

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский  
клинический  
научно-практический центр  
специализированных видов  
медицинской помощи  
(онкологический)  
(Санкт-Петербург, Россия)

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский  
медико-социальный  
институт  
(Санкт-Петербург, Россия)

# ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ, ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И НАУЧНЫЕ ВОПРОСЫ ОНКОМОРФОЛОГИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

К.В. Шелехова<sup>1,2</sup>, В.А. Хейнштейн<sup>1,2</sup>

## ORGANIZATIONAL, TECHNOLOGICAL AND SCIENTIFIC ISSUES OF MORPHOLOGY AND MOLECULAR GENETICS

**К.В. Шелехова<sup>1,2</sup>**

Доктор медицинских наук,  
заведующая кафедрой патологической анатомии,  
факультет дополнительного профессионального образования,  
Медико-Социальный Институт;  
заведующая патологоанатомическим отделением, СПбКНПЦСВМП(о),  
197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, Ленинградская ул., д. 68А.  
E-mail: ksbelekhova@mail.ru.

**В.А. Хейнштейн<sup>1,2</sup>**

Кандидат медицинских наук,  
доцент кафедры патологической анатомии,  
факультет дополнительного профессионального образования.

**K.V. Sbelekhova<sup>1,2</sup>**

Doctor of Medicine, Head of Pathology Department,  
Saint Petersburg Medico-Social Institute; Professor, Head of Pathology Department,  
St. Petersburg Clinical and Practical Center of Specialized Types of Medical Care (Oncological),  
197758, St. Petersburg, pos. Pesochniji, Leningradskaya ul., 68A.  
e-mail: ksbelekhova@mail.ru.

**V.A. Kheinshtein<sup>1,2</sup>**

Candidate of Medicine, Pathologist, Associated Professor, Pathology Department

Морфологическое исследование является единственным способом точной верификации опухолевой патологии и характеристики ее гистологического и молекулярно-генетического профиля, необходимого для персонализации стратегии лечения и прогнозирования течения заболевания. В обзоре обсуждаются организационные и технологические вопросы, касающиеся преаналитического этапа работы с биоматериалом для достижения качественных и достоверных результатов. В частности, уделяется большое внимание влиянию холодовой ишемии на морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические параметры.

**Ключевые слова:** морфология, холодовая ишемия, формалиновая фиксация, задержка, прогностические и предиктивные биомаркеры, иммуногистохимия, FISH, ISH.

Morphological research is the only way to accurately verify the tumor pathology and the characteristics of its histological and genetic profile, necessary to personify the treatment strategy and predict the course of the disease. The review discusses organizational and technical aspects related to the preanalytical stage of working with biomaterial to achieve high-quality and reliable results. In particular, much attention is paid to the effect of cold ischemia on morphological, immunohistochemical and molecular parameters.

**Keywords:** morphology, cold ischemia, formalin fixation, delay, prognostic and predictive biomarkers, immunohistochemistry, FISH, ISH.

Диагностика – процесс, посредством которого врач, используя различные методы исследования (наблюдение, осмотр, анамнез, лабораторные, морфологические и др.), формулирует заключение о болезни, т.е. ставит диагноз. Грамотная диагностика является залогом эффективного лечения и выздоровления пациента. Современная медицина и особенно онкология предъявляет высокие требования к диагностике патологического процесса. В свою очередь переход к медицинскому страхованию существенно изменил подходы к организации здравоохранения и обусловил необходимость стандартизации медицинской деятельности. Стандартизация морфологических исследований, охватывающая минимально необходимые объемы исследований, материально-техническое обеспечение процесса, нормативы нагрузки и оплату труда персонала, адекватные тарифы, в конечном итоге должна обеспечить межлабораторную воспроизводимость тестов (результатов исследований) и заключений.

Несмотря на преобладание узкопрофильных специалистов в современной модели медицины, врач должен вырабатывать навык общего видения состояния пациента для формирования диагноза и соответствующей тактики лечения. Наука продвинулась далеко вперед в понимании сущности многих патологических состояний благодаря появлению и развитию новых методик, позволивших перекинуть мостик и визуализировать непрерывность между так называемыми «морфологическими» и «химическими» изменениями, ранее составлявшими предмет дискуссии первопричинности структуры или функции. Стало ясно, что существует некий единый субстрат проявлений жизнедеятельности, включающий весь диапазон уровней организации от молекулярного до организменного, и любые функциональные изменения не могут возникнуть и исчезнуть, не отразившись в соответствующих структурах молекулярного и ультраструктурного уровня.

Наличие у пациента опухолевой патологии констатируется лишь после проведения морфологических исследований, являющихся единственным способом точной верификации субстрата и его характеристик. Никакие другие методы клинических обследований (УЗИ, КТ, МРТ, лабораторные анализы) не позволяют поставить окончательный диагноз. При этом в условиях персонифицированной медицины и онкологии, в частности, общий диагноз карциномы или рака не является нозологическим и не достаточен для лечения. Необходимо правильно верифицировать опухоль, установив ее гистологический подтип, а также отразить характерный для нее профиль. И ключевую роль на данном этапе играет врач-патологоанатом. Классификация злокачественных опухолей TNM, руководство NCCN по клинической практике в онкологии содержат информацию относительно оценки тех или иных биомаркеров, имеющих не только диа-

гностическое, но и прогностическое и предиктивное значение у онкологических пациентов. Как правило, большинство их представляют собой генетические аномалии, которые могут быть оценены на разных уровнях организации материи и разными методиками. Например, молекулярная аномалия может быть мутацией в определенном гене, что приводит к недостаточной экспрессии белка, кодируемого этим геном. Обычным тестом, позволяющим установить данный профиль, может быть иммуногистохимический, который определяет экспрессию белка, или ДНК-секвенирование и *in situ* гибридизация, обнаруживающие непосредственно мутацию.

Учитывая вышесказанное, целесообразно остановиться на технических моментах, имеющих критическое значение для диагностического процесса. Предварительно биологический материал проходит специальную подготовку. Образцы ткани, фиксированные формалином и залитые в парафин (ФФЗП), подвергаются морфологическому, иммуногистохимическому, генетическому анализу, включающему анализ экспрессии генов и протеомный анализ. Они составляют подавляющее большинство биологических образцов, хранящихся в банках тканей для потенциального использования в исследованиях. Все этапы – от забора и фиксации тканей до микроскопии, иммунофенотипирования и молекулярного тестирования – имеют большое значение как для точной диагностики, так для научных результатов. Поэтому чрезвычайно важно, чтобы в клинике соблюдались высокие стандарты качества на каждом шаге морфологических и молекулярных исследований. Такие шаги как префиксация, фиксация, фиксаторы, постфиксация, проводка (дегидратация, просветление и пропитывание парафином), изготовление срезов относят к так называемому преаналитическому этапу. Если выбор фиксатора, его качество и последующие манипуляции с материалом зависят преимущественно от квалификации патологоанатома и лаборанта-гистолога, то первый шаг работы с биоматериалом зачастую представляет собой проблему взаимоотношений патолога и клинициста. И на этом этапе именно клиницист несет большую ответственность за качество субстрата, морфологический и молекулярно-генетический анализ которого ляжет в основу его терапевтической стратегии и научных результатов. В связи с этим представляется целесообразным подробно остановиться на данном аспекте.

Итак, на этапе префиксации большое влияние на качество материала оказывает хирургическая манипуляция, так как при небрежном обращении с тканью могут возникнуть химические, термические повреждения или механические артефакты. Особенно чувствительна к сдавлению лимфоидная ткань и некоторые разновидности опухолей, к примеру, мелкоклеточный рак.

Другой важной преаналитической переменной, способной негативно отразиться на результатах, является тепловое и холодное ишемическое время, определяемое как период времени, в течение которого ткань лишена кислорода при температуре тела и ниже температуры тела. Воздействие тепловой ишемии при сборе биоматериала контролировать невозможно, и поэтому последствия, которые она вызывает, могут рассматриваться только как часть общей внутрииндивидуальной изменчивости. Напротив, время холодной ишемии находится под контролем персонала, собирающего и обрабатывающего биологические образцы, и поэтому является контролируемым, хотя кадровые ресурсы и затраты на обеспечение очень коротких периодов холодной ишемии высоки.

С практической позиции наибольшие проблемы с качеством образцов возникают при работе с оперативно-удаленным материалом. Это органы, компартменты или фрагменты тканей, значительно превышающие по объему образцы, получаемые при биопсиях. Длительный период времени пребывания иссеченного из организма фрагмента в условиях окружающей среды до поступления в патологоанатомическое отделение способствует возникновению необратимых и неисправимых артефактов, создающих существенные препятствия для последующего анализа материала и получения достоверных результатов.

Следует помнить, что дегенеративные (аутолитические) изменения в тканях начинают развиваться сразу после прекращения кровотока. В первую очередь повреждаются ультраструктуры эпителиальных тканей, как правило, митохондрии. Так, через 30 минут регистрируются субмикроскопические сдвиги в клубочках почек, проявляющиеся в набухании, разрыхлении и утолщении тканевых гликопротеиновых покрытий (базальных мембран). К исходу первого часа после прекращения кровотока наряду с выраженным набуханием неклочковых структур клубочка отмечается развитие внутриклеточного отека со стороны эндотелия клубочковых капилляров [1].

Alturkustani M. и Al-Magharabi H., оценивая эффект поздней формалиновой фиксации по результатам анализа объектов 78 гистерэктомий, обнаружили аутолитические изменения ткани во всех случаях. Они проявлялись отделением эпителия от стромы с формированием артефициальных пространств (артефакт аутолиз-индуцированной ретракции), коллапсом железистых структур, «закручиванием» эпителиального пласта, нарушением структуры ядер и ядрышек, которые искусственно исчезали. Хотя диагноз доброкачественной либо злокачественной опухоли может быть поставлен, диагностика пограничных состояний, таких как неоплазия высокой или низкой степени гистологической злокачественности, становится объективно проблематичной. Также вышеописанные артефакты могут стать причиной расхождения в определении гистологического подтипа или

степени гистологической злокачественности (Grade) опухоли между разными патологами [2].

Клиницисту следует иметь в виду, что патоморфологическая оценка во многом зависит от тинкториальных свойств хорошо фиксированных тканей, а аутолитические процессы создают препятствия объективной интерпретации, тем самым, приводя патолога к ложному заключению.

Тот факт, что экспрессия генов, а также белков изменяется в ответ на воздействие холодной ишемии, хорошо известен. Однако литература противоречива в отношении временных пороговых значений. Опираясь на данные сравнительных исследований, большинство противоречий касаются клинических маркеров рака молочной железы: ER, PR и HER2. В ретроспективном исследовании авторы сравнили результаты иммуногистохимического окрашивания рецептора эстрогена в парных образцах опухоли молочной железы, полученных при биопсировании, где холодная ишемия приближается к 0, и образцов резекции со временем холодной ишемии в диапазоне от 64 до 357 мин. у 97 пациентов [3]. По результатам, разница в процентном соотношении окрашивания рецепторов эстрогена между биопсией и резекцией не была достоверно связана со временем холодной ишемии, однако была обнаружена тенденция к снижению окрашивания ER в подгруппе с холодной ишемией более 2 часов, чем в подгруппе с более коротким временем. Данные исследования также показывают, что длительное время холодной ишемии до 4 часов (97% когорты) оказывает минимальное клиническое влияние на иммуногистохимическую экспрессию рецептора эстрогена в опухолях молочной железы.

Portier et al., исследовали влияние времени холодной ишемии на HER2, тестируя методами ISH, FISH и двойной ISH [4]. Они не обнаружили существенных изменений в отношениях HER2/CEP17 по результатам FISH или двойной ISH в каждой группе случаев, которые имели одинаковые периоды времени холодной ишемии. Авторы также оценивали интенсивность и сохранность сигнала как показателя качества ткани. Сравнивая каждый анализ ISH индивидуально, они не обнаружили значительного снижения интенсивности сигнала в образцах с периодом холодной ишемии до 3-х часов. Однако по результатам FISH выявилось значительное снижение интенсивности сигнала в образцах, подвергшихся холодной ишемии более 3-х часов. Впоследствии Khoury и соавторы, выполнив двойное окрашивание ISH в той же группе случаев, в которой ранее выполнялась FISH, обнаружили статистически значимое увеличение процента клеток с потерей сигналов, связанное с увеличением времени холодной ишемии [5]. Наибольшая разница наблюдалась между 1-часовыми и 2-часовыми образцами (11% и 21% соответственно). Кроме того, исследователи обнаружили, что такие артефакты, как «красная дымка» и вакуолизация ядер, стали статистически значимыми

уже через 30 минут холодовой ишемии. Khoury в своих исследованиях также выявил незначительное снижение экспрессии Ki-67, коррелировавшее со временем холодовой ишемии, равной 4-м и 8-ми часам [6]. Neumeister и соавторы провели окрашивание Ki-67 с использованием двух разных клонов (MIB1 и SP6) и обнаружили статистически незначимую тенденцию к снижению уровня Ki-67, связанную с длительностью периода холодовой ишемии [7].

Таким образом, длительная холодовая ишемия и промедление фиксации формалином является фактором, снижающим достоверность анализа биомаркеров рака молочной железы. В связи с этим Американское общество клинической онкологии (ASCO) и Колледж американских патологов (CAP) рекомендуют начинать процесс фиксации ткани в течение 1 часа после иссечения, хотя клинически значимые изменения биомаркеров молочной железы проявляются только через 3 или 4 часа холодовой ишемии.

Выявление генетического профиля опухолей в настоящее время является ключевым прогностическим и предиктивным параметром. При этом качество анализируемого биологического материала определяет результаты молекулярно-генетического исследования. В частности, РНК в тканях *ex vivo* быстро разрушается, влияя на паттерны экспрессии, что может искажать интерпретацию результатов. Freidin и соавторы обнаружили, что среднее время холодовой ишемии более 30 минут оказывает существенное влияние на профили экспрессии ряда генов. Результаты проведенного ими исследования продемонстрировали различия в экспрессии приблизительно 25% генов [8].

Grizzle et al., изучая эффект холодовой ишемии, пришли к выводу, что мРНК, как правило, довольно устойчива. Холодовая ишемия оказывает повреждающее воздействие от 3% транскриптома в течение 3 часов и до 10% через 6 часов, при этом немалое значение имеет тип ткани [9]. В трех исследованиях на основе тканевых матриц было показано от 8% до 30% транскриптов, демонстрирующих более чем двукратное изменение экспрессии через 10–120 мин холодовой ишемии в тканях кишки и легкого [8, 10, 11].

В работе Spruessel с соавт., изучавших влияние времени ишемии тканей на характер экспрессии генов и белков в опухолях толстой кишки, начальные изменения профилей их экспрессии наблюдались уже через

5–8 мин. после резекции органа [12]. Через пятнадцать минут после операции 10–15% молекул, а через 30 мин. – 20% всех обнаруживаемых генов и белков, соответственно, значительно отличались от исходных значений. Наибольшие изменения экспрессии были обнаружены в большинстве функциональных групп. Как было подтверждено с помощью ПЦР, это включало не только известные, связанные с гипоксией молекулы (HIF-1 альфа, c-fos, HO-1), но также гены цитоскелета (например, СК20) и опухолевые антигены (например, раково-эмбриональный антиген).

Два протеомных исследования, в которых использовалась масс-спектрометрия на свежемороженой ткани различных типов тканей, описывают изменения экспрессии белка, начинающиеся в течение 1 часа в условиях холодовой ишемии, при этом процент поврежденного протеома составлял менее 2% в одном исследовании и более 30% в другом [12, 13].

Относительная нестабильность фосфопротеома к холодовой ишемии хорошо известна, проиллюстрированная в исследовании с использованием свежемороженой ткани молочной железы и яичников, с повреждением 24% фосфопротеома, при этом ни один из общих протеомов не подверглись воздействию в течение 1 часа холодовой ишемии [14].

Обобщая данные литературы, приемлемое время холодовой ишемии для ткани ФФЗП может быть определено как менее 30 минут для анализа фосфопротеинов и 6 часов для анализа белка и мРНК, с более коротким периодом холодовой ишемии, когда мишенями с известной нестабильностью к холодовой ишемии является предмет анализа. В контексте образцов ткани ФФЗП учитывать негативный эффект воздействия холодовой ишемии особенно важно, так как он будет продолжаться после того, как образец помещен в формалин, потому что время, необходимое фиксатору, чтобы проникнуть в центр объекта и полностью зафиксировать блок ткани, очень велико. Скорость проникновения формалина в ткань составляет 1 мм в час, но химические процессы, необходимые и достаточные для фиксации материала, протекают минимум в течение 24 часов. Практически следует стремиться к тому, чтобы материал в течение 1 часа после иссечения поступал к патологоанатому для своевременной последующей его обработки.

## Список литературы

1. Лопухин Ю.М., Коган Э.М., Караганов Я.Л. Ультроструктурные основы жизнеспособности печени, почек и сердца // М.: Медицина, 1977. – 255 с.
2. Alturkustani M., Al-Maghrabi H. The Effects of Delayed Formalin Fixation on Endometrial Pathology in Hysterectomy Specimens // International Journal of Experimental Pathology. – 2019. – Vol. 12, № 8. – P. 3134–3139.

3. Li X., Deavers M.T., Guo M., Liu P., Gong Y., Albarracin C.T., Huo L. The effect of prolonged cold ischemia time on estrogen receptor immunohistochemistry in breast cancer // *Modern Pathology*. – 2013. – Vol. 26. – № 1. – P. 71–78.
4. Portier B.P., Wang Z., Downs-Kelly E., Rowe J.J., Patil D., Lanigan C., Tubbs R.R. Delay to formalin fixation 'cold ischemia time': effect on ERBB2 detection by in-situ hybridization and immunohistochemistry // *Modern pathology*. – 2013. – Vol. 26, № 1. – P. 1–9.
5. Khouiry T., Liu Q., Liu S. Delay to formalin fixation effect on HER2 test in breast cancer by dual-color silver-enhanced in situ hybridization (dual-ISH) // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. – 2014. – Vol. 22, № 9. – P. 688–695.
6. Khouiry T. Delay to formalin fixation alters morphology and immunohistochemistry for breast carcinoma // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. – 2012. – Vol. 20, № 6. – P. 531–542.
7. Neumeister V.M., Anagnostou V., Siddiqui S., England A.M., Zarrella E.R., Vassilakopoulou M., Rimm D.L. Quantitative assessment of effect of preanalytic cold ischemic time on protein expression in breast cancer tissues // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. – 2012. – Vol. 104, № 23. – P. 1815–1824.
8. Freidin M.B., Bhudia N., Lim E., Nicholson A.G., Cookson W.O., Moffatt M.F. Impact of collection and storage of lung tumor tissue on whole genome expression profiling // *The Journal of molecular diagnostics*. – 2012. – Vol. 14, № 2. – P. 140–148.
9. Grizzle W.E., Otali D., Sexton K.C., Atherton D.S. Effects of cold ischemia on gene expression: a review and commentary // *Biopreservation and biobanking*. – 2016. – Vol. 14, № 6. – P. 548–558.
10. Bray S.E., Paulin F.E., Fong S.C., Baker L., Carey F.A., Levison D.A., Kernoban N.M. Gene expression in colorectal neoplasia: modifications induced by tissue ischaemic time and tissue handling protocol // *Histopathology*. – 2010. – Vol. 56, № 2. – P. 240–250.
11. Lange N., Unger F.T., Schöppler M., Pursche K., Jubl H., David K.A. Identification and validation of a potential marker of tissue quality using gene expression analysis of human colorectal tissue // *PloS one*. – 2015. – Vol. 10, № 7.
12. Spruessel A., Steimann G., Jung M., Lee S.A., Carr T., Fentz A.K., Spangenberg J., Zornig C., Jubl H.H., David K.A. Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision // *Biotechniques*. – 2004. – Vol. 36, № 6. – P. 1030–1037.
13. Jackson D., Rowlinson R.A., Eaton C.K., Nickson J.A., Wilson I.D., Mills J.D., Wilkinson R.W., Tonge R.P. Prostatic tissue protein alterations due to delayed time to freezing // *Proteomics*. – 2006. – Vol. 6, № 13. – P. 3901–3908.
14. Mertins P., Yang F., Liu T., Mani D.R., Petyuk V.A., Gillette M.A., Clauser K.R., Qiao J.W., Gritsenko M.A., Moore R.J., Levine D.A., Townsend R., Erdmann-Gilmore P., Snider J.E., Davies S.R., Ruggles K.V., Fenyo D., Kitchens R.T., Li S., Olvera N., Dao F., Rodriguez H., Chan D.W., Liebler D., White F., Rodland K.D., Mills G.B., Smith R.D., Paulovich A.G., Ellis M., Carr S.A. Ischemia in tumors induces early and sustained phosphorylation changes in stress kinase pathways but does not affect global protein levels // *Molecular & cellular proteomics*. – 2014. – Vol. 13, № 7. – P. 1690–1704.

## References

1. Lopukhin Y.M., Kogan E.M., Karaganov Y.L. Ultrastructural fundamentals of the viability of the liver, kidneys, and heart. Moscow, Medicine, 1977; 255.
2. Alturkustani M., Al-Maghrabi H. The Effects of Delayed Formalin Fixation on Endometrial Pathology in Hysterectomy Specimens. *International Journal of Experimental Pathology*. 2019; 12(8): 3134–3139.
3. Li X., Deavers M.T., Guo M., Liu P., Gong Y., Albarracin C.T., Huo L. The effect of prolonged cold ischemia time on estrogen receptor immunohistochemistry in breast cancer. *Modern Pathology*. 2013; 26(1): 71–78. doi: 10.1038/modpathol.2012.135.
4. Portier B.P., Wang Z., Downs-Kelly E., Rowe J.J., Patil D., Lanigan C., Tubbs R.R. Delay to formalin fixation 'cold ischemia time': effect on ERBB2 detection by in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Modern pathology*. 2013; 26(1): 1–9.
5. Khouiry T., Liu Q., Liu S. Delay to formalin fixation effect on HER2 test in breast cancer by dual-color silver-enhanced in situ hybridization (dual-ISH). *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2014; 22(9): 688–695.
6. Khouiry T. Delay to formalin fixation alters morphology and immunohistochemistry for breast carcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2012; 20(6): 531–542.
7. Neumeister V.M., Anagnostou V., Siddiqui S., England A.M., Zarrella E.R., Vassilakopoulou M., Rimm D.L. Quantitative assessment of effect of preanalytic cold ischemic time on protein expression in breast cancer tissues. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2012; 104(23): 1815–1824. doi: 10.1093/jnci/djs438.
8. Freidin M.B., Bhudia N., Lim E., Nicholson A.G., Cookson W.O., Moffatt M.F. Impact of collection and storage of lung tumor tissue on whole genome expression profiling. *The Journal of molecular diagnostics*. 2012; 14(2): 140–148.
9. Grizzle W.E., Otali D., Sexton K.C., Atherton D.S. Effects of cold ischemia on gene expression: a review and commentary. *Biopreservation and biobanking*. 2016; 14(6): 548–558. doi: 10.1089/bio.2016.0013.
10. Bray S.E., Paulin F.E., Fong S.C., Baker L., Carey F.A., Levison D.A., Kernoban N.M. Gene expression in colorectal neoplasia: modifications induced by tissue ischaemic time and tissue handling protocol. *Histopathology*. 2010; 56(2): 240–250.

11. Lange N., Unger F.T., Schöppler M., Pursche K., Jubl H., David K.A. Identification and validation of a potential marker of tissue quality using gene expression analysis of human colorectal tissue. *PloS one*. 2015; 10(7). doi: 10.1371/journal.pone.0133987.
12. Spruessel A., Steimann G., Jung M., Lee S.A., Carr T., Fentz A.K., Spangenberg J., Zornig C., Jubl H.H., David K.A. Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. *Biotechniques*. 2004; 36(6): 1030-1037.
13. Jackson D., Rowlinson R.A., Eaton C.K., Nickson J.A., Wilson I.D., Mills J.D., Wilkinson R.W., Tonge R.P. Prostatic tissue protein alterations due to delayed time to freezing. *Proteomics*. 2006; 6(13): 3901-3908. doi: 10.1002/pmic.200500794.
14. Mertins P., Yang F., Liu T., Mani D.R., Petyuk V.A., Gillette M.A., Clauser K.R., Qiao J.W., Gritsenko M.A., Moore R.J., Levine D.A., Townsend R., Erdmann-Gilmore P., Snider J.E., Davies S.R., Ruggles K.V., Fenyo D., Kitchens R.T., Li S., Olvera N., Dao F., Rodriguez H., Chan D.W., Liebler D., White F., Rodland K.D., Mills G.B., Smith R.D., Paulovich A.G., Ellis M., Carr S.A. Ischemia in tumors induces early and sustained phosphorylation changes in stress kinase pathways but does not affect global protein levels. *Molecular & cellular proteomics*. 2014; 13(7): 169-1704.