

Значение CD44- и ALDH1-позитивных стволовых клеток в прогрессии колоректальной аденокарциномы

М. А. Шишкин*^{A,B,C}, В. А. Туманский^{E,F}, Т. А. Христенко^D

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

A – концепция и дизайн исследования; B – сбор данных; C – анализ и интерпретация данных; D – написание статьи;
E – редактирование статьи; F – окончательное утверждение статьи

Ключевые слова:

колоректальный рак, CD44 антиген, альдегиддегидрогеназа 1, пролиферация, апоптоз.

Патология. 2020.
Т. 17, № 2(49).
С. 170-177

*E-mail:
Shishkin.stomat@gmail.com

Цель работы – проанализировать показатели иммуногистохимической экспрессии CD44 и ALDH1, а также их корреляции с пролиферативной и апоптотической активностью раковых клеток на I–IV стадиях (pTNM) развития колоректальной аденокарциномы (КРА).

Материалы и методы. Проведено комплексное патогистологическое и иммуногистохимическое исследование операционного материала 30 пациентов, прооперированных по поводу колоректальной аденокарциномы I–IV стадий.

Результаты. Установлено, что колоректальная аденокарцинома характеризуется мембранно-цитоплазматической экспрессией CD44 в клетках стромы опухоли (площадь иммунопозитивных клеток в КРА = 61,26 (42,58; 79,15) %). Площадь, занимаемая этими клетками, достоверно возрастает при прогрессии рака от I к III стадии, а также прямо коррелирует с глубиной инвазии опухоли, наличием регионарных и отдаленных метастазов. Колоректальная карцинома характеризуется цитоплазматической экспрессией ALDH1 в клетках стромы опухоли. Площадь иммунопозитивных клеток стромы в КРА = 40,22 (22,54; 47,77) %, достоверно возрастает при прогрессии опухоли от II к IV стадии, а также прямо коррелирует с глубиной ее инвазии. В колоректальной карциноме также отмечена цитоплазматическая экспрессия ALDH1 в раковых клетках; площадь иммунопозитивных раковых клеток в КРА = 42,15 (32,06; 50,42) %. Площадь иммунопозитивных раковых клеток достоверно возрастает при прогрессии опухоли от III к IV стадии и прямо коррелирует с каждым из показателей pTNM. Корреляционный анализ показателей экспрессии изученных маркеров стволовых клеток, а также маркеров пролиферации и апоптоза позволил установить закономерности: возрастающая при прогрессии КРА площадь CD44-позитивных клеток стромы ассоциируется со снижением уровня пролиферации раковых клеток, а также с активацией эпителиально-мезенхимального перехода последних; возрастающая на больших стадиях КРА площадь ALDH1-позитивных клеток стромы ассоциируется со снижением уровня апоптоза раковых клеток.

Выводы. Площадь CD44-позитивных клеток стромы достоверно возрастает при прогрессии опухоли от I к III стадии и ассоциируется со снижением пролиферации раковых клеток. Площадь ALDH1-позитивных клеток стромы достоверно возрастает при прогрессии опухоли от II к IV стадии и ассоциируется со снижением апоптоза раковых клеток, а площадь ALDH1-позитивных раковых клеток достоверно возрастает при прогрессии опухоли от III к IV стадии.

Ключові слова:

колоректальний рак, CD44 антиген, альдегіддегідрогеназа 1, проліферація, апоптоз.

Патологія. 2020.
Т. 17, № 2(49).
С. 170-177

Значення CD44- і ALDH 1-позитивних стовбурових клітин у прогресії колоректальної аденокарциноми

М. А. Шишкін, В. О. Туманський, Т. О. Христенко

Мета роботи – проаналізувати показники імуногістохімічної експресії CD44 та ALDH1, а також їх кореляції з проліферативною та апоптотичною активністю ракових клітин на I–IV стадіях (pTNM) розвитку колоректальної аденокарциноми (КРА).

Матеріали та методи. Виконали комплексне патогістологічне та імуногістохімічне дослідження операційного матеріалу 30 пацієнтів, яких прооперували з приводу колоректальної аденокарциноми I–IV стадій.

Результати. Встановили, що колоректальна аденокарцинома характеризується мембранно-цитоплазматичною експресією CD44 у клітинах стромі пухлини (площа імунопозитивних клітин у КРА = 61,26 (42,58; 79,15) %). Площа, яку займають ці клітини, вірогідно збільшується під час прогресування раку від I до III стадії, а також прямо корелює з глибиною інвазії пухлини, наявністю регіонарних і віддалених метастазів. Колоректальна карцинома характеризується цитоплазматичною експресією ALDH1 у клітинах стромі пухлини. Площа імунопозитивних клітин стромі в КРА = 40,22 (22,54; 47,77) % вірогідно збільшується під час прогресування пухлини від II до IV стадії, а також корелює з глибиною її інвазії. В колоректальній аденокарциномі також наявна цитоплазматична експресія ALDH1 у ракових клітинах; площа імунопозитивних ракових клітин в КРА = 42,15 (32,06; 50,42) %. Площа імунопозитивних ракових клітин вірогідно зростає під час прогресування пухлини від III до IV стадії і прямо корелює з кожним із показників pTNM. Кореляційний аналіз показників експресії досліджених маркерів показав закономірності: площа CD44-позитивних клітин стромі, що збільшується під час прогресування КРА, асоціюється зі зниженням рівня проліферації ракових клітин, а також з активацією епітеліально-мезенхімального переходу останніх; площа ALDH1-позитивних клітин стромі, що збільшується на вищих стадіях КРА, асоціюється зі зниженням рівня апоптозу ракових клітин.

Висновки. Площа CD44-позитивних клітин стромі достовірно зростає при прогресії пухлини від I до III стадії та асоціюється зі зниженням проліферації ракових клітин. Площа ALDH1-позитивних клітин стромі вірогідно зростає при прогресії пухлини від II до IV стадії та асоціюється зі зниженням апоптозу ракових клітин, а площа ALDH1-позитивних ракових клітин вірогідно зростає при прогресії пухлини від III до IV стадії.

Significance of CD44- and ALDH1-positive stem cells in colorectal adenocarcinoma progression

M. A. Shyshkin, V. O. Tumanskyi, T. O. Khrystenko

Aim – to analyze CD44 and ALDH1 immunohistochemical expression levels, as well as their correlations with proliferative and apoptotic activity of cancer cells in colorectal adenocarcinoma (CRA) of stages I–IV (pTNM).

Materials and methods. Pathohistological and immunohistochemical studies of surgical material from 30 patients who underwent surgical treatment of colorectal adenocarcinoma (stages I–IV) were carried out.

Results. It was established that colorectal adenocarcinoma is characterized by membranous and cytoplasmic CD44 expression in stromal cells (the area of immunopositive cells in CRA = 61.26 (42.58; 79.15) %), the area taken by the cells significantly increases during the tumor progression from stage I to stage III and directly correlates with the depth of the tumor invasion, as well as the presence of regional and distant metastases. Colorectal adenocarcinoma is characterized by cytoplasmic ALDH1 expression in the tumor stromal cells; the area of immunopositive cells in CRA = 40.22 (22.54; 47.77) % and significantly increases during the tumor progression from stage II to stage IV, as well as directly correlates with the depth of its invasion. Cytoplasmic ALDH1 expression in cancer cells of colorectal cancer was also revealed; the area of immunopositive cancer cells in CRA = 42.15 (32.06; 50.42) %. The area of immunopositive cancer cells significantly increases during the tumor progression from stage III to stage IV and directly correlates with each of the pTNM indexes. The correlation analysis of the indexes obtained for studied markers, as well as the markers of proliferation and apoptosis, made possible to reveal the next tendencies: the increasing area of CD44-positive stromal cells in CRA is associated with decreasing cancer cells proliferation level, and also with the activation of epithelial-to-mesenchymal transition; the increasing area of ALDH1-positive stromal cells is associated with decreasing cancer cells apoptosis level.

Conclusions. The area of CD44-positive stromal cells significantly increases with the tumor progression from stage I to stage III and is associated with decreasing of the cancer cells proliferation level. The area of ALDH1-positive stromal cells significantly increases with tumor progression from stage II to stage IV and is associated with decreasing of the cancer cells apoptosis level, while the area of ALDH1-positive cancer cells significantly increases with tumor progression from stage III to stage IV.

Key words:
colorectal cancer, cd44 antigen, aldehyde dehydrogenase 1, cell proliferation, apoptosis.

Pathologia
2020; 17 (2), 170-177

По данным GLOBOCAN 2018, колоректальный рак занимает третье место среди причин онкологической смертности и четвертое место среди наиболее часто диагностируемых злокачественных новообразований; в развивающихся странах отмечен рост заболеваемости [1]. Наиболее распространенный гистологический вариант этого рака – колоректальная аденокарцинома (КРА), развивающаяся из эпителиоцитов толстой кишки. Обобщая современные данные об онкогенезе, можно сказать, что КРА развивается в случаях, когда в эпителиоцитах накапливается серия генетических и эпигенетических аномалий, что приводит к изменению морфологических и функциональных свойств в последующих популяциях клеток [2].

Особый интерес вызывает теория о раковых стволовых клетках (РСК). РСК представляют собой субпопуляции стволовых клеток опухоли, которые локализованы в строме раковой опухоли (мезенхимальные стволовые клетки) и среди злокачественных эпителиоцитов опухоли (собственно раковые стволовые клетки) [3]. Взаимодействие между мезенхимальными стволовыми и собственно раковыми стволовыми клетками пока изучены недостаточно. РСК обладают способностью к самообновлению, симметричному и ассиметричному делению, частичной дифференцировке, а также к существованию, самообновлению и дифференцировке вне первичной опухоли [4]. Среди изученных свойств стволовых раковых и мезенхимальных стволовых клеток раковых новообразований – способность к промоции опухолевого роста, рецидивированию и метастазированию рака, формированию химиорезистентности некоторых опухолей [5,6]. Пул раковых и мезенхимальных стволовых клеток в различных видах рака оценивают по коэкспрессии этими клетками определенных ИГХ маркеров, при изучении КРА для

определения РСК наиболее часто применяют CD44, CD133, ALDH1, EpCAM [7].

CD44 – мембранный гликопротеин, обладающий широким спектром функциональных свойств. Роль CD44 опосредуется его способностью связывать различные компоненты внеклеточного матрикса, включая гиалуроновую кислоту и остеопоинин, а также молекулы-«мессенджеры», такие как факторы роста, присутствующие в опухолевом микроокружении. Гиалуроновая кислота и остеопоинин, в свою очередь, изобилуют в нише лейкемических стволовых клеток и в нише стволовых клеток различных солидных опухолей, где они способствуют поддержанию популяций РСК [8]. В ряде работ показано, что CD44 участвует в активации нескольких сигнальных путей, включая MAPK-, PI3K/Akt- и Wnt-каскады. Последние, как хорошо известно, регулируют пролиферацию и дифференцировку клеток, апоптоз и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), т. е. ключевые механизмы, дисрегуляция которых приводит к опухолевой прогрессии [9–13]. Доказана взаимосвязь между экспрессией CD44 и активностью MMP-9, регулирующей инвазивные свойства опухолей [11]. Однако изучение механизмов вовлечения CD44 в колоректальный канцерогенез еще далеко от завершения.

ALDH1 (альдегиддегидрогеназа 1) – «метаболический маркер» стволовых клеток человека. Это NAD(P)+-зависимый фермент, обеспечивающий окисление широкого спектра эндо- и экзогенных альдегидов, основная функция которого – защита в условиях оксидативного стресса. Детоксифицирующая способность ALDH1 – одна из основ «долголетия» РСК, обеспечивая их защиту от окислительного повреждения. Также ALDH1 играет ключевую роль в биосинтезе ряда молекул-регуляторов, таких как ре-

тиновая кислота, γ -аминоасляная кислота, бетаин [14]. ALDH1 обеспечивает трансформацию ретиноальдегида в ретиновую кислоту – сигнальную молекулу, необходимую для активации клеточной пролиферации и дифференцировки. Более того, ALDH1 обеспечивает устойчивость к алкилирующим хемотерапевтическим агентам, запуская необратимое окисление алкильных групп [15]. Маркер эффективно применяли для обнаружения пула РСК в раке молочной железы, протоковой карциноме поджелудочной железы, а также в КРП [15–21]. Доказана роль ALDH1 как промотора ЭМП раковых клеток: атипичные эпителиоциты утрачивают дифференцировку и обретают свойства стволовых, что прямо коррелирует с возрастанием глубины инвазии опухоли и ее метастазированием [17].

Таким образом, по данным научной литературы, оба маркера (CD44 и ALDH1) вовлечены в колоректальный онкогенез путем опосредования различных сигнальных каскадов, включая те, что регулируют пролиферацию, дифференцировку, выживаемость клеточных популяций и ЭМП.

Число работ, посвященных сравнительному анализу экспрессии CD44 и ALDH1 в КРА ограничено, а противоречивость результатов этих работ оставляет вопрос о значимости экспрессии этих маркеров в КРА открытым.

Цель работы

Проанализировать показатели иммуногистохимической экспрессии CD44 и ALDH1, а также их корреляции с пролиферативной и апоптотической активностью раковых клеток на I, II, III, IV стадиях (pTNM) развития колоректальной аденокарциномы.

Материалы и методы исследования

Проведено патоморфологическое и иммуногистохимическое (ИГХ) исследование КРА в операционном материале 30 пациентов в возрасте 43–72 года, которым проведено оперативное вмешательство в связи с раком дистального отдела толстой кишки. На основании результатов патоморфологического исследования в соответствии с действующей классификацией pTNM сформировали 4 группы наблюдения: I стадия КРА ($T_{1-2} N_0 M_0$) – 5 больных, II стадия КРА ($T_{3-4} N_0 M_0$) – 9 больных, III стадия КРА ($T_{1-4} N_{1-3} M_0$) – 10 больных, IV стадия КРА ($T_{1-4} N_{1-3} M_1$) – 6 больных. В качестве группы контроля использован секционный материал 10 умерших больных – фрагменты стенки дистальной толстой кишки обычной гистологической структуры.

Операционный и секционный материал фиксировали в 10 % забуференном формалине и заливали в парафин. Особенности гистологического строения исследованных образцов изучали в срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. ИГХ-исследование проводили по стандартной методике, предусмотренной производителем антител. Использовали поликлональные антитела к CD44 (CD44 Std./HCAM Ab-4, Thermo Scientific, USA), моноклональные антитела к ALDH1 (ALDH1A1, Clone 5A11, Thermo Scientific, USA), систему визуализации EnVision FLEX с диаминобензидином (DAKO, USA).

Результаты ИГХ-реакций изучали в микроскопе Axioplan-2 (Carl Zeiss, Germany). В каждом случае оценивали площади CD44-позитивных и ALDH1-позитивных клеток в опухоли методом фотоцифровой морфометрии в 5 стандартизованных полях зрения микроскопа при увеличении $\times 200$ путем расчета числа пикселей иммунопозитивного цифрового изображения соответствующего маркера к общему числу пикселей в изображении, выраженному в %.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакета Statistica® for Windows 13.0 (StatSoft Inc., лицензия № JPZ8041382130ARCN10-J). Вычисляли медиану (Me), нижний и верхний квартили (Q_1 ; Q_3); сравнение между двумя группами наблюдений проводили при помощи критерия Манна–Уитни, между тремя и более группами наблюдений – при помощи критерия Краскела–Уоллиса; корреляционный анализ проведен с применением коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты считали статистически значимыми на уровне 95 % ($p < 0,05$).

Результаты

При ИГХ-исследовании с использованием антител к CD44 положительное мембранно-цитоплазматическое окрашивание наблюдали в клетках стромы опухоли. Площадь CD44-позитивных клеток в строме КРА составила 61,26 (42,58; 79,15) %. При сравнительном анализе площади CD44-позитивных клеток стромы на разных стадиях развития КРА установлено, что в КРА I и II стадий площадь CD44-позитивных клеток стромы составила 31,41 (19,87; 42,15) % (рис. 1) vs. 48,26 (35,44; 61,45) % стандартизованного поля зрения опухоли, $p < 0,05$; в КРА II и III стадий – 48,26 (35,44; 61,45) % vs. 78,36 (61,13; 80,06) % (рис. 2), $p < 0,05$; в КРА III и IV стадий – 78,36 (61,13; 80,06) % vs. 75,70 (69,35; 80,33) % стандартизованного поля зрения опухоли, $p > 0,05$. Таким образом, установлено наличие достоверного роста площади, занимаемой CD44-позитивными клетками стромы при прогрессии КРА от I к III стадии (рис. 3).

Положительная ИГХ-экспрессия ALDH1 отмечена в цитоплазме клеток стромы КРА, а при прогрессии опухоли – и в цитоплазме раковых клеток (ALDH1⁺ раковые клетки обнаружены в 50 % случаев КРА II–IV стадий).

Площадь ALDH1-позитивных клеток стромы КРА составила 40,22 (22,54; 47,77) %, а площадь ALDH1-позитивных раковых клеток – 42,15 (32,06; 50,42) % стандартизованного поля зрения опухоли. При сравнительном анализе площади ALDH1-позитивных клеток стромы на разных стадиях КРА установлено: в КРА I и II стадий они составляли 20,66 (18,51; 21,47) % vs. 25,75 (20,56; 32,86) % площади опухоли (рис. 4), $p < 0,05$; в КРА II и III стадий – 25,75 (20,56; 32,86) % vs. 44,93 (41,17; 50,01) %, $p < 0,05$; в КРА III и IV стадий – 44,93 (41,17; 50,01) % vs. 48,36 (42,15; 55,17) % площади опухоли, $p > 0,05$. При сравнительном анализе площади ALDH1-позитивных раковых клеток отмечено, что в КРА II и III стадий их площадь составляла 37,17 (31,07; 47,18) % vs. 34,25

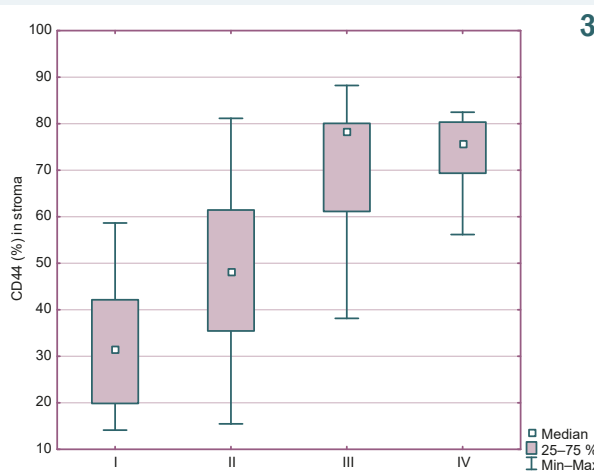
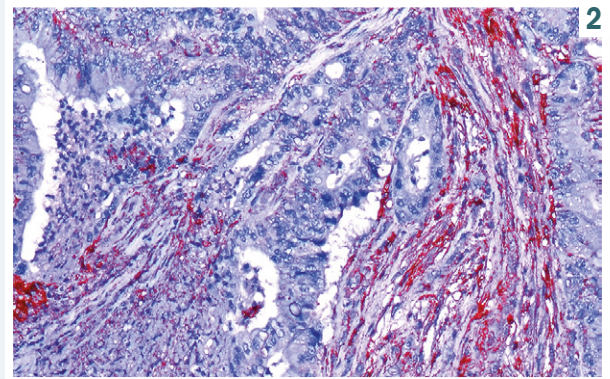
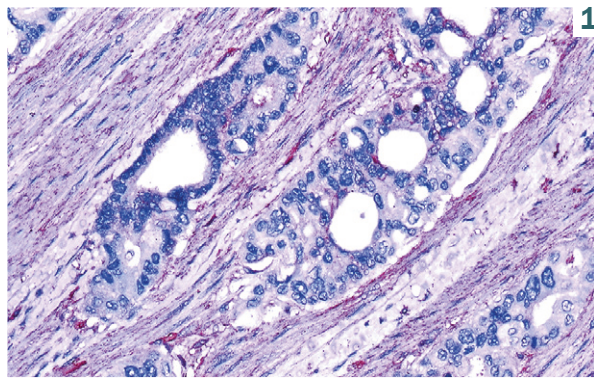


Рис. 1. Экспрессия CD44 в строме колоректальной аденокарциномы I стадии. CD44 Std./HCAM Ab-4 (Thermo Scientific, USA). 36. ×200.

Рис. 2. Экспрессия CD44 в строме колоректальной аденокарциномы III стадии. CD44 Std./HCAM Ab-4 (Thermo Scientific, USA). 36. ×200.

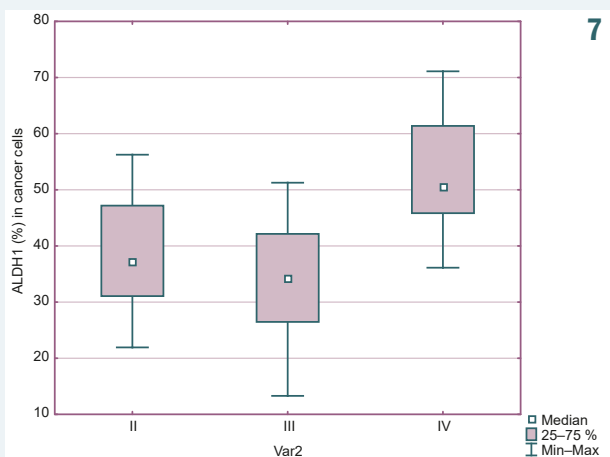
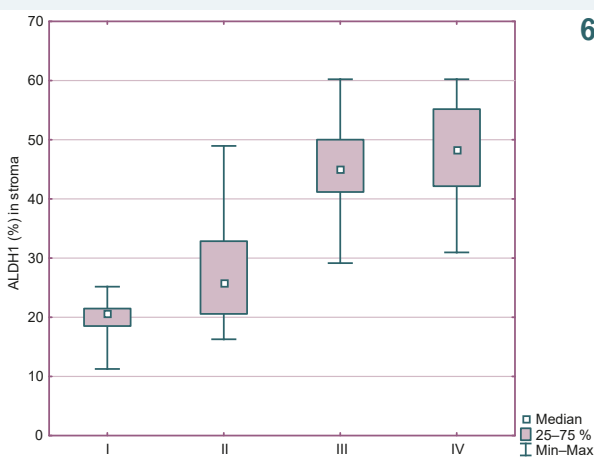
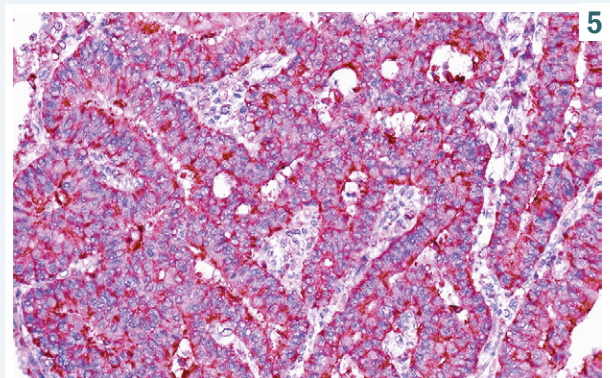
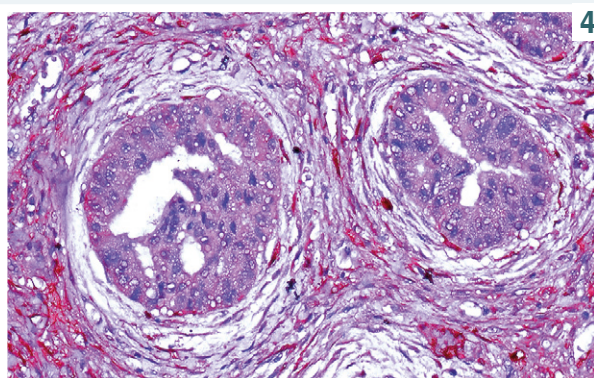
Рис. 3. Показатели площади CD44-позитивных клеток в строме колоректальной аденокарциномы I, II, III, IV стадий (pTNM).

Рис. 4. Экспрессия ALDH1 в колоректальной аденокарциноме II стадии. ALDH1A1/Clone 5A11 (Thermo Scientific, USA). 36. ×200.

Рис. 5. Экспрессия ALDH1 в колоректальной аденокарциноме IV стадии. ALDH1A1/Clone 5A11 (Thermo Scientific, USA). 36. ×200.

Рис. 6. Показатели площади ALDH1-позитивных клеток стромы в колоректальной аденокарциноме I, II, III, IV стадий (pTNM).

Рис. 7. Показатели площади ALDH1-позитивных раковых клеток в колоректальной аденокарциноме II, III, IV стадий (pTNM).



Таблиця 1. Результати кореляційного аналізу показателів експресії маркерів CD44, ALDH1, Ki-67, каспазы-3 и показателей pTNM в колоректальной аденокарциноме (с учетом данных [18,19])

	CD44	ALDH1 стромы	ALDH1 раковые клетки	Ki-67 [18,19]	каспаза-3 [18,19]	pT	pN	pM	pG
CD44	1,00	0,29	0,78*	-0,62*	-0,10	0,48*	0,53*	0,38*	0,27
ALDH1 стромы	0,29	1,00	0,55*	-0,10	-0,49*	0,45*	0,28	0,21	0,19
ALDH1 раковые клетки	0,78*	0,55*	1,00	-0,11	-0,23	0,33*	0,39*	0,62*	0,23
Ki-67 [18,19]	-0,62*	-0,10	-0,11	1,00	0,70*	-0,41*	0,01	-0,14	-0,29
Каспаза-3 [18,19]	-0,10	-0,49*	-0,23	0,70*	1,00	0,29	0,10	0,26	0,31

*: наличие корреляционной связи ($p < 0,05$).

(26,47; 42,15) % стандартизованной площади среза опухоли, $p > 0,05$; в KPA III и IV стадий – 34,25 (26,47; 42,15) % vs. 50,56 (45,84; 61,38) % (рис. 5) площади опухоли, $p < 0,05$. Таким образом, установлено наличие достоверного увеличения площади, занимаемой ALDH1-позитивными клетками стромы KPA при ее прогрессии от I к III стадии (рис. 6), а также достоверный рост площади ALDH1-позитивных раковых клеток опухоли при ее прогрессии от III к IV стадии (рис. 7).

В предыдущих работах описаны молекулярно-иммуногистохимические особенности пролиферации и апоптоза в KPA [21,22]. Установлено, что опухолевые клетки KPA характеризуются средним уровнем экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67 (41,20 (36,62; 59,42) %), а также обратной корреляцией ($r = -0,41$) между уровнем их пролиферативной активности клеток и глубиной инвазии (pT) опухоли. Эти данные согласуются с данными параллельно проведенного ПЦР-исследования, в котором показано, что при прогрессии KPA от I к IV стадии снижается транскрипционная активность гена Ki-67. Отмечено также, что раковые клетки KPA характеризуются низким уровнем апоптоза, оцененным по экспрессии каспазы-3 (28,72 (15,64; 76,71) УЕОП) на каждой из последовательных стадий прогрессии опухоли.

В контексте данной работы проведен корреляционный анализ показателей площади CD44-позитивных и ALDH1-позитивных клеток в KPA, параметров опухоли по pTNM и уровней пролиферации и апоптоза раковых клеток, оцененных по ИГХ-экспрессии маркеров Ki-67 и каспазы-3 соответственно. Установленные корреляции представлены в таблице 1.

Обсуждение

Согласно полученным данным, KPA характеризуется мембранно-цитоплазматической экспрессией CD44 клетками стромы, которые оценивают как PCK [9]. Площадь CD44+ клеток стромы составляет 61,26 (42,58; 79,15) % площади стандартизованного поля зрения опухоли. Отмечено достоверное возрастание площади CD44-позитивных клеток стромы при прогрессии KPA от I к III стадии, а также установлена прямая корреляция между площадью CD44-позитивных клеток стромы и стадией прогрессии pTNM опухоли.

Известно, что CD44-позитивные клетки могут как активировать, так и угнетать пролиферативную активность раковых клеток в зависимости от их плотности в микроокружении опухоли: при низкой плотности белок merlin фосфорилируется и образует комплексы

с ERM и CD44. Комплекс merlin + CD44 связывается с RTK-рецепторами, что приводит к активации Ras/Raf/Mek/Erk-сигнального пути, среди эффектов которой – стимуляция пролиферации раковых клеток. При высокой плотности клеток микроокружения угнетается фосфорилирование белка merlin, соответственно, «выключается» описанный вариант активации Ras/Raf/Mek/Erk-каскада [13].

Корреляционный анализ между площадью CD44-позитивных клеток стромы и уровнем экспрессии маркера пролиферативной активности Ki-67 опухолевыми клетками указал на наличие обратной связи средней силы ($r = -0,52$) между данными показателями: возрастающая при прогрессии KPA площадь CD44-позитивных клеток стромы ассоциируется со снижением пролиферативной активности раковых клеток. Описанный механизм, опосредованный белком merlin, объясняет эту ассоциацию: при возрастании площади, занимаемой в строме опухоли CD44-позитивными PCK, подавляется пролиферативная активность раковых клеток. Принимая во внимание, что эти процессы происходят на фоне прогрессии опухоли от I к III стадиям, а также учитывая результаты изучения пролиферации и апоптоза клеток в полипах-прекурсорах KPA [24], можно полагать, что возрастающая пролиферативная активность атипичных эпителиоцитов играет ключевую роль на ранних этапах колоректального онкогенеза, в частности, на этапе малигнизации полипа. При дальнейшей прогрессии KPA на стадиях реализации ее инвазивных и метастатических свойств ключевую роль, вероятно, играет ЭМП раковых клеток, в который CD44 задействован следующим образом. Одним из драйверных факторов транскрипции ЭМП служит ZEB1. ЭМП-индуцированная супрессия ESRP1 (epithelial splicing regulatory protein 1) контролирует альтернативный сплайсинг CD44, что служит причиной сдвига в экспрессии CD44 от вариантных (v) к стандартной (s) изоформе. CD44s обладает способностью самостоятельно активировать экспрессию ZEB1, способствуя таким образом запуску (поддержанию) ЭМП и поддержанию экспрессии CD44s. Описанный механизм называют CD44s-ZEB1-регуляторной петлей, ключевая роль которой заключается в независимой от внешних стимулов стимуляции ZEB1, угнетении ESRP1 и последующей промоции синтеза CD44s [25].

Показано, что KPA характеризуется цитоплазматической экспрессией ALDH1 клетками стромы (площадь ALDH1-позитивных клеток стромы составляет 40,22 (22,54; 47,77) % стандартизованной площади среза опухоли), а также цитоплазматической экс-

прессией ALDH1 раковыми клетками на II–IV стадиях прогрессии опухоли (площадь ALDH1-позитивных раковых клеток равна 42,15 (32,06; 50,42) % стандартизированной площади среза опухоли). Установлено достоверное возрастание площади, занимаемой ALDH1-позитивными клетками стромы КРА при ее прогрессии от I к III стадии, а также прямая корреляция между данным показателем и глубиной инвазии опухоли. Кроме того, обнаружена обратная корреляционная связь между площадью ALDH1-позитивных стромальных клеток КРА и уровнем апоптоза раковых клеток. Таким образом, ALDH1-позитивные ПСК вовлекаются в прогрессию больших стадий КРА, а также в угнетение апоптоза раковых клеток. В научной литературе найдена информация, что для ALDH1⁺-клеток характерна коэкспрессия анти-апоптотических молекул Bcl-2 и ABCG2 [17,19]. Кроме того, S. Tian, D. H. Liu, D. Wang et al. [26] описана обратная взаимосвязь между TRAIL-индуцированным апоптозом и количеством ALDH1⁺ клеток в немелкоклеточном раке легкого. Показано, что высокий уровень экспрессии ALDH1 ассоциируется с увеличенным числом DR4- и DR5-рецепторов, что приводит к избыточной активации MEK/ERK-сигнального каскада, одним из эффектов которой является резистентность к апоптотическим стимулам [26]. Выяснение механизма ассоциации между возрастанием площади ALDH1-позитивных стромальных стволовых клеток и снижением уровня апоптоза раковых клеток при прогрессии в КРА требует проведения дальнейших молекулярно-генетических исследований.

Установлено достоверное увеличение площади ALDH1-позитивных раковых клеток при прогрессии КРА от III к IV стадии, а также наличие прямой корреляции между площадью ALDH1-позитивных стромальных и раковых клеток КРА, а также прямых корреляций между площадью ALDH1-позитивных раковых клеток и стадией прогрессии pTNM опухоли. Наибольшей силы корреляция характеризует ассоциацию ALDH1-позитивных раковых клеток с наличием отдаленных метастазов (pM) КРА, что согласуется с достоверным ростом площади ALDH1-позитивных раковых клеток при прогрессии КРА от III к IV стадии.

По данным специализированной литературы, ALDH1 – маркер стволовых клеток, который экспрессируется как обычными стволовыми клетками (в толстой кишке экспрессия отмечена в основании кишечных крипт), так и ПСК [16,17]. Экспрессия ALDH1 обнаружена в клетках стромы и в раковых клетках КРА [20]. Описана значительная экспрессия ALDH1 раковыми клетками веретеновидной формы, которые обнаруживают в инвазивном фронте назофарингеального рака, а также значимая корреляция экспрессии ALDH1 с экспрессией маркеров ЭМП: возрастание экспрессии ALDH1 ассоциируется с возрастанием экспрессии виментина на фоне снижения экспрессии E-кадгерина [27]. Многие мезенхимальные стволовые клетки секретируют ЭМП-индуцирующие факторы: цитокины (IL-1, IL-6), хемокины (CCL5, CXCL1, CXCL5, CXCL7, CXCL8) и факторы роста (EGF, HGF, PDGF, TGF- β), которые паракринно «оркестрируют» программу ЭМП раковых клеток посредством активации

факторов транскрипции Twist, Snail, Slug, ZEB1 и ZEB2. Последние, в свою очередь, угнетают активность генов, кодирующих белки адгезии, десмосом и плотных контактов, а также повышают активность генов, кодирующих N-кадгерин, фибронектин и виментин [28,29].

Ранее описан механизм ассоциации высокого уровня экспрессии ALDH1 с увеличенным числом DR4- и DR5-рецепторов, что приводит к избыточной активации MEK/ERK-сигнального каскада [26], активирующего запуск ЭМП раковых клеток.

Данные о корреляции экспрессии ALDH1 с показателями pTNM прогрессии КРА согласуются с данными научной литературы. В ряде работ показана ассоциация возрастающей экспрессии этого маркера с увеличением показателя глубины инвазии КРА, наличием региональных и отдаленных метастазов, ухудшением прогноза для жизни больных [17,21–23]. Отмеченная корреляция между площадью ALDH1⁺ раковых клеток и площадью CD44⁺ клеток опухолевой стромы также свидетельствует о параллельном вовлечении этих молекул в ЭМП, который реализуется в ходе опухолевой прогрессии.

Таким образом, полученные данные о CD44-позитивных и ALDH1-позитивных стволовых клетках в КРА указывают на ведущую роль ЭМП в прогрессии опухоли на ее высших (II–IV) стадиях.

Выводы

1. Колоректальная аденокарцинома характеризуется мембранно-цитоплазматической экспрессией CD44 клетками стромы опухоли. Площадь CD44-позитивных клеток стромы КРА равна 61,26 (42,58; 79,15) % стандартизированной площади среза опухоли, достоверно возрастает при прогрессии опухоли от I к III стадии, а также ассоциируется со снижением пролиферативной активности раковых клеток.

2. Цитоплазматическая экспрессия характеризует ALDH1-позитивные клетки стромы колоректальной карциномы, площадь которых равна 40,22 (22,54; 47,77) % стандартизированной площади среза опухоли, достоверно возрастает при ее прогрессии от II к IV стадии, а также ассоциируется со снижением уровня апоптоза раковых клеток.

3. Раковые клетки на II–IV стадиях прогрессии колоректальной аденокарциномы характеризуются цитоплазматической экспрессией ALDH1: площадь ALDH1-позитивных раковых клеток равна 42,15 (32,06; 50,42) % стандартизированной площади среза опухоли, достоверно возрастает при прогрессии опухоли от III к IV стадии, отражая эпителиально-мезенхимальный переход раковых клеток.

Перспективы дальнейших исследований. Перспективным является дальнейшее изучение роли раковых стволовых клеток в прогрессии колоректальной аденокарциномы с использованием маркера EPCAM, а также оценка корреляций экспрессии изученных маркеров раковых стволовых клеток с маркерами ЭМП (e-cadherin, vimentin).

Финансирование

Исследование проведено в рамках НИР Запорожского государственного медицинского университета «Раннее молекулярно-генетическое и иммуногистохимическое прогнозирование склонности к прогрессии рака легких и органов пищеварения» (№ госрегистрации O117U002580).

Конфликт интересов: отсутствует.

Conflicts of interest: author has no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 30.04.2020

Після доопрацювання / Revised: 12.05.2020

Прийнято до друку / Accepted: 22.05.2020

Сведения об авторах:

Шишкин М. А., канд. мед. наук, доцент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Туманский В. А., д-р мед. наук, профессор каф. патологической анатомии и судебной медицины, проректор по научной работе, Запорожский государственный медицинский университет, Украина, заслуженный деятель науки и техники Украины.

Христенко Т. О., канд. мед. наук, ассистент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Відомості про авторів:

Шишкін М. А., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Туманський В. О., д-р мед. наук, професор каф. патологічної анатомії та судової медицини, проректор з наукової роботи, Запорізький державний медичний університет Україна, заслужений діяч науки і техніки України.

Христенко Т. О., канд. мед. наук, асистент каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Information about authors:

Shyshkin M. A., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Tumanskyi V. O., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Vice-Rector for Research, Zaporizhzhia State Medical University, Honored Worker of Science and Technology of Ukraine.

Khrystenko T. O., MD, PhD, Assistant of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Список литературы

- [1] Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram et al. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018. Vol. 68, Iss. 6. P. 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [2] Rawla P., Sunkara T., Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przeglad gastroenterologiczny*. 2019. Vol. 14, Iss. 2. P. 89-103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
- [3] Туманский В. А., Коваленко И. С. Раковые стволовые и мезенхимальные стволовые клетки в протоковой аденокарциноме поджелудочной железы. *Патологія*. 2019. Т. 16. № 1. С. 131-138. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2019.1.166476>
- [4] Cancer stem cells: An insight / R. B. Moharil, A. Dive, S. Khandekar, A. Bodhade. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*. 2017. Vol. 21, Iss. 3. P. 463. https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp.132_16
- [5] Najafi M., Farhood B., Mortezaee K. Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *Journal of cellular physiology*. 2019. Vol. 234, Iss. 6. P. 8381-8395. <https://doi.org/10.1002/jcp.27740>
- [6] Najafi M., Mortezaee K., Majidpoor J. Cancer stem cell (CSC) resistance drivers / M. Najafi, K. Mortezaee, J. Majidpoor. *Life sciences*. 2019. Vol. 234. P. 116781. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116781>
- [7] Cancer stem cells in progression of colorectal cancer / Y. Zhou, L. Xia, H. Wang et al. *Oncotarget*. 2017. Vol. 9, Iss. 70. P. 33403-33415. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23607>
- [8] Morath I., Hartmann T. N., Orian-Rousseau V. CD44: More than a mere stem cell marker. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2016. Vol. 81, Pt. A. P. 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.009>
- [9] The Role of CD44 and Cancer Stem Cells / L. Wang, X. Zuo, K. Xie, D. Wei. *Methods in molecular biology*. 2018. Vol. 1692. P. 31-42. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7401-6_3
- [10] The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications / C. Chen, S. Zhao, A. Karnad, J. W. Freeman. *Journal of hematology & oncology*. 2018. Vol. 11, Iss. 1. P. 64. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5>
- [11] Senbanjo L. T., Chelliah M. A. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2017. Vol. 5. P. 18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00018>
- [12] Xia P., Xu X. Y. Prognostic significance of CD44 in human colon cancer and gastric cancer: Evidence from bioinformatic analyses. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, Iss. 29. P. 45538-45546. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9998>
- [13] Inoue K., Fry E. A. Aberrant Splicing of Estrogen Receptor, HER2, and CD44 Genes in Breast Cancer. *Genetics & Epigenetics*. 2015. Vol. 7. P. 19-32. <https://doi.org/10.4137/GEG.S35500>
- [14] Vassalli G. Aldehyde Dehydrogenases: Not Just Markers, but Functional Regulators of Stem Cells. *Stem Cells International*. 2019. Vol. 2019. P. 3904645. <https://doi.org/10.1155/2019/3904645>
- [15] Acetaldehyde and Retinaldehyde Metabolizing Enzymes in Colon and Pancreatic Cancers / S. Singh, J. Arcaroli, D. C. Thompson et al. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015. Vol. 815. P. 281-294. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09614-8_16
- [16] Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression is an independent prognostic factor in triple negative breast cancer (TNBC) / F. Ma, H. Li, Y. Li et al. *Medicine*. 2017. Vol. 96, Iss. 14. P. e6561. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006561>
- [17] Prognostic Value of Cancer Stem Cell Marker ALDH1 Expression in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis / J. Chen, Q. Xia, B. Jiang et al. *PLoS One*. 2015. Vol. 10, Iss. 12. P. e0145164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145164>
- [18] Шишкин М. А. Сравнительная иммуногистохимическая характеристика пролиферации и апоптоза колоректальной аденокарциномы. *Патологія*. 2016. № 3. С. 65-72. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2016.3.87497>
- [19] Шишкин М. А. Молекулярно-иммуногистохимическая характеристика пролиферации и апоптоза опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы. *Патологія*. 2018. Т. 15, № 1. С. 49-56. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2018.1.129447>
- [20] Molecular profiling of ALDH1+ colorectal cancer stem cells reveals preferential activation of MAPK, FAK, and oxidative stress pro-survival signalling pathways / R. Vishnubalaji, M. Manikandan, M. Fahad et al. *Oncotarget*. 2018. Vol. 9, Iss. 17. P. 13551-13564. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24420>
- [21] Mahmood N. A., Abdulghany Z. S., Al-Sudani I. M. Expression of Aldehyde Dehydrogenase (ALDH1) and ATP Binding Cassette Transporter G2 (ABCG2) in Iraqi Patients with Colon Cancer and the Relation with Clinicopathological Features. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2018. Vol. 7, Iss. 4. P. 234-240. <https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.7.4.234>
- [22] Evaluation of the Role of ALDH1 as Cancer Stem Cell Marker in Colorectal Carcinoma: An Immunohistochemical Study / N. S. Holah, H. A. Aiad, N. Y. Asaad et al. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2017. Vol. 11, Iss. 1. P. EC17-EC23. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/22671.9291>
- [23] ALDH1A1 expression is associated with poor differentiation, 'right-sidedness' and poor survival in human colorectal cancer / L. M. van der Waals, I. Borel Rinkes, O. Kranenburg. *PLoS One*. 2018. Vol. 13, Iss. 10. P. e0205536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205536>
- [24] Shyshkin M. A., Khrystenko T. O. Distal colonic polyps: immunohistochemical study of proliferation and apoptosis. *Morphologia*. 2019. Vol. 13, Iss. 1. P. 67-75. <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.1.67-75>
- [25] A self-enforcing CD44s/ZEB1 feedback loop maintains EMT and stemness properties in cancer cells / B. T. Preca, K. Baidak, K. Mock et al. *International journal of cancer*. 2015. Vol. 137, Iss. 11. P. 2566-2577. <https://doi.org/10.1002/ijc.29642>
- [26] Aldehyde Dehydrogenase 1 (ALDH1) Promotes the Toxicity of TRAIL in Non-Small Cell Lung Cancer Cells via Post-Transcriptional Regulation of MEK-1 Expression / S. Tian, D. H. Liu, D. Wang et al. *Cellular physiology and biochemistry*. 2018. Vol. 51, Iss. 1. P. 217-227. <https://doi.org/10.1159/000495202>

- [27] Aldehyde dehydrogenase 1, a functional marker for identifying cancer stem cells in human nasopharyngeal carcinoma / A. Wu, W. Luo, Q. Zhang et al. *Cancer Letters*. 2013. Vol. 330, Iss. 2. P. 181-189. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.046>
- [28] Lazennec G., Lam P. Y. Recent discoveries concerning the tumor – mesenchymal stem cell interactions. *Biochimica et biophysica acta*. 2016. Vol. 1866, Iss. 2. P. 290-299. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.10.004>
- [29] Tumor specific recruitment and reprogramming of mesenchymal stem cells in tumorigenesis / L. Berger, Y. Shamai, K. L. Skorecki, M. Tzukerman. *Stem Cells*. 2016. Vol. 34, Iss. 4. P. 1011-1026. <https://doi.org/10.1002/stem.2269>
- ## References
- [1] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [2] Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przeglad gastroenterologiczny*, 14(2), 89-103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
- [3] Tumanskiy, V. O., & Kovalenko, I. S. (2019). Rakovye stvolovye i mezenkhimal'nye stvolove kletki v protokovoi adenokartsinome podzheludochnoi zhelezy [Cancer stem cells and mesenchymal stem cells in pancreatic ductal adenocarcinoma]. *Pathologia*, 16(1), 131-138. [in Russian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2019.1.166476>
- [4] Moharil, R. B., Dive, A., Khandekar, S., & Bodhade, A. (2017). Cancer stem cells: An insight. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, 21(3), 463. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_132_16
- [5] Najafi, M., Farhood, B., & Mortezaee, K. (2019). Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *Journal of cellular physiology*, 234(6), 8381-8395. <https://doi.org/10.1002/jcp.27740>
- [6] Najafi, M., Mortezaee, K., & Majidpoor, J. (2019). Cancer stem cell (CSC) resistance drivers. *Life sciences*, 234, 116781. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116781>
- [7] Zhou, Y., Xia, L., Wang, H., Oyang, L., Su, M., Liu, Q., Lin, J., Tan, S., Tian, Y., Liao, Q., & Cao, D. (2017). Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(70), 33403-33415. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23607>
- [8] Morath, I., Hartmann, T. N., & Orian-Rousseau, V. (2016). CD44: More than a mere stem cell marker. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 81(Pt A), 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.009>
- [9] Wang, L., Zuo, X., Xie, K., & Wei, D. (2018). The Role of CD44 and Cancer Stem Cells. *Methods in molecular biology*, 1692, 31-42. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7401-6_3
- [10] Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., & Freeman, J. W. (2018). The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *Journal of hematology & oncology*, 11(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5>
- [11] Senbanjo, L. T., & Chellaiah, M. A. (2017). CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Frontiers in cell and developmental biology*, 5, 18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00018>
- [12] Xia, P., & Xu, X. Y. (2016). Prognostic significance of CD44 in human colon cancer and gastric cancer: Evidence from bioinformatic analyses. *Oncotarget*, 7(29), 45538-45546. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9998>
- [13] Inoue, K., & Fry, E. A. (2015). Aberrant Splicing of Estrogen Receptor, HER2, and CD44 Genes in Breast Cancer. *Genetics & epigenetics*, 7, 19-32. <https://doi.org/10.4137/GEG.S35500>
- [14] Vassalli, G. (2019). Aldehyde Dehydrogenases: Not Just Markers, but Functional Regulators of Stem Cells. *Stem cells international*, 2019, 3904645. <https://doi.org/10.1155/2019/3904645>
- [15] Singh, S., Arcaroli, J., Thompson, D. C., Messersmith, W., & Vasilou, V. (2015). Acetaldehyde and retinaldehyde-metabolizing enzymes in colon and pancreatic cancers. *Advances in experimental medicine and biology*, 815, 281-294. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09614-8_16
- [16] Ma, F., Li, H., Li, Y., Ding, X., Wang, H., Fan, Y., Lin, C., Qian, H., & Xu, B. (2017). Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression is an independent prognostic factor in triple negative breast cancer (TNBC). *Medicine*, 96(14), e6561. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006561>
- [17] Chen, J., Xia, Q., Jiang, B., Chang, W., Yuan, W., Ma, Z., Liu, Z., & Shu, X. (2015). Prognostic Value of Cancer Stem Cell Marker ALDH1 Expression in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one*, 10(12), e0145164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145164>
- [18] Shyshkin, M. A. (2016). Sravnitel'naya immunogistokhimicheskaya kharakteristika proliferatsii i apoptoza kolorektal'noi adenokartsinomy [Comparative immunohistochemical study of proliferation and apoptosis in colorectal adenocarcinoma]. *Pathologia*, (3), 65-72. [in Russian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2016.3.87497>
- [19] Shyshkin, M. A. (2018). Molekulyarno-immunogistokhimicheskaya kharakteristika proliferatsii i apoptoza opukhlevykh kletok kolorektal'noi adenokartsinomy [Molecular-immunohistochemical characteristics of proliferation and apoptosis of tumor cells in colorectal adenocarcinoma]. *Pathologia*, 15(1), 49-56. [in Russian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2018.1.129447>
- [20] Vishnubalaji, R., Manikandan, M., Fahad, M., Hamam, R., Alfayez, M., Kassem, M., Aldahmash, A., & Alajez, N. M. (2018). Molecular profiling of ALDH1⁺ colorectal cancer stem cells reveals preferential activation of MAPK, FAK, and oxidative stress pro-survival signalling pathways. *Oncotarget*, 9(17), 13551-13564. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24420>
- [21] Mahmood, N. A., Abdulghany, Z. S., & Al-Sudani, I. M. (2018). Expression of Aldehyde Dehydrogenase (ALDH1) and ATP Binding Cassette Transporter G2 (ABCG2) in Iraqi Patients with Colon Cancer and the Relation with Clinicopathological Features. *International journal of molecular and cellular medicine*, 7(4), 234-240. <https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.7.4.234>
- [22] Holah, N. S., Aiad, H. A., Asaad, N. Y., Elkhouly, E. A., & Lasheen, A. G. (2017). Evaluation of the Role of ALDH1 as Cancer Stem Cell Marker in Colorectal Carcinoma: An Immunohistochemical Study. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 11(1), EC17-EC23. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/22671.9291>
- [23] van der Waals, L. M., Borel Rinkes, I., & Kranenburg, O. (2018). ALDH1A1 expression is associated with poor differentiation, 'right-sidedness' and poor survival in human colorectal cancer. *PLoS one*, 13(10), e0205536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205536>
- [24] Shyshkin, M. A., & Khrystenko, T. O. (2019). Distal colonic polyps: immunohistochemical study of proliferation and apoptosis. *Morphologia*, 13(1), 67-75. <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.1.67-75>
- [25] Preca, B. T., Bajdak, K., Mock, K., Sundararajan, V., Pfannstiel, J., Maurer, J., Wellner, U., Hopt, U. T., Brummer, T., Brabletz, S., Brabletz, T., & Stemmler, M. P. (2015). A self-enforcing CD44s/ZEB1 feedback loop maintains EMT and stemness properties in cancer cells. *International journal of cancer*, 137(11), 2566-2577. <https://doi.org/10.1002/ijc.29642>
- [26] Tian, S., Liu, D. H., Wang, D., Ren, F., & Xia, P. (2018). Aldehyde Dehydrogenase 1 (ALDH1) Promotes the Toxicity of TRAIL in Non-Small Cell Lung Cancer Cells via Post-Transcriptional Regulation of MEK-1 Expression. *Cellular physiology and biochemistry*, 51(1), 217-227. <https://doi.org/10.1159/000495202>
- [27] Wu, A., Luo, W., Zhang, Q., Yang, Z., Zhang, G., Li, S., & Yao, K. (2013). Aldehyde dehydrogenase 1, a functional marker for identifying cancer stem cells in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer letters*, 330(2), 181-189. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.046>
- [28] Lazennec, G., & Lam, P. Y. (2016). Recent discoveries concerning the tumor – mesenchymal stem cell interactions. *Biochimica et biophysica acta*, 1866(2), 290-299. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.10.004>
- [29] Berger, L., Shamai, Y., Skorecki, K. L., & Tzukerman, M. (2016). Tumor Specific Recruitment and Reprogramming of Mesenchymal Stem Cells in Tumorigenesis. *Stem cells*, 34(4), 1011-1026. <https://doi.org/10.1002/stem.2269>