

Биобанк ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России как ресурс для проведения исследований в области персонифицированной медицины

О.И. Кит, С.В. Тимофеева✉, А.О. Ситковская, И.А. Новикова, Е.Н. Колесников

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация

Биобанки представляют собой платформу для инновационных биомедицинских исследований в области трансляционной и персонифицированной медицины. Важным аспектом для проведения широкомасштабных исследований в области геномики, транскриптомики, протеомики является наличие выборки задокументированных образцов высокой разрешающей способности. Биобанки решают проблему формирования групп пациентов различных нозологий в пределах интересующей популяции и предоставляют клиническую и лабораторную информацию по каждому образцу. Цель данной статьи – описать работу биобанка ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России в рамках существующих проектов и собранных коллекций. В обзоре рассмотрены основные этапы систематизированной работы биобанка, описаны методы пробоподготовки различных типов биологического материала, а также приведена статистика собранных коллекций. На сегодняшний день преобладающая часть депозитария состоит из образцов тканей пациентов с диагнозами злокачественных новообразований толстой кишки – 24% и желудка – 23% от общего количества образцов тканей, в то время как количество образцов тканей рака поджелудочной железы составляет 10%, а рака пищевода и рака молочной железы – по 22%. Помимо образцов тканей в биобанке ФГБУ «НМИЦ онкологии» хранятся 24 клеточные линии человеческого происхождения и коллекция из 200 образцов микробиоты, из них 100 – от пациентов с диагнозом рак легкого и 100 – от условно здоровых доноров. В настоящее время на биоматериале из собранных коллекций биобанка выполнены исследования по поиску прогностических биомаркеров и потенциальных мишеней для таргетной терапии методом высокопроизводительного секвенирования у пациентов с диагностированным раком поджелудочной железы и раком мозга. Таким образом, коллекции играют важную роль для исследований в области персонифицированной медицины, обеспечивая раннюю диагностику и эффективные методы лечения каждому пациенту.

Ключевые слова: биобанк, персонифицированная медицина, онкология, биомаркер

Для цитирования: Кит О.И., Тимофеева С.В., Ситковская А.О., Новикова И.А., Колесников Е.Н. Биобанк ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России как ресурс для проведения исследований в области персонифицированной медицины. Современная Онкология. 2022;24(1):6–11. DOI: 10.26442/18151434.2022.1.201384

Введение

В последние десятилетия ранняя диагностика рака стала одним из основных направлений исследований в онкологии [1]. Секвенирование генома человека в 2001 г. проложило новый путь для изучения рака с улучшенным молекулярным профилированием, геномными и протеомными исследованиями [2]. Данная технология позволила глубже исследовать механизмы рака, от клеточного до субклеточного и молекулярного уровней, дав начало персонифицированной медицине [3]. Крупномасштабные исследования в данной области требуют объемных выборок биоматериала и данных пациентов для статистических анализов и разработок новых гипотез. Однако довольно часто исследовательские группы сталкиваются с проблемой формирования групп пациентов по той или иной нозологии в пределах научных лабораторий, региона или страны. Биобанки, или биорепо- зитории, в свою очередь, являются надежным решением такой

проблемы, так как накопленные там образцы уже содержат клиническую и лабораторную информацию о пациентах, патологиях, типах собранных тканей, проверке качества биобразцов и температурных режимах криоконсервации [4].

На сегодняшний день в мировом сообществе создано множество биорепо- зиторий, в которых образцы разделяют по расе, популяции, типу, стадии и степени различных видов рака на основе клинических данных пациентов [5]. Помимо относительно небольших биобанков, созданных научными группами, существуют сети очень обширных и известных биобанков, часто финансируемых государством и доступных для исследовательских целей. Так, например, в России существует Национальная ассоциация биобанков и специалистов по биобанкированию (НАСБИО), которая по информации на август 2021 г. насчитывает порядка 27 биобанков, в числе которых – биобанк ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (nasbio.ru). В Европе находится сеть биобанков

Информация об авторах / Information about the authors

✉Тимофеева Софья Владимировна – науч. сотр. лаб. клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии». E-mail: timofeeva.sophia@gmail.com; ORCID: 0000-0002-5945-5961

Кит Олег Иванович – д-р мед. наук, проф., чл.-кор. РАН, ген. дир. ФГБУ «НМИЦ онкологии». E-mail: onko-sekretar@mail.ru; ORCID: 0000-0003-3061-6108

Ситковская Анастасия Олеговна – зав. лаб. клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии». E-mail: grankina.anastasia@mail.ru; ORCID: 0000-0002-6035-1756

Новикова Инна Арнольдовна – канд. мед. наук, зам. ген. дир. по науке ФГБУ «НМИЦ онкологии». E-mail: novikovainna@yahoo.com; ORCID: 0000-0002-6496-9641

Колесников Евгений Николаевич – канд. мед. наук, зав. отд.-нием абдоминальной онкологии № 1 с группой рентгенэндоваскулярных методов диагностики и лечения ФГБУ «НМИЦ онкологии»

✉Sofia V. Timofeeva – Res. Officer, National Medical Research Centre for Oncology. E-mail: timofeeva.sophia@gmail.com; ORCID: 0000-0002-5945-5961

Oleg I. Kit – D. Sci. (Med.), Prof., Corr. Memb. RAS, National Medical Research Centre for Oncology. E-mail: onko-sekretar@mail.ru; ORCID: 0000-0003-3061-6108

Anastasiya O. Sitkovskaya – Head of Cell Technology Laboratory, National Medical Research Centre for Oncology. E-mail: grankina.anastasia@mail.ru; ORCID: 0000-0002-6035-1756

Inna A. Novikova – Cand. Sci. (Med.), National Medical Research Centre for Oncology. E-mail: novikovainna@yahoo.com; ORCID: 0000-0002-6496-9641

Evgeniy N. Kolesnikov – Cand. Sci. (Med.), National Medical Research Centre for Oncology

The biobank of the National Medical Research Centre for Oncology as a resource for research in the field of personalized medicine: A review

Oleg I. Kit, Sofia V. Timofeeva✉, Anastasiya O. Sitkovskaya, Inna A. Novikova, Evgeniy N. Kolesnikov

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

Biobanks are the platform for innovative biomedical research in the field of translational and personalized medicine. The important aspect for conducting large-scale research in the field of genomics, transcriptomics, proteomics is the availability of a sample information of the documented high-resolution samples. The biobanks solve the problem of forming groups of patients with different nosology within the population of interest and provide clinical and laboratory information on each sample. The aim of this article is to describe the Biobank processes of the National Medical Research Centre for Oncology within the framework of existing projects and build up collections. The review discusses the main stages of the systematized biobank process, describes the methods of sample preparation of different types of biological material, and also provides statistics of the build up collections. To this date, the predominant part of the depository consists of tissue samples of patients diagnosed with colorectal cancer 24% and stomach cancer 23% of the total number of tissue samples, while the number of tissue samples of pancreatic cancer is 10%, and esophageal cancer and breast cancer – 22%. In addition to tissue samples, the biobank of the National Medical Research Centre for Oncology stores 24 cell lines of a human origin and the collection of 200 microbiota samples: 100 are from patients diagnosed with lung cancer and 100 from conditional healthy donors. Currently, the studies have been performed on biomaterial from the biobank build up collections to search for prognostic biomarkers and potential targets for targeted therapy by using high-throughput sequencing in patients diagnosed with pancreatic cancer and brain cancer. Thus, the collections play an important role for research in the field of personalized medicine, providing early diagnosis and effective treatment for each patient.

Keywords: biobank, personalized medicine, oncology, biomarker, Russia

For citation: Kit OI, Timofeeva SV, Sitkovskaya AO, Novikova IA, Kolesnikov EN. The biobank of the National Medical Research Centre for Oncology as a resource for research in the field of personalized medicine: A review. Journal of Modern Oncology. 2021;24(1):6–11. DOI: 10.26442/18151434.2022.1.201384

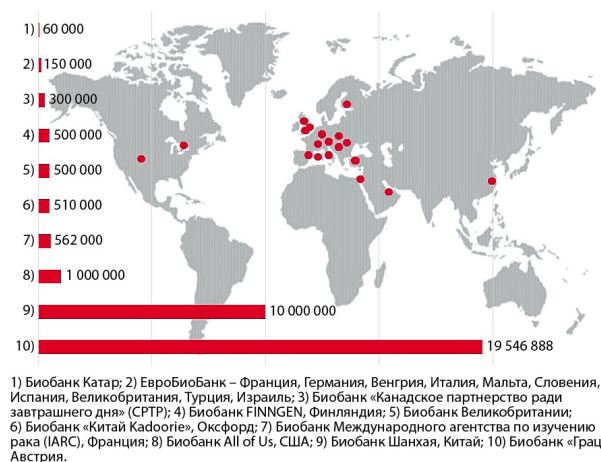
Biobanking and BioMolecular resources Research Infrastructure – European Research Infrastructure Consortium (BBMRI-ERIC), которая объединяет 325 биобанков из 20 стран Европы, а также EuroBioBank (www.eurobiobank.org), который включает 22 биобанка. В Азии располагается Национальный биобанк Кореи (NBK), который интегрирован с 17 региональными корейскими биобанками. Однако больше всего биобанков находится в США. В 2017 г. сформировано 636 биорепопозитория на территории США [6]. Еще одной ведущей организацией в области биобанкирования в Европе является European Association for Predictive, Preventive & Personalised Medicine (EPMA), которая представлена в 54 странах мира, активно продвигая проекты по персонализированной медицине в биологических науках и практической медицине [7, 8].

В мае 2018 г. на сайте biobanking.com опубликован топ-лист 10 крупнейших биобанков мира (рис. 1).

Биобанк ФГБУ «НМИЦ онкологии» представляет собой отдельную инфраструктуру с большими сложными коллекциями биологических образцов, дополненными обширными и хорошо аннотированными клиническими и патологическими данными о пациентах, включая медицинские изображения, патологическую гистологию и молекулярный анализ [9].

Коллекции образцов криохранилища формировались в зависимости от задач и проектов ФГБУ «НМИЦ онкологии» с постоянным каталогизированием, включая штрихкодирование, ведение баз по клинической информации о пациентах от нескольких отделений и систематизированное заполнение Freezer Pro (база криостативов). Впоследствии информацию использовали для различных генетических и молекулярных исследований, включающих корреляции генотип-фенотип, перекрестные исследования, исследования «случай-контроль» и когортные исследования. Для обеспечения конфиденциальности и анонимности все образцы

Рис. 1. Крупнейшие биобанки мира по версии biobanking.com.
Fig. 1. The largest biobanks in the world according to biobanking.com.



коллекций были зашифрованы в соответствии с внутренней кодировкой проектов ФГБУ «НМИЦ онкологии». Также при сборе проб пациент всегда был проинформирован о целях исследования, важности его участия в исследованиях рака, потенциальных рисках и шансах отказа в любой момент в будущем.

Сбор, обработка и хранение биоматериала

Стабильность работы биобанка на сегодняшний день сохраняется благодаря разработанным алгоритмам действий подразделений исследовательских и клинических групп, включающих сбор клинической информации, биологического материала, пробоподготовку, контроль качества биообразцов,

Рис. 2. Схема работы Биобанка.
Fig. 2. The scheme of Biobank processes.



хранение, а также соблюдение правовых норм и правил, связанных с конфиденциальностью пациентов (рис. 2).

Кровь

Чтобы гарантировать как количество (например, выход ДНК), так и качество (например, неповрежденную ДНК) образца, мы учитывали этапы предварительной обработки исходного материала, такие как центрифугирование или добавление стабилизирующих агентов для ингибирования деградации ДНК в образце. Для сбора цельной крови на базе биобанка ФГБУ «НМИЦ онкологии» использовали пробирки с К2ЭДТА. Несмотря на то что гепариновые пробирки широко используются для определения уровней гормонов или холестерина в повседневной клинической практике, они не являются предпочтительными для молекулярных анализов. Раствор К2ЭДТА сохраняет клетки и ингибирует активность ДНКазы; его применение дает более высокие концентрации ДНК, сохраняя качество образцов [10]. Наряду с цельной кровью для молекулярных исследований используют сыворотку или плазму крови для анализов внеклеточной ДНК, белков или гормонов [11]. Транспортировку крови из отделений в криохранилище осуществляли в криоконтейнере с жидким азотом. Все образцы крови в ФГБУ «НМИЦ онкологии» хранятся при температуре от -80°C.

Примерами крупных биобанков с коллекциями образцов крови онкологических больных являются Биобанк Велико-

Рис. 3. Распределение основной группы пациентов по национальной принадлежности, n=100.
Fig. 3. Distribution of the main group of patients by nationality, n=100.

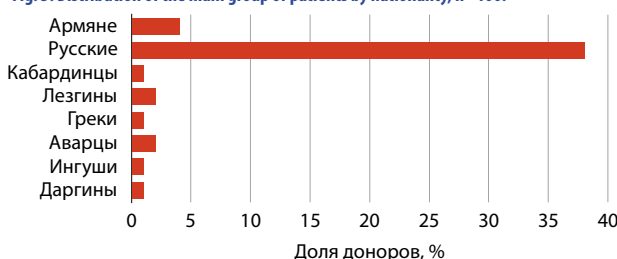
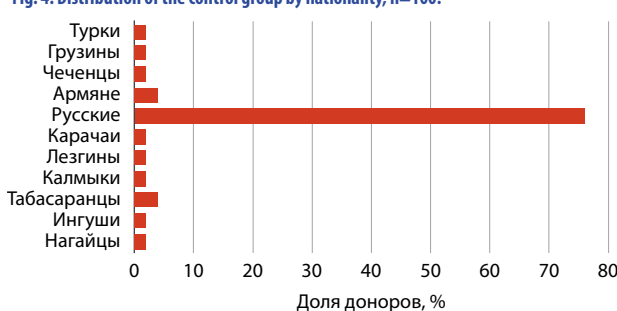


Рис. 4. Распределение контрольной группы по национальной принадлежности, n=100.
Fig. 4. Distribution of the control group by nationality, n=100.



британии [12], Биобанк Японии [13], Викторианский биобанк рака [14] и Канадская сеть репозитория опухолей [15].

Микробиота

Образцы микробиоты используют для исследований иммунного ответа, таргетной терапии, поиска биомаркеров, а также для трансплантации фекальной микробиоты, как было показано в работе E. Terveer и соавт. [16]. В основном микробиоту секвенируют методом секвенирования нового поколения (NGS), используя в качестве маркера 16S рРНК [17]. Ген 16S рРНК кодирует прокариотическую небольшую 30S субъединицу 70S рибосомного комплекса у большинства бактерий и архей. Последовательность гена состоит из высококонсервативных сайтов связывания праймера и 9 переменных областей (V_1-V_9). Большинство протоколов секвенирования на основе 16S рРНК используют V_5-V_6 , V_3-V_4 [18].

При отборе образцов важно минимизировать время забора биоматериала и использовать ресурсы асептической лаборатории, поскольку изменения температуры, влажности или других факторов могут загрязнить образцы [19, 20]. Состав микробов нестабилен с момента взятия пробы, поэтому немедленное замораживание считается обязательным [21]. В исследовании фекальной микробиоты человека было показано, что быстрое охлаждение при -80°C и добавление криоконсерванта сохраняют разнообразие микробиоты, которое значительно изменяется при хранении в сухом виде при 4°C [22, 23].

Так, на базе биобанка ФГБУ «НМИЦ онкологии» в рамках проекта «Создание банка биообразцов сыворотки крови и фекалий здоровых доноров и больных раком легкого с различным течением и определение в них содержания кинуренинов, адипокинов и цитокинов» сформирована коллекция из 200 образцов микробиоты, из них 100 – от пациентов с диагнозом рака легкого и 100 – от условно здоровых доноров. Биоматериал хранили при температуре +4°C после забора в течение 24 ч, далее замораживали при -80°C в криоконсерванте (25% раствор глицерина) для длительного хранения.

Согласно данным в выборках контрольной и основной групп подавляющим большинством были доноры русской национальности. На рис. 3, 4 представлено распределение по национальной принадлежности.

Рис. 5. Гендерный состав пациентов и доноров контрольной группы.
Fig. 5. Gender composition of patients and donors of the control group.

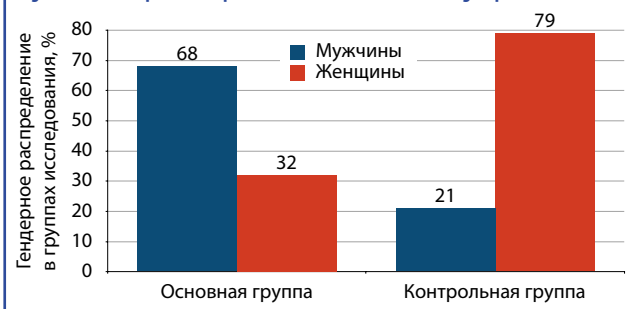
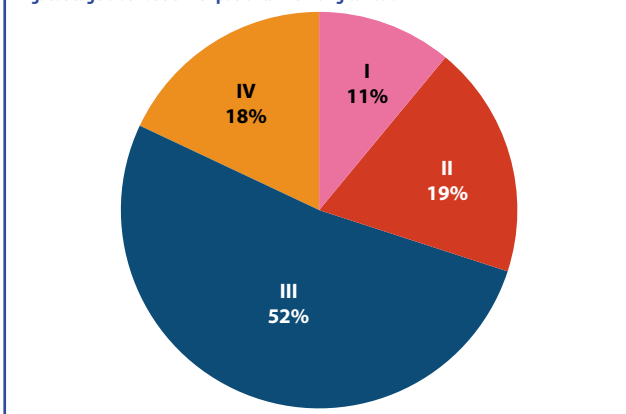


Рис. 6. Распределение пациентов по стадиям заболевания рака легкого.
Fig. 6. Stage distribution for patients with lung cancer.



Гендерно-возрастной состав пациентов и доноров контрольной группы, вошедших в исследование, представлен на рис. 5. Средний возраст пациентов составил 60,48 года с диапазоном вариации от 36 до 81 лет. Средний возраст условно здоровых доноров составил 31,92 года с диапазоном вариации от 23 до 62 лет.

В основной группе пациентов мужского пола было больше – 68% в отличие от контрольной группы, где число условно здоровых доноров женского пола составило 79%.

Распределение пациентов основной группы по стадиям заболевания рака легкого представлено на рис. 6.

В исследовании преобладали больные с III стадией рака легкого, на их долю приходилось 52% выборки. Доля пациентов на терминальной, IV стадии заболевания составила 18%, а доля пациентов со II стадией заболевания – 19%. В исследованной выборке уровень пациентов на ранней стадии I не превышал 11% (рис. 7).

Депонирование образцов свежемороженых опухолевых тканей

В ходе стандартной операционной процедуры по резекции органа врач-хирург передавал биоматериал на сухом льду в течение 10–20 мин в патологоанатомическое отделение в комплекте с информированным согласием от пациента и выпиской из истории болезни. Далее врач-патологоанатом вырезал 4 равных образца опухолевой ткани и 2 условно здоровой, находящихся на максимальном удалении от опухоли, размерами не менее 0,5×0,5×0,5 см. Одновременно производился зеркальный забор материала для стандартного гистологического исследования. Образцы ткани в криопробирках помещали в жидкий азот, а затем в криохранилище в пары жидкого азота на долгосрочное хранение при температуре хранения от -150 до -196°C.

Критерии включения материала в исследование: размер ткани не менее 0,5×0,5×0,5 см; доля опухолевых клеток в образце не менее 20%; соблюдение временного интервала заморозки образца в жидком азоте не более 20 мин с момента экстракции образца в операционной.

Рис. 7. Распределение пациентов основной группы по TNM классификации заболевания рака легкого.
Fig. 7. Distribution of patients of the main group according to the lung cancer TNM classification.

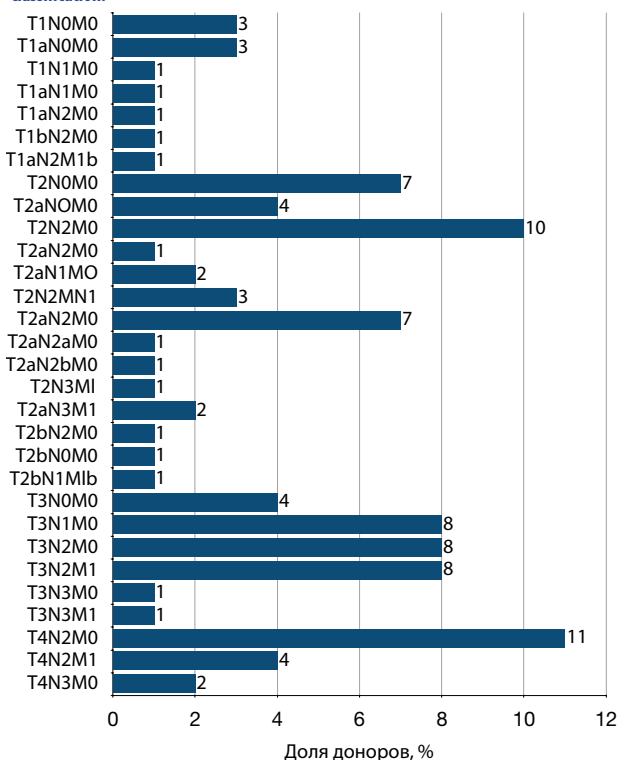
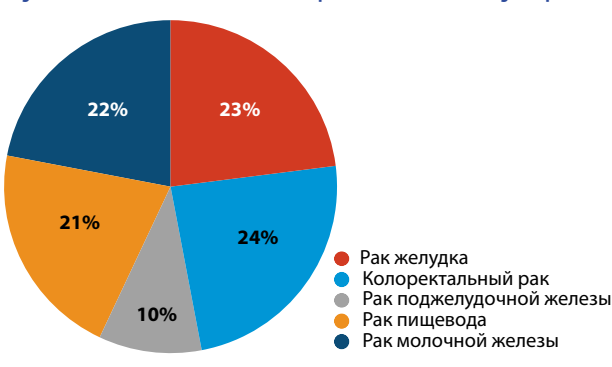


Рис. 8. Распределение образцов свежемороженых тканей по локализации злокачественного процесса.
Fig. 8. Distribution of fresh frozen tissue samples derived from the malignant process.



Гистологически верифицированные парные образцы свежемороженых биоптатов были депонированы в коллекцию биобанка от 1834 пациентов со следующими злокачественными новообразованиями (рис. 8):

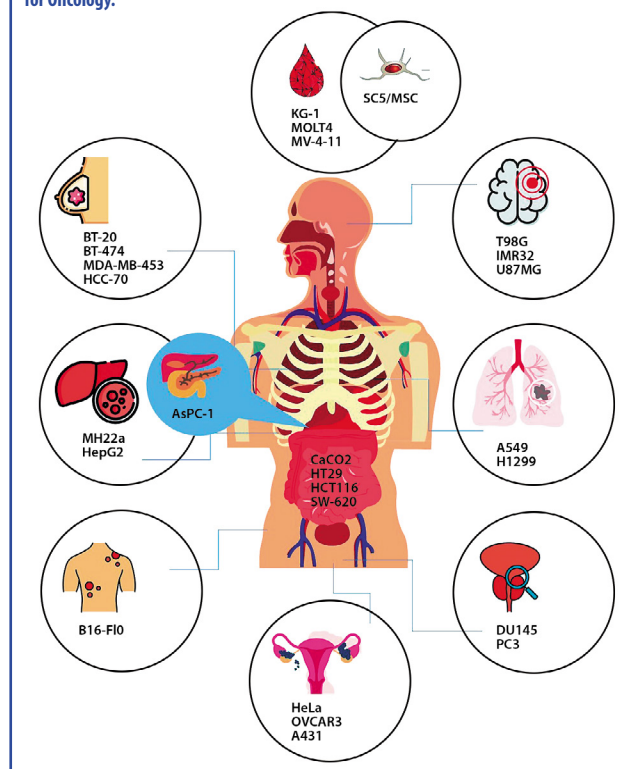
- рак желудка – 424 образца (опухоль/норма);
- колоректальный рак – 438 образцов (опухоль/норма);
- рак поджелудочной железы – 195 образцов (опухоль/норма);
- рак пищевода – 380 образцов (опухоль/норма);
- рак молочной железы – 397 образцов (опухоль/норма).

Таким образом, преобладающая часть депозитария состоит из образцов тканей пациентов с диагнозами злокачественных новообразований толстой кишки и желудка.

Коллекции клеточных линий

В биорепозитории ФГБУ «НМИЦ онкологии» содержатся коллекции первичных и иммортализованных клеточных линий. Первичные клеточные линии получали из послеоперационного материала, отобранного в ходе удаления опухолей. Для создания первичных культур исполь-

Рис. 9. Иммутированные клеточные линии биобанка ФГБУ «НМИЦ онкологии». Fig. 9. Immortalized cell lines of the biobank of the National Medical Research Centre for Oncology.



зовали методы первичных эксплантатов, ферментативной диссоциации или механической дезагрегации [24, 25].

Все коллекционные клеточные линии свободны от контаминантов (экзогенных вирусов, микоплазм и L-форм бактерий) и культивируются без антибиотиков. В коллекцию входит 24 клеточных линий человеческого происхождения (рис. 9).

Заключение

Биобанки — это сложная система хранения биологических образцов и связанных с ними данных, имеющих особое значение для прикладных и фундаментальных исследований. На материале образцов тканей нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы и глиальных опухолей различной степени злокачественности были выполнены исследования по определению прогностических биомаркеров и потенциальных мишеней для таргетной терапии методом высокопроизводительного секвенирования [26, 27].

Таким образом, данные коллекций биобанка играют важную роль для персонализированной медицины, обеспечивая раннюю диагностику и эффективные методы лечения каждому пациенту.

Раскрытие интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Disclosure of interest. The authors declare that they have no competing interests.

Вклад авторов. Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработка концепции статьи, получение и анализ фактических данных, написание и редактирование текста статьи, проверка и утверждение текста статьи.

Authors' contribution. The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Авторы декларируют отсутствие внешнего финансирования для проведения исследования и публикации статьи.

Funding source. The authors declare that there is no external funding for the exploration and analysis work.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Smittenaar CR, Petersen KA, Stewart K, Moitt N. Cancer incidence and mortality projections in the UK until 2035. *Br J Cancer*. 2016;115(9):1147-155. DOI:10.1038/bjc.2016.304
- Swede H, Stone CL, Norwood AR. National population-based biobanks for genetic research. *Genet Med*. 2007;9(3):141-9. DOI:10.1097/gim.0b013e3180330039
- Goetz LH, Schork NJ. Personalized medicine: motivation, challenges, and progress. *Fertil Steril*. 2018;109(6):952-63. DOI:10.1016/j.fertnstert.2018.05.006
- Драпкина О.М. Российская «Национальная ассоциация биобанков и специалистов по биобанкированию» — инструмент интеграции российских биобанков и повышения эффективности биомедицинских исследований. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2020;19(6):2757 [Drapkina OM. Russian National Association of Biobanks and Biobanking Specialists — a tool for integrating Russian biobanks and increasing the efficiency of biomedical research. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2020;19(6):2757 (in Russian)]. DOI:10.15829/1728-8800-2020-2757
- Braun KL, Tsark JU, Powers A, et al. Cancer patient perceptions about biobanking and preferred timing of consent. *Biopreserv Biobank*. 2014;12(2):106-12. DOI:10.1089/bio.2013.0083
- Patil S, Majumdar B, Awan KH, et al. Cancer oriented biobanks: A comprehensive review. *Oncol Rev*. 2018;12(1):357. DOI:10.4081/oncol.2018.357
- Coppola L, Cianflone A, Grimaldi AM, et al. Biobanking in health care: evolution and future directions. *J Transl Med*. 2019;17(1):172. DOI:10.1186/s12967-019-1922-3
- Liu A, Pollard K. Biobanking for Personalized Medicine. *Adv Exp Med Biol*. 2015;864:55-68. DOI:10.1007/978-3-319-20579-3_5
- Самохина И.В., Сагакянц А.Б. Работа в условиях пандемии COVID-19 — опыт биобанка ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2020;19(6):2741 [Samokhina IV, Sagakyants AB. Work within the COVID-19 pandemic — the experience of the biobank of the National Medical Research Center of Oncology. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2020;19(6):2741 (in Russian)]. DOI:10.15829/1728-8800-2020-2741
- Kotikalapudi R, Patel RK. Comparative study of the influence of EDTA and sodium heparin on long term storage of cattle DNA. *Cell J*. 2015;17(1):181-6. DOI:10.22074/cellj.2015.526
- Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, et al. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(10):2569-83. DOI:10.1007/s00216-018-0931-z
- UK Biobank, 2007. Protocol for A Large-Scale Prospective Epidemiological Resource. UK Biobank Coordinating Centre; Stockport, UK: Protocol No: UKBB-PROT-09-06 (Main Phase).
- Nagai A, Hirata M, Kamatani Y, et al. Overview of the BioBank Japan Project: Study design and profile. *J Epidemiol*. 2017;27(3S):S2-8. DOI:10.1016/j.je.2016.12.005
- Victorian Cancer Biobank, 2020. Available at: <https://viccancerbiobank.org.au/> Accessed: 30.10.2021.
- Canadian Tissue Repository Network, 2020. Available at: <https://www.ctrnet.ca/> Accessed: 30.10.2021.
- Terveer EM, van Beurden YH, Goorhuis A, et al. How to: Establish and run a stool bank. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(12):924-30. DOI:10.1016/j.cmi.2017.05.015
- Pel J, Leung A, Choi WWY, et al. Rapid and highly-specific generation of targeted DNA sequencing libraries enabled by linking capture probes with universal primers. *PLoS One*. 2018;13(12):e0208283. DOI:10.1371/journal.pone.0208283
- Woo PC, Lau SK, Teng JL, et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(10):908-34. DOI:10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x
- Thomas T, Gilbert J, Meyer F. Metagenomics — a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp*. 2012;2(1):3. DOI:10.1186/2042-5783-2-3

20. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 2014;12:87. DOI:10.1186/s12915-014-0087-z
21. Cuthbertson L, Rogers GB, Walker AW, et al. Time between collection and storage significantly influences bacterial sequence composition in sputum samples from cystic fibrosis respiratory infections. *J Clin Microbiol.* 2014;52(8):3011-6. DOI:10.1128/JCM.00764-14
22. Choo JM, Leong LE, Rogers GB. Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Sci Rep.* 2015;5:16350. DOI:10.1038/srep16350
23. Smirnova DV, Zalomova LV, Zagainova AV, et al. Cryopreservation of the human gut microbiota: Current state and perspectives. *Int J Med Microbiol.* 2019;309(5):259-69. DOI:10.1016/j.ijmm.2019.06.001
24. Межевова И.В., Ситковская А.О., Кит О.И. Первичные культуры опухолевых клеток: современные методы получения и поддержания in vitro. *Южно-российский онкологический журнал.* 2020;1(3):36-49 [Mezhevova IV, Sitkovskaya AO, Kit OI. Primary tumor cell cultures: current methods of obtaining and subcultivation. *South Russian Journal of Cancer.* 2020;1(3):36-49 (in Russian)]. DOI:10.37748/2687-0533-2020-1-3-4
25. Шамова Т.В., Ситковская А.О., Росторгуев Э.Е., и др. Получение первичных клеточных линий глиальных опухолей. *Пермский медицинский журнал.* 2020;37(5):79-89 [Shamova TV, Sitkovskaya AO, Rostorguev EE, et al. Preparation of primary glial tumor cell lines. *Permskii meditsinskii zhurnal.* 2020;37(5):79-89 (in Russian)]. DOI:10.17816/pmj37579%89
26. Кит О.И., Гвалдин Д.Ю., Трифанов В.С., и др. Молекулярно-генетические особенности нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы. *Генетика.* 2020;56(1):142-60 [Kit OI, Gvaldin DY, Trifanov VS, et al. Molecular-genetic features of pancreatic neuroendocrine tumors. *Russian Journal of Genetics.* 2020;56(1):142-60 (in Russian)]. DOI:10.31857/S001667582002006X
27. Кит О.И., Пушкин А.А., Росторгуев Э.Е., и др. Дифференциальная экспрессия 15-ти генов в глиальных опухолях различной степени злокачественности. *Современные проблемы науки и образования.* 2019;5:230 [Pushkin AA, Timoshkina NN, Rostorguev EE, et al. Expression status of 15th genes in glial tumors of the brain. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya.* 2019;5:230 (in Russian)].

Статья поступила в редакцию / The article received: 02.12.2021

Статья принята к печати / The article approved for publication: 15.03.2022

