

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РЕГИОНАЛЬНЫХ И ДИСТАНТНЫХ МЕТАСТАЗАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Сагакянц А.Б., Ульянова Е.П., Шульгина О.Г., Златник Е.Ю., Новикова И.А., Карнауков Н.С., Кузнецова М.А., Ващенко Л.Н., Петриашвили И.Р., Лысенко Е.П.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» МЗ РФ, Ростов-на-Дону, e-mail: asagak@rambler.ru

Опухолевым стволовым клеткам (ОСК) отводится важное место в возникновении, развитии, метастазировании и устойчивости к терапии солидных опухолей. Данная группа клеток обнаружена и при раке молочной железы, но их фенотипические особенности и вовлеченность в патогенез заболевания изучены не полностью. Кроме того, ОСК участвуют в процессах метастазирования, однако их вклад в это явление не определен. Показано, что при данном заболевании имеется определенная гетерогенность опухолевых стволовых клеток, которая определяет исход развития патологического процесса. Целью работы являлось изучение фенотипических характеристик опухолевых клеток с фенотипом стволовых в ткани регионарных и дистантных метастазов при опухолях молочной железы. В работе представлены результаты изучения количества опухолевых клеток с фенотипом стволовых в первичном очаге и метастазах рака молочной железы, определенных с использованием иммуногистохимического подхода в биологическом материале 20 пациенток. Обнаружено, что ОСК с фенотипом CD44⁺ и CD133⁺ преобладают в первичной опухоли РМЖ по сравнению с тканью регионарных и дистантных метастазов. Исключением является повышенное содержание CD44⁺-клеток в метастазе РМЖ в легкое.

Ключевые слова: рак молочной железы, опухолевые стволовые клетки, региональные метастазы, дистантные метастазы, ИГХ-маркеры.

EXPRESSION OF TUMOR STEM CELL MARKERS IN REGIONAL AND DISTANT BREAST CANCER METASTASES

Sagakyants A.B., Ulyanova E.P., Shulgina O.G., Zlatnik E.Yu., Novikova I.A., Karnaukhov N.S., Kuznetsova M.A., Vashchenko L.N., Petriashvili I.R., Lysenko E.P.

National Medical Research Center for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: asagak@rambler.ru

Tumor stem cells play an important role in the emergence, development, metastasis and resistance to therapy of solid tumors. This group of cells has also been found in breast cancer, but their phenotypic features and involvement in the pathogenesis of the disease have not been fully studied. In addition, CSCs are involved in metastatic processes, but their contribution to this phenomenon has not been determined. It is shown that in this disease there is a certain heterogeneity of tumor stem cells, which determines the outcome of the development of the pathological process. The purpose was to study the phenotypic characteristics of tumor cells with a stem phenotype in the tissue of regional and distant metastases in breast tumors. The results of studying the number of tumor stem cells with a phenotype in the primary focus and metastatic breast cancer, determined using immunohistochemical approach in biological material 20 patients. It was found that CSCs with the CD44⁺ and CD133⁺ phenotype predominate in the primary breast cancer compared with the tissue of regional and distant metastases. An exception is the increased content of CD44⁺ cells in breast cancer metastasis to the lung.

Key words: breast cancer, cancer stem cells, regional metastases, distant metastases, IHC markers.

Рак молочной железы (РМЖ) занимает особое место в структуре заболеваемости и смертности женского населения. В Российской Федерации за последние годы зарегистрировано около 1,38 млн новых случаев рака данной локализации [1]. При этом профессиональным сообществом признается факт сложного контроля за ростом заболеваемости РМЖ по причине отсутствия эффективных путей первичной профилактики. До сих пор нерешенными остаются вопросы применения имеющихся прогностических маркеров и предикторов в ежедневной практике онколога, спектр которых неуклонно растет.

В настоящее время сформировано представление о том, что РМЖ – группа гетерогенных опухолей с различными биологическими свойствами, на основании чего проводится их выделение в соответствующие подтипы, имеющие выраженные отличия по экспрессии отдельных маркеров, характеру протекания заболевания, ответу на проводимое лечение и прогнозу развития заболевания. Более того, внутри соответствующего подтипа выделяются отдельные больные, значительно отличающиеся по срокам развития рецидива заболевания и его прогрессирования [2].

За последние десятилетия показано, что у 30–90% пациентов с первичным РМЖ могут развиваться отдаленные метастазы [3]. Вероятно, распространение опухолевых клеток происходит на ранних стадиях, однако они долгое время могут находиться в дормантном состоянии, что, по мнению ряда авторов, может быть объяснено с позиций «теории опухолевых стволовых клеток (ОСК)» [4].

Опухолевые стволовые клетки (ОСК, cancer stem cells) – особая часть гетерогенной опухолевой популяции, участвующая в формировании и росте первичного и метастатического очага, обуславливающая высокую резистентность к различным видам терапии за счет наличия клеточных систем детоксикации (например, ABC-транспортеров) [5].

Действие разнообразных факторов микроокружения ОСК приводит к значительному изменению профиля поверхностных маркеров, биологических характеристик ОСК, что обуславливает разнообразие этих клеток. Вероятно, гетерогенность, присущая опухоли в принципе, проявляется уже на уровне ее стволовых клеток. Кроме того, не во всех случаях отмечено соответствие между «стволовым» фенотипом опухолевых клеток и их способностью вызывать опухолевый рост на моделях *in vivo* [6].

Для идентификации ОСК РМЖ наиболее часто используют такие маркеры, как ESA^+ , $CD44^+$ и $CD24^+$ [7], а также $ALDH1^+$, $Ost-4^+$ [8].

Появляется все больше свидетельств того, что агрессивная природа опухолей молочной железы может быть обусловлена наличием более высокой частоты присутствия ОСК с фенотипом $CD44^{hi}CD24^{low/-}$ [9, 10, 11, 12]. Напротив, люминальные РМЖ, как полагают, являются преимущественно $ALDH^+$ ($CD44^+CD24^{low/-}ALDH1^+$) [13]. Эти наблюдения позволяют предположить, что подгруппа ОСК в опухолях является гетерогенной по природе в отношении фенотипа и, возможно, по-разному функционирует среди различных подтипов РМЖ.

Цель работы – изучить фенотипические характеристики опухолевых клеток с фенотипом стволовых в ткани регионарных и дистантных метастазов при опухолях молочной железы.

Материалы и методы исследования

Проведено ретроспективное исследование, в которое были включены 20 больных РМЖ с регионарными (в лимфатические узлы) и дистантными метастазами (в легкие, печень, головной мозг) в возрасте от 42 до 74 лет (средний возраст $56,1 \pm 3,3$ года).

В опухоли и ткани метастазов производили несколько параллельных горизонтальных разрезов через всю опухоль, избегая очагов некроза. Для фиксации материала использовали раствор 10%-ного нейтрального формалина с последующей стандартной проводкой и получением парафиновых блоков. На микротоме готовили срезы толщиной 3–5 мкм с последующим их окрашиванием гематоксилином и эозином.

Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. «Демаскировку» антигенов проводили в PT-LinkThermo. Протокол включал в себя предварительный нагрев до 65°C , восстановление антигена в течение 20 минут при температуре 97°C и дальнейшее охлаждение до 65°C . Затем стекла промывали в течение 1–3 минут TBS-буфером (CellMarque), помещали для окрашивания в автостейнер Thermo Scientific.

Для определения экспрессии CD44 и CD133 на опухолевых клетках иммуногистохимическим методом использовали моноклональные мышиные антитела к CD44 клон 156-3C11 (Thermo Scientific) в разведении 1:2500 и поликлональные кроличьи антитела к CD133 (Cloud-Clone Corp.) в разведении 1:700 с использованием автостейнера Thermo Scientific 480; для демаскировки антигена CD133 применяли буфер 10 мМ Tris, 1 мМ EDTA (pH 8,0), для CD44 – цитратный буфер (Abcam) (pH 6,0).

Оценивали мембранную окраску, характеризовали интенсивность окрашивания клеточной мембраны: 0, 1+ слабое, 2+ умеренное, 3+ сильное окрашивание. При наличии интенсивности окрашивания 2+ и 3+ случай рассматривался как позитивный. Экспрессия белка CD44 определялась как положительная при окрашивании в 10% (cut-off) и более всех опухолевых клеток, а в случае с CD133 – в более 5%.

На основании полученных результатов осуществляли расчет средних значений, стандартных отклонений. После проверки характера распределения проводили оценку статистической значимости различий между показателями экспрессии маркера в первичной опухоли и в ткани региональных и дистантных метастазов по критерию χ^2 Пирсона. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Пациентки с РМЖ, отобранные для данного исследования, характеризовались наличием как регионарных (в лимфатические узлы), так и дистантных метастазов. Последние были представлены вторичными опухолями, локализованными в легких, головном мозге и

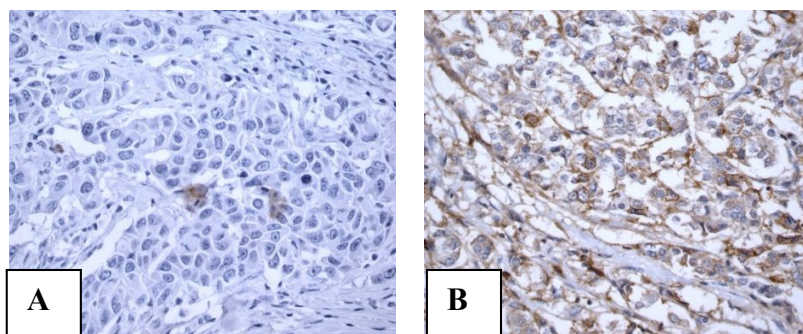
печени. В соответствии с задачами проводимого исследования осуществлялась идентификация ОСК с выбранными маркерами в указанных региональных и дистантных метастазах.

Для обнаружения ОСК при раке молочной железы (ОСК-РМЖ) используются аналогичные фенотипические маркеры, как и при ряде других солидных опухолей. В нашей работе мы применяли иммуногистохимический подход к идентификации данных клеток. На рисунках 1–4 представлены примеры полученных результатов ИГХ окрашивания препаратов опухоли, региональных и дистантных метастазов при РМЖ для выявления CD44⁺ и CD133⁺-клеток. Полученные результаты определения числа экспрессирующих выбранных маркеров ОСК-РМЖ представлены в таблице.

Из полученных результатов видно, что в ткани опухоли молочной железы (РМЖ) экспрессия CD44⁺ обнаружена в 80% случаев (16 образцов), при этом в 20% случаев данный маркер не определялся. Средний уровень экспрессии CD44 составил 27,2±13,9% (таблица, рис. 1).

Выявлено, что частота экспрессии CD44 в регионарных метастазах РМЖ (в лимфатических узлах) составила 35% с колебанием данного показателя от 0% до 30%, в среднем составив 17,0±6,8% (таблица, рис. 2), что указывает на значимое отличие данного показателя от уровня в первичном очаге ($\chi^2=8,286$ при $p<0,004$).

В различных дистантных метастазах РМЖ уровень экспрессии CD44 был различен (таблица, рис. 3). Так, экспрессия CD44⁺ была выявлена в 60% случаев при метастазах в легкие (от 20% до 75%), в среднем составив 41,4±13,4%, при метастазах в головной мозг – в 30% случаев (от 0% до 60%), в среднем составив 23,3±17,8%, а при метастазах в печень данный показатель был отрицателен. Найденные отличия также были статистически значимы ($\chi^2=30,077$ при $p<0,001$).



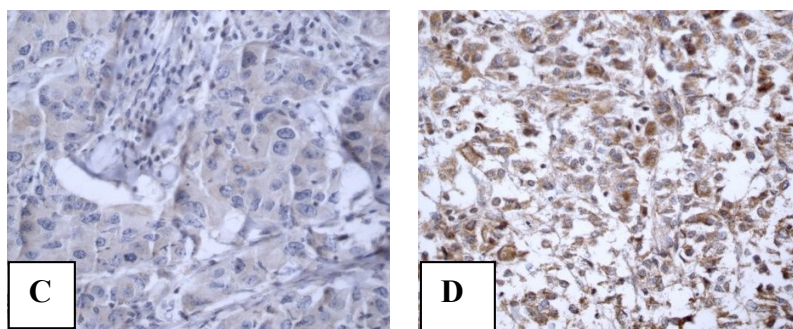


Рис. 1. Экспрессия маркеров ОСК в опухоли при РМЖ: А – отрицательная экспрессия CD44; В – положительная экспрессия CD44 (2+); С – отрицательная экспрессия CD133 (1+). D – положительная экспрессия CD133 (3+). Ув. x400

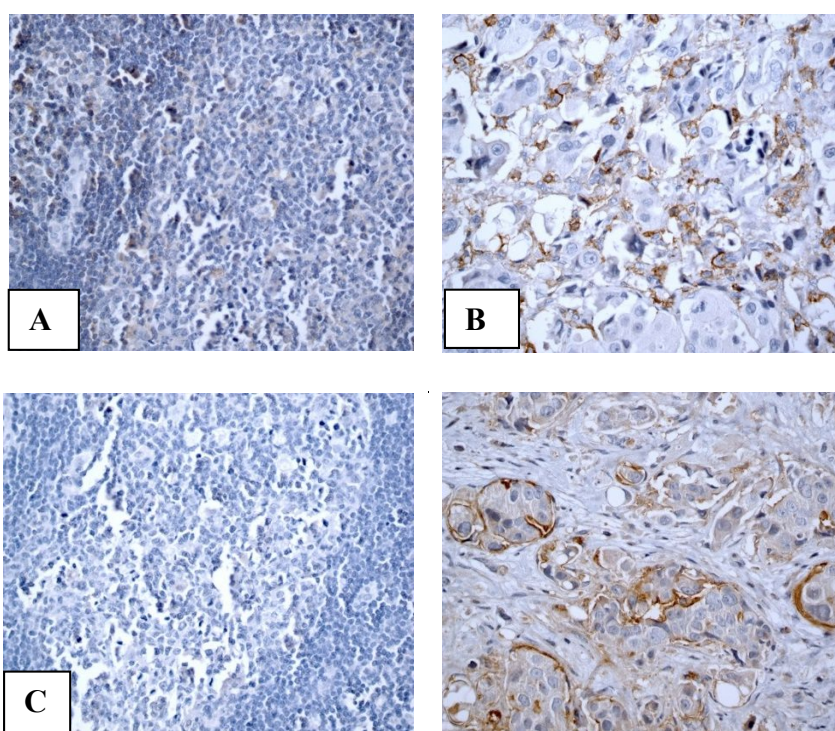
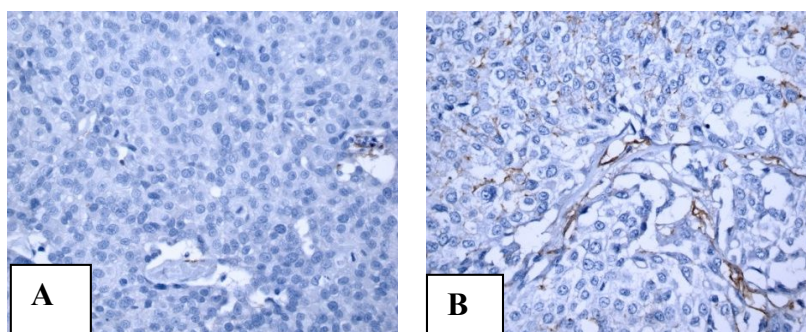


Рис. 2. Экспрессия маркеров ОСК в регионарных метастазах (ЛН) опухоли при РМЖ: А – отрицательная экспрессия CD44; В – положительная экспрессия CD44 (3+); С – отрицательная экспрессия CD133; D – положительная экспрессия CD133 (3+). Ув. x400



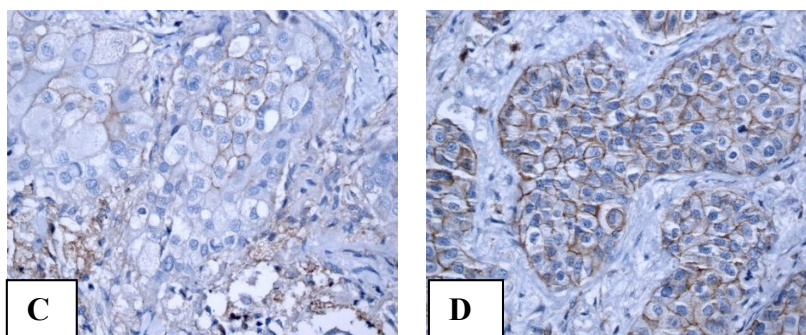


Рис. 3. Экспрессия CD44 маркера в дистантных метастазах опухоли РМЖ:

А – отрицательная экспрессия CD44, метастаз в головной мозг. В – отрицательная экспрессия CD44 (1+), метастаз в головной мозг. С – отрицательная экспрессия CD44 (1+), метастаз в легкое. D – положительная экспрессия CD44 (2+), метастаз в легкое. Ув. x400

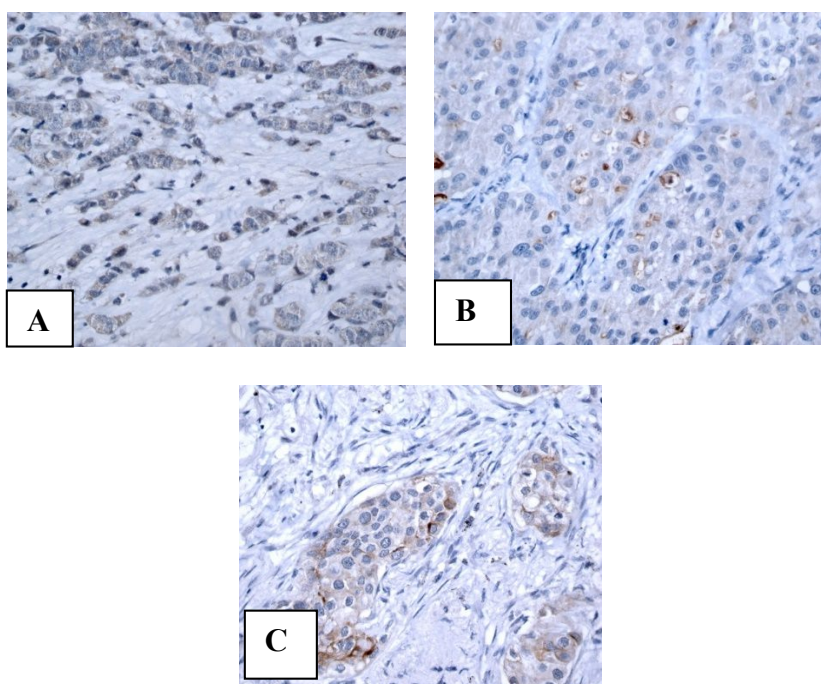


Рис. 4. Экспрессия CD133 маркера в дистантных метастазах опухоли РМЖ:

А – отрицательная экспрессия CD133, метастаз в головной мозг. В – отрицательная экспрессия CD133 (1+), метастаз в легкое. С – положительная экспрессия CD133 (2+), метастаз в легкое. Ув. x400

Экспрессия маркеров ОСК в клетках опухоли рака молочной железы, регионарных и дистантных метастазах

	CD44		CD133	
	% экспрессирующих маркер клеток (число случаев)		% экспрессирующих маркер клеток (число случаев)	
	CD44 ⁺	CD44 ⁻	CD133 ⁺	CD133 ⁻

ОПУХОЛЬ	80% (16)	20% (4)	80% (16)	20% (4)
средние значения позитивных клеток, %	27,2±13,9		56,0±14,6	
МЕТАСТАЗ, региональный (ЛУ)	35% (7)	65% (13)	15% (3)	85% (17)
средние значения позитивных клеток, %	17,0±6,8		33,0±15,4	
МЕТАСТАЗ, Дистантный <i>Легкое</i>	60% (12)	40% (8)	20% (4)	80% (16)
средние значения позитивных клеток, %	41,4±13,4		3,6±2,05* $p \leq 0,001$	
<i>Печень</i>	–	100% (20)	–	100% (20)
средние значения позитивных клеток, %	–		–	
<i>Головной мозг</i>	30% (6)	70% (14)	–	100% (20)
средние значения позитивных клеток, %	23,3±17,8* $p \leq 0,001$		–	

* – статистически достоверные различия уровня экспрессии маркера по сравнению с первичной опухолью РМЖ

CD44 – поверхностный гликопротеид, рецептор для гиалуронана (ГА) – линейного гликозамингликана, основного компонента внеклеточного матрикса, участвующего в межклеточных взаимодействиях и определяющего таким способом подвижность клеточных элементов. Отмечается, что в результате присоединения ГА к CD44 активируются многие рецепторные тирозинкиназы, в том числе EGFR и ERBB2, что обуславливает закономерное изменение структурно-функциональных свойств клетки, изменение ее миграционной активности. В норме данная структура представлена на различных соматических клетках, но уровень ее экспрессии увеличивается при опухолевой трансформации. В результате проведенных ранее исследований показано, что CD44 регулирует инвазивные и пролиферативные свойства опухолевых клеток, включая клетки молочной железы, а также процессы ангиогенеза [14]. Представляет особый интерес тот факт, что данная молекула характеризуется наличием нескольких изоформ. Показано, что в результате альтернативного сплайсинга и вариации в посттрансляционных модификациях в виде N- и O-гликозилирования возникают молекулы, отличающиеся структурными и функциональными особенностями, что в свою очередь обуславливает дифференциальную роль изоформ CD44 в патогенезе различных опухолей, в том числе и РМЖ [14].

У больных РМЖ наличие субпопуляции CD44⁺CD24^{low} в образцах опухоли коррелировало с наличием отдаленных метастазов, особенно в костях [15].

По-видимому, опухолевые клетки с фенотипом стволовых закономерным образом изменяют свой фенотип, испытывая на себе воздействие различных факторов микроокружения, что позволяет данным клеткам наиболее эффективно приспособиться к

новым условиям. В нашей работе мы обнаружили, что количество ОСК-РМЖ с фенотипом CD44⁺ уменьшается в региональных метастазах (ЛУ), в то время как в различных дистантных метастазах либо превышает данный показатель в первичной опухоли (метастаз в легкое), либо находится в его пределах (метастаз в головной мозг). Эти результаты могут указывать на некоторые особенности соответствующих тканей, где наблюдается развитие метастаза.

Другим маркером, который достаточно часто исследуется при определении ОСК солидных опухолей, является CD133, функциональная роль которого в биологии соматических клеток, а также в ОСК-РМЖ изучена в меньшей степени.

CD133 (AC133, проминин-1) впервые был обнаружен на гемопоэтических стволовых клетках в 1997 г. [16]. Это трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 120 кД, взаимодействующий с холестерином [17], принадлежит к семейству промининов, определяются 3 его изоформы: CD133-1, CD133-2, CD133-3. Данная молекула аккумулируется в мембранных выпячиваниях, но ее функциональная роль точно не известна.

В результате проведенного исследования наличие CD133⁺ в ткани опухоли РМЖ выявлялось в 80% случаев при среднем уровне экспрессии данного маркера $56,0 \pm 14,6\%$, с преобладанием положительного цитоплазматического окрашивания в 60% случаев (таблица, рис. 1).

Определение данного маркера в регионарных метастазах (лимфатических узлах) РМЖ позволило получить положительный результат в 15% случаев (3 образца), с колебанием экспрессии от 0% до 60%, при этом средний уровень экспрессии был $33,0 \pm 15,4$ (таблица, рис. 4), достоверно отличаясь от уровня данного показателя в опухоли ($\chi^2=16,942$ при $p<0,001$).

В дистантных метастазах наличие CD133-маркера при РМЖ наблюдалось в 20% случаев при метастазах в легкие, с колебанием от 0% до 10%, в среднем составив $3,6 \pm 2,05\%$ (таблица), что также достоверно отличалось от уровня данного показателя в опухоли ($\chi^2=40,867$ при $p<0,001$). Следует отметить, что в метастазах в печень и головной мозг экспрессия CD133 была отрицательная.

Таким образом, выявлено, что в первичной опухоли РМЖ отмечается наибольшее количество ОСК, экспрессирующих CD133 маркер, а для метастазов показано выраженное снижение клеток данного фенотипа, причем в дистантных метастазах количество этих клеток и уровень экспрессии рассматриваемого маркера наименьшие.

Заключение

Полученные результаты определения экспрессии выбранных маркеров ОСК указывают на некоторые особенности распределения данных клеток в первичной опухоли и в различных метастазах. Вследствие того что в последнее время с ОСК ассоциируют и такой

тип опухолевых клеток, как циркулирующие опухолевые клетки, можно предположить, что выявленные закономерности отражают в определенной степени особенности миграции клеток и формирования метастатических поражений.

Для объяснения характера поведения опухолевых клеток с фенотипом стволовых особый интерес представляет концепция «мигрирующих ОСК», предложенная Brabletz et al. еще в 2005 г. [18]. В основе данной концепции лежат представления о том, что потенциально существует две формы ОСК, которые обуславливают опухолевую прогрессию. Эти две формы раковых клеток представлены так называемыми стационарной ОСК и мобильной ОСК.

Стационарные ОСК неподвижны и всегда окружены эпителиальными тканями. Эти клетки ответственны за формирование трансформированных потомков, формирующих первичную опухоль. В настоящий момент остается открытым вопрос о наличии у данных популяций ОСК фенотипических особенностей, но поиск ответа на данный вопрос продолжается, и, вероятно, для его решения необходимо дальнейшее развитие в том числе и методических подходов к изучению обсуждаемых явлений.

В отличие от них, «мобильные ОСК», как правило, расположены на границе опухоли и здоровых тканей организма [18]. Для данных клеток характерным свойством является способность к эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT), лежащему в основе сохранения стволоподобных свойств и повышенной мобильности [19]. Оба этих свойства имеют важное значение в осуществлении дальнейшей злокачественной прогрессии. Появление данной субпопуляции «мигрирующих ОСК» ознаменывает «срыв гомеостаза эпителиальной ткани», что сопровождается потерей данными клетками эпителиального фенотипа с последующим увеличением миграционной активности.

Появление и увеличение числа данных субтипов ОСК, характеризующихся повышенной ядерной экспрессией β -катенинов, а также наличие некоторых дополнительных функциональных молекул и их топографическое расположение ближе к краю опухоли, по мнению ряда исследователей, лежат в основе процесса метастазирования солидных опухолей [18, 20, 21].

Изучение роли ОСК-PMЖ представляется весьма перспективным для решения как фундаментальных, так и прикладных проблем онкологии, особенно для дальнейшей разработки новых стратегий лекарственной терапии больных с данной патологией [22].

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о процентном преобладании CD44⁻ и CD133⁺-клеток в первичной опухоли по сравнению с тканью метастазов. Исключением является повышенное содержание CD44⁺-клеток при метастазе PMЖ в легкое.

Список литературы

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 236 с.
2. Кит О.И., Шатова Ю.С., Франциянц Е.М., Новикова И.А., Златник Е.Ю. Рак молочной железы у женщин в различные репродуктивные периоды жизни: клинико-эпидемиологические и гормонально-метаболические аспекты: монография. Ростов н/Д.: ООО «ДГТУ-ПРИНТ», 2018. 276 с.
3. Титов К.С., Оганесян А.П., Ротин Д.Л., Рябчиков Д.А., Лепкова Н.В. Опухолевые стволовые клетки при раке молочной железы. Роль в патогенезе и подходы к терапии // Злокачественные опухоли. 2016. № 2. С. 22-27.
4. Luo Y., Zhou X., Yakisich J.S. Stemness and plasticity of lung cancer cells: paving the road for better therapy. *Onco. Targets and Ther.* 2014. Vol. 7. P. 1129-1134.
5. Сагакянц А.Б., Франциянц Е.М., Златник Е.Ю., Ульянова Е.П., Бондаренко Е.С., Шульгина О.Г., Самойленко Н.С., Дашков А.В., Каймакчи Д.О. Биологические свойства и некоторые клинические аспекты опухолевых стволовых клеток: современное состояние проблемы // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 4. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=27950> (дата обращения: 13.08.2020).
6. Papaccio F., Paino F., Regad T., Papaccio G., Desiderio B., Tirino V. Concise Review: Cancer Cells, Cancer Stem Cells, and Mesenchymal Stem Cells: Influence in Cancer Development. *Stem Cells Translational medicine.* 2017. Vol. 6. P. 2115-2125.
7. Li L., Hao X., Qin J. et al. Antibody against CD44s inhibits pancreatic tumor initiation and postradiation recurrence in mice. *Gastroenterology.* 2014. Vol. 146. No. 4. P. 1108-1118.
8. Liu C.G., Lu Y., Wang B.B. et al. Clinical implications of stem cell gene Oct-4 expression in breast cancer. *Ann. Surg.* 2011. Vol. 253. No. 6. P. 1165-1171.
9. Bianchini G., Balko J.M., Mayer I.A., Sanders M.E., Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2016. Vol. 13. No. 11. P. 674-690.
10. O'Connor C.J., Chen T.I., González I., Cao D., Peng Y. Cancer stem cells in triple-negative breast cancer: a potential target and prognostic marker. *Biomark Med.* 2018. Vol. 12. No. 7. P. 813-820.
11. Gener P., Rafael D., Seras-Franzoso J., Perez A., Pindado L.A., Casas G., Arango D., Fernández Y., Díaz-Riascos Z.V., Abasolo I., Schwartz S. Jr. Pivotal role of AKT2 during dynamic phenotypic change of breast cancer stem cells. *Cancers.* 2019. Vol. 11. No. 8. P. 1058.

12. Park S.-Y., Choi J.-H., Nam J.-S. Targeting cancer stem cells in triple-negative breast cancer. *Cancers*. 2019. Vol. 11. P. 965.
13. Ithimakin S., Day K.C., Malik F., Zen Q., Dawsey S.J., Bersano-Begey T.F., Quraishi A.A., Ignatoski K.W., Daignault S., Davis A. HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: implications for efficacy of adjuvant trastuzumab. *Cancer Res*. 2013. Vol. 73. P.1635-1646.
14. Götte M., Yip G.W. Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Res*. 2006. Vol. 66. P. 10233-10237.
15. Abraham B.K., Fritz P., McClellan M. et al. Prevalence of CD44⁺/CD24^{-/low} cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin. Cancer Res*. 2005. Vol. 11. No. 3. P. 1154-9.
16. Пучинская М.В. Маркеры опухолевых стволовых клеток и их прогностическое значение // *Архив патологии*. № 2. 2016. С. 47-54.
17. Lingala S, Cui YY, Chen X, Ruebner BH, Qian XF, Zern MA, Wu J. Immunohistochemical staining of cancer stem cell markers in hepatocellular carcinoma// *Experimental and Molecular Pathology*. 2010. Vol. 89. No. 1.P. 27-35.
18. Brabletz T., Jung A., Spaderna S., Hlubek F., Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat. Rev. Cancer*. 2005. Vol. 5. P. 744-9.
19. Thiery J.P. Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell. Biol*. 2003. Vol. 15. P. 740-6.
20. Ueno H., Murphy J., Jass J.R., Mochizuki H., Talbot I.C. Tumour «budding» as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*. 2002. Vol. 40. P. 127-32.
21. Ueno H., Price A.B., Wilkinson K.H., Jass J.R., Mochizuki H., Talbot I.C. A new prognostic staging system for rectal cancer. *Ann Surg*. 2004. Vol. 240. P. 832-9.
22. Титов К.С., Оганесян А.П., Ротин Д.Л., Рябчиков Д.А., Лепкова Н.В. Опухолевые стволовые клетки при раке молочной железы. Роль в патогенезе и подходы к терапии // *Злокачественные опухоли*. 2016. № 2. С. 22-27.