

УДК 616-006-073.524-076.5:576.385.5

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ВИМЕНТИНА В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Т.А. Богуш^{1*}, С.А. Калюжный¹, А.А. Башарина¹, А.Н. Гришанина¹,
Ю.Б. Дьякова¹, Е.А. Богуш¹, В.Ю. Кирсанов², М.М. Давыдов²

(¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; ²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет); *e-mail: tatbogush@mail.ru)

Разработан метод двойного иммунофлуоресцентного анализа, ассоциированный с проточной цитофлуориметрией, который позволяет количественно оценить экспрессию специфического мезенхимального белка виментина в эпителиальных клетках солидной опухоли, представляющей собой «смесь» клеток разного гистогенеза. Метод обладает рядом очевидных преимуществ по сравнению с широко применяемыми в клинической практике иммуногистологическими исследованиями опухолевых маркёров: внутрилабораторная воспроизводимость результатов, щадящая преаналитическая подготовка, отсутствие субъективизма в интерпретации результатов, а также интегральность показателя при исследовании большого числа клеток и большого по объёму образца ткани (≥ 5 тыс. клеток, из образца ≥ 2 см в диаметре).

Ключевые слова: иммунофлуоресцентный анализ, проточная цитофлуориметрия, виментин, цитокератины, эпителиально-мезенхимальная трансформация.

Стремительное развитие молекулярного фенотипирования опухолей, направленное на диагностику мишеней противоопухолевых препаратов и персонализацию лекарственной терапии, выявило ряд методических проблем, которые обсуждаются едва ли не в каждой публикации. Причина заключается в противоречивости результатов исследования одного и того же молекулярного маркёра, полученных в разных работах. Разброс большой – от наличия тесной корреляции с клиническими характеристиками заболевания до ее отсутствия [1, 2].

Так, широко применяемый в клинической практике метод иммуногистохимии (ИГХ) включает не только субъективную оценку количества клеток, окрашенных специфическими антителами, но и произвольный выбор «порога позитивности» экспрессии маркёра, который может быть ниже (например, 1%) порога чувствительности метода ИГХ [3, 4].

Другой важнейший фактор неточности ИГХ-анализа – крайне агрессивная преаналитическая подготовка материала, которая включает дегидратацию и гидратацию клеток, а затем так называемую ревитализацию мишени. Более того, при ИГХ-исследовании локального участка опухоли не удается решить проблему молекулярной

гетерогенности клеток в исследуемом новообразовании.

Эти серьезные недостатки сведены к минимуму в разработанной нами иммунофлуоресцентной оценке экспрессии маркёров методом проточной цитофлуориметрии [5]. Преаналитическая подготовка включает только фиксацию материала в 4%-м растворе формальдегида. Метод лишен субъективизма и позволяет одномоментно количественно анализировать ≥ 5 тыс. клеток, которые получают из образцов опухолей большого размера (≥ 2 см в диаметре). Показатель экспрессии маркёра при этом становится интегральным по большому объёму опухоли, а не по локальному участку (как при ИГХ-исследовании), что в значительной степени нивелирует внутриопухолевую гетерогенность [6, 7].

В настоящей работе проведена адаптация этого метода для изучения экспрессии маркёра в определенной клеточной популяции, выделенной из смеси клеток разного гистогенеза, которые присутствуют в новообразовании. Речь идет об оценке в эпителиальных опухолевых клетках *de novo* экспрессии специфического мезенхимального белка виментина, который конститутивно экспрессируется только в клетках мезенхимального происхождения (клетки крови, стромаль-

ные элементы опухоли). Эпителиальные клетки, экспрессирующие виментин, утрачивают присущие им свойства и приобретают особенности мезенхимальных клеток, что сопровождается резистентностью к химиотерапии и повышением метастатического потенциала опухоли. Это доказанный в фундаментальных исследованиях факт, однако в настоящее время этот важнейший опухолевый маркер в клинической практике, как правило, не используется.

Материалы и методы

Исследование проведено на образцах ткани серозного рака яичников, полученных во время хирургических операций, выполненных в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Метод получения одноклеточных суспензий из образцов опухолей описан ранее [5]. Для получения одноклеточной суспензии, пригодной для работы на проточном цитофлуориметре, хирургические образцы опухоли, зафиксированные в 4%-м растворе формальдегида, тщательно измельчали и инкубировали в растворе Версена при 37 °С в течение 30 мин. Измельченную ткань гомогенизировали в фосфатном буфере (pH 7,4) в стеклянном гомогенизаторе пятикратным движением пестика и фильтровали через фильтр диаметром 40 мкм. Полученную суспензию клеток центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин, осадок ресуспендировали в фосфатном буфере (pH 7,4). Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток проводили в 100 мкл суспензии с концентрацией 200 тыс. клеток в 1 мл.

В работе использовали первичные моноклональные антитела при конечном разведении 1:200.

1. Мышиные антитела, специфичные к широкому спектру цитокератинов (панцитокератины, клон MNF116, «DAKO», США).

2. Кроличьи антитела, специфичные к белку виментину (клон SP20, «BIO CARE», США).

В качестве вторичных использовали антикроличьи антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем DyLight650 (ab98510, Великобритания) и антимышиные антитела, конъюгированные с DyLight488 (ab98637, Великобритания) при конечном разведении 1:1000 и 1:120 соответственно. Для удаления из анализа дегриза и эритроцитов использовали краситель ДНК Hoechst 33258 («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 1,2 мкг/мл.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре «Navios» («Beckman Coulter», США). Регистрацию сигнала флуорес-

ценции красителей DyLight488, DyLight650 и Hoechst 33258 проводили в каналах FL-1, FL-6 и FL-9 соответственно. Для визуализации распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре использовали точечные диаграммы, построенные с помощью программы WinMDI 2.9. Уровень *de novo* экспрессии виментина в эпителиальных клетках определяли как отношение (%) числа клеток, коэкспрессирующих цитокератины и виментин, к общему числу опухолевых клеток, экспрессирующих цитокератины.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка и парного *t*-критерия Стьюдента, включенных в пакет GraphPad Prism 7.0 («GraphPad Software», «San Diego CA», США). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В настоящем исследовании разработан метод двойного иммунофлуоресцентного окрашивания, который позволяет оценить экспрессию специфического мезенхимального белка виментина в эпителиальных клетках солидной опухоли, которая представляет «смесь» клеток разного гистогенеза. Подобное изменение молекулярной характеристики эпителиальных опухолевых клеток – признак так называемой эпителиально-мезенхимальной трансформации, которая ассоциирована с повышением метастатического потенциала опухоли и ее резистентности к противоопухолевой химиотерапии [8]. Виментин – один из наиболее надежных маркеров этого молекулярного изменения, так как в состоянии эпителиально-мезенхимальной трансформации клетки экспрессируют мезенхимальный белок виментин *de novo*, что делает результаты клинических оценок значительно более определенными.

Проведение двойного иммунофлуоресцентного окрашивания для количественной оценки уровня виментина в популяции эпителиальных клеток солидных новообразований требует соблюдения нескольких обязательных условий.

Адекватные для каждого из исследуемых белковых маркеров антитела должны удовлетворять определенным условиям. Первичные антитела должны быть неконъюгированными, моноклональными и полученными от разных видов животных. Вторичные антитела должны быть конъюгированы с флуорохромами с максимально удаленными спектрами флуоресценции. В на-

стоящем исследовании для оценки экспрессии цитокератинов были выбраны первичные мышечные моноклональные антитела и вторичные антимышечные, конъюгированные с флуорохромом DyLight488, а для виментина – первичные кроличьи антитела и вторичные антикроличьи DyLight650.

Выбор концентрации первичных и вторичных антител проведен при одиночном окрашивании маркёров на культуре эпителиальных опухолевых клеток NCI/ADR, в которых ранее нами был выявлен высокий уровень экспрессии цитокератинов и виментина [9]. В дальнейшем эту культуру клеток использовали во всех экспериментах для контроля активности как первичных, так и вторичных антител.

При разработке методики двойного иммунофлуоресцентного окрашивания мы ориентировались на условия проведения одиночного окрашивания маркёров [10]. В результате, оптимальным признан следующий алгоритм исследования (табл. 1).

На I этапе для выделения фракции эпителиальных клеток одноклеточную суспензию, полученную из исследуемого опухолевого узла, инкубировали в течение ночи (15–20 ч) с первичными мышечными моноклональными антителами к широкому спектру цитокератинов. На II этапе суспензию клеток в течение 1 ч инкубировали с кроличьими моноклональными первичными

антителами к виментину для выделения пула эпителиальных клеток, экспрессирующих данный мезенхимальный белок. После однократной отмывки свободных первичных антител к цитокератинам и виментину в 20-кратном объеме 0,5%-го раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA) в фосфатном буфере pH 7,4 (этап III) клетки инкубировали в течение 1,5 ч одновременно вторичными антителами к цитокератинам и виментину (этап IV). В предварительных экспериментах показано, что при таком проведении анализа (одновременное добавление вторичных антител) результаты идентичны данным, полученным при последовательной инкубации в течение 1,5 ч с каждым из антител, конъюгированных с разными флуорохромами (DyLight488 и DyLight650).

Для удаления из анализа дебриса и эритроцитов в течение 15 мин клеточную суспензию инкубировали с красителем ДНК Hoechst 33258 (этап V), после чего клетки дважды отмывали от свободных флуорохромов в 20-кратном объеме 0,5%-го раствора BSA в фосфатном буфере (pH 7,4) (заключительный VI этап) и анализировали на проточном цитофлуориметре.

Два примера результатов, полученных при использовании разработанного метода (рис. 1, 2), демонстрируют точечные диаграммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в разных каналах проточного цитофлуориметра.

Т а б л и ц а 1

Алгоритм проведения двойного иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к цитокератинам и виментину

Этап анализа	Условия проведения анализа (в темноте при +4 °С, pH 7,4)
I	инкубация в течение ночи (15–20 ч) с первичными мышечными моноклональными антителами к цитокератинам (клон MNF116, «ДАКО») в конечном разведении 1:200
II	инкубация в течение 1 ч с первичными кроличьими моноклональными антителами к мезенхимальному белку виментину (клон SP20, «BIOCARE») в конечном разведении 1:200
III	однократная отмывка свободных первичных антител в 20-кратном объеме 0,5%-го раствора BSA* в фосфатном буфере (pH 7,4)
IV	одновременная инкубация в течение 1,5 ч с вторичными антимышечными (ab98637, DyLight488) и антикроличьими (ab98510, DyLight650) антителами в конечном разведении 1:120 и 1:1000 соответственно
V	инкубация в течение 15 мин с красителем ДНК Hoechst 33258 («Sigma-Aldrich») в концентрации 1,2 мкг/мл
VI	двукратная отмывка свободных первичных антител в 20-кратном объеме 0,5%-го раствора BSA* в фосфатном буфере (pH 7,4)

П р и м е ч а н и е. BSA* – бычий сывороточный альбумин (фракция V).

ПРИМЕР 1

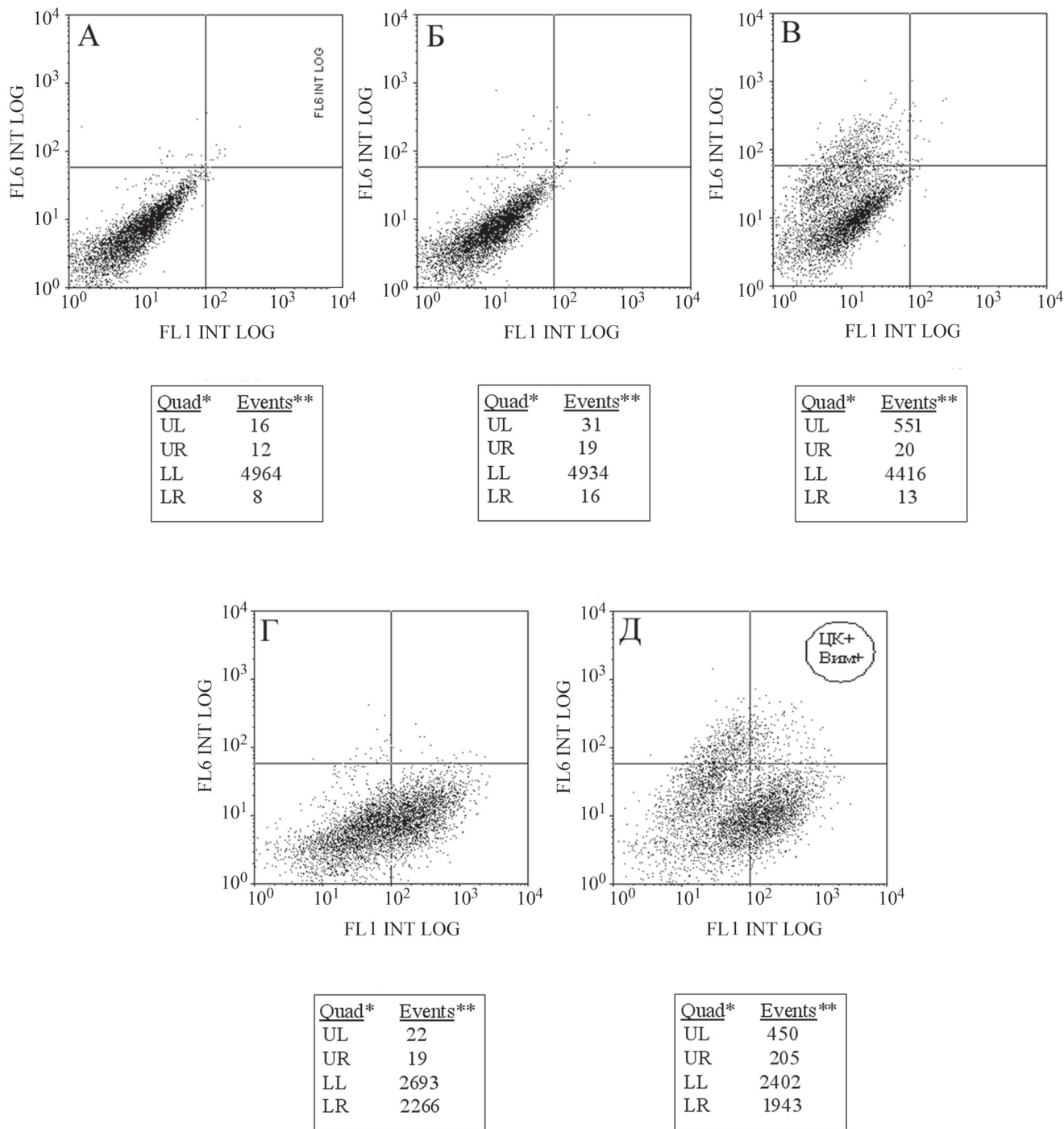


Рис. 1. Пример 1. Точечные диаграммы распределения клеток по двум каналам флуоресценции, иллюстрирующих алгоритм количественной оценки уровня эпителиально-мезенхимальной трансформации при последовательном иммунофлуоресцентном окрашивании клеток рака яичников антителами к эпителиальным цитокератинам и к мезенхимальному белку виментину. По оси абсцисс – интенсивность внутриклеточной флуоресценции (усл. ед.) красителя DyLight488, по оси ординат – DyLight650. А – автофлуоресценция (интактные клетки); Б – инкубация клеток только с вторичными антителами; В и Г – одиночное окрашивание клеток антителами к виментину и цитокератинам соответственно; Д – двойное окрашивание клеток антителами к виментину и цитокератинам. В таблицах под диаграммами: Quad* – обозначение квадранта: UL – верхний левый, UR – верхний правый, LL – нижний левый и LR – нижний правый; Events** – количество клеток в каждом квадранте

ПРИМЕР 2

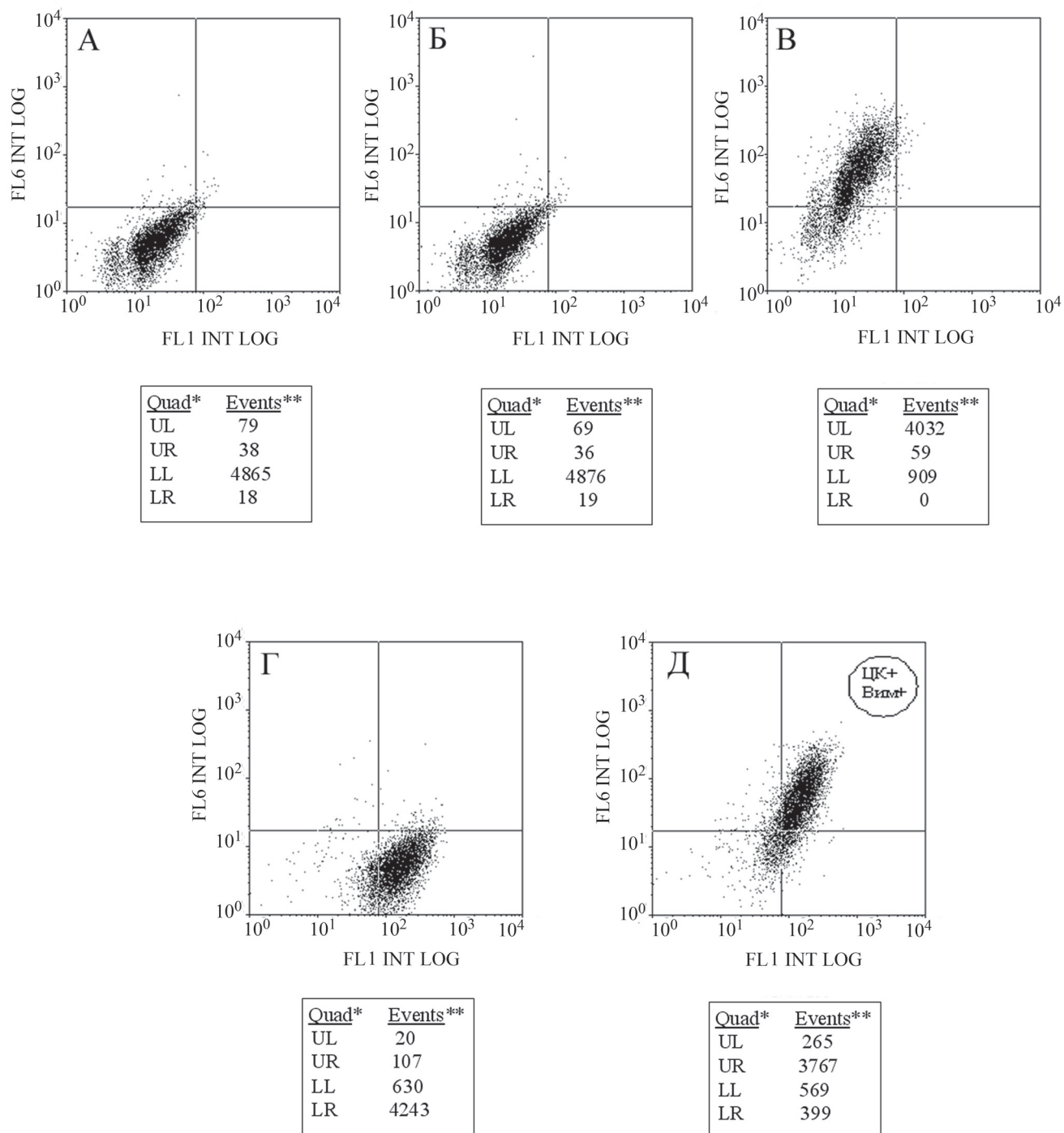


Рис. 2. Пример 2. Точечные диаграммы распределения клеток по двум каналам флуоресценции, иллюстрирующих алгоритм количественной оценки уровня эпителиально-мезенхимальной трансформации при последовательном иммунофлуоресцентном окрашивании клеток рака яичников антителами к эпителиальным цитокератинам и к мезенхимальному белку виментину. По оси абсцисс – интенсивность внутриклеточной флуоресценции (усл. ед.) красителя DyLight488, по оси ординат – DyLight650. А – автофлуоресценция (интактные клетки); Б – инкубация клеток только с вторичными антителами; В и Г – одиночное окрашивание клеток антителами к виментину и цитокератинам соответственно; Д – двойное окрашивание клеток антителами к виментину и цитокератинам. В таблицах под диаграммами: Quad* – обозначение квадранта: UL – верхний левый, UR – верхний правый, LL – нижний левый и LR – нижний правый; Events** – количество клеток в каждом квадранте

Разработан следующий алгоритм оценки полученных результатов.

Анализ автофлуоресценции интактных клеток и клеток после инкубации с вторичными антителами (левый нижний квадрант на диаграммах А и Б), проводится для контроля отмытки клеток от неспецифической флуоресценции (диаграммы А и Б) и для дальнейшей точной диспозиции областей размещения клеток, окрашенных разными антителами. Вертикальная и горизонтальная линии устанавливаются таким образом, чтобы число клеток в каждом из квадрантов (помимо нижнего левого) при окраске вторичными антителами (диаграмма Б), не превышало 3% от общего числа клеток. В этом случае в левом верхнем квадранте (диаграмма В) локализуются клетки, окрашенные только виментином, в правом нижнем квадранте (диаграмма Г) – клетки, окрашенные только цитокератинами. Это позволяет контролировать активность антител к этим маркерам при проведении каждого анализа.

При двойном иммунофлуоресцентном окрашивании (диаграмма Д) в правом верхнем квадранте локализуются клетки с фенотипом эпителиаль-

но-мезенхимальной трансформации (ЦК⁺Вим⁺). Эпителиальные клетки, экспрессирующие только специфические цитокератины (ЦК⁺), локализуются в нижнем правом квадранте. Уровень *de novo* экспрессии виментина в эпителиальных клетках (уровень эпителиально-мезенхимальной трансформации) оценивается как доля (%) эпителиальных клеток, коэкспрессирующих цитокератины и виментин (фенотип ЦК⁺Вим⁺ – верхний правый квадрант на диаграмме Д), в общем количестве проанализированных эпителиальных опухолевых клеток (сумма клеток в верхнем и нижнем правых квадрантах на диаграмме Д).

Построение точечных диаграмм и подсчет числа клеток в каждом из квадрантов (таблицы под гистограммами) проводится с помощью программы WinMDI 2.9. Общее число исследованных клеток (сумма клеток в четырех квадрантах) во всех случаях составляет 5000.

Результаты анализа опухолей на примерах 1 и 2 показывают, что уровни эпителиально-мезенхимальной трансформации (клетки с фенотипом ЦК⁺Вим⁺) различаются кардинально: 8,5% (рис. 1) и 90% (рис. 2).

Т а б л и ц а 2

Уровень коэкспрессии цитокератинов и виментина в опухолевых клетках рака яичников и возможность верификации результатов анализа после длительного хранения образца в 4%-м растворе формальдегида (рН 7,4)

Номер образца	Уровень коэкспрессии цитокератинов и виментина, %		Изменение показателя при повторном анализе, %*	p**
	исходный	после двух лет хранения образца		
1	79	85	6	0,837
2	34	28	-6	
3	62	57	-5	
4	11	10	-1	
5	40	37	-3	
6	40	38	-2	
7	70	76	6	
8	33	33	0	
9	42	45	3	
10	48	53	5	
Mean±SD***	45,9±19,8	46,2±22,4	3,7±2,2 (по модулю)	

* Разница между показателями коэкспрессии цитокератинов и виментина (%) при исходном и повторном анализе: «-» – уменьшение, «+» – увеличение; ** – парный *t*-критерий Стьюдента; *** – среднее значение ± стандартное отклонение.

Результаты оценки уровня коэкспрессии цитокератинов и виментина в эпителиальных опухолевых клетках серозного рака яичников ($n = 10$) представлены в табл. 2. Здесь же приведены данные о влиянии длительного хранения клеточных суспензий в 4%-м растворе формальдегида в фосфатном буфере (рН 7,4). Важно отметить, что повторный анализ проводил другой исследователь.

Первое, что обращает на себя внимание – опухоли значительно различаются по уровню коэкспрессии виментина и цитокератинов, т.е. по уровню *de novo* экспрессии в эпителиальных опухолевых клетках мезенхимального белка. Минимальное и максимальное значения составили 11 и 79% соответственно. Среднее значение показателя $45,9 \pm 19,8\%$.

Важно, что при повторном анализе получены сходные результаты. В среднем различие между исходным значением уровня коэкспрессии виментина и цитокератинов (результат получен в течение 1–2 недель после оперативного вмешательства) и при повторном анализе (после двух лет хранения в 4%-м растворе формальдегида) составило $3,7 \pm 2,2\%$ по модулю. Согласно попарному *t*-критерию Стьюдента, различия между данными группами статистически незначимы ($p = 0,837$).

Внутрилабораторная воспроизводимость результатов после длительного хранения материала свидетельствует о стабильности мезенхимального белка виментина, экспрессирующегося в эпителиальных клетках рака яичников, и об адекватности разработанного метода его оценки. Безусловно, ценность метода повышает возможность верификации результатов анализа в случае его

клинического использования. Более того, алгоритм проведения анализа включает ночную инкубацию с первичными антителами, что не требует изменения графика работы персонала лаборатории. Такие характеристики предложенного метода, как щадящая преаналитическая подготовка, лишенная субъективизма высокая точность интерпретации результатов, воспроизводимость «в разных руках» и интегральность оценки показателя при исследовании большого числа клеток из значительного по объему образца ткани (≥ 5 тыс. клеток из образца ≥ 2 см в диаметре) дают ему существенные преимущества по сравнению с распространенным иммуногистологическим исследованием опухолевых маркеров.

Что касается клинической значимости разработанного метода количественной оценки виментина в эпителиальных опухолевых клетках, выделенных из популяции клеток разного гистогенеза, которые присутствуют в любом солидном новообразовании, то она безусловна. Экспрессия этого маркера указывает на эпителиально-мезенхимальную трансформацию опухолевых клеток, которая приводит к повышению метастатического потенциала опухоли и резистентности к химиотерапии [8].

Работа выполнена в рамках программы исследований, запланированных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Рег. номер 115112540012).

Конфликта интересов нет.

Дополнительной информации нет.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sallum L.F., Andrade L., Bastos Eloy da Costa L., Ramalho S., Ferracini A.C., Natal R.A., Brito A.B.C., Sarian L.O., Derchain S. // *Int J Gynecol Cancer*. 2018. N 283. P. 437 (DOI: 10.1097/IGC.0000000000001205).
2. Chen M., Yao S., Cao Q., Xia M., Liu J., He M. // *Oncotarget*. 2016. Vol. 8. N 64. P. 107877 (DOI: 10.18632/oncotarget.14112).
3. Hammond M.E., Hayes D.F., Dowsett M., Allred D.C., Hagerty K.L., Badve S., Fitzgibbons P.L., Francis G., Goldstein N.S., Hayes M., Hicks D.G., Lester S., Love R., Mangu P.B., McShane L., Miller K., Osborne C.K., Paik S., Perlmutter J., Rhodes A., Sasano H., Schwartz J.N., Sweep F.C., Taube S., Torlakovic E.E., Valenstein P., Viale G., Visscher D., Wheeler T., Williams R.B., Wittliff J.L., Wolff A.C. // *Arch Pathol Lab Med*. 2010. Vol. 134. N 7. P. e48 (DOI: 10.1043/1543-2165-134.7.e48).
4. Meng X., Huang Z., Teng F., Xing L., Yu J. // *Cancer Treat Rev*. 2015. Vol. 41. N 10. P. 868 (DOI: 10.1016/j.ctrv.2015.11.001).
5. Богуш Т.А., Калюжный С.А., Дудко Е.А., Кирсанов В.Ю., Тюляндина А.С., Богуш Е.А., Тюляндин С.А., Давыдов М.М. // *Вестн. Моск. ун-та Сер. 2. Химия*. 2016. Т. 57. № 5. С. 330 [Bogush T.A., Kaliuzhny S.A., Dudko E.A., Kirsanov V.Yu.B., Tjulandina A.S., Bogush E.A., Tjulandin S.A., Davydov M.I. // *Mosc. Univ. Chem. Bull*. 2016. Vol. 71. N 5–6. P. 307] (DOI: 10.3103/S0027131416050035).
6. Tellez-Gabriel M., Ory B., Lamoureux F., Heymann M.F., Heymann D. // *Int J Mol Sci*. 2016. Vol. 17. N 12. P. e2142.
7. Богуш Т.А., Дудко Е.А., Родионова М.В., Богуш Е.А., Кирсанов В.Ю., Родионов В.В., Воротников И.К. // *ДАН*. 2015. Т. 465. № 2. С. 235 [Bogush T.A.,

- Dudko E.A., Rodionova M.V., Bogush E.A., Kirsanov V.J., Rodionov V.V., Vorotnikov I.K.* // Dokl. Biochem. Biophys. 2015. Vol. 465. N 2. P. 361] (DOI: 10.1134/S1607672915060058).
8. *Huang J., Li H., Ren G.* // Int J Oncol. 2015. Vol. 47. N 3. P. 840 (DOI: 10.3892/ijo.2015.3084).
9. *Богущ Т.А., Калюжный С.А., Четыркина М.Р., Ястребова М.А., Щербakov А.М., Мамичев И.А., Каменский А.А.* // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 2018. Т. 59. № 5. С. 374 [*Bogush T.A., Kalyuzhny S.A., Chetyrkina M.R., Yastrebova M.A., Scherbakov A.M., Ryabinina O.M., Mamichev I.A., Bogush E.A., Kamensky A.A.* // Mosc. Univ. Chem. Bull. 2018. Vol. 73. № 5. P. 248] (DOI: 10.3103/S0027131418050036).
10. *Богущ Т.А., Тихомиров М.В., Дудко Е.А., Синицына М.Н., Раманаускайте Р.Ю., Полоцкий Б.Е., Тюляндин С.А., Давыдов М.И.* // Вестн. Моск. ун-та Сер. 2, Химия. 2012. Т. 53. №3. С. 207 [*Bogush T.A., Tikhomirov M.V., Dudko E.A., Sinitsyna M.N., Ramanauskaite R.J., Polotsky B.E., Tjulandin S.A., Davidov M.I.* // Mosc. Univ. Chem. Bull. 2012. Vol. 67. N 3. P. 142 (DOI: 10.3103/S0027131412030054).

Поступила в редакцию 10.03.2019

Получена после доработки 12.03.2019

Принята к публикации 14.05.2019

IMMUNOFLUORESCENCE ANALYSIS OF VIMENTIN EXPRESSION IN EPITHELIUM CELLS

T.A. Bogush^{1*}, S.A. Kaliuzhny¹, A.A. Basharina¹, A.N. Grishanina¹, Yu.B. Dyakova¹, E.A. Bogush¹, V.Yu. Kirsanov², M.M. Davydov²

(¹ FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation; ² FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University); *e-mail: tatbogush@mail.ru)

A new method of dual immunofluorescence analysis by flow cytometry was developed to evaluate the quantitative expression of mesenchymal marker vimentin in epithelium cells of solid tumor, which in its turn is a “mixture” of different histogenesis cells. The method has a number of evident advantages as compared to clinically used immunohistochemistry technique for marker investigation: intermediate precision of results, gentle pre-analytical preparation, lack of subjectivity in results interpretation and integral evaluation of markers expression in a large number of cells from a large volume tumor tissue sample (≥5k cells out of ≥2 cm in sample diameter).

Key words: immunofluorescence analysis, flow cytometry, vimentin, cytokeratins, epithelial-to-mesenchymal transition.

Сведения об авторах: *Богущ Татьяна Анатольевна* – руководитель группы молекулярных маркеров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, профессор, докт. биол. наук (tatbogush@mail.ru); *Калюжный Сергей Андреевич* – мл. науч. сотр. группы молекулярных маркеров лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (labmedchem@mail.ru); *Башарина Анна Александровна* – мл. науч. сотр. группы молекулярных маркеров лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (basharinaa@inbox.ru); *Гришанина Анна Николаевна* – науч. сотр. группы молекулярных маркеров лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (labmedchem@mail.ru); *Дьякова Юлия Борисовна* – науч. сотр. группы молекулярных маркеров лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей (labmedchem@mail.ru); *Богущ Елена Александровна* – ст. науч. сотр. хирургического отделения № 2, канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); *Кирсанов Владислав Юрьевич* – доцент кафедры онкологии лечебного факультета ФGAOY BO Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); *Давыдов Михаил Михайлович* – зав. кафедрой онкологии лечебного факультета ФGAOY BO Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, чл.-корр. РАН, докт. мед. наук (labmedchem@mail.ru).