Połom W.**, Gruszecka A., Markuszewski M., Cytawa W., Lass P., Matuszesski M. Radio-Guided Lymph Node Mapping in Bladder Cancer Using SPECT/CT and Intraoperative γ -Probe Methods: Reply. Clin Nucl Med. 2017 Apr;42(4):327-328.

IF= 4.278; MNiSW= 35

Łączna wartość IF= 11,155; MNiSW= 104 (na dzień 04.05.2017)

W tekście rozprawy doktorskiej dane z prac, które są podstawą rozprawy doktorskiej, zaznaczono w nawiasie w następujący sposób np. [publikacja 1].

Charakterystyka problemu naukowego.

Cele niniejszej rozprawy:

1. Znalezienie korelacji między rodzajem i lokalizacją nowotworu pęcherza moczowego, a umiejscowieniem zajętych węzłów chłonnych w miednicy z użyciem nowych technik obrazowania dróg spływu chłonki, i zaproponowanie zakresu limfadenektomii wykonywanej przy usuwaniu pęcherza moczowego.
2. Zaprezentowanie schematu spływu chłonnego oraz dokładne określenie miejsc przerzutów nowotworu do węzłów chłonnych miednicy w raku pęcherza moczowego.

W pracy dokonano prospektywnej analizy wyników 38 [publikacja 2] oraz 50 pacjentów [publikacja 3] z MIBC, którzy byli leczeni chirurgicznie w latach 2012 – 2015 w Klinice Urologii Uniwersyteckiego Centrum Medycznego w Gdańsku. Badanie zostało zgłoszone i zaakceptowane przez miejscową komisję bioetyczną przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym pod numerem: NKBBN/87/2012.

Cele rozprawy zostały zrealizowane w cyklu czterech doniesień opublikowanych w latach 2014 – 2016 [publikacje 1-4]. Rozprawę doktorską stanowią spójne tematycznie dwie prace oryginalne [publikacje 2 – 3], jedna praca poglądowa [publikacja 1] oraz jeden list do redakcji będący odpowiedzią na komentarz do publikacji pracy oryginalnej [publikacja 4]. Obie prace oryginalne mają charakter prekursorski i uwzględniają omówienie wyżej wymienionych celów rozprawy doktorskiej [publikacje 2 ,3]. W pracy poglądowej omówiono szczegółowo na podstawie piśmiennictwa dostępnego w bazach

medycznych PubMed i Medline zasadę działania oraz wykorzystanie technologii związków fluorescencyjnych – zieleni indocyjaninowej i błękitu metylenowego oraz niewidzialnego dla ludzkiego oka światła podczerwonego w urologii onkologicznej do obrazowania śródoperacyjnego, szczególnie skupiając się na wykorzystaniu tej technologii w przypadku biopsji węzłów chłonnych wartowniczych oraz śródoperacyjnej wizualizacji zmian nowotworowych celem określenia marginesu resekcji. Wchodzący w skład rozprawy doktorskiej list do redakcji [publikacja 4] odpowiada na komentarz do pracy oryginalnej [publikacja 2] dotyczący jej części statystycznej.

Publikacja 1

Usage of invisible near infrared light (NIR) fluorescence with indocyanine green (ICG) and methylene blue (MB) in urological oncology. Part 1. Cent European J Urol. 67(2):142-8.

W pracy poglądowej na temat zastosowania nowej techniki wizualizacji śródoperacyjnej z zastosowaniem związku o właściwościach fluorescencyjnych - zieleni indocyjaninowej (ICG), oraz światła podczerwonego, near infrared light (NIR), opisano jej użycie w dwóch aspektach:

1. Biopsji węzła chłonnego „wartowniczego” w nowotworach urologicznych

Biopsja węzła chłonnego wartowniczego została zaproponowana przez Wawroshek i wsp. jako dodatkowe narzędzie w celu zmniejszenia objawów ubocznych leczenia w przypadku wykonywania rozszerzonej limfadenektomii miedniczej w raku prostaty [33]. Procedura ta pozwala na poprawę *stagingu* węzłów chłonnych poprzez dokładniejsze badanie patomorfologiczne wskazanych węzłów chłonnych wartowniczych jak również poprzez

maksymalizację ilości pozostałych, usuniętych węzłów chłonnych. W naszej publikacji omówione zostały badania dotyczące SLNB z zastosowaniem ICG i światła podczerwonego z wykorzystaniem zjawiska fluorescencji.

Knapp i wsp. wykonał biopsję węzłów chłonnych wartowniczych w przypadku raka pęcherza moczowego na modelu zwierzęcym [21]. Autorzy wykorzystali do jej wykonania nawigację śródoperacyjną przy użyciu kamery wykorzystującej światło podczerwone oraz ICG.

Pierwsze badanie na ludziach z użyciem śródoperacyjnej nawigacji przy pomocy kamery na podczerwień oraz ICG zostało przeprowadzone przez Van der Poel i wsp. w przypadku raka prostaty [27]. W tym badaniu użyto połączenia związku ICG wraz z radioznacznikiem – ICG – ^{99m}Tc NanoCol. Badanie to było przeprowadzone na 11 pacjentach i jest to pierwsza publikacja opisując kliniczne zastosowanie w urologii połączenia obu związków tworzących tak zwany związek hybrydowy wykazujący korzyści wynikające z zastosowania obu związków jednocześnie.

2. Śródoperacyjnej wizualizacji zmian nowotworowych celem określenia marginesu resekcji w raku nerki.

Jest to kolejne zastosowanie związków fluorescencyjnych i światła podczerwonego w nowoczesnej diagnostyce śródoperacyjnej w urologii. Obecny standard postępowania w przypadku dużej części guzów nerek jest leczenie organooszczędzające, w którym ważne jest całkowite usunięcie zmiany oraz pozostawienie jak największej części zdrowej tkanki narządu. Niezależnie od zastosowanej techniki ryzyko niedoszczętej resekcji guza szacowane jest na poziomie 2.5 % do 5.7 % według różnych autorów [34-36]. Oceny uzyskania wolnego od guza marginesu resekcji dokonuje chirurg podczas zabiegu

polegając tylko na własnym doświadczeniu i zmyśle wzroku. Użycie ICG z kamerą wykorzystującą światło podczerwone wydaje się być użyteczne w przypadku oceny marginesu resekcji guzów nerek. Technika ta została opisana zarówno w zabiegach klasycznych z wykorzystaniem laparotomii, jak również endoskopowych z użyciem robota [37,38]. Dzięki niej możliwe jest zaobserwowanie różnicy fluorescencji w świetle podczerwonym pomiędzy tkanką zdrową i zmianą patologiczną, co umożliwia dokładną ocenę marginesu resekcji w trakcie usuwania guza [39].

Publikacja 2

Radio-Guided Lymph Node Mapping in Bladder Cancer Using SPECT/CT and Intraoperative γ -Probe Methods. Clin Nucl Med. 41(8):e362-7.

W publikacji opisano możliwość wykonania mapowania węzłów chłonnych wartowniczych w przypadku MIBC przy użyciu radioizotopu technetu. SLBN jest metodą identyfikacji węzłów chłonnych wartowniczych stosowaną w chirurgii onkologicznej od wielu lat i jest uznawana za złoty standard w leczeniu przede wszystkim takich nowotworów jak rak piersi i czerniak skóry [40,41].

W naszej publikacji dodatkowo porównaliśmy wyniki przedoperacyjnej detekcji SLNs przy zastosowaniu hybrydowej limfoscyntygrafii 3D SPECT/CT ze śródoperacyjną detekcją radioaktywnych węzłów chłonnych z użyciem ręcznej sondy gamma. Do badania włączeni zostali pacjenci bez stwierdzonych przedoperacyjnie w badaniach obrazowych przerzutów w węzłach chłonnych. Dodatkowym celem badania była ocena wpływu chłonnego z obszaru guza pęcherza moczowego – mapowanie węzłów chłonnych oraz

zapropozowanie schematu limfadenektomii w przypadku, gdy SLNs były znajdowane poza miejscami standardowej limfadenektomii.

Do badania włączono 38 pacjentów, którym usunięto w sumie 535 węzły chłone (średnia usuniętych węzłów chłonnych wyniosła 14.07). Przerzuty w oznaczonych radioaktywnie węzłach chłonnych znaleziono u 13 pacjentów. U 22 pacjentów z kolei węzły te nie zawierały przerzutów. W opisywanej grupie pacjentów u 3 nie zaobserwowano spływu chłonnego z obszaru guza – określono ich jako „pacjenci niedrenujący”, których wyłączo z dalszej analizy.

Metoda hybrydowej limfoscyntygrafii 3D SPECT/CT wykryła 58 radioaktywnych węzłów chłonnych. Podobny wynik uzyskano w trakcie śródoperacyjnej detekcji radioaktywnych węzłów chłonnych przy użyciu ręcznej sondy gamma. W tym przypadku wykryto również 58 radioaktywnych węzłów chłonnych, jednak w przypadku 2 pacjentów obie metody dały różne wyniki. Spośród tych 58 radioaktywnych węzłów chłonnych, 55 (94%) zostało znalezionych dystalnie oraz doogonowo w stosunku do skrzyżowania moczowodu z naczyniami biodrowymi. W przypadku 3 pacjentów (8.6%), węzły chłonne radioaktywne znaleziono poza obszarem standardowej limfadenektomii, i nie znaleziono w nich przerzutów komórek raka. Mimo, że jest to niewielka grupa pacjentów, znalezienie spływu chłonnego poza standardowym zakresem limfadenektomii rekomendowanym przez EAU (European Association of Urology) może doprowadzić do zmiany zakresu limfadenektomii w oparciu o technikę SLNB. Aby odpowiedzieć na to pytanie kliniczne konieczne są dalsze badania na większej grupie pacjentów.

Warto tu podkreślić, że zastosowanie techniki SLNB w raku pęcherza moczowego prawdopodobnie pozwoliłoby na znalezienie podgrupy pacjentów, którzy odnieśli by korzyść z rozszerzonej limfadenektomii lub tylko usunięcia węzłów chłonnych

wartowniczych znajdujących się poza standardowym obszarem spływu chłonki z guza. Jest to odpowiedź na postawione w niniejszej pracy doktorskiej pytanie dotyczące zakresu celów badania, proponujące indywidualizację zakresu limfadenektomii, w zależności od wyniku badania SPECT/CT węzłów chłonnych wartowniczych przed zabiegiem operacyjnym (cel numer 1).

Drugim zagadnieniem dotyczącym indywidualizacji zakresu limfadenektomii jest propozycja wykonania samej procedury SLNB w raku pęcherza moczowego. W tym aspekcie w naszym badaniu wyniki fałszywie negatywne wystąpiły w 8% przypadków. Dodatkowym celem niniejszej pracy doktorskiej było znalezienie korelacji pomiędzy rodzajem i lokalizacją guza pęcherza moczowego, a umiejscowieniem zajętych węzłów chłonnych w miednicy. W naszym badaniu u wszystkich pacjentów w końcowym wyniku histopatologicznym zdiagnozowano raka urotelialnego pęcherza moczowego (cel numer 1). W grupie badanej przeciwległy odpływ chłonny został zaobserwowany u 9 pacjentów (45%), co zdaje się potwierdzać teorię krzyżowego drenażu limfatycznego do węzłów chłonnych miednicy opisaną również przez innych autorów. Tłumaczy to także konieczność wykonania pełnej obustronnej limfadenektomii miedniczej niezależnie od umiejscowienia guza w pęcherzu moczowym [42]. Prawdopodobnie wytłumaczeniem tego zjawiska jest złożoność układu chłonnego pęcherza moczowego (cel numer 1). Aby w pełni odpowiedzieć na pytanie dotyczące indywidualizacji zakresu limfadenektomii w raku pęcherza moczowego konieczne są dalsze wielośrodkowe badania z randomizacją.

W 13 radioaktywnych węzłach chłonnych znaleziono przerzuty raka. W 6 z nich były one jedynym miejscem przerzutu nowotworu. Średnio 1.52 radioaktywnego węzła chłonnego (od 1 do 5) zostało zlokalizowanych przedoperacyjnie oraz śródoperacyjnie. W 3 przypadkach przerzuty nowotworu zostały znalezione poza węzłami oznaczonymi

radioaktywnie i nie zaobserwowano odpływu chłonnego z obszaru guza. Taka sytuacja mogła mieć miejsce w przypadku obecności komórek nowotworowych blokujących odpływ chłonny.

Celem numer 2 w niniejszej pracy doktorskiej jest zaprezentowanie schematu spływu chłonnego oraz dokładne określenie miejsc przerzutów nowotworu do węzłów chłonnych miednicy w raku pęcherza moczowego. Dzięki prospektywnemu określeniu anatomicznego podziału stacji węzłowych, celem lepszego określenia miejsca występowania węzłów chłonnych wartowniczych, stworzona została mapa przedstawiająca lokalizację spływu chłonki do pierwszych węzłów chłonnych obszaru spływu chłonnego z guza nowotworowego. Rycina 4 przedstawia podsumowanie lokalizacji znalezionych radioaktywnych węzłów chłonnych. Rycina ta przedstawia w sposób graficzny odpowiedź na cel numer 2 zawarty w założeniach niniejszej pracy doktorskiej. Obecnie limfadenektomia w raku pęcherza moczowego naciekającego mięśniówkę opiera się na usunięciu węzłów chłonnych z miednicy według przyjętego schematu anatomicznego. Jest to więc w pewnym sensie usunięcie „na ślepo” tych węzłów. Przygotowywana praca ma na celu znalezienie narzędzi mających poprawić ocenę węzłów chłonnych przewidzianych do usunięcia.

Publikacja 3

Fluorescent versus radioguided lymph node mapping in bladder cancer. Clin Genitourin Cancer. 2016 Nov 30.

W publikacji przedstawiono wyniki porównania dwóch metod śródoperacyjnej detekcji węzłów chłonnych wartowniczych w przypadku MIBC. Porównano standardową technikę

detekcji i lokalizowania węzłów chłonnych wartowniczych z zastosowaniem radioznacznika oraz nowej techniki ich obrazowania i identyfikacji przy użyciu związku fluorescencyjnego ICG oraz kamery emitującej światło podczerwone. Ponieważ nie są to standardowe metody postępowania u każdego pacjenta dla weryfikacji wyników wykonano dodatkowo miedniczą limfadenektomię.

Badanie zostało przeprowadzone na grupie 50 pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem pęcherza moczowego naciekającym jego mięśniówkę poddanych następnie zabiegowi radykalnej cystektomii/cystoprostatektomii. W grupie badanych pacjentów usunięto łącznie 681 węzłów chłonnych, średnia liczba usuniętych węzłów chłonnych na pacjenta wyniosła 13.62 (± 4.99). Troje pacjentów (6%) zostało wyłączonych z dalszej analizy z powodu braku zdiagnozowanego odpływu chłonnego z obszaru guza. Jako że w tych przypadkach zostały znalezione przerzuty do węzłów chłonnych, można domniemywać, że było to powodem zablokowania dalszego spływu chłonnego z obszaru guza do pierwszych węzłów chłonnych. U 47 pacjentów zostały znalezione węzły chłonne, oznaczone przez co najmniej jeden ze znaczników (radioznacznik lub znacznik fluorescencyjny). U 16 pacjentów przynajmniej jeden węzeł chłonny wartowniczy zawierał przerzuty raka, natomiast u 31 pacjentów węzły te nie zawierały przerzutów nowotworu. U 17 pacjentów znaleziono 56 węzłów chłonne innych niż węzły chłonne wartownicze, zawierających przerzuty raka niezależnie od tego, czy węzły chłonne wartownicze zawierały komórki raka. W badanej grupie 47 pacjentów, biopsja węzłów chłonnych wartowniczych wykonana metodą fluorescencyjną wykryła te same węzły chłonne, co metoda radioaktywna z użyciem związku promieniotwórczego. W przypadku 12 z 47 pacjentów (25.6%) metoda fluorescencyjna pozwoliła na oznaczenie większej liczby węzłów chłonnych niż metoda radioaktywna. W przypadku 8 z 47 pacjentów (17%), u

których węzły chłonne były oznaczone obydwoma metodami, i które zawierały przerzuty nowotworu, inne węzły chłonne również zawierały przerzuty nowotworu. U 3 pacjentów (6.4%) znaleźliśmy węzły chłonne wartownicze poza obszarem standardowej limfadenektomii, to jest powyżej skrzyżowania moczowodu z naczyniami biodrowymi (cel numer 1). Spośród tych węzłów chłonnych żaden nie zawierał przerzutów nowotworu. Także wykorzystując technikę fluorescencyjną możliwa jest wizualizacja węzłów chłonnych wartowniczych znajdujących się poza standardowym zakresem limfadenektomii, co mogłoby pozwolić na indywidualizację zakresu usunięcia węzłów chłonnych w przypadku resekcji MIBC (cel numer 1).

Analizując całą grupę 50 pacjentów, wykorzystując do tego badanie histopatologiczne wszystkich usuniętych węzłów chłonnych wykazano, że w 6 przypadkach (12%) nie udało się zidentyfikować przerzutów nowotworu do węzłów chłonnych stosując procedurę biopsji węzła chłonnego wartowniczego, niezależnie od użytej metody radioaktywnej lub fluorescencyjnej. Dodatkowo należy podkreślić, iż w przypadku radiokoloidu wyniki fałszywie negatywne zostały znalezione w 6.2% przypadków, a przy zastosowaniu ICG- w 11.1%.

SLNB z użyciem nowej techniki wizualizacji jakim jest wizualizacja ICG w świetle podczerwonym wydaje się być obiecującą metodą diagnostyczną. Naturalnym etapem rozwoju tej metody wydaje się być zastosowanie związku hybrydowego zaproponowanego przez zespół holenderski – czyli połączenie radiokoloidu z ICG. Badania wielośrodkowe na większej liczbie pacjentów z randomizacją pozwala na znalezienie jasnej odpowiedzi co do zastosowania tej metody w codziennej praktyce klinicznej [27].

Publikacja 4

Radio-Guided Lymph Node Mapping in Bladder Cancer Using SPECT/CT and Intraoperative γ -Probe Methods: Reply. Clin Nucl Med. 2017 Apr;42(4):327-328.

W odpowiedzi na list do redakcji w którym autorzy zaproponowali użycie ich metody statystycznej, dodatkowo sugerując błędne zastosowanie metod statystycznych w naszej publikacji. W odpowiedzi nie zgodziliśmy się z sugestiami i podtrzymaliśmy zastosowanie przez nas klasycznych metod statystycznych, które są standardowo stosowane w dostępnych publikacjach.

Podsumowanie

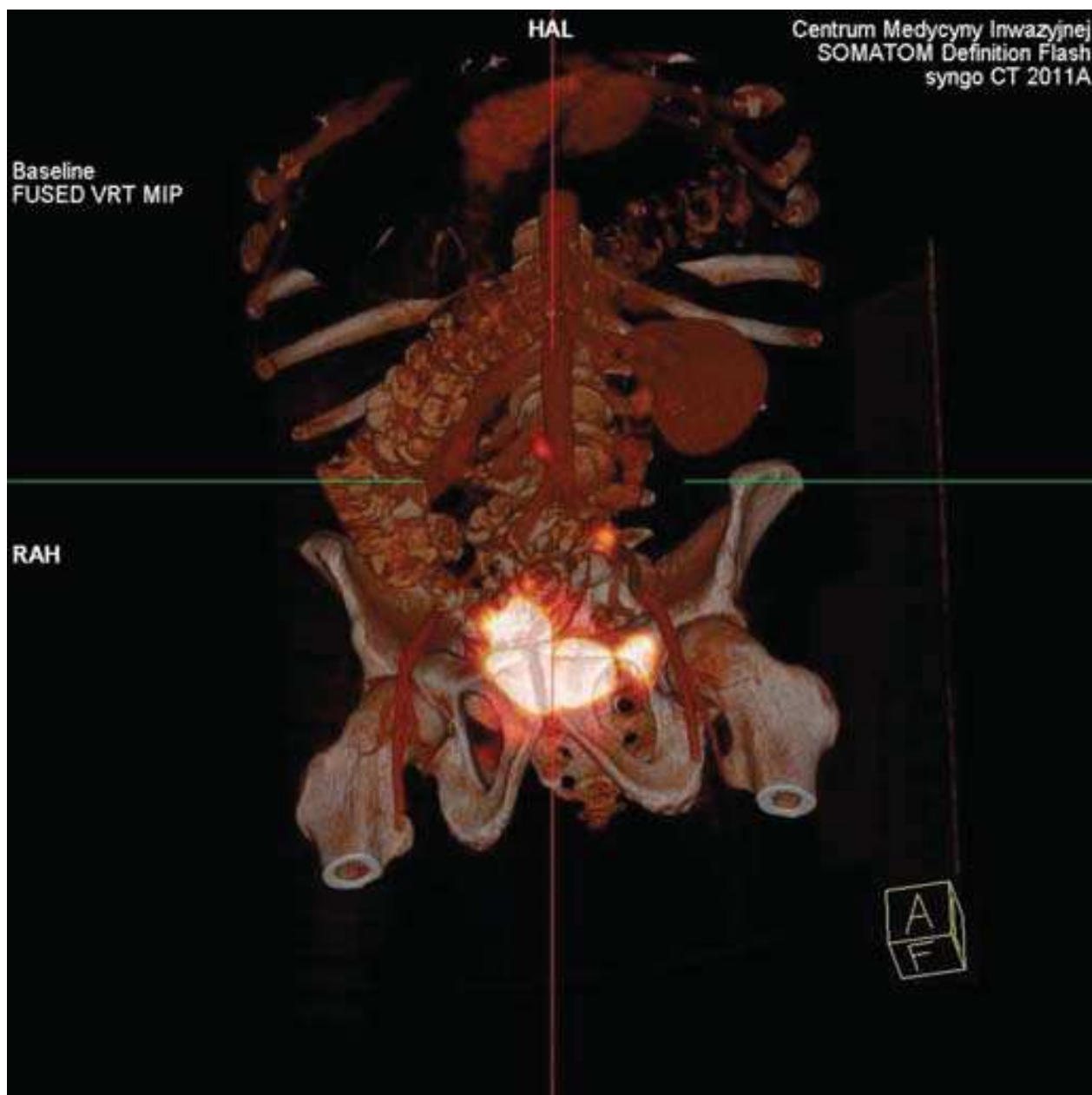
Indywidualizacja diagnostyki oraz leczenia choroby nowotworowej jest niezbędna. Zastosowanie jej w przypadku pacjentów z rakiem pęcherza moczowego ma duże znaczenie ze względu na częste zmienne, zarówno co do położenia guza w pęcherzu moczowym, jak również co do złożonej sieci układu chłonnego drenującego chłonkę z pęcherza moczowego. Zastosowanie nowych technik diagnostycznych oraz obrazujących przedoperacyjnie oraz w trakcie samego zabiegu chirurgicznego, pozwala na lepsze leczenie tych pacjentów, oraz znalezienie grupy pacjentów o niestandardowym przebiegu choroby, u których dodatkowe informacje uzyskane przed zabiegiem mogą wpłynąć na zakres wykonywanego zabiegu.

Wnioski

- 1- Zastosowanie związków fluorescencyjnych z użyciem światła podczerwonego wydaje się być nową i obiecującą metoda do badania SLNs oraz wizualizacji guzów

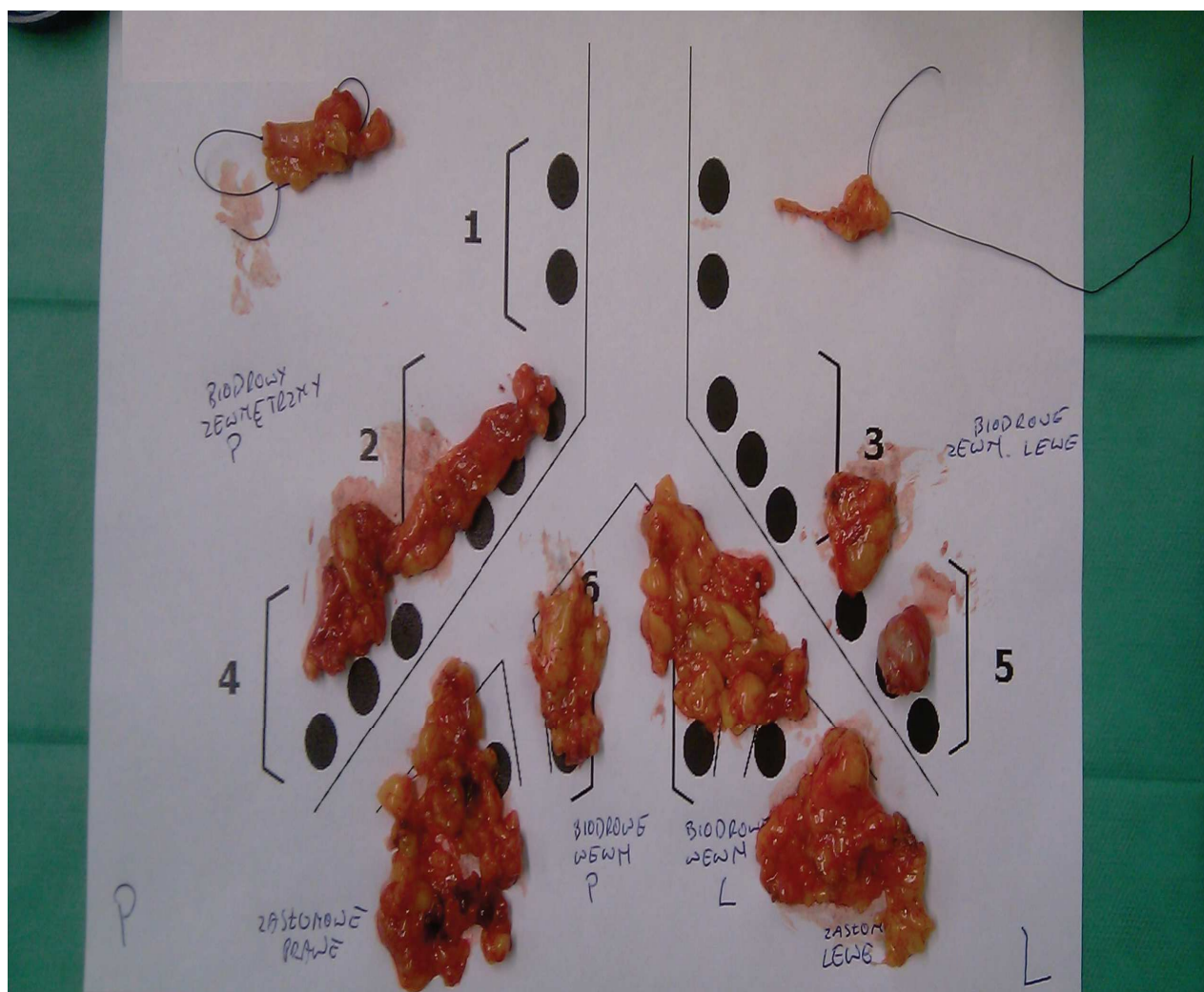
nowotworowych i ewentualnego określenia ich granic ze zdrową tkanką. Ta nowa metoda jest obecnie we wczesnym etapie rozwoju i wydaje się być obiecującym narzędziem śródoperacyjnym, które prawdopodobnie poprawi jakość oraz dokładność wykonywanych operacji.

- 2- Przedoperacyjne zastosowanie SPECT-CT do obrazowania węzłów chłonnych z wychwytem radioaktywnego znacznika pozwala na lepsze zaplanowanie zabiegu operacyjnego oraz ewentualne poszerzenie zakresu limfadenektomii o dodatkowe stacje węzłowe znajdujące się poza standardowym zakresem limfadenektomii.
- 3- Nowe techniki wizualizacji węzłów chłonnych takie jak użycie związku ICG pozwalają na ocenę w czasie rzeczywistym dróg chłonnych oraz węzłów chłonnych wartowniczych. Ta obiecująca, nowa metoda diagnostyczna wymaga dalszych badań klinicznych, jednakże dostępne wstępne wyniki wydają się być obiecujące.
- 4- SLNB w raku pęcherza moczowego nie jest procedurą standardową. W naszych publikacjach mapowanie dróg i węzłów chłonnych jako narzędzie dodatkowe do standardowej limfadenektomii miednicznej w przypadku raka pęcherza moczowego wydaje się być użytecznym sposobem optymalizacji i indywidualizacji wyników leczenia onkologicznego.



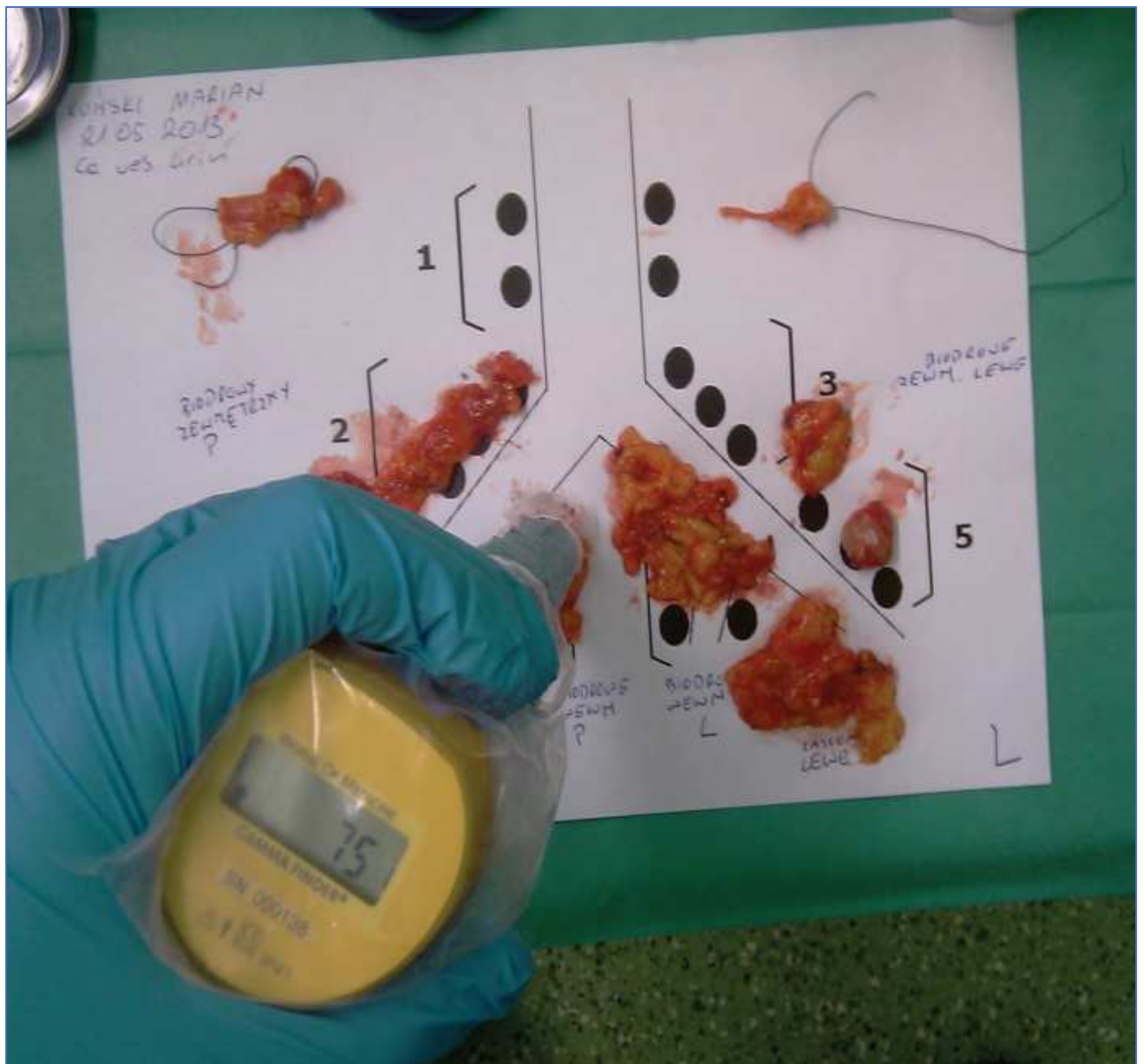
Rycina 1.

Limfoscyntygrafia SPECT/CT z rekonstrukcją trójwymiarową u pacjenta z rakiem pęcherza moczowego. Przykład umiejscowienia węzła chłonnego wartowniczego powyżej rozwidlenia aorty, poza obszarem standardowej limfadenektomii.



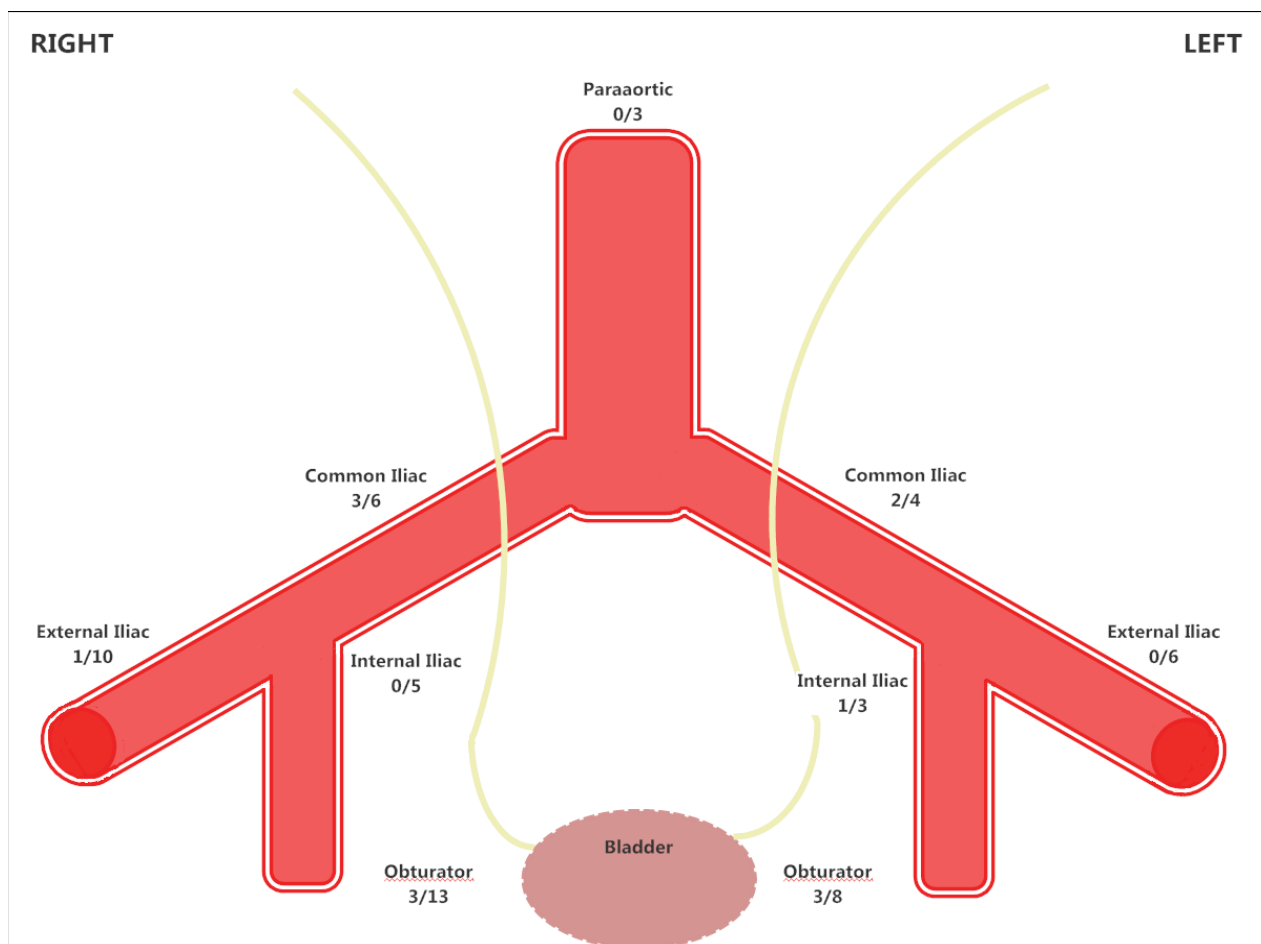
Rycina 2.

Węzły chłonne ex vivo rozłożone na schemacie splywu chłonnego miednicy.



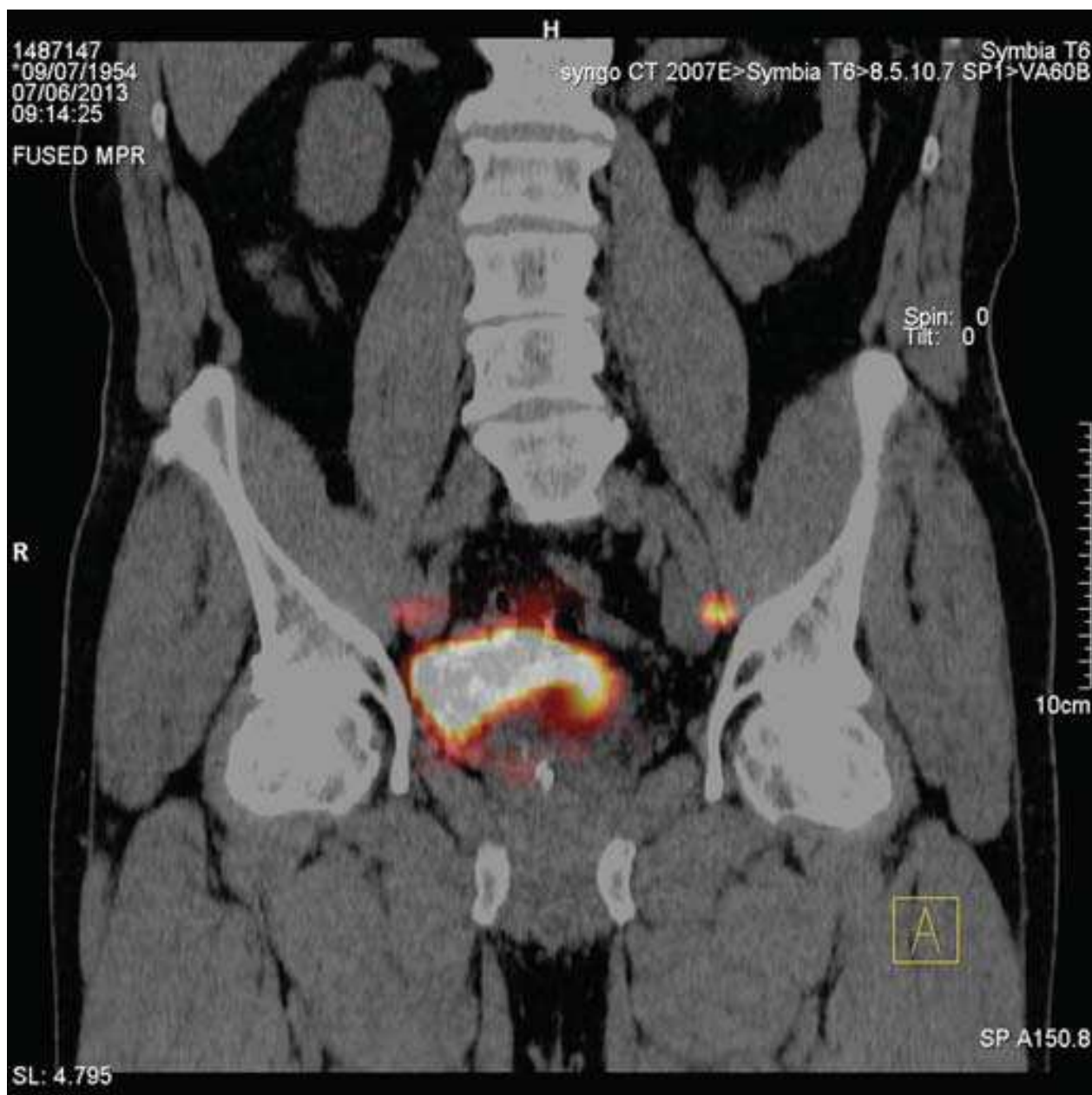
Rycina 3.

Identyfikacja radioaktywnego węzła chłonnego (węzła wartowniczego) ręczną sondą gamma.



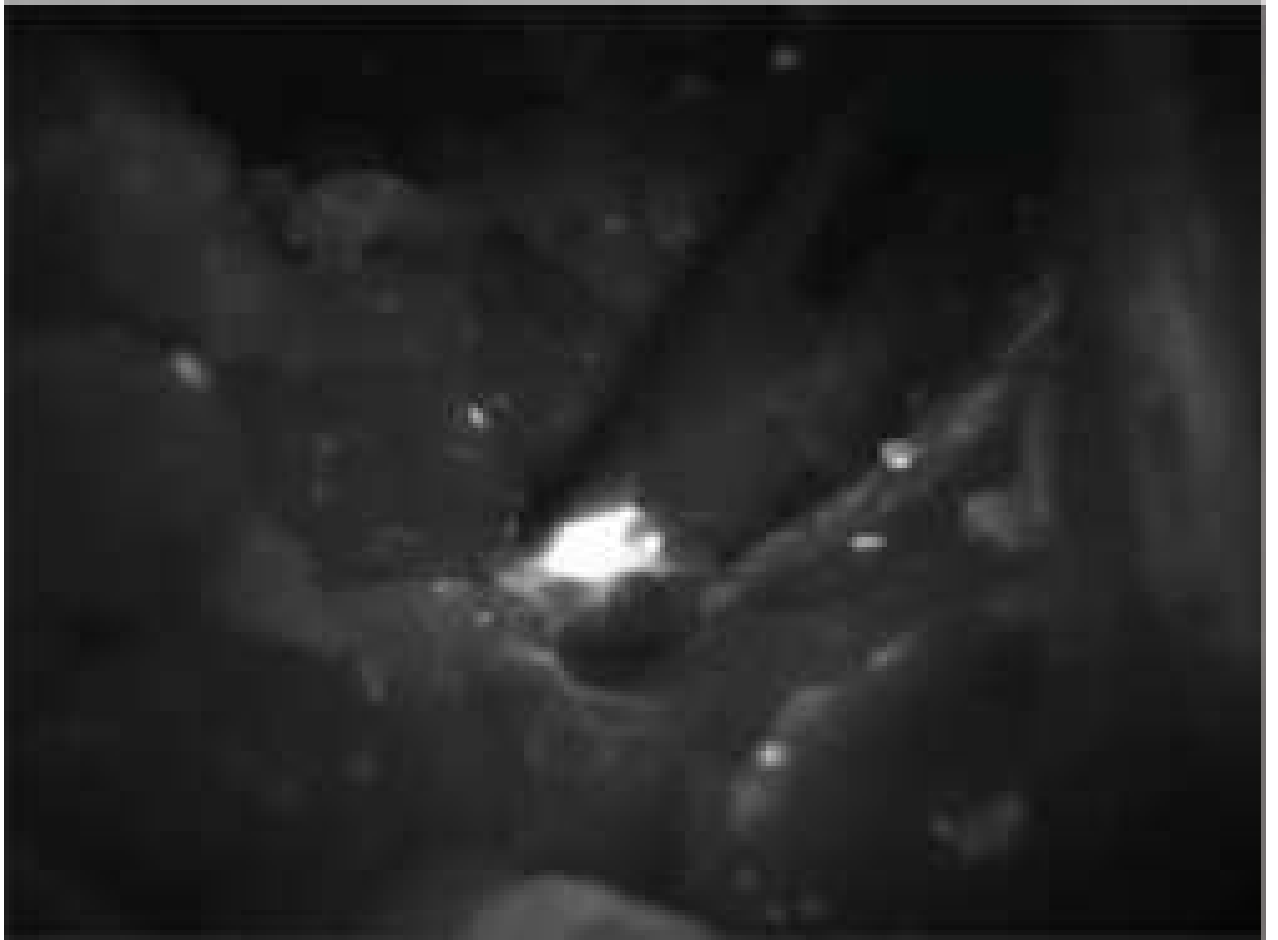
Rycina 4.

Schemat przedstawiający lokalizację sływu chłonki do pierwszych węzłów chłonnych obszaru sływu chłonnego z guza pęcherza moczowego.



Rycina 5.

Limfoscyntygrafia SPECT/CT przedstawiająca przykład przeciwnego spływu chłonnego z obszaru guza pęcherza moczowego, tak zwany „crossover phenomenon”.



Rycina 6.

Węzeł chłonny wartowniczy oznaczony związkiem fluorescencyjnym ICG widoczny
śródoperacyjnie w miednicy.



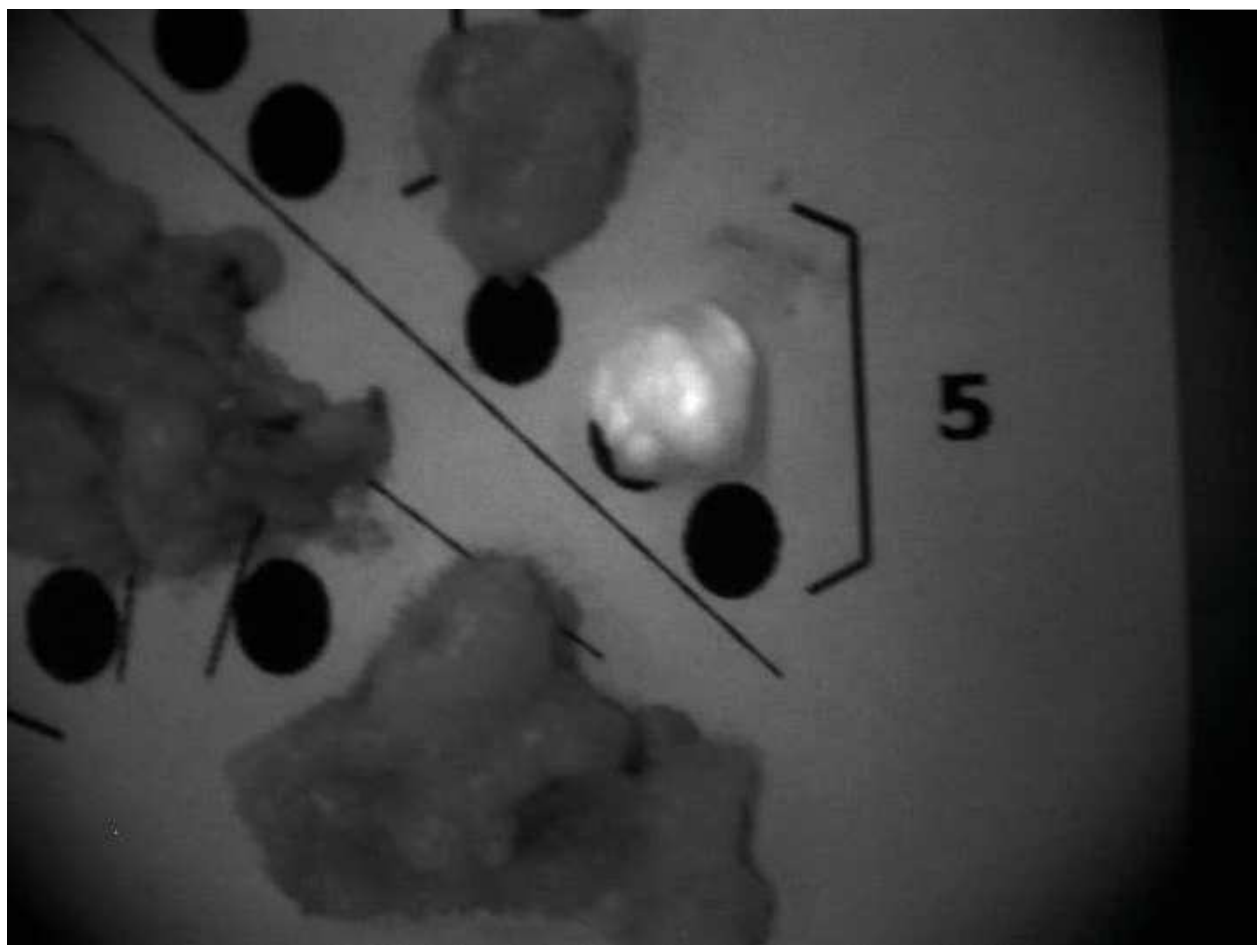
Rycina 7.

Preparat przedstawiający drogę chłoną wraz z węzłami chłonnymi po resekcji widziany w świetle białym.



Rycina 8.

Preparat przedstawiający drogę chłoną wraz z węzłami chłonnymi po resekcji widziany w świetle podczerwonym przy użyciu techniki fluorescencyjnej. Widoczny wybarwiony, fluorescencyjny węzeł chłonny.



Rycina 9.

Węzeł chłonny wybarwiony fluorescencyjnie ex-vivo na schemacie spływu chłonnego miednicy zidentyfikowany przy użyciu związku fluorescencyjnego oraz kamery na podczerwień.

Bibliografia

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL. et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015 Mar;65(2):87-108.
2. Witjes JA, Compérat E, Cowan NC. et al. European Association of Urology. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *Eur Urol.* 2014 Apr;65(4):778-92.
3. van der Pas MH, Meijer S, Hoekstra OS. et al. Sentinel-lymph-node procedure in colon and rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2011 Jun;12(6):540-50.
4. Schaafsma BE, Verbeek FP, Elzevier HW. et al. Optimization of sentinel lymph node mapping in bladder cancer using near-infrared fluorescence imaging. *J Surg Oncol.* 2014 Dec;110(7):845-50.
5. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ. et al. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. *N Engl J Med.* 2014 Feb 13;370(7):599-609.
6. Galimberti V, Cole BF, Zurrada S. et al. International Breast Cancer Study Group Trial 23-01 investigators. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2013 Apr;14(4):297-305.
7. Yashiro M, Matsuoka T. Sentinel node navigation surgery for gastric cancer: Overview and perspective. *World J Gastrointest Surg.* 2015 Jan 27;7(1):1-9.
8. Oh SY, Kim do Y, Kim YB. et al. Clinical application of sentinel lymph node mapping in colon cancer: in vivo vs. ex vivo techniques. *Ann Surg Treat Res.* 2014 Sep;87(3):118-22

9. Sherif A, De La Torre M, Malmstrom PU. et al. Lymphatic mapping and detection of sentinel nodes in patients with bladder cancer. *J Urol* 2001;166:812–815.
10. Van Den Berg NS, Buckle T, Kleinjan GI. et al. Hybrid tracers for sentinel node biopsy. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2014 Jun;58(2):193-206.
11. Reinhart MB, Huntington CR, Blair LJ. et al. Indocyanine Green: Historical Context, Current Applications, and Future Considerations. *Surg Innov*. 2015 Sep 10.
12. Polom K, Murawa D, Rho YS. et al. Current trends and emerging future of indocyanine green usage in surgery and oncology: a literature review. *Cancer*. 2011 Nov 1;117(21):4812-22.
13. Schaafsma BE, Mieog JS, Hutteman M. et al. The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *J Surg Oncol*. 2011 Sep 1;104(3):323-32.
14. Polom W, Markuszewski M, Rho YS. et al. Usage of invisible near infrared light (NIR) fluorescence with indocyanine green (ICG) and methylene blue (MB) in urological oncology. Part 1. *Cent European J Urol*. 2014;67(2):142-8.
15. Kitai T, Inomoto T, Miwa M. et al. Fluorescence navigation with indocyanine green for detecting sentinel lymph nodes in breast cancer. *Breast Cancer*. 2005;12(3):211-5.
16. Malmström PU, Ren ZP, Sherif A. et al. Early metastatic progression of bladder carcinoma: molecular profile of primary tumor and sentinel lymph node. *J Urol*. 2002 Nov;168(5):2240-4.
17. Marits P, Karlsson M, Sherif A, et al. Detection of immune responses against urinary bladder cancer in sentinel lymph nodes. *Eur Urol* 2006;49:59–70.

18. Sherif A, Garske U, de la Torre M. et al. Hybrid SPECT-CT: an additional technique for sentinel node detection of patients with invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2006 Jul;50(1):83-91.
19. Liedberg F, Chebil G, Davidsson T. et al. Intraoperative sentinel node detection improves nodal staging in invasive bladder cancer. *J Urol.* 2006 Jan;175(1):84-8.
20. Roth B, Wissmeyer MP, Zehnder P. et al. A new multimodality technique accurately maps the primary lymphatic landing sites of the bladder. *Eur Urol.* 2010 Feb;57(2):205-11.
21. Knapp DW, Adams LG, Degrand AM. et al. Sentinel lymph node mapping of invasive urinary bladder cancer in animal models using invisible light. *Eur Urol.* 2007 Dec;52(6):1700-8.
22. Motomura K, Inaji H, Komoike Y. et al. Combination technique is superior to dye alone in identification of the sentinel node in breast cancer patients. *J Surg Oncol.* 2001 Feb;76(2):95-9.
23. Markuszewski M, Polom W, Cytawa W. et al. Comparison of Real-Time Fluorescent Indocyanine Green and (99m)Tc-Nanocolloid Radiotracer Navigation in Sentinel Lymph Node Biopsy of Penile Cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 2015 Dec;13(6):574-80
24. Hojo T, Nagao T, Kikuyama M. et al. Evaluation of sentinel node biopsy by combined fluorescent and dye method and lymph flow for breast cancer. *Breast.* 2010 Jun;19(3):210-3.
25. Polom K, Murawa D, Rho YS. et al. Skin melanoma sentinel lymph node biopsy using real-time fluorescence navigation with indocyanine green and indocyanine green with human serum albumin. *Br J Dermatol.* 2012 Mar;166(3):682-3.

26. Schaafsma BE, Verbeek FP, Elzevier HW. et al. Optimization of sentinel lymph node mapping in bladder cancer using near-infrared fluorescence imaging. *J Surg Oncol*. 2014 Dec;110(7):845-50.
27. van der Poel HG, Buckle T, Brouwer OR. et al. Intraoperative laparoscopic fluorescence guidance to the sentinel lymph node in prostate cancer patients: clinical proof of concept of an integrated functional imaging approach using a multimodal tracer. *Eur Urol*. 2011 Oct;60(4):826-33.
28. Inoue S, Shiina H, Mitsui Y. et al. Identification of lymphatic pathway involved in the spread of bladder cancer: Evidence obtained from fluorescence navigation with intraoperatively injected indocyanine green. *Can Urol Assoc J*. 2012 Sep 10:1-7.
29. Manny TB, Hemal AK. Fluorescence-enhanced robotic radical cystectomy using unconjugated indocyanine green for pelvic lymphangiography, tumor marking, and mesenteric angiography: the initial clinical experience. *Urology*. 2014 Apr;83(4):824-9.
30. Lerner SP. Editorial comment on: Sentinel lymph node mapping of invasive urinary bladder cancer in animal models using invisible light. *E ur Urol*. 2007 Dec;52(6):1708-9
31. Chiu CH, Chao YK, Liu YH, Wen CT, Chen WH, Wu CY, Hsieh MJ, Wu YC, Liu HP. Clinical use of near-infrared fluorescence imaging with indocyanine green in thoracic surgery: a literature review. *J Thorac Dis*. 2016 Oct;8(Suppl 9):S744-S748
32. Rocha A, Domínguez AM, Lécuru F, Bourdel N. Indocyanine green and infrared fluorescence in detection of sentinel lymph nodes in endometrial and cervical cancer staging - a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016 Nov;206:213-219.

33. Wawroschek F, Wagner T, Hamm M, Weckermann D, Vogt H, Märkl B, et al. The influence of serial sections, immunohistochemistry and extension of pelvic lymph node dissection on the lymph node status in clinically localized prostate cancer. *Eur Urol.* 2003; 43: 132–137.
34. Scoll BJ, Uzzo RG, Chen DY, Boorjian SA, Kulkov A, Manley BJ, Viterbo R. Robotic-assisted partial nephrectomy: a large single institutional experience. *Urology* 2010; 75: 1328-1334.
35. Benway BM, Bhayani SB, Rogers CG, Dulabon LM, Patel MN, Lipkin M, et al. Robot assisted partial nephrectomy versus laparoscopic partial nephrectomy for renal tumors: a multi-institutional analysis of perioperative outcomes. *J Urol.* 2009; 182: 866-872.
36. Wang AJ and Bhayani SB. Robot assisted partial nephrectomy versus laparoscopic partial nephrectomy for renal tumors: a multi-institutional analysis of perioperative outcomes. *J Urol.* 2009; 182: 866–872.
37. Golijanin DJ, Madeb RR, Singer EA, Marshall JS, Wood RW, Reeder JE, et al. Intraoperative imaging of renal cortical tumors using near infrared fluorescence of intravenous indocyanine green. *Can Urol Assoc J.* 2007; 1: 305–332.
38. Tobis S, Knopf J, Silvers C, Yao J, Rashid H, Wu G, Golijanin D. Near Infrared Fluorescence Imaging with robotic assisted laparoscopic partial nephrectomy: Initial Clinical Experience for Renal Cortical Tumors. *J Urol.* 2011; 186: 47–52.
39. Golijanin DJ, Marshall J, Cardin A, Singer EA, Wood RW, Reeder JE, et al. Near infrared fluorescence of intravenous indocyanine green for intraoperative imaging of renal cortical tumors: a completed feasibility study. *J Urol.* 2008; suppl 179; abstr 598.

40. Niebling MG, Pleijhuis RG, Bastiaannet E, Brouwers AH, van Dam GM, Hoekstra HJ. A systematic review and meta-analyses of sentinel lymph node identification in breast cancer and melanoma, a plea for tracer mapping. *Eur J Surg Oncol*. 2016 Apr;42(4):466-73.
41. Joyce DP, Manning A, Carter M, Hill AD, Kell MR, Barry M. Meta-analysis to determine the clinical impact of axillary lymph node dissection in the treatment of invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Sep;153(2):235-40.
42. Roth B, Zehnder P, Birkhäuser FD, et al. Is bilateral extended pelvic lymphadenectomy necessary for strictly unilateral invasive bladder cancer? *J Urol*. 2012;187:1577–1582.

Abstract

Introduction

Nowadays bladder cancer is the ninth most commonly diagnosed type of tumor in the world, with approximately 429,800 new cases diagnosed, and more than 165,100 deaths annually [1]. Radical cystectomy (RC) is a treatment method of choice in muscle invasive bladder cancer (MIBC). This method increases life expectancy by approximately 50% [2, 3]. In terms of cancer recurrence, the spread of lymph nodes has a significant independent prognostic value for patients' survival [4]. The conventional methods of lymph nodes examination – both intra- and post-operative – as well as their histopathological examination do not offer satisfactory results, and consequently can leave metastases in these lymph nodes overlooked and thus undetected. In 25% of patients subjected to RC in c50 clinical stage, metastases in lymph nodes are found in post-operative histopathological examination [5]. Such patients are recommended to undergo radical cystectomy and pelvic lymph node dissection (PLND) in order to resect the tumor and conduct detailed examination of the stage of bladder cancer [6].

Nowadays the recommended extensity of PLND and the number of lymph nodes that should be resected in the procedure are still a matter of discussion. Some studies imply that PLND increases life expectancy in patients both with and without metastases in lymph nodes [7-10]. Hence, RC with PLND is a treatment and staging method of choice in case of MIBC [3]. The number of resected lymph nodes is a frequent subject of discussion – yet, interestingly, this criterion does not always reflect the quality of the performed PLND procedure. This observation is supported by autopsy results. The authors present great

individual differences in the number of lymph nodes resected in super-extended lymphadenectomy, which varied from 10 to 53 lymph nodes [11]. The described number of resected lymph nodes, depending on the extent of lymphadenectomy, varied from fewer than 5 to over 75 [12]. The current discussion regarding the extent of lymphadenectomy and the number of lymph nodes which should be resected in the procedure, requires a better assessment of the stage of the lymph nodes which are resected on the basis of the preconceived anatomical outline. Sentinel lymph node biopsy (SLND) seems to be a promising solution. This method is beneficial regarding the assessment of the lymphatic flow and cancer spread into lymph nodes in various types of cancer. Additionally, during the pathological examination of the post-operative microscopic slide, it can potentially improve nodal staging by focusing on the lymph node(s) which may be affected by metastatic cells. However, it should be stressed that in neoplasms such as bladder cancer, conducting the SLNB procedure still requires the standard assessment of the remaining, non-sentinel lymph nodes resected during the procedure.

The concept of SLNB is based on the assumption that the identification and examination of sentinel lymph node(s) which drain the tumor can provide an accurate picture of the whole lymphatic drainage of the tumor. So far, this method has been successfully applied in the treatment of breast cancer [13], malignant melanoma [14], colorectal cancer [15], penile cancer [16], as well as other neoplasms [17]. Depending on the type of tumor and the affected organ, the lymphatic drainage can be simple or complex. The simple drainage is characteristic of, for instance, breast cancer [13], malignant melanoma [14], and penile cancer [16]. In these neoplasms one can expect one, simple lymphatic drainage route, leading from the tumor to the sentinel lymph node. However, there are also numerous cancers in which the lymphatic drainage is far more complex than

this, in which it is thus difficult to predict the location and the number of sentinel lymph nodes. Such neoplasms include, among others, stomach cancer [18], colorectal cancer [15], as well as bladder cancer [19]. In all these cancers SLNB is applicable, as it can provide a more accurate staging of the neoplasm through a more detailed examination of lymph nodes. However, nowadays the application of SLNB still requires PLND when no metastases are found in SLNs, which is not the case in cancers with simple lymphatic drainage.

For MIBC, SLNB was used for the first time back in 2001 by Sherif et al. [19]. The authors managed to successfully identify sentinel lymph nodes in 11 out of 13 patients (85%). Since then, only a few authors have researched the application of SLNB in MIBC [20, 21]. This may be due to the fact that the lymphatic drainage from bladder, a spherical organ, can be highly varied – and, consequently, difficult to assess [21, 22].

In their experiment, Sherif et al. conducted intravesical injection of radioactive tracer and blue dye marker into the bladder, followed by planar lymphoscintigraphy [19]. This technique was somewhat improved by Malmström et al. The authors used a hybrid lymphoscintigraphy combined with single-photon emission computed tomography/computed tomography (SPECT-CT) in order to estimate the location of SLNs more accurately. This technique, through combining computed tomography with the results of functional scintigraphy, has increased the spectrum of available methods used for SLNs detection, especially the smaller ones [23].

A few years later Sherif et al. described the application of hybrid lymphoscintigraphy SPECT-CT as an additional technique which provides an even more accurate estimation of the location of SLNs, which improved the method of SLNs detection [24]. Additionally, a manual γ probe is used for a better intra-operative SLNs detection of

SLNs. Liedberg et al. have proved that preoperative lymphoscintigraphy combined with intraoperative SLNs detection provides further improvement of nodal staging in muscle invasive bladder cancer [25]. Unfortunately, most of these studies were conducted on relatively small groups of patients.

SLNs identification methods are constantly being improved upon. It is based on the assumption that the anatomical location of the sentinel lymph node is impossible due to the high variability in lymphatic drainage from patient to patient. Consequently, the visualisation of the SLNs through using markers is necessary in every individual case.

SLNB can be conducted in various ways, and the choice of the technique depends on the type of neoplasm. Radioactive tracers combined with nanocolloid are typically used in SLNs detection, where methylene blue is used as a substance which dyes lymph nodes, improving the intra-operative visualisation of lymph nodes. The markers are injected prior to surgery.

In the case of radioactive tracers, a manual gamma probe is used intra-operatively for tracing lymph nodes which are marked with the injected radioactive tracer. SLNB combined with indocyanine green (ICG) is a new and increasingly more commonly applied technique. Thanks to its fluorescent activity in near-infrared light, the use of ICG with a near-infrared fluorescence (NIRF) camera allows to observe not only SLNs, but also lymphatic routes from the tumor to the SLNs. ICG is a safe substance, which has for a long time been used in ophthalmology, transplantology, hepatology and cardiosurgery [12, 26]. The application of ICG for visualising lymphatic drainage and SLNs was proposed for the first time by Kirai et al. in breast cancer treatment [15]. Since then the technique has been attracting increasing interest, which has given rise to research into its application in SLNs detection in various other types of neoplasm [27-32].

When applying ICG in SLNB one has to bear in mind the downsides of both the substance and the technique [12, 26]. On the one hand, ICG is doubtlessly valuable in visualising the lymphatic drainage in real time and in visualising SLNs. On the other, the depth of fluorescence penetration through the tissue is relatively small; currently it is about 1 cm, which makes it difficult or even impossible to detect SLNs which are located deeper in the adipose tissue, especially in obese patients. It is likely that thanks to using hybrid ICG dyes it will be possible to improve this parameter and at the same time eliminate the drawbacks of this substance in the future [27].

Currently the treatment of MIBC patients is still evolving. The applied surgical techniques allow for personalizing the treatment and, whenever possible, minimizing the trauma resulting from the surgery, as well as the possible complications. There is a lot of research being conducted into laparoscopic and robotic techniques of bladder resection, and conducting extensive PLND with these techniques makes the procedures significantly more difficult. Further research is necessary in order to prove the effectiveness of individualized treatment in patients suffering from this type of neoplasm, as well as the possibility of using safer pre- and intra-operative methods. Thanks to this, personalization of the treatment can lead to improving the results in patients diagnosed with bladder cancer.

PhD thesis: list of publications

Review article:

1. **Polom W.**, Markuszewski M., Rho YS., Matuszewski M. (2014) Usage of invisible near infrared light (NIR) fluorescence with indocyanine green (ICG) and methylene blue (MB) in urological oncology. Part 1. Cent European J Urol. 67(2):142-8.

IF= 0; MNiSW= 9

Original articles:

2. **Polom W.**, Markuszewski M., Cytawa W., Lass P., Matuszewski M. (2016) . Radio-Guided Lymph Node Mapping in Bladder Cancer Using SPECT/CT and Intraoperative γ -Probe Methods. Clin Nucl Med. 41(8):e362-7.

IF= 4.278; MNiSW= 35

3. **Polom W.**, Markuszewski M., Cytawa W., Czapiewski P., Lass P., Matuszewski M. Fluorescent versus radioguided lymph node mapping in bladder cancer. Clin Genitourin Cancer. 2016 Nov 30

IF= 2.599; MNiSW= 25

Letter to the editor:

4. Połom W., Gruszecka A., Markuszewski M., Cytawa W., Lass P., Matuszesski M.
Radio-Guided Lymph Node Mapping in Bladder Cancer Using SPECT/CT and
Intraoperative γ -Probe Methods: Reply. Clin Nucl Med. 2017 Apr;42(4):327-
328.

IF= 4.278; MNiSW= 35

Total value IF = 11,155; MNiSW = 104 (updated on 04/05/2017)

In the present thesis the data from publications to which the thesis refers are marked in square brackets in the following way: [publication 1].

Characteristics of the scientific problem

Aims of the thesis:

1. To find a correlation between the type and location of bladder cancer and the location of the affected pelvic lymph nodes, by using new techniques of visualising the lymphatic drainage, and to propose the extent of lymphadenectomy for bladder resection.
2. To present a scheme of lymphatic drainage and to determine the exact location of metastases in pelvic lymph nodes in bladder cancer.

The present thesis is based on a prospective analysis of the results obtained from 38 [publication 2] and 50 [publication 3] patients diagnosed with MIBC, who underwent surgical treatment between 2012 and 2015 at the Urology Department of Medical University of Gdansk. The study was approved by the local ethics committee under the number NKBBN/87/2012 and was performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1975 Declaration of Helsinki and its later amendments. All patients included in this study gave their informed consent prior to inclusion into the study.

The aims of the thesis were achieved over the course of four academic papers published between 2014 and 2016 [publications 1-4]. The present thesis comprises two thematically consistent original papers [publications 2-3], one overview paper [publication 1], and one letter to the editor [publication 4]. Both original papers are of innovative nature, and cover the research aims as stated above [publications 2, 3]. The overview paper provides a detailed outline compiled on the basis of the literature available on Pubmed and Medline. The outline concerns the effects and the application of fluorescent substance

technologies - indocyanine green and methylene blue - as well as near-infrared light, in terms of their application in intra-operative visualization in urologic oncology, with a special focus on the application of these technologies in sentinel lymph nodes biopsy and intra-operative visualization of the extent of the tissue affected by the neoplasm, in order to assess the margin for resection. The letter to the editor which is included in this thesis [publication 4] is an answer to a comment to one of the original papers [publication 2] regarding the statistical aspects of the paper.

Publication 1

Usage of invisible near infrared light (NIR) fluorescence with indocyanine green (ICG) and methylene blue (MB) in urological oncology. Part 1. Cent European J Urol. 67(2):142-8.

This overview paper discusses the application of the new technique of intra-operative visualisation with the use of a fluorescent substance – indocyanine green (ICG) – together with near-infrared light (NIR). The technique is discussed in the following two aspects:

1. Sentinel lymph node biopsy in urologic neoplasms

Subjecting the sentinel lymph node to biopsy was suggested by Wawroshek et al. as an additional tool used in order to minimize the side effects of extensive pelvic lymphadenectomy in prostate cancer [33]. This procedure allows a better staging of lymph nodes through a more detailed pathomorphological examination of the selected sentinel lymph nodes, as well as through maximizing the total number of resected lymph nodes. The

paper discusses research into SNB with the use of ICG and NIR and the use of fluorescence.

Knapp et al. conducted a biopsy of sentinel lymph nodes in bladder cancer on an animal model [21]. The authors used intra-operative navigation thanks to a NIR camera and ICG. The first study conducted on humans with the use of intra-operative navigation through a NIR camera and ICG was conducted by Van der Poel et al. in prostate cancer [27]. They used a combination of an ICG compound with a radiotracer – ICG - ^{99m}Tc NanoCol. The study was conducted on 11 patients. It is the first publication reporting the clinical application of the so-called hybrid compound which is a combination of the two substances. The study also proved the benefits of applying these two substances at the same time.

2. Intra-operative visualisation of neoplastic lesion in order to determine the margin for resection in kidney cancer.

This is another application of fluorescent compounds and infrared light in modern intra-operative diagnostics in urology. The present standard procedure in most cases of kidney cancer is nephron sparing surgery, which consists in the total resection of the neoplasm while leaving as much of the healthy tissue as possible. Regardless of the applied technique the risk of incomplete tumor resection is estimated at 2.5-5.7% depending on the report [34-36]. The estimation of the cancer-free tissue margin is conducted by the surgeon during the operation, relying solely on their experience and the sense of sight. The application of ICG with a NIR camera seems to be useful in assessing the margin in the resection of kidney tumors. This technique has been described both in classical surgery with the use of laparotomy, as well as in endoscopic surgery with the use of robotic devices [37, 38]. It

enables the visualisation of the difference in fluorescence in infrared light between healthy and neoplastic tissue, which facilitates accurate estimation of the resection margin in tumor resection [39].

Publication 2

Radio-Guided Lymph Node Mapping in Bladder Cancer Using SPECT/CT and Intraoperative γ -Probe Methods. Clin Nucl Med. 41(8):e362-7.

The paper discusses the possibility of mapping sentinel lymph nodes in MIBC with the use of Technetium-99m. SLBN has been a method of detecting sentinel lymph nodes used in oncologic surgery for many years and is considered to be the golden standard, especially in the treatment of breast cancer and malignant melanoma [40, 41].

The present paper offers a comparison of the results of the pre-operative SLNs with the use of hybrid lymphoscintigraphy 3D SPECT/CT and intra-operative detection of radioactive lymph nodes with a manual gamma probe. The study was conducted on a group of patients without metastases in lymph nodes. Additional goals of the study included the assessment of the lymphatic drainage of the bladder tumor, together with mapping the lymph nodes and designing the scheme of lymphadenectomy whenever SLNs were found outside the extent of standard lymphadenectomy.

38 patients were included in the study. In total, we removed 535 lymph nodes (on average 14.07 per patient). In 13 patients we found metastases in lymph nodes which were tagged radioactively. In 22 patients these lymph nodes did not show any trace of metastases. In 3 patients we found no lymphatic drainage of the tumor – these patients were classified as “non-draining patients”, and excluded from further analysis.

The hybrid 3D SPECT/CT lymphoscintigraphy method allowed us to detect 58 radioactive lymph nodes. A similar result was obtained with the intra-operative detection of radioactive lymph nodes with the use of a manual gamma probe. With the latter method we also found 58 radioactive lymph nodes, however, in 2 patients the two methods offered different results. Out of these radioactive lymph nodes, 55 (94%) were found distal and caudal to the uretero-iliac crossing. In 3 patients (8.6%), radioactive lymph nodes were found outside the extent of standard lymphadenectomy, and no trace of cancerous cells was found in them. Although admittedly this group of patients is small, finding lymphatic drainage outside the standard extent of lymphadenectomy as recommended by EAU (European Association of Urology) may lead to the change in the extent of lymphadenectomy, based on the SLNB technique. In order to answer this clinical question, more research conducted on a larger group of patients is required.

Importantly, the application of the SLNB method in bladder cancer would likely allow for finding a group of patients who could benefit from extended lymphadenectomy or from minimizing the extent of the resection to sentinel lymph nodes outside the standard area of the tumor's lymphatic drainage. This is the answer to one of the research questions of the present thesis, proposing personalization of the extent of lymphadenectomy depending on the SPECT/CT results of the sentinel lymph nodes prior to the surgery (aim No 1).

The second question regarding treatment personalization in the extent of lymphadenectomy is the idea to conduct the SLNB procedure in bladder cancer. In this respect, our analysis found false-negative results in 8% of the cases. An additional goal of the paper was to find a correlation between the type and position of bladder tumor and the position of the affected pelvic lymph nodes. In our study, all the patients were diagnosed

with urothelial bladder cancer (aim No 1). In the analysed group of patients the opposite lymphatic drainage was observed in 9 patients (45%), which seems to support the hypothesis of cross-lymphatic drainage to pelvic lymph nodes, which has already been described in several papers by other authors. This finding also shows that bilateral pelvic lymphadenectomy is necessary, regardless of the location of the bladder tumor [42]. A possible explanation for this phenomenon lies in the complexity of bladder's lymphatic drainage (aim No 1). In order to fully answer the question of the personalization of the extent of lymphadenectomy in bladder cancer further, randomised research is required.

We found neoplastic cells in 13 radioactive lymph nodes. 6 out of these were the only location of metastases. On average, 1.52 radioactive lymph nodes (from 1 to 5) were identified pre- and intra-operatively. In 3 cases metastases were found through radioactive detection outside lymph nodes, and no lymphatic drainage from the tumor was observed. Such a situation could only happen due to neoplastic cells blocking the lymphatic drainage.

Aim No 2 of the present thesis was to present a scheme of the lymphatic drainage and to determine the precise location of metastases to pelvic lymph nodes in bladder cancer. Thanks to prospective determination of anatomical distribution of major lymph nodes, in order to better determine the location of sentinel lymph nodes, we devised a schematic map showing the scheme of lymphatic drainage to sentinel lymph nodes. Fig. 4 presents a summary of the locations of the lymph nodes found radioactively. The figure thus graphically presents the answer to aim No 2 of the present thesis. Currently lymphadenectomy in MIBC is based on the resection of lymph nodes from the pelvis according to the accepted anatomical template. Thus, in a way, it is a "blind" resection. The present thesis researches tools which are supposed to improve the examination of lymph nodes which are to be resected.

Publication 3

Fluorescent versus radioguided lymph node mapping in bladder cancer. Clin Genitourin Cancer. 2016 Nov 30.

The paper presents the results of a comparative analysis of two methods of intra-operative detection of sentinel lymph nodes in MIBC. The two compared methods are the standard technetium radiocolloid (RadCol) detected by a gamma ray detection probe, and experimentally- ICG detected by near infrared fluorescent (NIRF) camera. Since the latter is not a standard method, in order to verify the results each patient was subjected to routine pelvic lymphadenectomy.

The study was conducted on a group of 50 patients diagnosed with MIBC, who were subsequently subjected to cystectomy. In total, 681 lymph nodes were resected – on average 13.62 (± 4.99) per patient. 3 patients (6%) were excluded from further analysis due to the fact that no lymphatic drainage from the tumor was found in them. As in these 3 cases metastases were found in lymph nodes it may be assumed that they were responsible for the blocked lymphatic drainage. We found lymph nodes tagged with at least one tracer (radiotracer or fluorescent tracer) in 47 patients. In 16 patients at least one sentinel lymph node had metastases, whereas in 31 patients we found no metastases in sentinel lymph nodes. In 17 patients we found 56 non-sentinel lymph nodes with metastases regardless of the presence of metastases in sentinel lymph nodes. In the analyzed group of 47 patients the biopsy of sentinel lymph nodes conducted with the use of the fluorescent method detected the same lymph nodes as the radiotracer method. In 12 out of 47 patients (25.6%) the fluorescent method resulted in more tagged lymph nodes than the radioactive method. In 8

out of 47 patients (17%), in whom we found lymph nodes tagged by two methods and containing metastases, other lymph nodes also had metastases. In 3 patients (6.4%) we found sentinel lymph nodes outside the extent of standard lymphadenectomy, i.e. above the uretero-iliac crossing (aim No 1). None of these lymph nodes had metastases. The fluorescent method allows for visualising sentinel lymph nodes outside the extent of standard lymphadenectomy as well, which could facilitate the personalization of the extent of the resection of lymph nodes in MIBC resection (aim No 1).

Analyzing the whole group of 50 patients in histopathological examination of all the resected lymph nodes, we failed to identify metastases in lymph nodes through the biopsy of sentinel lymph node in 6 cases (12%), regardless of the method. Moreover, it should be stressed that the use of radiocolloid gave false-negative results in 6.2% of the cases, whereas ICG – in 11.1%.

Using the new visualization technique of ICG with a NIRF camera seems to be a promising diagnostic method. The next step should be to use a hybrid compound as proposed by the Dutch team, i.e. a compound of radiocolloid and ICG. Multicenter, randomized studies conducted on larger groups of patients should help find a clear answer to the question of the feasibility of including this method in standard clinical practice [27].

Publication 4

Answer to comment on the publication "Radio-Guided Lymph Node Mapping in Bladder Cancer Using SPECT/CT and Intraoperative γ -Probe Methods". Clin Nucl Med. 2017 Apr;42(4):327-328.

In answer to our paper, a letter was sent to the editor in which it was implied that we used wrong statistical methods, and an alternative method was suggested. In answer to the letter we disagreed with its authors, arguing that the classical statistical methodology that we used and which is commonly used in the available literature, was superior to the one suggested.

Summary

It is necessary to personalize the diagnostics and treatment of cancer. Personalization is especially important in the case of bladder cancer due to numerous variables regarding the position of the tumor in the bladder, as well as the lymphatic drainage of the tumor. The application of new diagnostic methods, as well as methods providing pre- and intra-operative visualization creates better, more effective treatment options, as well as the possibility to identify patients with a non-standard course of disease, in whom obtaining additional information prior to surgery can affect the extent of the applied procedure.

Conclusions

- 1- The use of fluorescent compounds with NIR light seems to be a new and promising method of examining SLNs and visualizing tumors, as well as assessing the safe margin of healthy tissue. This new method is currently in its early stages and seems to be a promising intra-operative tool, which is likely to improve the quality and accuracy of the surgery.
- 2- Pre-operative application of SPECT-CT for visualizing lymph nodes through the use of radioactive tracers allows for better planning of the surgical procedure

and facilitates potential extension of lymphadenectomy outside the standard extent of the procedure.

- 3- New techniques of visualizing lymph nodes, such as the use of ICG compounds, allow for real-time assessment of the lymphatic drainage and sentinel lymph nodes. This new, promising diagnostic technique requires further clinical research, however, the preliminary results which are currently available seem to be promising.
- 4- SLNB in bladder cancer is not a standard procedure. In our publications, we showed that mapping the lymphatic routes and lymph nodes as a tool accompanying the standard pelvic lymphadenectomy in bladder cancer seems to be a useful method of optimizing and personalizing the results of oncologic treatment.

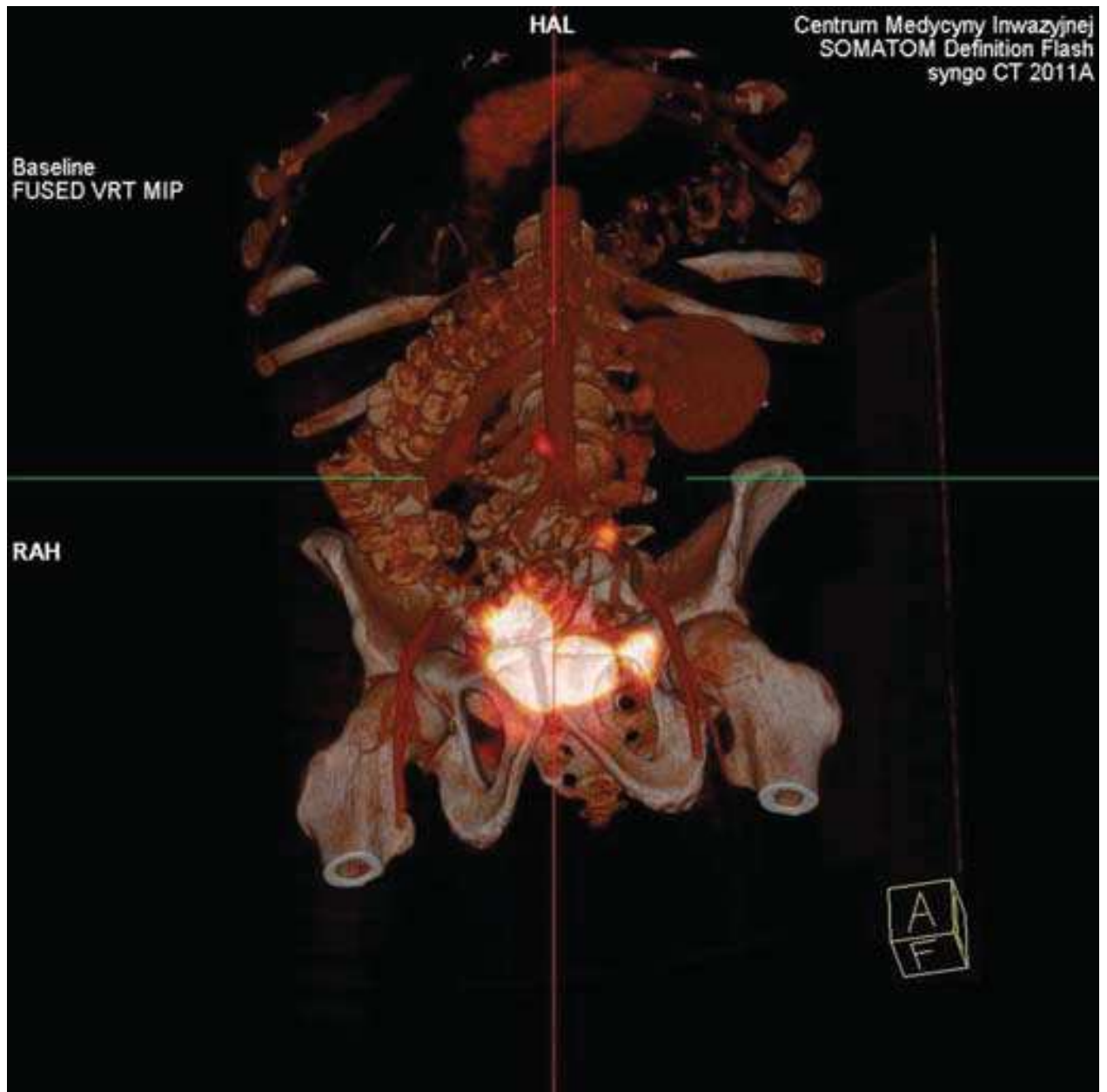


Figure 1.

SPECT / CT lymphoscintigraphy with 3D reconstruction in a patient with bladder cancer.

Example of positioning of the sentinel lymph node above the aortic bifurcation, outside the area of standard lymphadenectomy.

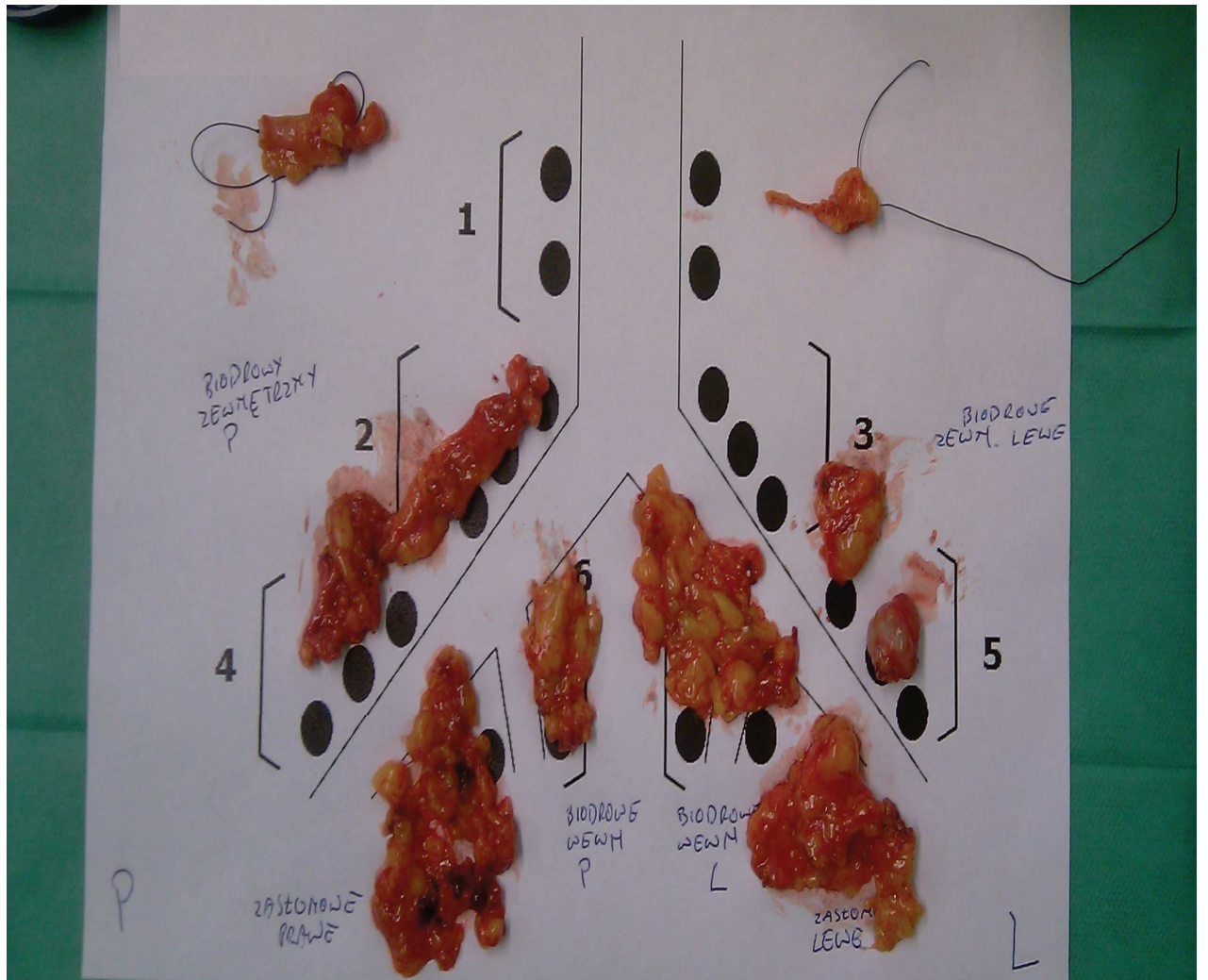


Figure 2.

Lymph nodes ex vivo visualized on the pelvic lymph drainage scheme.

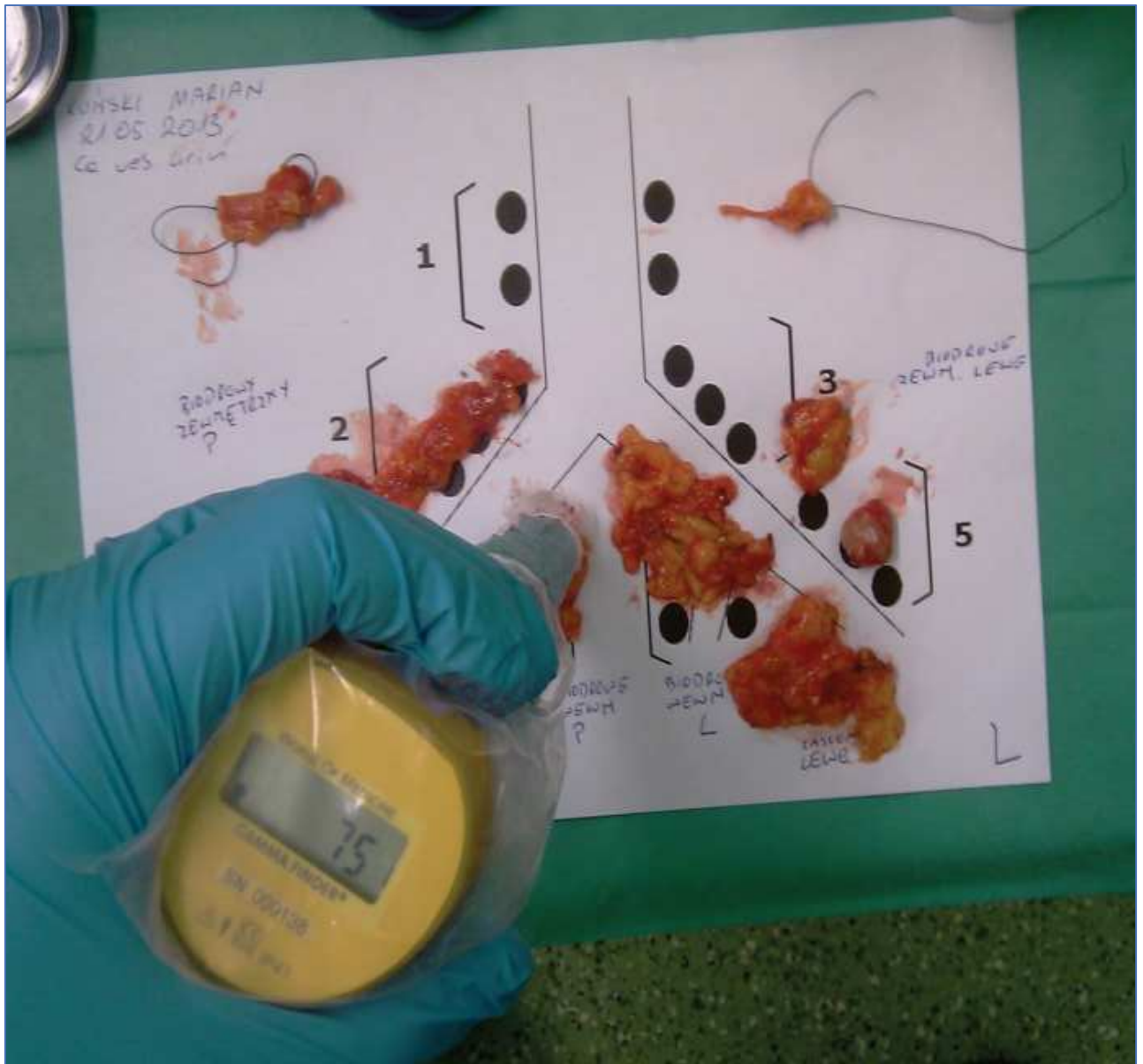


Figure 3.

Identification of the radioactive lymph node (sentinel lymph node) by a hand-held gamma probe.

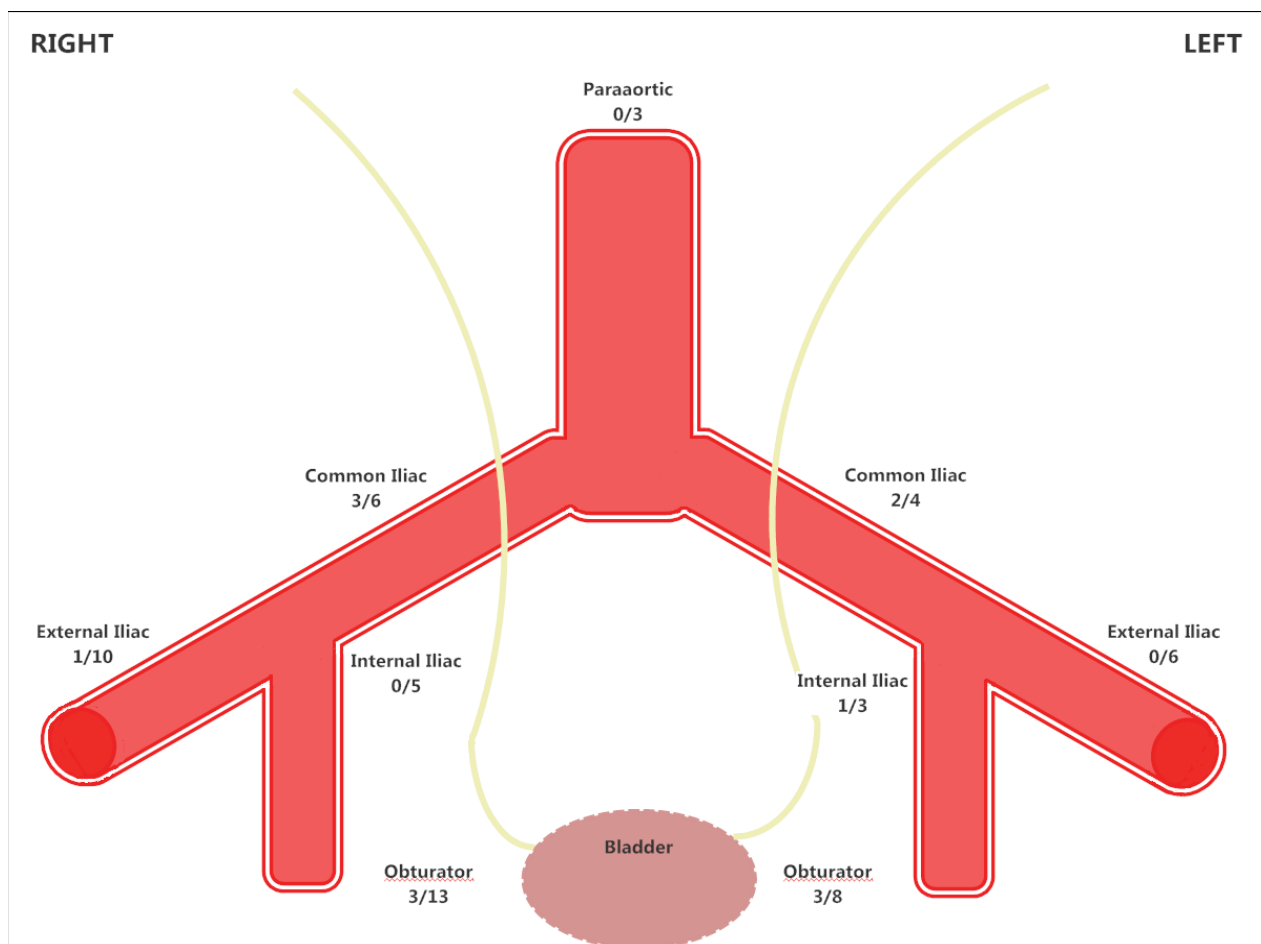


Figure 4.

Diagram presenting the localisation of the lymphatic outflow to the first lymph nodes from the bladder tumor area.

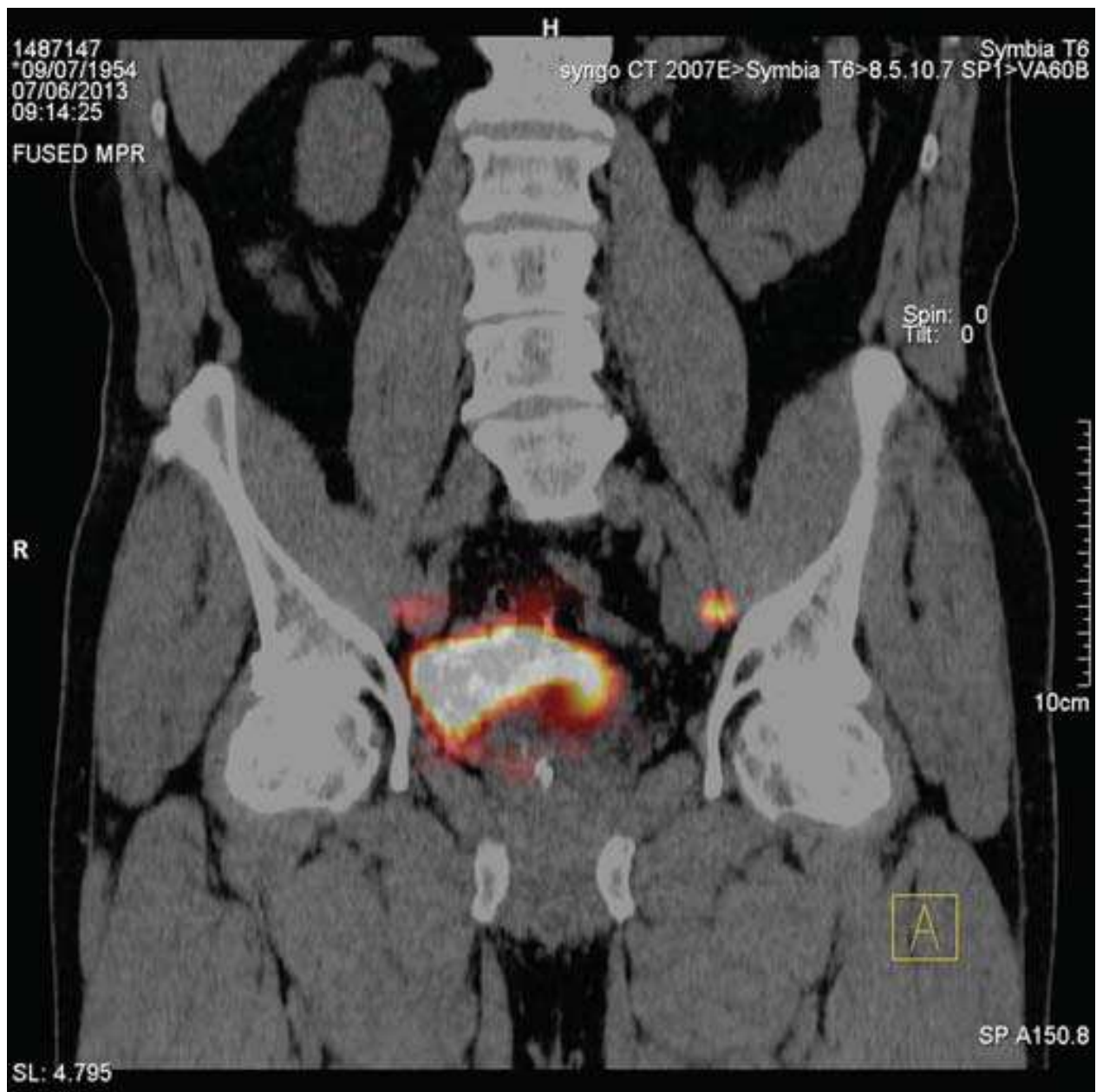


Figure 5.

SPECT / CT lymphoscintigraphy showing an example of an opposite lymphatic outflow from the bladder tumor area, the so-called "crossover phenomenon".

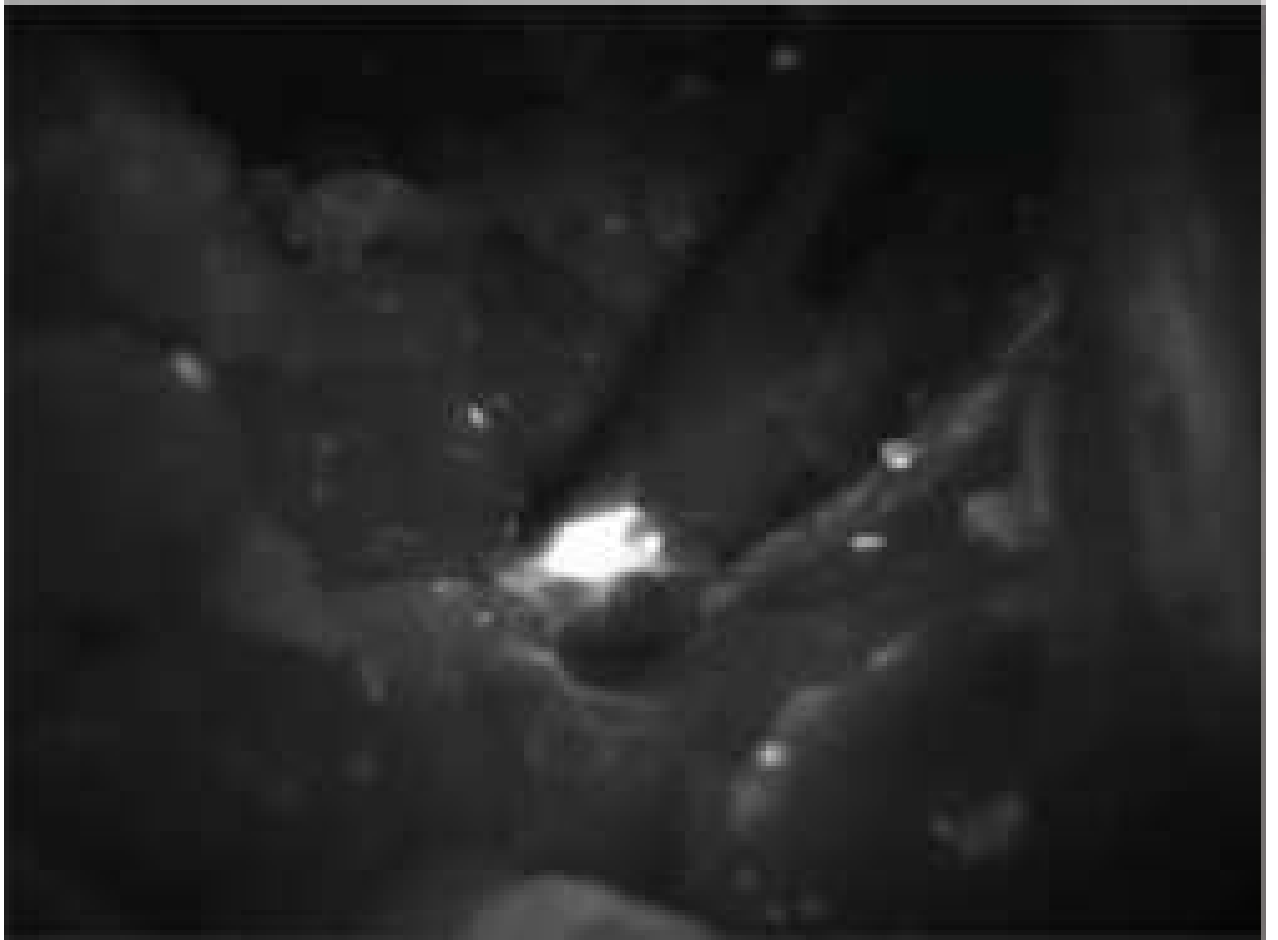


Figure 6.

Sentinel lymph node marked by ICG fluorescence compound visible intraoperatively in the pelvis.



Figure 7.

Figure shows the specimen of lymphatic pathway with lymph nodes after resection seen in white light.



Figure 8.

Figure shows the specimen of lymphatic pathway with lymph nodes seen in infrared light using fluorescence technique. Visible stained, fluorescent lymph node.

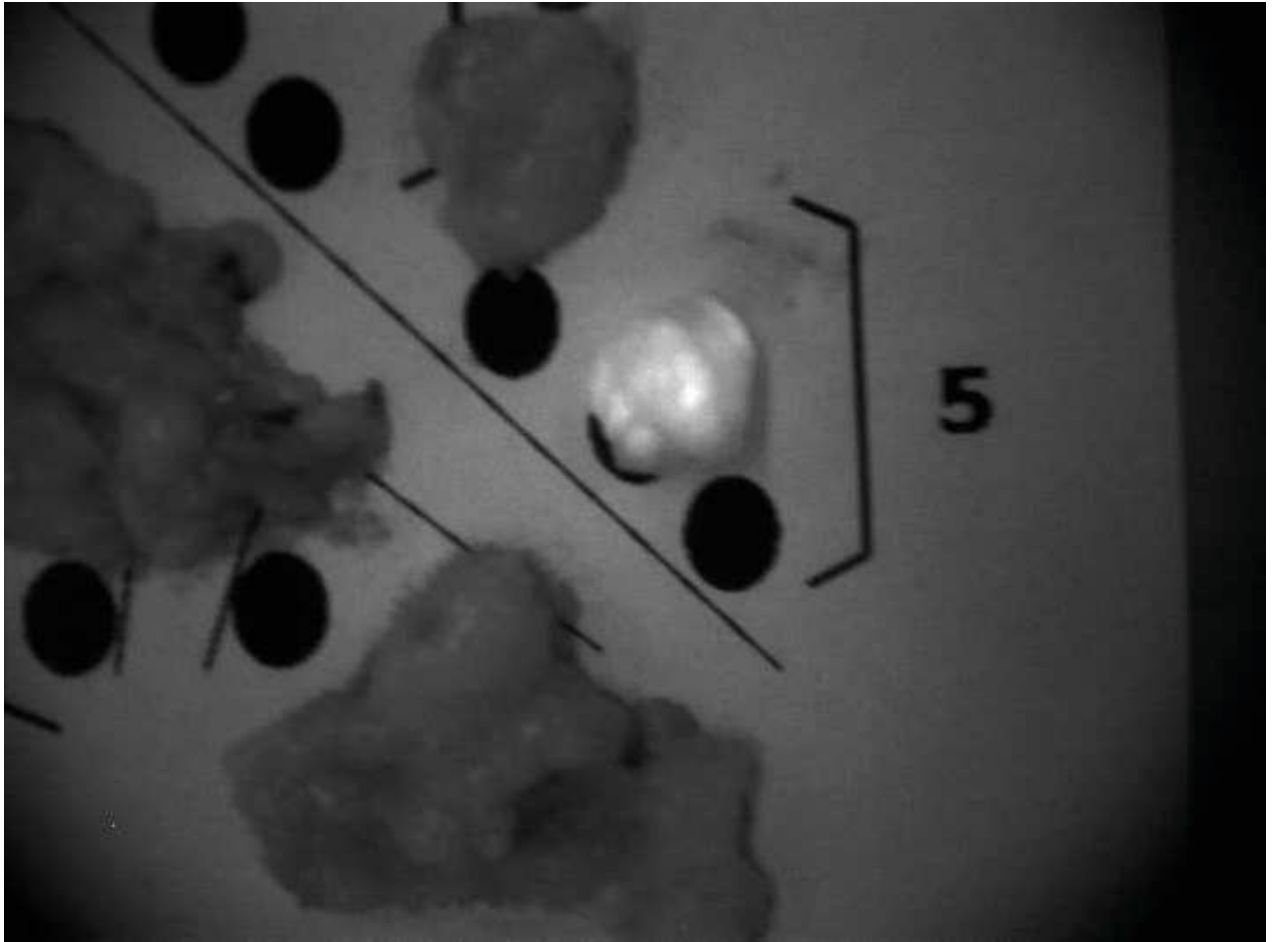


Figure 9.

Lymph node stained with fluorescent compound seen ex-vivo on the pelvic lymphatic outflow scheme seen with the use of fluorescent compound and infrared camera.

References

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL. et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015 Mar;65(2):87-108.
2. Witjes JA, Compérat E, Cowan NC. et al. European Association of Urology. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *Eur Urol.* 2014 Apr;65(4):778-92.
3. van der Pas MH, Meijer S, Hoekstra OS. et al. Sentinel-lymph-node procedure in colon and rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2011 Jun;12(6):540-50.
4. Schaafsma BE, Verbeek FP, Elzevier HW. et al. Optimization of sentinel lymph node mapping in bladder cancer using near-infrared fluorescence imaging. *J Surg Oncol.* 2014 Dec;110(7):845-50.
5. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ. et al. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. *N Engl J Med.* 2014 Feb 13;370(7):599-609.
6. Galimberti V, Cole BF, Zurrada S. et al. International Breast Cancer Study Group Trial 23-01 investigators. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2013 Apr;14(4):297-305.
7. Yashiro M, Matsuoka T. Sentinel node navigation surgery for gastric cancer: Overview and perspective. *World J Gastrointest Surg.* 2015 Jan 27;7(1):1-9.
8. Oh SY, Kim do Y, Kim YB. et al. Clinical application of sentinel lymph node

- mapping in colon cancer: in vivo vs. ex vivo techniques. *Ann Surg Treat Res.* 2014 Sep;87(3):118-22
9. Sherif A, De La Torre M, Malmstrom PU. et al. Lymphatic mapping and detection of sentinel nodes in patients with bladder cancer. *J Urol* 2001;166:812–815.
 10. Van Den Berg NS, Buckle T, Kleinjan GI. et al. Hybrid tracers for sentinel node biopsy. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2014 Jun;58(2):193-206.
 11. Reinhart MB, Huntington CR, Blair LJ. et al. Indocyanine Green: Historical Context, Current Applications, and Future Considerations. *Surg Innov.* 2015 Sep 10.
 12. Polom K, Murawa D, Rho YS. et al. Current trends and emerging future of indocyanine green usage in surgery and oncology: a literature review. *Cancer.* 2011 Nov 1;117(21):4812-22.
 13. Schaafsma BE, Mieog JS, Hutteman M. et al. The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *J Surg Oncol.* 2011 Sep 1;104(3):323-32.
 14. Polom W, Markuszewski M, Rho YS. et al. Usage of invisible near infrared light (NIR) fluorescence with indocyanine green (ICG) and methylene blue (MB) in urological oncology. Part 1. *Cent European J Urol.* 2014;67(2):142-8.
 15. Kitai T, Inomoto T, Miwa M. et al. Fluorescence navigation with indocyanine green for detecting sentinel lymph nodes in breast cancer. *Breast Cancer.* 2005;12(3):211-5.
 16. Malmström PU, Ren ZP, Sherif A. et al. Early metastatic progression of bladder carcinoma: molecular profile of primary tumor and sentinel lymph node. *J Urol.* 2002 Nov;168(5):2240-4.

17. Marits P, Karlsson M, Sherif A, et al. Detection of immune responses against urinary bladder cancer in sentinel lymph nodes. *Eur Urol* 2006;49:59–70.
18. Sherif A, Garske U, de la Torre M. et al. Hybrid SPECT-CT: an additional technique for sentinel node detection of patients with invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2006 Jul;50(1):83-91.
19. Liedberg F, Chebil G, Davidsson T. et al. Intraoperative sentinel node detection improves nodal staging in invasive bladder cancer. *J Urol.* 2006 Jan;175(1):84-8.
20. Roth B, Wissmeyer MP, Zehnder P. et al. A new multimodality technique accurately maps the primary lymphatic landing sites of the bladder. *Eur Urol.* 2010 Feb;57(2):205-11.
21. Knapp DW, Adams LG, Degrand AM. et al. Sentinel lymph node mapping of invasive urinary bladder cancer in animal models using invisible light. *Eur Urol.* 2007 Dec;52(6):1700-8.
22. Motomura K, Inaji H, Komoike Y. et al. Combination technique is superior to dye alone in identification of the sentinel node in breast cancer patients. *J Surg Oncol.* 2001 Feb;76(2):95-9.
23. Markuszewski M, Polom W, Cytawa W. et al. Comparison of Real-Time Fluorescent Indocyanine Green and (99m)Tc-Nanocolloid Radiotracer Navigation in Sentinel Lymph Node Biopsy of Penile Cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 2015 Dec;13(6):574-80
24. Hojo T, Nagao T, Kikuyama M. et al. Evaluation of sentinel node biopsy by combined fluorescent and dye method and lymph flow for breast cancer. *Breast.* 2010 Jun;19(3):210-3.
25. Polom K, Murawa D, Rho YS. et al. Skin melanoma sentinel lymph node biopsy

- using real-time fluorescence navigation with indocyanine green and indocyanine green with human serum albumin. *Br J Dermatol.* 2012 Mar;166(3):682-3.
26. Schaafsma BE, Verbeek FP, Elzevier HW. et al. Optimization of sentinel lymph node mapping in bladder cancer using near-infrared fluorescence imaging. *J Surg Oncol.* 2014 Dec;110(7):845-50.
27. van der Poel HG, Buckle T, Brouwer OR. et al. Intraoperative laparoscopic fluorescence guidance to the sentinel lymph node in prostate cancer patients: clinical proof of concept of an integrated functional imaging approach using a multimodal tracer. *Eur Urol.* 2011 Oct;60(4):826-33.
28. Inoue S, Shiina H, Mitsui Y. et al. Identification of lymphatic pathway involved in the spread of bladder cancer: Evidence obtained from fluorescence navigation with intraoperatively injected indocyanine green. *Can Urol Assoc J.* 2012 Sep 10:1-7.
29. Manny TB, Hemal AK. Fluorescence-enhanced robotic radical cystectomy using unconjugated indocyanine green for pelvic lymphangiography, tumor marking, and mesenteric angiography: the initial clinical experience. *Urology.* 2014 Apr;83(4):824-9.
30. Lerner SP. Editorial comment on: Sentinel lymph node mapping of invasive urinary bladder cancer in animal models using invisible light. *Eur Urol.* 2007 Dec;52(6):1708-9
31. Chiu CH, Chao YK, Liu YH, Wen CT, Chen WH, Wu CY, Hsieh MJ, Wu YC, Liu HP. Clinical use of near-infrared fluorescence imaging with indocyanine green in thoracic surgery: a literature review. *J Thorac Dis.* 2016 Oct;8(Suppl 9):S744-S748
32. Rocha A, Domínguez AM, Lécuru F, Bourdel N. Indocyanine green and infrared fluorescence in detection of sentinel lymph nodes in endometrial and cervical

- cancer staging - a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016 Nov;206:213-219.
33. Wawroschek F, Wagner T, Hamm M, Weckermann D, Vogt H, Märkl B, et al. The influence of serial sections, immunohistochemistry and extension of pelvic lymph node dissection on the lymph node status in clinically localized prostate cancer. *Eur Urol.* 2003; 43: 132–137.
 34. Scoll BJ, Uzzo RG, Chen DY, Boorjian SA, Kulkov A, Manley BJ, Viterbo R. Robot-assisted partial nephrectomy: a large single institutional experience. *Urology* 2010; 75: 1328-1334.
 35. Benway BM, Bhayani SB, Rogers CG, Dulabon LM, Patel MN, Lipkin M, et al. Robot assisted partial nephrectomy versus laparoscopic partial nephrectomy for renal tumors: a multi-institutional analysis of perioperative outcomes. *J Urol.* 2009; 182: 866-872.
 36. Wang AJ and Bhayani SB. Robot assisted partial nephrectomy versus laparoscopic partial nephrectomy for renal tumors: a multi-institutional analysis of perioperative outcomes. *J Urol.* 2009; 182: 866–872.
 37. Golijanin DJ, Madeb RR, Singer EA, Marshall JS, Wood RW, Reeder JE, et al. Intraoperative imaging of renal cortical tumors using near infrared fluorescence of intravenous indocyanine green. *Can Urol Assoc J.* 2007; 1: 305–332.
 38. Tobis S, Knopf J, Silvers C, Yao J, Rashid H, Wu G, Golijanin D. Near Infrared Fluorescence Imaging with robot assisted laparoscopic partial nephrectomy: Initial Clinical Experience for Renal Cortical Tumors. *J Urol.* 2011; 186: 47–52.
 39. Golijanin DJ, Marshall J, Cardin A, Singer EA, Wood RW, Reeder JE, et al. Near infrared fluorescence of intravenous indocyanine green for intraoperative imaging of

- renal cortical tumors: a completed feasibility study. *J Urol.* 2008; suppl 179; abst 598.
40. Niebling MG, Pleijhuis RG, Bastiaannet E, Brouwers AH, van Dam GM, Hoekstra HJ. A systematic review and meta-analyses of sentinel lymph node identification in breast cancer and melanoma, a plea for tracer mapping. *Eur J Surg Oncol.* 2016 Apr;42(4):466-73.
41. Joyce DP, Manning A, Carter M, Hill AD, Kell MR, Barry M. Meta-analysis to determine the clinical impact of axillary lymph node dissection in the treatment of invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Sep;153(2):235-40.
42. Roth B, Zehnder P, Birkhäuser FD, et al. Is bilateral extended pelvic lymphadenectomy necessary for strictly unilateral invasive bladder cancer? *J Urol.* 2012;187:1577–1582.

Wykaz publikacji będących przedmiotem rozprawy doktorskiej

Prace pogładowe:

1. **Polom W.**, Markuszewski M., Rho YS., Matuszewski M. (2014) Usage of invisible near infrared light (NIR) fluorescence with indocyanine green (ICG) and methylene blue (MB) in urological oncology. Part 1. Cent European J Urol. 67(2):142-8.

Prace oryginalne:

2. **Polom W.**, Markuszewski M., Cytawa W., Lass P., Matuszewski M. (2016) . Radio-Guided Lymph Node Mapping in Bladder Cancer Using SPECT/CT and Intraoperative γ -Probe Methods. Clin Nucl Med. 41(8):e362-7.
3. **Polom W.**, Markuszewski M., Cytawa W., Czapiewski P., Lass P., Matuszewski M. Fluorescent versus radioguided lymph node mapping in bladder cancer. Clin Genitourin Cancer. 2016 Nov 30

List do redakcji:

4. **Polom W.**, Gruszecka A., Markuszewski M., Cytawa W., Lass P., Matuszewski M. Radio-Guided Lymph Node Mapping in Bladder Cancer Using SPECT/CT and Intraoperative γ -Probe Methods: Reply. Clin Nucl Med. 2017 Apr;42(4):327-328.