

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Старкова М.В., Славнова Е.Н., Зикиряходжаев А.Д.

ПРИМЕНЕНИЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ИММУНОЦИТОХИМИИ В ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКЕ МЕТАСТАЗОВ В СТОРОЖЕВЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ ПРИ РАННЕМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 125284, Москва, Россия

Цель исследования - показать возможности флюоресцентной иммуноцитохимии при срочном интраоперационном исследовании сторожевых лимфатических узлов при раннем раке молочной железы. Авторами проанализированы данные состояния лимфатических узлов у 94 больных, прооперированных по поводу раннего рака молочной железы с декабря 2016 г. по январь 2018 г. в отделении реконструктивно-пластической хирургии молочной железы и кожи МНИОИ им. П.А.Герцена. В результате использования радиофармпрепарата «Технефит^{99m}Tc» во время операции выделяли сторожевые лимфатические узлы (ЛУ), состояние которых оценивали методом срочного цитологического исследования. В сложных для диагностики случаях применяли флюоресцентную иммуноцитохимию, что позволило избежать гипо- и гипердиагностики у 30 больных с диагнозом раннего рака молочной железы. Чувствительность срочного цитологического метода исследования отпечатка сторожевых ЛУ составила 83,3%, специфичность – 100%, эффективность – 83%, прогностическая ценность положительного результата – 83,3%, а отрицательного результата – 100%. Таким образом, диагностическая точность срочного цитологического исследования сторожевого лимфатического узла составила 94%.

Ключевые слова: сторожевые лимфатические узлы; срочное интраоперационное цитологическое исследование; флюоресцентная иммуноцитохимия.

Для цитирования: Старкова М.В., Славнова Е.Н., Зикиряходжаев А.Д. Применение флюоресцентной иммуноцитохимии в интраоперационной диагностике метастазов в сторожевых лимфатических узлах при раннем раке молочной железы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (1): 31-36. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-31-36>

Для корреспонденции: Славнова Елена Николаевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. отд-ния онкоцитологии; e-mail: slawnowaelena@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 09.09.2021

Принята к печати 17.11.2021

Опубликовано 28.01.2022

Starkova M.V., Slavnova E.N., Zikiryakhodzhaev A.D.

APPLICATION OF FLUORESCENT IMMUNOCYTOCHEMISTRY IN INTRAOPERATIVE DIAGNOSTICS OF METASTASES IN SENTINEL LYMPH NODES IN EARLY BREAST CANCER

Moscow Scientific Research Institute of Oncology named by P.A. Herzen –branch of the Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center of Radiology» of the Ministry of Health of Russia, 125284, Moscow, Russia

The aim of the study was to show the possibilities of fluorescent immunocytochemistry in urgent intraoperative examination of sentinel lymph nodes in patients with early breast cancer. The authors analyzed the data on the state of the lymph nodes in 94 patients with early breast cancer who had been operated on since December 2016 to January 2018 in the Department of reconstructive plastic surgery of the breast and skin of the P.A. Herzen Moscow Oncological Institute. As a result of the use of the «Tekhnefit^{99m}Tc» radiopharmaceutical during the operation, sentinel lymph nodes were isolated, the state of which was assessed by the method of urgent intraoperative cytology. In difficult-to-diagnose cases, fluorescent immunocytochemistry was used, which made it possible to avoid hypo- and overdiagnosis in 30 patients with early breast cancer. The sensitivity of the urgent cytological method for examining the sentinel lymph nodes smears was 83.3%, the specificity – 100%, the efficiency – 83%, the predictive value of a positive result – 83.3%, and the predictive value of a negative result – 100%. Thus, the diagnostic accuracy of urgent cytological examination of the sentinel lymph node was 94%.

Key words: sentinel lymph nodes; urgent intraoperative cytological examination; fluorescent immunocytochemistry.

For citation: Starkova M.V., Slavnova E.N., Zikiryakhodzhaev A.D. Application of fluorescent immunocytochemistry in intraoperative diagnostics of metastases in sentinel lymph nodes in early breast cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (1): 31-36 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-31-36>

For correspondence: Slavnova E. N., Doctor of Medicine, PhD, Leading Researcher; e-mail: slawnowaelena@yandex.ru

Information about authors:

Starkova M.V., <https://orcid.org/0000-0003-4141-8414>;
Slavnova E.N., <https://orcid.org/0000-0003-2307-4355>;
Zikiryakhodzhaev A.D., <https://orcid.org/0000-0001-7141-2502>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 09.09.2021

Accepted 17.11.2021

Published 28.01.2022

Введение. Цитологический метод достаточно давно применяется в интраоперационной диагностике с целью верификации метастазов в лимфатических узлах [1]. Срочное интраоперационное цитологическое исследование лимфатических узлов (ЛУ) во многом определяет выбор рационального объема и характера оперативного вмешательства [1,2].

В настоящее время на предоперационном этапе под контролем компьютерной и ультразвуковой диагностики можно получить тонкоигольные аспирационные биоптаты из опухолей, но не всегда возможно адекватно оценить состояние лимфатического коллектора. В современной хирургии имеется две основные тенденции: 1 – проведение расширенной лимфаденэктомии; 2 – сохранение лимфатического коллектора с удалением и исследованием сторожевых ЛУ, что диктует важность точной оценки состояния лимфатического коллектора [3, 4]. Таким образом, показания к расширенной лимфаденэктомии и удалению сторожевых ЛУ определяется состоянием лимфатического барьера, которое адекватно оценить визуально не всегда представляется возможным.

Отсутствие метастазов в сторожевых ЛУ при раннем раке молочной железы позволяет применять органосохраняющее лечение с щадящей тактикой в отношении лимфатического коллектора.

Предоперационная объективная оценка состояния зон регионарного метастазирования не всегда возможна. В лимфатических узлах, макроскопически не подозрительных по метастатическому поражению при микроскопическом исследовании, в 30% выявляются метастазы, и в таком же проценте наблюдений в увеличенных плотных ЛУ метастазы не выявляются. Полученные данные определяют необходимость интраоперационного морфологического изучения лимфатического барьера. Гистологическое исследование небольшого количества ЛУ может привести к неадекватной оценке распространенности опухолевого процесса, исследование большого числа ЛУ требует значительной затраты времени, что в интраоперационных условиях не выполнимо. При рутинном гистологическом исследовании ЛУ ошибка может достигать 25%. Эту ситуацию можно преодолеть, используя многоступенчатые срезы и иммуногистохимию, но на это уходит много времени и этот метод сложно применить в условиях срочного интраоперационного исследования [5-13]. Срочное интраоперационное цитологическое исследование ЛУ является альтернативой гистологическому методу и требует гораздо меньших затрат времени и средств [14, 15,]. Но при цитологическом исследовании возможны ошибки, которые носят характер гипо- и гипердиагностики. Возможны сложности цитологической диагностики по единичным опухолевым клеткам. Объективная оценка метастатического поражения лимфатических узлов возможна с помощью иммуноцитохимического исследования (ИЦХИ). Однако иммунопероксидазное ИЦХИ проводится

в плановом порядке и занимает по времени 2.5–3 часа. В отделении онкоцитологии МНИОИ им. П.А.Герцена разработана технология и получен патент на интраоперационную флюоресцентную иммуноцитохимическую диагностику метастатического поражения лимфатических узлов, позволяющая интраоперационно, в течение 20 мин объективно оценить характер поражения лимфатических узлов [16–18].

В настоящее время биопсия сигнальных ЛУ при раке молочной железы в зарубежных странах входит в критерии современных рекомендаций, таких, как NCCN, ASCO, ESMO и др. [19–21]. В Российской Федерации, согласно протоколу клинической апробации «Метод биопсии сигнальных (сторожевых) лимфатических узлов у больных операбельными (ранними) стадиями рака молочной железы cT1-2N0M0 как компонент органосохраняющего или функционально щадящего лечения», утвержденному Минздравом России 19.11.16 г., можно использовать в качестве клинических испытаний радиоизотопный коллоид Технефит ^{99m}Tc. В качестве срочной интраоперационной диагностики сторожевых ЛУ используют, в основном, гистологическое исследование.

Цель исследования – показать возможности флюоресцентной иммуноцитохимии при срочном интраоперационном исследовании сторожевых лимфатических узлов при раке молочной железы.

Материал и методы. С декабря 2016 г. по январь 2018 г. в отделении реконструктивно-пластической хирургии молочной железы и кожи МНИОИ им. П.А.Герцена были проведены клинические исследования для диагностики состояния ЛУ у 94 больных с диагнозом раннего рака молочной железы. Идентификацию сторожевого ЛУ проводили в три этапа:

1. предоперационная визуализация сторожевого ЛУ с использованием радиоизотопного коллоида;
2. интраоперационная детекция сторожевого ЛУ с использованием портативного гамма-датчика;
3. срочное интраоперационное исследование сторожевого ЛУ.

Для предоперационной визуализации сторожевого ЛУ использовали радиоизотопный препарат «Технефит^{99m}Tc» производства фирмы «Диамед» (Россия) (регистрационный номер: ЛС-00002365 от 28.09.2011 г.).

Для визуализации сторожевого ЛУ за 1,5–2 ч до предполагаемого хирургического вмешательства больным вводили 1 мл радиофармпрепарата (РФП). Введение выполняли периареолярно, со стороны квадранта, соответствующего проекции опухоли, внутрикжно и подкожно, предварительно обработав зону инъекции раствором антисептика.

Через 25-30 минут после введения препарата всем больным проводили сцинтиграфию в режиме однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) и в режиме совмещенной однофотонной

эмиссионной компьютерной томографии, совмещенной с рентгеновской компьютерной томографией (ОФЭКТ-КТ). Для исследования использовали однофотонный компьютерный томограф, совмещенный с рентгеновской компьютерной томографией Discovery NM/CT 670 (General Electric, США).

Полученные в ходе исследования данные сцинтинограммы позволяли определить зону интенсивного накопления РФП в месте введения, «дорожку» от первичного очага до сторожевого лимфатического узла и очага накопления препарата, соответствующие количеству и локализации выявленных сторожевых лимфатических узлов.

Интраоперационную детекцию сторожевого лимфатического узла проводили с помощью портативного гамма-детектора Gamma Finder® II (W.O.M World of Medicine AG., Германия).

В условиях операционной с помощью гамма-детектора выполняли оценку локализации лимфатического узла и показателей интенсивности накопления РФП. После этого выполняли выделение и удаление сторожевого лимфатического узла с помощью электрокоагуляции.

После удаления сторожевой ЛУ направляли в цитологическое отделение для проведения срочного цитологического исследования.

Срочное цитологическое исследование включало в себя три этапа: выполнение разреза лимфатического узла, взятие соскоба и микроскопическое заключение. В случае небольшого размера сторожевого лимфатического узла ≤ 5 мм выполняли разрез лимфатического узла в одной плоскости, в случае более крупного размера лимфатического узла ≥ 5 мм – в 2–3 параллельных плоскостях.

Далее брали соскобы с поверхностей плоскостей всех срезов сторожевого лимфатического узла с последующей окраской азури-эозиновыми смесями с использованием набора для быстрого окрашивания Лейкодиф 200. Изучение материала проводили с помощью микроскопа LEICA DMLS 2 (Германия). В случаях, вызывавших затруднение в постановке диагноза, проводили дополнительное исследование – флуоресцентное ИЦХИ. С целью выявления опухолевых клеток применяли эпителиальный антиген Ber-EP4 FITC. Данный антиген представляет молекулу адгезии эпителиальных клеток и состоит из двух гликопротеинов молекулярной массой 34 и 39 кД, которые находятся преимущественно на поверхности клеточной мембраны почти всех эпителиальных клеток, за исключением некоторых видов плоского эпителия, гепатоцитов, проксимальных отделов эпителия почечных канальцев, желудочных париетальных и миоэпителиальных клеток. Элементы лимфатического узла Ber-EP4-отрицательны. Ber-EP4 является маркером клеток эпителиальной природы, его экспрессия отмечается в клетках широкого спектра новообразований эпителиального происхождения, включая мелкоклеточный, недифференцированный рак и нейроэндокринные опухоли. Для флуоресцентного ИЦХИ использовали жидкостные препараты, приготовленные с помощью центрифуги Cytospin 3. Это позволило получить монослой клеток, сконцентрировать клеточные элементы на ограниченном участке, обеспечило сохранность клеточных структур, снизило содержание в препарате фоновых элементов, сэкономило дорогостоящие реактивы.

Материалом для проведения флуоресцентного ИЦХИ служили клеточные суспензии, полученные при соскобах с ЛУ.

1. Клеточный материал, полученный при соскобе с ЛУ, помещали в специальную питательную среду накопления, находящуюся в микропробирке (800 мкл), для получения клеточной суспензии.

2. Хорошо перемешанную клеточную суспензию вносили по 100 мкл на дно каждой пробирки, добавляли 5 мкл моноклонального антитела Ber EP4 FITC и перемешивали 5с на вортексе.

3. Контроль качества проводили окрашиванием двух цитоспиновых препаратов методом срочной интраоперационной цитологической окраски. При наличии в мазках достаточного количества клеточного материала (200–300 клеток), проводили флуоресцентное ИЦХИ оставшихся неокрашенных цитопрепаратов.

4. Материал инкубировали 30 мин в темноте в холодильнике (2–8°C). В процессе инкубации происходила реакция взаимодействия поверхностных антигенов со специфическим антителом Ber-EP4 FITC, меченным соответствующим флюорохромным красителем с образованием комплексов антиген + антитело.

5. Затем взвесь клеток распределяли по 50-100 мкл в контейнеры центрифуги Cytospin 3 и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут.

6. Полученные препараты окрашивали ядерным флуоресцентным красителем Dapi.

7. Затем осуществляли микроскопию полученных препаратов.

При добавлении к клеточной суспензии моноклональных антител Ber-EP4 FITC, конъюгированных с флюорохромами, происходило связывание их с поверхностными антигенами клеток, возбуждение флуоресценции и последующая ее регистрация при длине волны 488 нм (в спектре Green). Последующую диагностику проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Imager M1 (Carl Zeiss, Германия). Реакцию оценивали качественно. Мембранное окрашивание наблюдали при проведении реакции с эпителиальным антигеном Ber-EP4 FITC. При оценке результатов ИЦХИ принимали во внимание интенсивность и полноту окрашивания. При наличии в исследуемом материале опухолевых клеток при микроскопической визуализации отмечали мембранную экспрессию маркера на клетках рака молочной железы, представленную ярким зеленым окрашиванием по периферии клеток (рис. 1, а, б).

Нами отмечены некоторые особенности экспрессии эпителиального маркера Ber-EP4 FITC, выявляемые при флуоресцентной микроскопии. Характерной особенностью является хорошо выраженная четкая мембранная реакция в виде секреторных вакуолей, которые располагались на поверхности клетки, иногда в виде своеобразного кружева. Наблюдала также отрыв цитоплазмы в виде секреторных вакуолей. Такой характер экспрессии характерен для клеток аденогенного рака. Наличие таких клеток не вызывало сомнений в их эпителиальной природе. Для предотвращения гипердиагностики метастазов рака в ЛУ учитывали, что макрофагальные элементы, присутствующие в лимфатических узлах, захватывают частицы красителя и выглядят как светящиеся включения в цитоплазме (рис.2, а, б). Срочное гистологическое исследование не проводили.

Результаты. Оценка эффективности метода биопсии сторожевого ЛУ с использованием срочного цитологического исследования была проанализирована в группе 94 больных с диагнозом рака молочной железы.

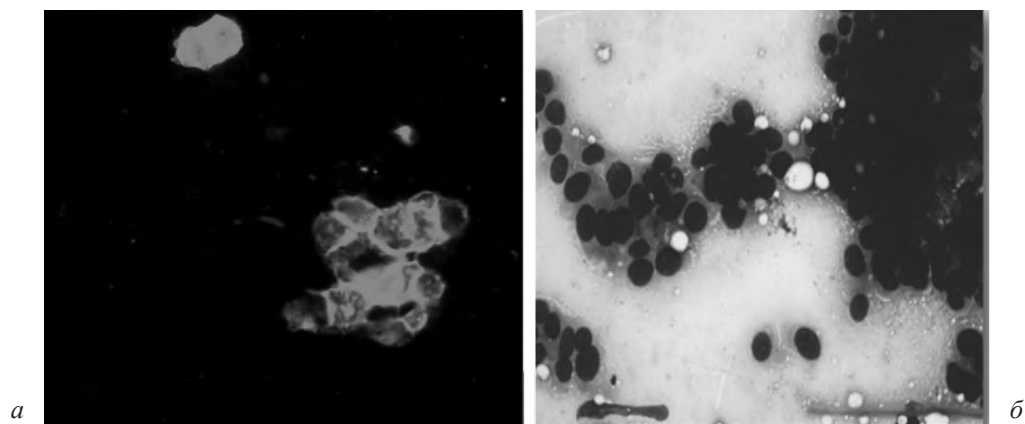


Рис. 1. Макростаза в сторожевой лимфатический узел.
a – ИЦХИ с VerEp4FITC; *б* – традиционная цитология. Окраска азур-эозином. Ув. х40.

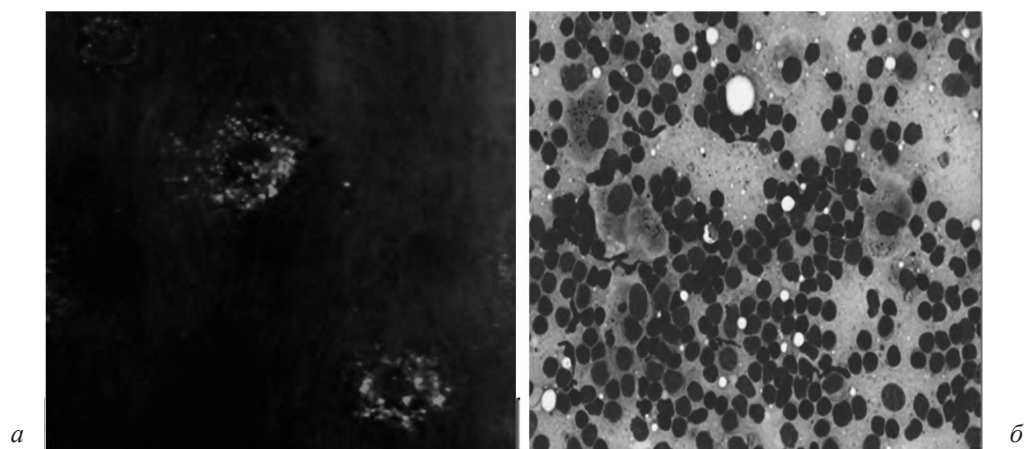


Рис. 2. Гиперплазированный лимфатический узел с синус-гистиоцитозом.
a – ИЦХИ с VerEp4FITC; *б* – традиционная цитология. Окраска азур-эозином. Ув. х40.

Наиболее часто у 68 больных из 94 (72,3%) при биопсии выявляли один сторожевой ЛУ, два сторожевых ЛУ обнаружено у 17 (18,1%) больных и только у 9 (9,6%) больных были диагностированы три сторожевых ЛУ.

При срочном цитологическом исследовании метастатическое поражение выделенного сторожевого ЛУ было выявлено в 25 (26,6%) наблюдениях, в то время как при плановом гистологическом исследовании – в 30 (32%). У 5 (5,3%) больных при срочном исследовании не удалось выявить метастатическое поражение сторожевого ЛУ. Таким образом, ошибка цитологического исследования составила 16,1% от всех выявленных случаев метастатического поражения сторожевого ЛУ. У 30 больных применяли флюоресцентное ИЦХИ, с помощью которого у 15 больных с сомнительной цитологической картиной удалось установить метастазы рака молочной железы и избежать гиподиагностики, а у остальных 15 больных отвергнуть наличие метастазов. Трудности возникали при микрометастазах (рис. 3, *a*, *б*), когда опухолевых клеток в цитологическом препарате было мало, при метастазе дольчатого рака молочной железы, когда опухолевые клетки имели небольшие размеры, сравнимые с лимфоцитами и располагались разрозненно. При выраженном синус-гистиоцитозе гистиоцитарные элементы могут ошибочно быть приняты за опухолевые клетки.

Именно в этих случаях необходимо флюоресцентное ИЦХИ. Анализ чувствительности, специфичности, точности и прогностической ценности метода срочного цитологического исследования был проведен на основе оценки положительных и отрицательных результатов срочного цитологического и планового гистологического исследования сторожевого ЛУ. В 64 (68%) из 94 (100%) случаев при срочном цитологическом исследовании отпечатков с разрезов сторожевого ЛУ метастазы не были выявлены, что расценивалось как истинно отрицательный результат. В 25 (26,6%) из 94 клинических наблюдений обнаружены злокачественные клетки, что соответствовало истинно положительному результату. В 5 (5,3%) из 94 случаев случаях при срочном исследовании злокачественные клетки не определялись, однако, при проведении планового гистологического исследования были выявлены метастазы, что расценивалось как ложноотрицательный результат срочного цитологического исследования. Ни одного случая ложноположительного результата срочного цитологического исследования зафиксировано не было, что явилось результатом применения флюоресцентного ИЦХИ в сложных для цитологической диагностики наблюдениях (см. таблицу).

Основываясь на полученных данных анализа, чувствительность срочного цитологического метода ис-

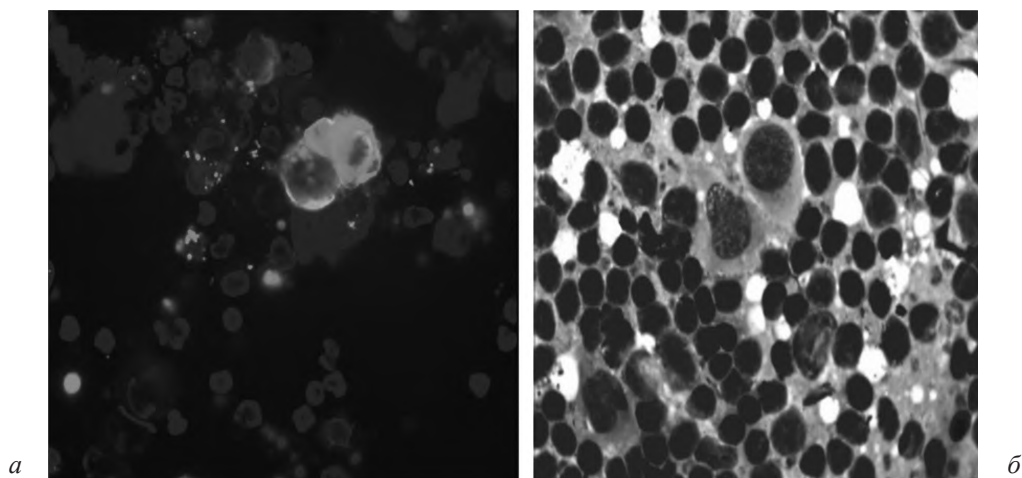


Рис. 3. Микрометастаз рака молочной железы в сторожевой лимфатический узел.
 а – ИЦХИ с VerEр4FITC; б – традиционная цитология. Окраска азур-эозином. Ув. х63.

Анализ чувствительности и специфичности срочного цитологического исследования сторожевого лимфатического узла

Показатели	Плановое гистологическое исследование сигнальных ЛУ		Общее число	
	с метастазами	без метастазов		
Срочное цитологическое исследование сигнальных ЛУ	С метастазами	ИП - 25	ЛП - 0	25
	Без метастазов	ЛО-5	ИО-64	69
	Всего	30	64	94

Примечание. ЛП – ложноположительный результат, ИП – истинно положительный результат, ЛО – ложноотрицательный результат, ИО – истинно отрицательный результат.

следования отпечатка сигнального ЛУ составила 83,3%, специфичность – 100%, эффективность – 83%, прогностическая ценность положительного результата – 83,3%, а прогностическая ценность отрицательного результата – 100%. Таким образом, диагностическая точность срочного цитологического исследования сторожевого лимфатического узла была равна 94%. При оценке дополнительно удаленных лимфатических узлов после выполненной регионарной лимфодиссекции у 7 (7,4%) из 94 больных было выявлено поражение сторожевого ЛУ в комбинации с поражением дополнительно выделенных ЛУ, а у 6 (6,4%) из 94 (100%) больных было выявлено изолированное метастатическое поражение дополнительно выделенных несторожевых ЛУ.

Заключение. Срочное цитологическое исследование с точностью до 94% позволяет оценить статус сторожевого лимфатического узла. Показатели исследования во многом зависят от техники диссекции и взятия цитологического материала. В трудных случаях диагностики, таких как микрометастазы с наличием лишь единичных опухолевых клеток в цитологическом мазке, метастазы дольчатого рака, когда опухолевые клетки трудно отличить от лимфоидных элементов, выраженный синус гистиоцитоз, необходимо применять флуоресцентное ИЦХИ, позволяющее в течение 20 мин объективно оценить цитологическую картину. Флуоресцентное ИЦХИ позволяет избежать гипо- и гипердиагностики в интраоперационной цитологической оценке поражения сторожевых ЛУ при раннем раке молочной железы.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5-13, 19-21 см. REFERENCES)

1. Волченко Н.Н., Славнова Е.Н., Мельникова В.Ю., Ермолаева А.Г., Борисова О.В. Срочная интраоперационная морфологическая диагностика в онкологии. *Новости клинической цитологии России*. 2014; 18 (1-2): 33-4.
2. Волченко Н.Н., Славнова Е.Н. Современная цитологическая диагностика онкологических поражений лимфатических узлов. *Новости клинической цитологии России*. 2014; 18(1-2): 32-3.
3. Волченко Н.Н., Гладунова З.Д., Славнова Е.Н., Ермолаева А.Г., Мельникова В.Ю. Возможности цитологического метода в выявлении метастатического поражения лимфатических узлов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009; 62(12): 39-43.
4. Волченко Н.Н., Гладунова З.Д., Славнова Е.Н., Ермолаева А.Г., Мельникова В.Ю. Цитологический метод в выявлении метастатического поражения лимфатических узлов. *Российский онкологический журнал*. 2010; 3: 9-12.
14. Волченко Н.Н., Борисова О.В., Ермолаева А.Г., Мельникова В.Ю., Петров А.Н., Славнова Е.Н. Срочная интраоперационная морфологическая диагностика в онкологии. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*. 2015; 4(4): 5-11.
15. Волченко Н.Н., Борисова О.В., Мельникова В.Ю., Ермолаева А.Г., Глухова Ю.К., Славнова Е.Н. Срочная морфологическая диагностика в онкологии. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*. 2020; 9(1): 5-13.
16. Волченко Н.Н., Славнова Е.Н., Борисова О.В. Интраоперационная флуоресцентная иммуноцитохимическая диагностика распространенного опухолевого процесса (медицинская технология). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена; 2012.
17. Славнова Е.Н., Волченко Н.Н. Срочная флуоресцентная иммуноцитохимическая диагностика метастатического поражения лимфатических узлов. Патент РФ №2582275; 2016.

18. Старкова М.В., Зикийходжаев А.Д., Грушина Т.И., Суркова В.С., Славнова Е.Н., Леонтьев А.В. Диагностическая значимость биопсии сторожевого лимфатического узла у больных ранним раком молочной железы. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*. 2019; 8(6) 422-7.

REFERENCES

1. Volchenko N.N., Slavnova E.N., Mel'nikova V.Yu., Ermolaeva A.G., Borisova O.V. Urgent intraoperative morphological diagnostics in oncology. *Novosti klinicheskoy tsytologii Rossii*. 2014; 18 (1-2): 33-4. (in Russian)
2. Volchenko N.N., Slavnova E.N. Modern cytological diagnosis of oncological lesions of the lymph nodes. *Novosti klinicheskoy tsytologii Rossii*. 2014; 18(1-2): 32-3. (in Russian)
3. Volchenko N.N., Gladunova Z.D., Slavnova E.N., Ermolaeva A.G., Mel'nikova V.Yu. Possibilities of the cytological method in identifying metastatic lesions of the lymph nodes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2009; 62(12): 39-43. (in Russian)
4. Volchenko N.N., Gladunova Z.D., Slavnova E.N., Ermolaeva A.G., Mel'nikova V.Yu. Cytological method in identifying metastatic lesions of the lymph nodes. *Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal*. 2010; 3: 9-12. (in Russian)
5. Johnston E.I., Beach R.A., Waldrop S.M., Lawson D., Cohen C. Rapid intraoperative immunohistochemical evaluation of sentinel lymph nodes for metastatic breast carcinoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2006; 14(1): 57-62.
6. Celebioglu F., Sylvan M., Perbeck L., Bergkvist L., Frisell J. Intraoperative sentinel lymph node examination by frozen section, immunohistochemistry and imprint cytology during breast surgery — a prospective study. *Eur. J. Cancer*. 2006; 42(5): 617-20.
7. Safai A., Razeghi A., Monabati A., Azarpira N., Talei A. Comparing touch imprint cytology, frozen section analysis, and cytokeratin immunostaining for intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes in breast cancer. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2012; 55(2):183-6.
8. Francz M., Egervari K., Szollosi Z. Intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: comparison of frozen sections, imprint cytology and immunocytochemistry. *Cytopathology*. 2010; 22(1):36-42.
9. Sharma Upender, Harsh Mohan, Uma Handa AKA. Intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes in breast carcinoma by imprint cytology, frozen section and rapid immunohistochemistry. *Diagn. Cytopathol.* 2009; 37(12):871-5.
10. Mori M, Tada K, Ikenaga M, Miyagi Y, Nishimura S, Takahashi K, Makita M, Iwase T, Kasumi F, Koizumi M. Frozen section is superior to imprint cytology for the intra-operative assessment of sentinel lymph node metastasis in stage I breast cancer patients. *World J. Surg. Oncol.* 2006; 4:26.
11. Lumachi F, Marino F, Zanella S, Chiara GB, Basso SM. Touch imprint cytology and frozen-section analysis for intraoperative evaluation of sentinel nodes in early breast cancer. *Anticancer Res.* 2012; 32(8):3523-6.
12. Krishnamurthy S, Meric-Bernstam F, Lucci A, Hwang RF, Kuerer HM, Babiera G, Ames FC, Feig BW, Ross MI, Singletary E, Hunt KK, Bedrosian I. A prospective study comparing touch imprint cytology, frozen section analysis, and rapid cytokeratin immunostain for intraoperative evaluation of axillary sentinel lymph nodes in breast cancer. *Cancer*. 2009;115(7):1555-62.
13. Petropoulou T, Kapoula A, Mastoraki A, Politi A, SpanidouKarvouni E, Psychogios I, Vassiliou I, Arkadopoulos N. Imprint cytology versus frozen section analysis for intraoperative assessment of sentinel lymph node in breast cancer. *Breast Cancer: (Dove Med Press)*. 2017; 9:325-30.
14. Volchenko N.N., Borisova O.V., Ermolaeva A.G., Melnikova V.Yu., Petrov A.N., Slavnova E.N. Urgent intraoperative morphological diagnostics in oncology. *Onkologiya. Zhurnal im.P.A.Gertsena*. 2015; 4(4): 5-11. (in Russian)
15. Volchenko N.N., Borisova O.V., Melnikova V.Yu., Ermolaeva A.G., Glukhova Yu.K., Slavnova E.N. Urgent morphological diagnostics in oncology. *Onkologiya. Zhurnal im. P.A.Gertsena*. 2020; 9(1): 5-13. (in Russian)
16. Volchenko N.N., Slavnova E.N., Borisova O.V. Intraoperative fluorescent immunocytochemical diagnostics of a widespread tumor process (medical technology) [Intraoperatsionnaya fluorestsennaya immunotsytokhimicheskaya diagnostika rasprostrannogo opukholevogo protsessa (meditsinskaya tekhnologiya)]. Moscow: MNIIOI im. P.A.Gertsena; 2012. (in Russian)
17. Slavnova E.N., Volchenko N.N. Urgent fluorescent immunocytochemical diagnosis of metastatic lesions of the lymph nodes. Patent RF № 2582275; 2016. (in Russian)
18. Starkova M.V., Zikiryakhodzaev A.D., Grushina T.I., Surkova V.S., Slavnova E.N., Leontiev A.V. Diagnostic value of sentinel lymph node biopsy in patients with early breast cancer. *Onkologiya. Zhurnal im. P.A.Gertsena*. 2019; 8(6) 422-7. (in Russian)
19. Giammarile F., Alazraki N., Aarsvold J.N., Audisio R.A., Glass E., Grant S.F. et al. The EANM and SNMMI practice guideline for lymphoscintigraphy and sentinel node localization in breast cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2013; 40(12):1932-47.
20. Lyman G.H., Somerfield M.R., Giuliano A.E. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: 2016 American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update summary. *J. Oncol. Pract.* 2017;13(3):196-8.
21. Lyman G.H., Giuliano A.E., Somerfield M.R., Benson A.B. 3rd, Bodurka DC, Burstein HJ, Cochran AJ, Cody HS3rd, Edge SB, Galper S, et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(30):7703-20.