

METODA LYMFATICKÉHO MAPOVÁNÍ A BIOPSIE SENTINELOVÉ UZLINY U KARCINOMU TRAČNÍKU

LYMPHATIC MAPPING AND SENTINEL NODE BIOPSY IN COLON CARCINOMA

ŠEFR R., COUFAL O., PENKA I., FAIT V., KAPLAN Z., ONDRÁK M., FABIAN P.¹, ŽALOUĐÍK J.

ODDĚLENÍ CHIRURGIE A ¹ ODDĚLENÍ PATOLOGIE
MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn: *Východiska:* Sentinelová biopsie je v indikovaných případech široce akceptována pro staging maligního melanomu i karcinomu prsu. Její použití u kolorektálního karcinomu je ve stadiu klinických výzkumů. Cílem studie bylo zavést metodiku lymfatického mapování a biopsie sentinelové uzliny do klinické praxe u karcinomu tračnicku, zjistit její proveditelnost a případná úskalí a vyhodnotit získané zkušenosti. *Typ studie a soubor:* Cestou prospektivní klinické studie bylo u 43 pacientů provedeno peroperační lymfatické mapování pomocí metylenové modři, fluoresceinu nebo radionavigovaně a identifikace sentinelové uzliny „in vivo“ nebo modifikovanou metodou „ex vivo“. Následovala standardní resekce tračnicku respektující kritéria chirurgické onkologie. *Metody a výsledky:* Nalezené sentinelové uzliny byly vyšetřeny mikroskopicky s běžným barvením hematoxylinem-eozinem i imunohistochemicky. Lymfatické mapování vedlo k identifikaci minimálně jedné sentinelové uzliny (SN) u všech 43 pacientů (100 %). Průměrný počet sentinelových uzlin byl 1,77; ostatních uzlin 14,51 na jeden resekat. Sentinelová uzlina správně predikovala stav spádového lymfatického řečiště ve více než 80%. V 8 případech byla SN falešně negativní. U jednoho pacienta došlo k upstagingu na základě imunohistochemického vyšetření. *Závěry:* Mapování lymfatické biopsie sentinelové uzliny u kolorektálního karcinomu je dobře proveditelný a bezpečný výkon, bez zřejmých vedlejších účinků, úspěšnost zachytu SN je vysoká. Význam sentinelové biopsie však zůstává v případě karcinomu tračnicku, oproti jiným solidním nádorům, zatím kontroverzní. Rozsáhlejší prospektivní studie se standardizovanými postupy budou nezbytné k ověření potenciálního přínosu nové metody.

Klíčová slova: kolorektální karcinom – lymfatické mapování - sentinelová uzlina – biopsie - chirurgie

Summary: *Backgrounds:* Sentinel lymph node biopsy is a widely accepted method for staging of melanoma and breast cancer in indicated cases. However, the use of the method in colorectal cancer is under clinical investigation. *Design and Subjects:* The aim of the prospective clinical study was to introduce the technique into the surgical practice in colon carcinoma, to determine the feasibility and potential problems and to evaluate the first results. 43 patients with colon cancer underwent lymphatic mapping and sentinel node biopsy using blue dye, fluorescein or lymphoscintigraphy followed by standard surgical resection. *Methods and Results:* The acquired sentinel nodes were investigated with both standard hematoxylin – eosin staining and immunohistochemical staining for cytokeratin. Lymphatic mapping adequately identified at least one sentinel node (SN) in all 43 patients. The average number of SN was 1,77; non-SN 14,51 per patient. SN correctly predicted the regional lymphatic basin status in more than 80%. The false negative SN was found out in 8 patients. One patient has been upstaged on the basis of immunohistochemical staining. *Conclusions:* Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in colon cancer is a feasible and safe method with a high SN identification rate. The role and significance of sentinel node biopsy in colon cancer is not as clear as its role in breast cancer or melanoma. Further large prospective studies with standardized techniques are needed to evaluate the potential benefit of this new method.

Key words: colorectal cancer – lymphatic mapping – sentinel node – biopsy - surgery

Úvod

Karcinom tračnicku a konečnicku představuje v České republice, vzhledem ke své vysoké incidenci i mortalitě, závažný celospolečenský problém, který se zatím nepodařilo zásadněji směřovat k lepšímu. Pokrok ve stagingu onemocnění a rozvoj molekulárních vyšetřovacích metod ke stanovení prognostických a prediktivních faktorů však dává určitou naději na zlepšení v budoucnosti.

Lokoregionální nádorové recidivy a vývoj metastáz vedou k úmrtí pacientů postižených karcinomem tračnicku nebo konečnicku (CRC) ve vysokém procentu případů. Jejich prognóza je závislá především na stadiu, v němž je onemocnění zachyceno a zahájena adekvátní léčba, přitom postižení regionálních mízních uzlin v okamžiku stanovení diagnózy je považováno za nevýznamnější prognostický faktor při absenci vzdálených metastáz.

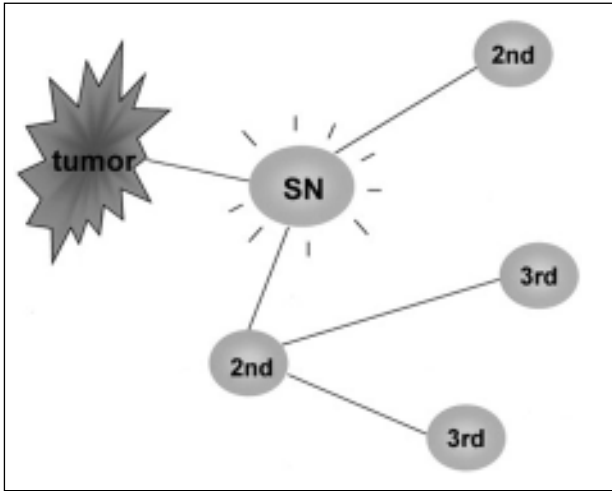
Uzlinová infiltrace ve spádové oblasti mezokolon, prokázaná klasickým histopatologickým vyšetřením, snižuje 5leté přežití na přibližně 70 až 30 % v závislosti na počtu „pozitivních“ uzlin [1].

Základním pilířem terapie je chirurgický výkon, následovaný zpravidla chemoterapií v závislosti na stadiu onemocnění. Operační výkony již tradičně zahrnují nejen resekci postiženého střevního úseku, ale též en bloc odstranění mezokolon zasahující příslušnou oblast spádové lymfatické drenáže [1,2]. Na rozsahu jejího odstranění, počtu nalezených uzlin a na důkladnosti jejich histopatologického zpracování závisí přesnost stanovení kategorie pN respektive míra rizika falešně negativního posouzení uzlinových metastáz (understaging). Také mikrometastatické postižení spádových uzlin, zachytitelné pouze speciálními vyšetřovacími metodami, může být důležitým indikátorem rizika rekurence onemocnění.

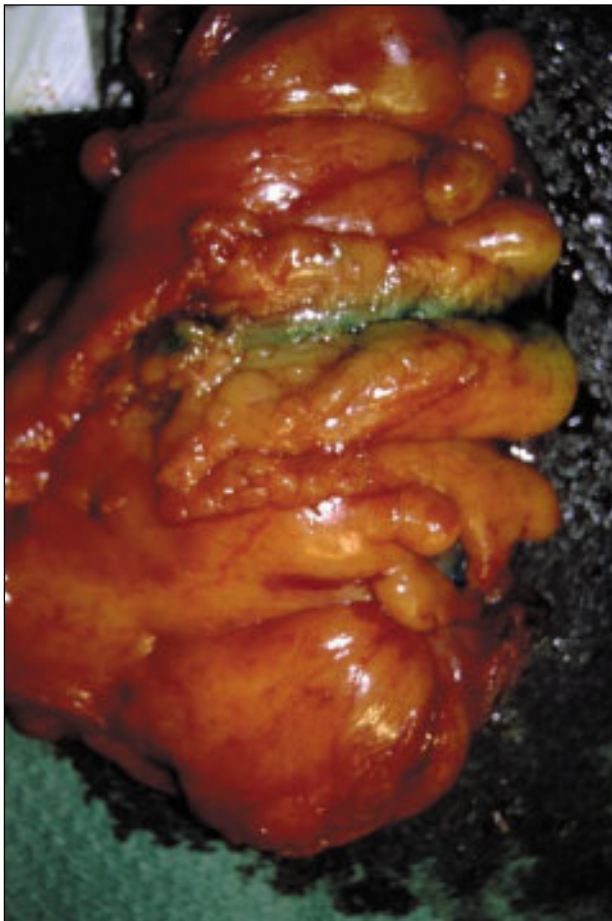
Jednou z mála možných cest jak přesně a efektivně posoudit stav spádového lymfatického řečiště u pacientů s karcinomem tračníku je lymfatické mapování a biopsie sentinelové uzliny. Základní principy vychází z poznatků a zkušeností Cabanase, Mortona a Guliana tak, jak jsou dnes úspěšně aplikovány zejména u maligního melanomu a karcinomu prsu (Obr. 1).

Materiál a metody

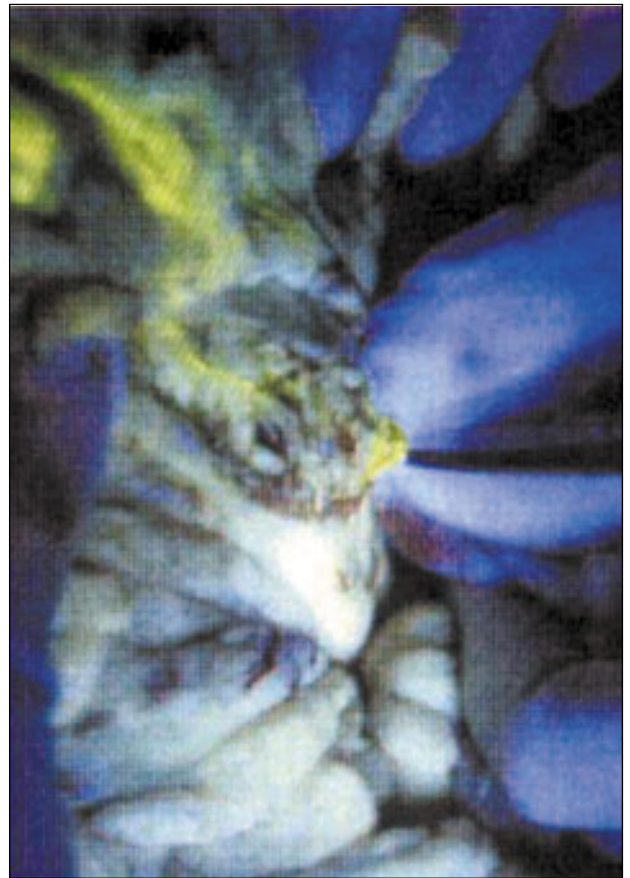
Lymfatické mapování a vyhledání sentinelové uzliny (uzlin) zpravidla nepředstavuje složitou ani nákladnou záležitost,



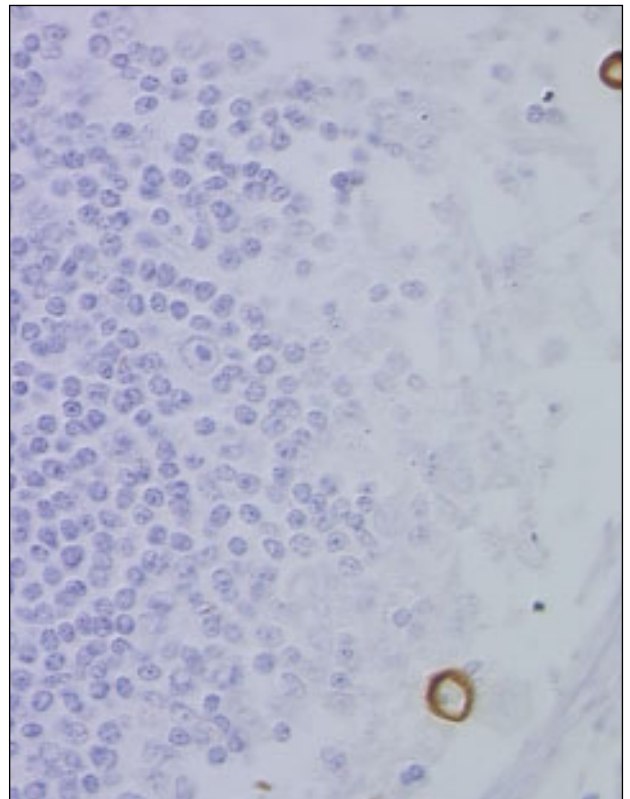
Obr. 1. Schematické znázornění sentinelové uzliny.



Obr. 2. Lymfatické mapování patentní modří na tračníku.



Obr. 3. Lymfatické mapování fluoresceinem.



Obr. 4. Solitární nádorová buňka v lymfatické uzlině (imunohistochemie cytokeratin 20).

pokud se jedná o barvení pomocí patentní modří s využitím identifikace buďto „in vivo“ nebo modifikací metodiky „ex vivo“ jak již bylo referováno [3,4]. Proto uvádíme jen stručný přehled základních kroků.

K mapování byli vybráni pacienti s biopticky prokázaným karcinomem kolon stadií Tis až T3, Nx, M0. Pacienti s nádory rekta, stejně jako s tumory jednoznačně prorůstajícími do okolních orgánů (T4) nebo předoperačně prokázanými vzdálenými metastázami byli ze souboru vyloučeni. Klinicky jednoznačně metastatické uzlinové postižení také vylučovalo lymfatické mapování.

Každý pacient byl seznámen s technikou provedení operačního výkonu a podepsal informovaný souhlas, který byl projednán a schválen Etickou komisí MOU.

Všichni nemocní prodělali standardní předoperační vyšetření včetně koloskopie, ultrasonografie jater, rtg plic, CT břicha, výběrově pak CT plic, celotělové FDG-PET vyšetření.

Operační výkon byl vždy prováděn v celkové anestezii. Po otevření a vyšetření dutiny břišní bylo co nejdříve aplikováno barvivo (Patent Blau, Guerbet, Roisse Cedex, Francie) v objemu maximálně 1–2 ml přísně subserózně ze čtyř stran do okolí tumoru tuberkulinovou stříkačkou. Zásadou byla velmi šetrná a pokud možno minimální manipulace se střevem i mezocolon před nástřikem. Nádory fixované k parietálnímu peritoneu byly šetrně uvolněny bez narušení integrity mezokolon. Často již během aplikace patentní modří bylo možné sledovat průtok indikátoru lymfatickými cévami a u astenických pacientů i jeho další postup přes mezokolon. Po 3–5 minutách byly identifikovány zpravidla 1–3 sentinelové uzliny v mezokolon přilehlém ke střevu (Obr. 2) a označeny svorkami nebo stehy (technika „in vivo“). Následovala standardní tlustostřešní resekce respektující současná kritéria chirurgické onkologie.

Variálně lze přistoupit k lymfatickému mapování pomocí fluoresceinu (Fluorescite, Alcon, USA) v zatemnění operačního sálu a osvitou operačního pole světlem typu Woodovy lampy (Obr. 3).

Tato technika je oblíbená zejména v USA, prodlužuje však operační čas více než mapování patentní modří a, jak můžeme potvrdit z vlastní zkušenosti, je náročnější na technické vybavení a provedení. Třetí možností je radionavigované mapování scintilační sondou, které je používáno ve větší míře japonskými chirurgy při operacích na žaludku. Z uvedených technik je personálně, časově, organizačně i finančně zdaleka nejnáročnější, proto její využití vidíme spíše jako metody doplňkové, zejména v případech kombinovaného mapování s některým z používaných barviv. Zcela nezbytné jsou zkušenosti operátora s touto technikou, v našem případě poznatky získané při vyhledávání sentinelových uzlin u maligního melanomu a karcinomu prsu, a úzká spolupráce s oddělením nukleární medicíny.

V literatuře je také popsána technika „ex vivo“, kdy shora uvedený postup je aplikován na resekátu již mimo operační sál [5]. Tato metodika se však nedočkala většího rozšíření a podle našeho názoru má několik slabín. Jako zásadní se jeví přerušování nervově-cévního zásobení, což nepochybně ovlivňuje motilitu a tím i transportní schopnosti lymfatických cév [4]. Nevýhodou je jistě také nepřítomnost chirurga z operačního týmu.

V současné době, po získání zkušeností s téměř 50 případy, se jeví jako nejvýhodnější vlastní modifikace metodiky, využívající spojení největších výhod obou technik. Spočívá v lymfatickém mapování „in vivo“ a identifikaci sentinelové uzliny „ex vivo“ v přísáli operačního sálu jedním ze členů operačního týmu. Nalezené zbarvené uzliny jsou označeny pro patologa stehem nebo klipem podle časové posloupnosti barvení i anatomické lokalizace a explantát je urychleně odeslán na patologické oddělení ústavu k dalšímu zpracování.

Výtěžnost i přesnost této modifikace je vyšší než u izolovaných technik, přitom neznamená větší časové zatížení nebo personální nároky. S výhodou je také využívána u obezích

pacientů (BMI>30), kde zbytnění tukové tkáně mezocolon omezuje jak vizualizaci průběhu mapování po peritumorálním nástřiku střeva, tak pozdější vyhledání sentinelové uzliny. Před ukončením operačního výkonu je vždy pátráno po zbarvených uzlinách i mimo resekční zónu.

Na souboru dosud operovaných nemocných jsme nezaznamenali žádné komplikace metody, ani v literatuře popisované alergické reakce na patentní modř či fluorescein.

Za velmi důležité považujeme histopatologické vyšetření a zhodnocení, pro které byl zvolen následující postup. Bezprostředně po dodání nefixovaného resekátu z operačního sálu je patologem vyhledána označená uzlina (uzliny) nebo zbarvená uzlina (uzliny) bez předchozího označení do počtu maximálně 4 uzlin podle anatomické lokalizace a každá z nich je zpracována následovně: celá uzlina je beze zbytku rozdělena na plátky síly 1–2 mm, jejich množství činí zpravidla 2–5, u větších uzlin i více. Každý plátek je oddělen fixován formolem a zpracován rutinní histologickou technikou do parafinových bloků. V prvním kroku jsou z každého tkáňového bločku pořízeny dva řezy síly 5 mikrometrů a obarveny standardní metodikou hematoxylin & eosin (HE). Tyto řezy jsou pozorovány ve světelném mikroskopu. Pokud je nález stran metastáz negativní, je indikováno zhotovení dvou řezů k provedení imunohistochemického průkazu cytokeratinu 20. Je-li cytokeratin 20 imunohistochemicky prokázán, označujeme výsledek za „upstaging“. Speciální vyšetření v tomto případě odhalilo metastázy, které by běžným způsobem byly přehlédnuty. Pokud je i imunoreakce negativní, je celá uzlina označena jako negativní.

Pokud se v uzlině prokážou metastázy, je uzlina klasifikována jako pozitivní. Nedosahuje-li velikost metastáz v největším rozměru 2 mm, je uzlina klasifikována jako pozitivní s mikrometastázami.

Nález roztroušených samostatných nádorových buněk nebo jejich clusterů menších než 0,2 mm je klasifikován jako negativní, ovšem s výslovným uvedením této skutečnosti v textu bioptického závěru, biologický význam tohoto stavu není zatím znám.

Pokud se v sentinelové uzlině (sentinelových uzlinách) nezjistí metastázy, ale vyšetření ostatních (nesentinelových) uzlin lymfatické metastázy prokáže, je vyšetření sentinelové uzliny považováno za falešně negativní. Může být způsobeno nedůkladným vyšetřením sentinelové uzliny anebo skutečnou nepřítomností metastázy v sentinelové uzlině, kdy jsou jako první postiženy uzliny vyššího řádu. V tom případě lze hovořit o tzv. „skip metastázách“.

Výsledky

V letech 2002–2004 bylo popsáno metodikou prospektivně vyšetřeno a vyhodnoceno celkem 43 pacientů. Do souboru bylo zařazeno 19 žen a 24 mužů průměrného věku 61,4 roků (rozmezí 18–84 let). Identifikace byla provedena „in vivo“ u 22 pacientů a modifikovanou metodou „ex vivo“ v 21 případě. V každém případě se podařilo identifikovat alespoň jednu sentinelovou uzlinu. Průměrný počet sentinelových uzlin u případů vyšetřených „in vivo“ metodou byl 1,36, při kombinované metodě 2,19. Průměrný počet sentinelových uzlin v celém souboru byl 1,77. Průměrný počet identifikovaných nesentinelových uzlin u jednoho pacienta byl 14,51. V porovnání s výsledky dosahovanými na našem pracovišti v letech 1998 až 2001 jsme tak zaznamenali výrazný nárůst celkového počtu vyšetřených uzlin.

V tabulce č. 1 (Tab. 1) je uvedeno rozdělení případů podle lokalizace primárního nádoru a počty falešně negativních vyšetření. Falešná negativita činila v případě metodiky in vivo 5 případů (62,5 %), v případě modifikované metodiky ex vivo 3 případy (25 %). U jednoho pacienta došlo k upstagingu pomocí imunohistochemického vyšetření. Jak vyplývá z lokalizace nádorů, nejčastějším operačním výkonem byla resekce (rektosigmoidu) a pravostranná hemikolektomie.

Tab. 1. Lokalizace nádorů, počty falešně negativních SN.

Lokalizace nádoru	Počet případů	Falešně negativní SN
Colon ascendens	3	1
Cékum	7	2
Colon descendens	2	1
Hepatální flexura	4	
Lienální flexura	1	
Colon transversum	3	1
Colon (recto)sigmoideum	23	3

Tab. 2. Závislost postižení uzlin na pT stádiu.

PT	počet případů	N- případů	N+ případů	% N+
Tis	1	1	0	0 %
1	4	4	0	0 %
2	10	7	3	30 %
3	26	12	14	54 %
4	2	1	1	50 %

Tabulka č. 2 (Tab. 2) zobrazuje závislost postižení lymfatických uzlin na pT stadiu nádoru. V souladu s obecně známými poznatky narůstala s pokročilostí primárního nádoru pravděpodobnost uzlinových metastáz. Pro kompletnost jsou zařazeni i dva pacienti hodnocení jako pT4. V obou případech se jednalo o fixaci ilea k nádoru tračnicku v malém rozsahu s resekci en bloc.

Diskuse

Použití metody u karcinomu tlustého střeva je založeno na známém principu, který definuje pojem sentinelová uzlina = první uzlina v řetězci spádových lymfatických drenujících oblastí primárního tumoru. Předpokládá se tedy, že i v případě karcinomu tračnicku bude tato uzlina jako první vystavena riziku invaze nádorových buněk, tedy uzlinou (případně uzlinami) nejčasněji postiženou metastatickou infiltrací [6].

Teoretické předpoklady i praktický úspěch metody, které se potvrzují u maligního melanomu i karcinomu prsu, zůstávají zatím v případě karcinomu tračnicku, případně konečnicku, nejasné. Příčin je celá řada, některé zůstávají dosud neobjasněny. K těm hlavním patří především složitější a členitější anatomicko - topografické uspořádání cévního i lymfatického zásobení střeva s množstvím individuálních variací a odchylek. Také aktuální pohled na radikální lymfadenektomie jako nedílné součásti operačního výkonu u karcinomu kolon i rekta zůstává prozatím neměnný, i když možnost významně redukovat vyšetření spádového lymfatického řečiště na jednu, dvě či tři sentinelové uzliny je lákavá, zejména v souvislosti s rozšiřováním laparoskopicky prováděných operačních výkonů. Naráží však na řadu nevyřešených problémů, z nichž zásadním zůstávají falešně negativní vyšetření. Jejich četnost na jednotlivých pracovištích kolísá až v rozmezí desítek procent vzhledem k počtu všech pN+ případů [7,8,9].

Naše dosavadní zkušenosti se nejvíce přibližují údajům publikovaným Feigem z prestižního pracoviště M.D. Andersona v Houstonu [4]. Falešně negativní výsledky kolem 40% a upstaging do 10% zůstávají dosud za očekáváním, i když na některých ústavech, zejména v USA, jsou uváděny výsledky podstatně optimističtější, což můžeme potvrdit i vlastními čísly z poslední doby [4, 10].

Dosud jen okrajově zmiňovanou a ojedinele experimentálně řešenou je otázka spolehlivého peroperačního vyšetření sentinelové uzliny včetně detekce mikrometastáz. Pro složitost a všeobecnou náročnost provedení není zatím součástí běžných protokolů ani publikačních výstupů.

Přes některé nejasnosti však metoda v sobě nese zásadní potenciál ke zpřesnění klasifikace nádorového onemocnění ve smys-

lu upstagingu a to detekcí mikrometastáz v případech, které by klasickým vyšetřením byly hodnoceny jako pN0. Dosavadní publikované údaje ovšem opět výrazně kolísají – k upstagingu došlo od 0% do více než 20% případů [7,8,9,10].

Klinický a biologický význam mikrometastatického uzlinového postižení stejně jako význam volně cirkulujících nádorových buněk zjištěných molekulárními technikami zůstává nejasný. Podobně není dosud jednoznačně prokázáno, zda těmto pacientům přinese benefit adjuvantní chemoterapie. Objevují se práce, které svědčí o prognostickém významu mikrometastáz zejména ve smyslu časnějších rekurencí, ale i studie, které tuto skutečnost nepotvrzují [6, 10, 11]. Přesto po radikální resekci primárního nádoru nádorové buňky buď vymizí nebo - v případě residuální nemoci - přetrvávají v cirkulaci. Přítomnost nádorových buněk v kostní dřevě 6 (a více) měsíců po resekci ukazuje na signifikantní dispozici k vývoji klinicky detekovatelných metastáz. Klinický význam mikrometastáz a volných nádorových buněk v uzlinách i systémovém oběhu každopádně vyžaduje další sledování.

Překvapivým, ale velmi pozitivním a vítaným zjištěním byla skutečnost, že došlo k evidentnímu nárůstu počtu hodnocených uzlin v explantátech v porovnání se souborem pacientů operovaných v letech 1998 – 2001. To lze v zásadě vysvětlit třemi způsoby. Jednak snahou o maximální radikalitu chirurgického výkonu ve smyslu objemu resekovaného mesokolon při mapování a identifikaci sentinelové uzliny, dále pak situacemi, kdy kontrastní látka proniká do míst, která by při standardní resekci nemusela být chirurgicky odstraněna, a také při pátrání po aberantní lymfatické drenáži. Lymfatické mapování tak může upozornit nejen na případný výskyt skip metastáz, ale i na méně často popisované, ale nepochybně existující aberantní lymfatické drenáže, které jsou pravděpodobně častější než se dosud předpokládalo [7, 11, 12]. Podle našeho názoru je také důsledkem dokonalejšího zpracování a vyšetření preparátů patologie při pátrání po eventuelních dalších (neoznačených) zbarvených uzlinách.

Přesto, že zatím nelze zobecňovat, jsou tyto poznatky prospěšné v situaci, kdy na řadě pracovišť jsou počty vyšetřených mizních uzlin hluboko pod požadovanými standardy pro mezinárodně uznávanou klasifikaci, a to ve vysokém procentu případů [2]. Nedokonalé a/nebo nepřesné určení důležitých prognostických ukazatelů (zejména pN) pak může zhoršovat celkové výsledky onkologické léčby i po úspěšném a dostatečně radikálním chirurgickém výkonu. Důkazem je i nejnovější, šesté vydání AJCC Cancer Staging Manual (2002), které již rozlišuje mezi mikrometastázami a izolovanými nádorovými buňkami, což se odráží i v klasifikaci postižení lymfatické uzliny a do budoucna dále zvýrazňuje nutnost jejich spolehlivého a precizního vyšetření [10]. Mapování lymfatické uzliny a biopsie vyšetření sentinelové uzliny u kolorektálního karcinomu může výrazně přispět k tomuto cíli.

Závěr

Identifikace a biopsie sentinelové uzliny u karcinomu tračnicku je při vytvoření odpovídajících podmínek a optimálního technického zázemí dobře proveditelný, bezpečný výkon, bez zřejmých negativních vedlejších účinků. Úspěšnost zachytu sentinelové uzliny je vysoká a použití této metody může vést i ke zvýšení celkového počtu vyšetřovaných uzlin.

V současné době tato metoda u karcinomu kolorekta zatím nemá jednoznačné a rozhodující klinické důsledky, jako je tomu u maligního melanomu a karcinomu prsu. Po spolehlivějším ověření této metodiky však můžeme očekávat její přínos pro upřesnění stagingu a významu uzlinových mikrometastáz a volných nádorových buněk. Další oblast využití mohou být laparoskopicky asistované operace pro kolorektální karcinom, jejichž počty ve světě trvale rostou, i když zatím nejsou zcela standardním výkonem.

Studie byla podpořena grantem IGA MZ ČR ND 7112-3/2002

Literatura

1. Gervasoni JE Jr, Taneja C, Chung MA, Cady B. Biologic and clinical significance of lymphadenectomy. *Surg Clin North Am*, 2000, 80, s. 1631-73.
2. Coufal O, Svobodník A, Žaloudík J, et al: Faktory ovlivňující vyšetřování mizních uzlin v resekcích karcinomů kolon a rektu. *Klinická onkologie*, 2004, 17, s. 96–100.
3. Šefr R, Fait V, Penka I, et al: Mapování lymfatických uzlin u vybraných karcinomů trávicího ústrojí. *Rozhl. Chir.*, 2002, 81, s. 454-458.
4. Šefr R, Penka I, Coufal O, et al: Biopsie sentinelové uzliny u kolorektálního karcinomu – pilotní studie. *Rozhl. Chir.*, 2003, 82, s. 486-491.
5. Wong J, Steineman S, Christiano C, et al: Ex vivo sentinel node mapping in carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg.*, 2001, 233, s. 515-521.
6. Cox CE, Yeatman T, Salud CJ, Bass SS. Significance of sentinel node micrometastasis. *Cancer Control*, 1999, 6, s. 601-605.
7. Esser S, Reilly TW, Riley LB, et al: The role of sentinel lymph node mapping in staging of colon and rectal cancer. *Dis Colon Rectum*, 2001, 44, s. 850-854.
8. Joosten JJA, Stroble LJA, Wauters CAP, et al: Intraoperative lymphatic mapping and the sentinel node concept in colorectal carcinoma. *Br J Surg*, 1999, 86, s. 482-486.
9. Merrie AEH, Van Rij AM, Phillips LV, et al: Diagnostic use of the sentinel node in colon cancer. *Dis Colon Rectum*, 2001, 44, s. 410-417.
10. Bilchik AJ, Saha S, Wiese D, et al: Molecular staging of early colon cancer on the basis of sentinel node analysis: a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol*, 2001, 19, s. 1128-36.
11. Schlag PM. The sentinel node concept: more questions raised than answers provided? *The Oncologist*, 1998, 3, s. 165-170.
12. Thorn M. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy: is the method applicable to patients with colorectal and gastric cancer? *Eur J Surg*, 2000, 166, s. 755-758.