

Экспрессия виментина в культурах клеток эпителиальных опухолей человека

Т.А. Богуш¹, С.А. Калюжный¹, М.Р. Четыркина², М.А. Ястребова², А.М. Щербаков¹,
И.А. Мамичев¹, А.А. Каменский²

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Контакты: Татьяна Анатольевна Богуш labmedchem@mail.ru

Введение. Клеточные культуры, используемые в качестве модельных при исследовании опухолей эпителиального происхождения, получают не только из солидных новообразований, но и из экстрацеллюлярных жидкостей. Известно, что диссеминация рака яичников по брюшине и дальнейший рост опухолевых клеток в асцитической жидкости сопровождаются активацией в них эпителиально-мезенхимального перехода и, следовательно, клеточные культуры, полученные из экстрацеллюлярных жидкостей, могут иметь молекулярный фенотип, отличный от первичного новообразования.

Цель исследования – оценка «сохранности» эпителиального фенотипа клеточных линий рака молочной железы и яичников.

Материалы и методы. В работе использованы клеточные линии, полученные из плевральной жидкости (MCF-7, T-47D), молочицы (HBL-100), солидного опухолевого узла (BT-474, HCC1937) больных раком молочной железы и асцитической жидкости (SCOV-3) больной раком яичников. Экспрессию цитокератинов и виментина оценивали с помощью количественного иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией.

Результаты. Высокий уровень виментина в клетках, полученных из экстрацеллюлярных жидкостей, сохранялся (линия HBL-100), умеренно снижался (клетки SCOV-3) и даже утрачивался (клетки MCF-7 и T-47D). Клетки линии HCC1937, полученные из солидного узла с ожидаемо низкой экспрессией виментина, при росте в культуре приобрели молекулярный фенотип с высоким уровнем экспрессии этого мезенхимального маркера. В клетках рака молочной железы BT-474, полученных из солидного новообразования, по показателю экспрессии виментина обнаружено сохранение эпителиального фенотипа при росте *in vitro*.

Заключение. Оценка параметров экспрессии *de novo* мезенхимального белка виментина показала, что фенотип опухоли в организме не всегда реализуется в клетках, адаптированных к росту в культуре, и не всегда является «строго» эпителиальным, что необходимо учитывать при разного рода молекулярных исследованиях эпителиальных клеток *in vitro*.

Ключевые слова: эпителиально-мезенхимальный переход, виментин, клеточная культура, рак молочной железы, рак яичников

Для цитирования: Богуш Т.А., Калюжный С.А., Четыркина М.Р. и др. Экспрессия виментина в культурах клеток эпителиальных опухолей человека. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(2):24–30.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-2-24-30

Vimentin expression in human cell lines of epithelial tumors

T.A. Bogush¹, S.A. Kaliuzhny¹, M.R. Chetyrkina², M.A. Yastrebova², A.M. Scherbakov¹, I.A. Mamichev¹, A.A. Kamensky²

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²M.V. Lomonosov Moscow State University; Build. 12, 1 Leninskie gory, Moscow 119991, Russia

Background. Cell cultures used as a models in studies of epithelial tumors, are obtained not only from solid tumors, but also from extracellular fluids. It is known that dissemination of ovarian cancer in the peritoneum and further growth of tumor cells in ascetic liquid is accompanied with the activation of epithelial-mesenchymal transition, and, therefore, cell cultures derived from extracellular fluids can have a distinct molecular phenotype from primary tumors.

Objective: evaluation the “persistence” of epithelial phenotype in breast and ovarian cancer cell cultures.

Materials and methods. The cells obtained from pleural fluid (MCF-7, T-47D), colostrum (HBL-100), solid tumors (BT-474, HCC1937) of patients with breast cancer and ascitic fluid (SCOV-3) of patients with ovarian cancer. The expression of cytokeratins and vimentin was evaluated using a quantitative immunofluorescence method associated with flow cytometry.

Results. Vimentin expression in cells derived from extracellular fluids was not changed (line HBL-100), slightly decreased (SCOV-3 cells), or even was lost (MCF-7 and T-47D cells). HCC1937 cells obtained from solid tumor with expected low expression of vimentin acquired a molecular phenotype with a high expression of this mesenchymal marker. In breast cancer cells BT-474 derived from solid tumor a “persistence” of epithelial phenotype was discovered.

Conclusion. Quantitative assessment of the *de novo* expression of mesenchymal protein vimentin showed that the tumor phenotype within the organism is not always realized in cells adapted to growth in culture, and is not always «strictly» epithelial, and this evidence must be considered with different kinds of molecular studies of epithelial cells *in vitro*.

Key words: epithelial-to-mesenchymal transition, vimentin, cell culture, breast cancer, ovarian cancer

For citation: Bogush T.A., Kaliuzhny S.A., Chetyrkina M.R. et al. Vimentin expression in human cell lines of epithelial tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5 (2):24–30.

Введение

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) – один из важнейших признаков агрессивности опухолевого процесса, который ассоциирован с повышением метастатического потенциала эпителиальных опухолевых клеток и снижением чувствительности к противоопухолевой терапии [1–3]. В ходе ЭМП нарушается экспрессия белков клеточных контактов [4–6], при этом выявляется экспрессия специфического мезенхимального белка виментина [5, 7]. Эти изменения обратимы [8, 9], и подавление экспрессии виментина индуцирует процесс мезенхимально-эпителиального перехода [10, 11]. Таким образом, экспрессия *de novo* мезенхимального белка виментина является признанным специфическим маркером изменения молекулярного фенотипа эпителиальных клеток в сторону мезенхимального [11, 12].

Ранее мы описали подобные изменения молекулярного фенотипа опухолевых клеток больных раком яичников (РЯ). Было показано, что в отличие от солидной формы, клетки рецидивного асцитного РЯ, помимо эпителиальных цитокератинов, экспрессируют общий лейкоцитарный антиген CD45 и маркер мезенхимальных клеток виментин [13]. Если принимать во внимание тот факт, что источником эпителиальных клеточных культур, которые широко используются в фундаментальных исследованиях, являются не только солидные новообразования, но и экстрацеллюлярные жидкости, представляется важной оценка «сохранности» эпителиального фенотипа при адаптации клеток к росту *in vitro*.

Цель исследования – количественная оценка *de novo* экспрессии виментина в культурах клеток, полученных из эпителиальных опухолей, различающихся формой роста в организме. Контролем для сравнения послужили клетки солидной и рецидивной асцитной опухолей больной серозным РЯ.

Материалы и методы

В качестве референсного контроля использовали клетки первичного серозного РЯ III стадии, полученные из хирургического биопсийного образца, и клетки из асцитической жидкости при диссеминации процесса по брюшине той же пациентки. Суспензии клеток инкубировали последовательно с первичными мышинными антителами к цитокератинам 5/6/8/17 (клоны PAN, AE1/AE3, MNF116; Dako, США), затем с вторичными антимышиными антителами DyLight488 (Abcam, Великобритания), затем с первичными кроличьими антителами к виментину (клон SP20; BIOCARE, США) и, наконец, с вторичными антикроличьими антителами

DyLight650 (Abcam, Великобритания). Для выведения из анализа дебриса и эритроцитов после завершения инкубации с вторичными антителами клетки инкубировали со специфическим красителем ДНК Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США).

Для исследования уровня экспрессии мезенхимального маркера виментина в культурах использовали клеточные линии, полученные из плевральной жидкости (MCF-7, T-47D), молозива (HBL-100), солидного опухолевого узла (BT-474, HCC1937) больных раком молочной железы (РМЖ) и асцитической жидкости (SCOV-3) больной РЯ. В каталоге Американской коллекции клеточных культур ATCC (США) клеточные линии числятся под номерами: НТВ-22 (MCF-7), НТВ-133 (T-47D), НТВ-124 (HBL-100), НТВ-20 (BT-474), CRL-2336 (HCC1937), НТВ-77 (SCOV-3).

Все клеточные линии, полученные из ATCC, до проведения экспериментов хранились в криобанке НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Идентичность линий подтверждали с помощью анализа коротких tandemных повторов (GORDIZ, Россия). Клетки культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM; Gibco, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки телят (HyClone, США), 50 ед/мл гентамицина (ПанЭко, Россия) и 0,1 мг/мл пирувата натрия (Santa Cruz, США) при температуре 37 °С, 5 % CO₂ и относительной влажности 80–85 %. В экспериментах использовали культуры в логарифмической фазе роста.

Следует отметить, что в процессе нашего исследования появились новые данные, касающиеся культуры HBL-100, в которой при проведении стандартных цитогенетических исследований (флуоресцентная гибридизация *in situ*, метод дифференциального G-окрашивания хромосом) обнаружили присутствие Y-хромосомы, вследствие чего данная культура не соответствует первичному описанию и снята с производства. Поскольку культуры содержат только клетки эпителиального происхождения, проводилось только одиночное окрашивание на виментин с использованием вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентным красителем DyLight650.

Показатели экспрессии цитокератинов и виментина оценивали с помощью количественного иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией, с применением разработанной ранее методики [14]. Флуоресценцию клеток измеряли на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Регистрацию сигнала флуоресценции красителя DyLight488 проводили в канале FL-1, а для DyLight650 использовали канал FL-6. Уровень экспрессии –

количество специфически флуоресцирующих клеток (в процентах) по отношению к контролю (инкубация с вторичными антителами) — анализировали с помощью критерия Колмогорова—Смирнова, включенного в программу FlowJo 10.0.8 (FlowJo LLC, США). Интенсивность экспрессии (в условных единицах) — отношение специфической интенсивности флуоресценции клеток после инкубации с первичными и вторичными антителами к аналогичному показателю в контроле после инкубации — только с вторичными антителами. Интегральный индекс экспрессии оценивали как произведение доли клеток, экспрессирующих виментин, и интенсивности экспрессии маркера. Точечные гистограммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре получали с помощью программы WinMDI 2.9 (The Scripps Research Institute, США).

Результаты и обсуждение

На 1-м этапе исследования проведена сравнительная оценка уровня экспрессии мезенхимального маркера виментина в клетках, полученных из асцитической жидкости и солидного новообразования больной РЯ. Для точной оценки показателя *de novo* экспрессии виментина эпителиальные опухолевые клетки были предварительно окрашены антителами к цитокератинам и затем — к виментину. Метод двойного окрашивания биопсийных образцов антителами применяли в целях исключения из эксперимента мезенхимальных клеток, также экспрессирующих виментин, например фибробластов, которые обязательно присутствуют в биопсийных образцах в некотором количестве. Уровень ЭМП в исследуемой опухоли оценивали как долю клеток, коэкспрессирующих цитокератины и виментин, от общего количества эпителиальных клеток, включенных в анализ.

Точечные гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре представлены на рис. 1. На гистограммах № 1 продемонстрирована автофлуоресценция исследуемых клеток (левый нижний квадрант). Гистограммы № 2 показывают изменение исходной автофлуоресценции клеток после их инкубации с вторичными антителами, которая возникает в результате неспецифических взаимодействий вторичных антител с клетками (левый нижний квадрант). В дальнейшем этот анализ позволяет точно локализовать области расположения клеток, специфически окрашенных антителами к виментину (левый верхний квадрант, гистограммы № 3) или к цитокератинам (правый нижний квадрант, гистограммы № 4). При последовательном окрашивании этими антителами клеток одной клеточной суспензии (двойное флуоресцентное окрашивание, гистограммы № 5), в правом нижнем квадранте по-прежнему локализуются эпителиальные цитокератинположительные, а в верхнем левом — ви-

ментинположительные клетки. В правом верхнем квадранте при этом локализуются клетки, коэкспрессирующие виментин и цитокератины.

На рис. 1 представлен результат иммунофлуоресцентного окрашивания клеток, полученных из образца солидной опухоли (образец 1), и асцитической жидкости (образец 2) той же больной РЯ. Отчетливо видна разница в уровне экспрессии виментина в эпителиальных опухолевых клетках в исследованных образцах: низкий (26 %) уровень маркера в первом случае и высокий (86 %) — во втором. Таким образом, продемонстрировано почти 4-кратное превышение показателя *de novo* экспрессии мезенхимального белка виментина в клетках РЯ, полученных из асцитической жидкости при диссеминации опухоли по брюшине, по сравнению с клетками солидного новообразования этой же больной. Эти результаты совпадают с ранее описанным наблюдением [13].

В следующей части работы проведено сравнение клеточных культур, полученных из эпителиальных опухолей, различающихся по форме роста в организме. Гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции после иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к мезенхимальному маркеру виментин представлены на рис. 2.

Неожиданным оказались различия между клетками линий ВТ-474 и НСС1937, полученных из солидного узла РМЖ. В первом случае *de novo* экспрессия виментина оказалась минимальной, а во втором была выражена значительно. В клетках линии ВТ-474 по сравнению с клетками линии НСС1937 уровень экспрессии виментина оказался ниже более чем в 2 раза (29 % против 71 %), интенсивность экспрессии — в 3 раза (2,1 против 6,4), а интегральный индекс — более чем в 6 раз (0,7 против 4,8).

Отсутствие ассоциации молекулярного фенотипа клеток, растущих в культуре, относительно формы их существования в организме также продемонстрировано при исследовании культур клеток линий МСF-7 и Т-47D, полученных из плевральной жидкости больных РМЖ при диссеминации опухоли по плевре (см. рис. 2). Не отмечено ожидаемо высокой экспрессии виментина в клетках обеих культур. Уровень экспрессии маркера в клетках линий МСF-7 и Т-47D составил 8 и 20 %, интенсивность — 1,1 и 1,3, а интегральный индекс экспрессии 0,2 и 0,4 соответственно. Иными словами, судя по экспрессии виментина, молекулярный фенотип клеток линий МСF-7 и Т-47D максимально приближен к эпителиальному.

В то же время исследование культур клеток линий SCOV-3 и НBL-100, также полученных из экстрацеллюлярных жидкостей (асцитической жидкости и молозива), выявило в разной степени ярко выраженный фенотип ЭМП. Так, в клетках РЯ линии SCOV-3 уровень, интенсивность и интегральный индекс экспрессии составили 51 %, 3,6 и 1,9, а в клетках РМЖ линии НBL-100 — 75 %, 6,8 и 5,1 соответственно.

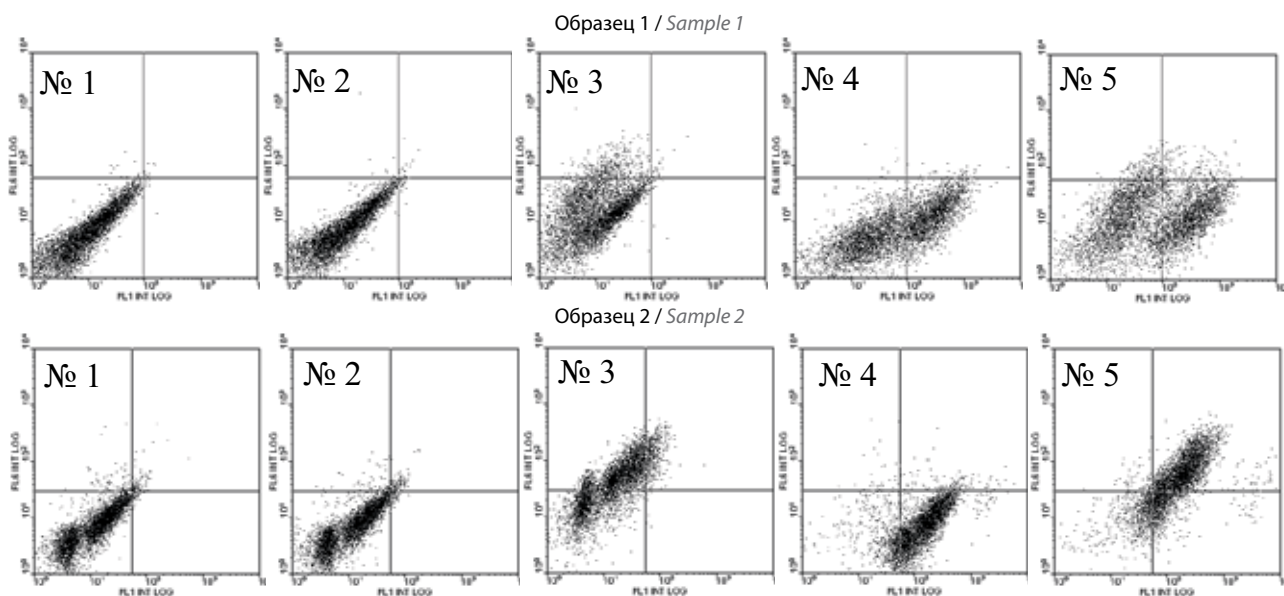


Рис. 1. Результаты последовательного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток рака яичников специфическими антителами к виментину и цитокератину. Образец 1 – клетки солидной опухоли; образец 2 – клетки, полученные из асцитической жидкости той же больной. Представлены точечные диаграммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре: № 1 – автофлуоресценция (левый нижний квадрант); № 2 – инкубация с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем (левый нижний квадрант); № 3 – клетки, экспрессирующие виментин (левый верхний квадрант); № 4 – клетки, экспрессирующие цитокератины (правый нижний квадрант); № 5 – клетки, экспрессирующие цитокератины (правый нижний квадрант) и коэкспрессирующие цитокератины и виментин (правый верхний квадрант)

Fig. 1. Results of sequential immunofluorescence staining of ovarian cancer cells with specific antibodies against vimentin and cytokeratin. Sample 1 – solid tumor cells; sample 2 – cells extracted from ascitic fluid of the same patient. Dot plots of cell distribution versus fluorescence intensity in different channels in flow cytometer: No. 1 – autofluorescence (bottom left quadrant); No. 2 – incubation with secondary antibodies conjugated with a fluorescent dye (bottom left quadrant); No. 3 – cells expressing vimentin (top left quadrant); No. 4 – cells expressing cytokeratins (bottom right quadrant); No. 5 – cells expressing cytokeratins (bottom right quadrant) and co-expressing cytokeratins and vimentin (top right quadrant)

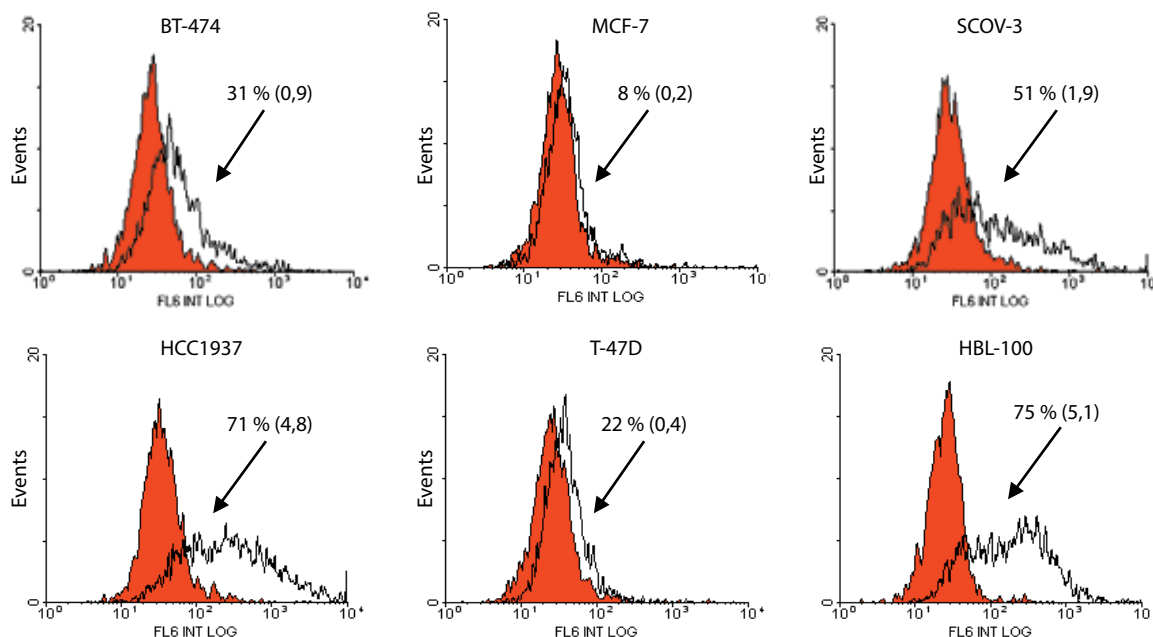


Рис. 2. Примеры гистограмм распределения клеток в зависимости от интенсивности клеточной флуоресценции при иммунофлуоресцентном окрашивании. По осям абсцисс – интенсивность специфической флуоресценции (условные единицы), по осям ординат – количество клеток; красные гистограммы – после инкубации с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем (контроль), прозрачные гистограммы – после инкубации с антителами к виментину; цифры на гистограммах – уровень экспрессии маркера (%), интенсивность окрашивания указана в скобках

Fig. 2. Examples of histograms demonstrating the dependence of cell distribution on cellular fluorescence intensity during immunofluorescent staining. X-axis – intensity of specific fluorescence (arbitrary units), Y-axis – number of cells; red histograms – after incubation with secondary antibodies conjugated with a fluorescent dye (control), transparent histograms – after incubation with antibodies against vimentin; numbers denote the level of marker expression (%), staining intensity is presented in brackets

Заключение

ЭМП, сопровождающийся изменением молекулярного фенотипа эпителиальных клеток, — важнейший фактор, повышающий метастатический потенциал опухоли. Эти изменения обратимы, и при определенных условиях возможен возврат клеток к исходному, эпителиальному молекулярному фенотипу. Признанный специфический маркер подобных изменений молекулярного фенотипа эпителиальных клеток — мезенхимальный белок виментин, который экспрессируется *de novo* при изменении молекулярного фенотипа эпителиальных клеток в сторону мезенхимального [11, 12].

Ранее мы показали, что у больных РЯ одним из факторов, индуцирующих процесс ЭМП, является изменение формы существования опухолевых клеток в организме. В подавляющем числе клеток, растущих в асцитической жидкости при диссеминации процесса по брюшине, выявлена высокая экспрессия виментина, чего не наблюдалось в солидных новообразованиях [13].

Если принимать во внимание последний факт и то, что источником культур опухолевых клеток, используемых в фундаментальных исследованиях, являются клетки, полученные как из солидных новообразований, так и из экстрацеллюлярных жидкостей, в настоящем исследовании проведена оценка «сохранности» исходного фенотипа опухоли при адаптации клеток к росту в культуре.

При использовании в качестве маркера уровня ЭМП белка виментин показано, что фенотип опухоли в организме не всегда сохраняется при адаптации к росту в культуре. При этом предсказать выявленные изменения не представляется возможным.

Так, ожидаемо высокий уровень виментина в клетках, полученных из экстрацеллюлярных жидкостей, может сохраняться (линия HBL-100), умеренно сни-

жаться (клетки SCOV-3) и даже утрачиваться (клетки MCF-7 и T-47D). Последние 2 примера указывают на возможность мезенхимально-эпителиального перехода, ассоциированного с адаптацией клеток к росту в культуре.

В то же время клетки линии HCC1937, полученные из солидного узла с ожидаемо низкой экспрессией виментина, при росте в культуре приобрели молекулярный фенотип с высоким уровнем экспрессии этого мезенхимального маркера, т. е. подверглись ЭМП. Согласно современной молекулярной классификации РМЖ линия HCC1937 относится к трижды негативному РМЖ и характеризуется отсутствием экспрессии рецепторов стероидных гормонов и HER2/neu. Трижды негативный рак, как правило, имеет агрессивное клиническое течение и плохо отвечает на стандартную химиотерапию. В образцах трижды негативного рака часто определяются признаки полного или частичного ЭМП, что подтверждено нашими данными об экспрессии виментина в линии HCC1937. Кроме того, в клетках HCC1937 была выявлена мутация BRCA1 5382C, а белок BRCA1, в свою очередь, является непосредственным регулятором молекулярных путей ЭМП [15].

И только в одном случае — в культуре клеток линии BT-474, полученных из солидного новообразования — по показателю экспрессии виментина отмечено сохранение эпителиального фенотипа при росте клеток в культуре.

Наши результаты согласуются с данными литературы о пластичности молекулярного фенотипа опухолевых клеток [16, 17] и с очевидностью демонстрируют необходимость контроля «сохранности» эпителиального фенотипа клеточных культур рака человека при разного рода молекулярных исследованиях эпителиальных клеток.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Davidson B., Holth A., Hellesylt E. et al. The clinical role of epithelial mesenchymal transition and stem cell markers in advanced-stage ovarian serous carcinoma effusions. *Hum Pathol* 2015;46(1):1–8. DOI: 10.1016/j.humpath.2014.10.004. PMID: 25455994.
- Choi Y., Lee H.J., Jang M.H. et al. Epithelial-mesenchymal transition increases during the progression of in situ to invasive basal-like breast cancer. *Hum Pathol* 2013;44(11):2581–9. DOI: 10.1016/j.humpath.2013.07.003. PMID: 24055090.
- Heerboth S., Housman G., Leary M. et al. EMT and tumor metastasis. *Clin Transl Med* 2015;26(4):1–13. DOI: 10.1186/s40169-015-0048-3. PMID: 25852822.
- Savagner P., Kusewitt D.F., Carver E.A. et al. Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol* 2005;202(3):858–66. DOI: 10.1002/jcp.20188. PMID: 15389643.
- Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139(5):871–90. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.007. PMID: 19945376.
- Cao L., Shao M., Schilder J. et al. Tissue transglutaminase links TGF- β , epithelial to mesenchymal transition and a stem cell phenotype in ovarian cancer. *Oncogene* 2012;31(20):2521–34. DOI: 10.1038/onc.2011.429. PMID: 21963846.
- Wu D.I., Liu L., Ren C. et al. Epithelial-mesenchymal interconversions and the regulatory function of the ZEB family during the development and progression of ovarian cancer. *Oncol Lett* 2016;11(2):1463–8. DOI: 10.3892/ol.2016.4092. PMID: 26893761.
- Nieto M.A. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* 2013;342(6082):1–7. DOI: 10.1126/science.1234850. PMID: 24202173.
- Tsai J.H., Donaher J.L., Murphy D.A. et al. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* 2012;22(6):725–36. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.09.022. PMID: 23201165.

10. Klymenko Y., Kim O., Stack M.S. Complex determinants of epithelial-mesenchymal phenotypic plasticity in ovarian cancer. *Cancers (Basel)* 2017;9(8):1–32. DOI: 10.3390/cancers9080104. PMID: 28792442.
11. Hay E.D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 2005;233(3):706–20. DOI: 10.1002/dvdy.20345. PMID: 15937929.
12. Kidd M.E., Shumaker D.K., Ridge K.M. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;50(1):1–6. DOI: 10.1165/rctmb.2013-0314TR. PMID: 23980547.
13. Богущ Т.А., Калюжный С.А., Дудко Е.А. и др. Молекулярные особенности асцитных клеток рака яичников, выявляемые при иммунофлуоресцентном анализе с привлечением проточной цитофлуориметрии. *Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия* 2016;57(5):330–5. [Bogush T.A., Kalyuzhnyy S.A., Dudko E.A. et al. Molecular peculiarities of ascitic ovarian cancer cells revealing by immunofluorescence assay involving flow cytometry. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Ser. 2. Khimiya = Moscow State University Bulletin, Ser. 2, Chemistry* 2016;57(5):330–5. (In Russ.)].
14. Богущ Т.А., Шатунова А.С., Дудко Е.А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека. *Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия* 2011;52(4):305–12. [Bogush T.A., Shaturova A.S., Dudko E.A. et al. Quantitative immunofluorescent estimation of estrogen receptor β expression in human solid tumors using flow cytometry. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Ser. 2. Khimiya = Moscow State University Bulletin, Ser. 2, Chemistry* 2011;52(4):305–12. (In Russ.)].
15. Bai F., Chan H.L., Scott A. et al. BRCA1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell dedifferentiation during mammary and tumor development. *Cancer Res* 2014;74(21):6161–72. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1119. PMID: 25239453.
16. Strauss R., Li Z.Y., Liu Y. et al. Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS One* 2011;6(1):1–20. DOI: 10.1371/journal.pone.0016186. PMID: 21264259.
17. Bezdniezhnykh N., Lykhova A., Semesiuk N. et al. Establishment and characterization of new breast and ovarian cancer cell lines as a model for studying cellular plasticity *in vitro*. *Exp Oncol* 2016;38(2):94–100. PMID: 27356577.

Вклад авторов

Т.А. Богущ: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи;

С.А. Калюжный: цитофлуориметрия, статистический анализ;

М.Р. Четыркина: цитофлуориметрия;

М.А. Ястребова, А.М. Щербаков: работа с клеточными культурами;

И.А. Мамичев: анализ полученных данных;

А.А. Каменский: написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи.

Authors' contributions

T.A. Bogush: developing the research design, article writing, analysis of obtained data, reviewing of publications of the article's theme;

S.A. Kaliuzhny: flow cytometry; statistical analysis;

M.R. Chetyrkina: flow cytometry;

M.A. Yastrebova, A.M. Scherbakov: work with cell cultures;

I.A. Mamichev: analysis of the obtained data;

A.A. Kamensky: article writing, reviewing of publications of the article's theme.

ORCID авторов

Т.А. Богущ: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>

С.А. Калюжный: <https://orcid.org/0000-0002-8701-7707>

М.Р. Четыркина: <https://orcid.org/0000-0002-8524-2222>

М.А. Ястребова: <https://orcid.org/0000-0003-0405-9360>

А.М. Щербаков: <https://orcid.org/0000-0002-2974-9555>

И.А. Мамичев: <https://orcid.org/0000-0002-6776-4502>

А.А. Каменский: <https://orcid.org/0000-0003-4912-922X>

ORCID of authors

T.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>

S.A. Kaliuzhny: <https://orcid.org/0000-0002-8701-7707>

M.R. Chetyrkina: <https://orcid.org/0000-0002-8524-2222>

M.A. Yastrebova: <https://orcid.org/0000-0003-0405-9360>

A.M. Scherbakov: <https://orcid.org/0000-0002-2974-9555>

I.A. Mamichev: <https://orcid.org/0000-0002-6776-4502>

A.A. Kamensky: <https://orcid.org/0000-0003-4912-922X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке средств Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 18-015-00422, 16-04-00347).

Financing. The study was performed with the support of the Russian Foundation for Basic Research (projects No. 18-015-00422, 16-04-00347).