

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ СВОБОДНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО КАРЦИНОМАТОЗА ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Шельгин Ю.А., Образцов И.В., Сухина М.А.,
Ачкасов С.И., Кашников В.Н., Сушков О.И., Сайфутдинова К.Р.

ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» МЗ РФ, г. Москва, Россия
(директор – чл.-корр. РАН, профессор, д.м.н. Ю.А.Шельгин)

ЦЕЛЬ: апробация метода выделения свободных интраперитонеальных клеток колоректального рака (КРР) для их фенотипирования и оценки эффективности внутрибрюшной гипертермической химиотерапии (ВБГХТ) митомцином С.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ: обследовано 27 пациентов с КРР; у 10 пациентов перитонеальный лаваж выполнен перед и после ВБГХТ. Лаважную жидкость подвергали многостадийной процедуре очистки от фибрина; сконцентрированные клетки окрашивали антителами CD133 VioBright-FITC, CD24 PE, CD26 ECD, CD184 PC5 и CD44 PC7 и выполняли проточную цитометрию.

РЕЗУЛЬТАТЫ: выявлено повышение экспрессии CD133 ($p<0,001$) и CD184 ($p<0,05$) в группе больных с опухолями ободочной кишки. Вовлечение брыжеечных лимфоузлов характеризовалось увеличением экспрессии CD26 ($p<0,05$). Соотношение экспрессии CD44 / CD26 ($p<0,05$) было повышено у пациентов с карциноматозом брюшины. Под действием ВБХТ падает экспрессия CD24 у опухолевых стволовых клетках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: предложенный способ выделения и оценки свободных перитонеальных клеток КРР пригоден для применения в клинической практике, в частности, для оценки эффективности ВБГХТ. Показано подавляющее действие ВБГХТ на раковые стволовые клетки.

[Ключевые слова: перитонеальный карциноматоз, опухолевые стволовые клетки, внутрибрюшинная химиотерапия, фибрин, трипсин]

IMMUNE PHENOTYPING OF FREE TUMOUR CELLS FOR EARLY DIAGNOSIS OF PERITONEAL CARCINOMATOSIS IN COLORECTAL CANCER

Shelygin Yu.A., Obraztsov I.V., Sukhina M.A., Achkasov S.I., Kashnikov V.N., Sushkov O.I., Sayfutdinova K.R.
State Scientific Centre for Coloproctology, Moscow, Russia

AIM: to test a method of free intraperitoneal colorectal cancer (CRC) cells isolation for the immunophenotyping and evaluation of mitomycin C hyperthermic intraabdominal chemotherapy (HICT)

PATIENTS AND METHODS: twenty-seven patients with CRC were included in the study. Peritoneal lavage prior and after HICT was performed for 10 of them. We defibrinated lavage fluid and stained concentrated tumour cells with monoclonal antibodies CD133 Vio Bright – FITC, CD24 PE, CD26 ECD, CD184 PC5 and CD44 PC7. FACS analysis was done after staining.

RESULTS: patients with colon cancers had the increased expression of CD133 ($p<0,001$) and CD184 ($p<0,05$). Mesenteric lymph nodes involvement was followed by an increase of CD26 expression ($p<0,05$) in CD133+ cancer cells. The ratio of CD44/CD26 expression was increased in patients with peritoneal carcinomatosis ($p<0,05$). HICT lowers CD24 expression on CD133+ cancer stem cells.

CONCLUSION: the method proposed for free peritoneal CRC cells identification and phenotyping can be used in clinical practice, particularly for evaluating the HICT efficacy. Suppressive effect of HICT on cancer stem cells is detected.

[Key words: peritoneal carcinomatosis, cancer stem cells, intraperitoneal chemotherapy, fibrin, trypsin]

Адрес для переписки: Образцов И.В., ФГБУ «ГНЦК им. А.Н.Рыжих» Минздрава России, ул. Саляма Адила, д.2, Москва, 123423;
e-mail: info@gnck.ru

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) представляет собой злокачественное новообразование, развивающееся из эпителия толстой кишки. Заболеваемость и смертность от КРР чрезвычайно высока: в мире ежегодно регистрируется до 1,4 миллиона новых случаев КРР и до 700 000 смертей. Кроме того, среди злокачественных новообразований КРР занимает третье место по

частоте встречаемости и второе место по смертности [1]. Одним из часто встречающихся проявлений КРР, значительно ухудшающим прогноз пациентов, является перитонеальный карциноматоз (ПК). ПК развивается у 55% больных КРР группы высокого риска (первичный КРР, осложнённый перфорацией, кровотечением, кишечной непроходимостью и т.п.), при этом медиана выживаемости при развитии ПК составляет 5-13 месяцев [2]. На сегодняшний день

разработан ряд лечебных мероприятий, позволяющих увеличить продолжительность жизни при ПК, которые включают различные циторедуктивные операции, а также внутрибрюшную гипертермическую химиотерапию (ВБГХТ). Использование этих подходов способствует увеличению медианы выживаемости до 22-63 месяцев, показатель 5-летней выживаемости при этом составляет 50% [2]. Эффективность этих режимов напрямую зависит от того, насколько рано начато лечение, однако в настоящее время в рутинной клинической практике отсутствуют подходы для выявления ПК на доклиническом этапе. Поэтому поиск и разработка таких подходов весьма актуальны для своевременного начала специфического лечения [3].

Развитие ПК связано с интраперитонеальным появлением свободных раковых клеток, которые имплантируются на брюшину и дают начало опухолевым отсевам. Диссеминация свободных раковых клеток может происходить как спонтанно при трансмуральном распространении рака, так и во время хирургических манипуляций при удалении опухоли. На сегодняшний день предложен ряд методологических подходов, направленных на определение свободных клеток КРР. К ним относятся цитологическое исследование лаважной жидкости, ПЦР и иммуноцитохимические методы [4]. Для выполнения цитологического исследования брюшную полость промывают 500-800 мл физиологического раствора, из центрифугата которого затем готовят мазки. Мазки окрашивают по Папаниколау, Гимзе или гематоксилином-эозином. Иммуноцитохимическое исследование включает специфическое окрашивание мечеными антителами к опухолевым антигенам (например, ЕрСАМ, HER-2нец, МUC-1) в различных комбинациях. Цитологические и иммуноцитохимические методы определения свободных клеток КРР весьма чувствительны, но очень низкоспецифичны (менее 35%) [5]. ПЦР-определение свободных интраперитонеальных опухолевых клеток основано на выявлении специфических нуклеотидных последовательностей. В качестве ДНК-мишеней используют различные геномные аномалии опухолевых клеток, в частности мутации *k-Ras* или *p53*, также определяют мРНК ММР-7 [6]. При этом нужно отметить, что, поскольку свободные интраперитонеальные клетки не всегда клональны по отношению к материнской опухоли, молекулярно-генетическое выявление таких клеток имеет ограниченное применение. Кроме того, ПЦР не позволяет отличить клеточное событие от тканевого детрита. Использование метода проточной цитометрии обладает рядом преимуществ по сравнению с ПЦР, цитологией и иммуноцитохимией. Анализ большого количества событий позволяет достоверно определять даже малые клеточные популяции, а одновременное

определение нескольких маркеров даёт возможность тонкого фенотипирования опухолевых клеток. На сегодняшний день описан ряд поверхностных маркеров, позволяющих охарактеризовать клетки КРР. CD133 (проминин 1) относится к антигенам стволовых клеток мезенхимального роста, при этом плотность его экспрессии обратно пропорциональна степени дифференцировки. Таким образом, высокая экспрессия CD133 характерна для раковых стволовых клеток [7,8]. CD24 является мембранным гликопротеидом, способным активировать ERK/MAPK каскады, а также запускать эпителиально-мезенхимальный переход клеток КРР. Повышенная экспрессия CD24 определяется в опухолях, склонных к формированию лимфогенных и отдалённых метастазов [9,10]. CD26, известный как дипептидил-пептидаза IV, также относится к показателям злокачественности КРР: увеличение его экспрессии ассоциировано с развитием метастазов, химиорезистентности, а также со значительным снижением выживаемости [11]. Экспрессия CD184, или хемокинового рецептора CXCR4, характерна для многих раков. Активация этого рецептора способствует эпителиально-мезенхимальному переходу, пролиферации и миграции опухолевых клеток [12,13]. CD44 – поверхностный гликопротеин, ответственный за межклеточные взаимодействия, адгезию и миграцию. В частности, CD44 высоко экспрессируется клетками КРР, дающего ранние метастазы в печень [14,15]. Сочетанное определение упомянутых опухолевых антигенов позволяет оценить функциональный потенциал свободных интраперитонеальных опухолевых клеток для дальнейшего прогнозирования риска развития карциноматоза брюшины.

ЦЕЛЬ

Целью работы стала апробация метода концентрации свободных интраперитонеальных клеток КРР с последующим цитометрическим анализом для функциональной характеристики интраперитонеальных опухолевых клеток у пациентов с КРР Т3-Т4, а также определение воздействия ВБГХТ на функциональный потенциал этих клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 27 пациентов с КРР (14 мужчин и 13 женщин, средний возраст – 60 лет). Опухоли были локализованы в верхнеампулярном отделе прямой или в сигмовидной кишке в 15 случаях, в слепой, восходящей, поперечной или нисходящей ободочной кишке – в 12. Глубина инвазии Т3 наблюдалась в 8 случаях, Т4а – в 7 и Т4б – в 8 случаях. Диаметр уда-

лѐнной первичной опухоли составил 42,6-61 мм. В 6 случаях наблюдался перитонеальный карциноматоз, в 9 случаях отмечено наличие отдалѐнных метастазов. После лапаротомии брюшная полость пациентов промывалась 500-800 мл 5% раствора глюкозы, смыв аспирировали и доставляли в лабораторию. У 10 пациентов перитонеальный лаваж выполнен дважды: перед и после ВБГХТ митомицином С. Лаважную жидкость центрифугировали и удаляли надосадочную жидкость вместе с макроскопическими фибриновыми тяжами и сгустками. Все центрифугирования выполняли при 400G 10 минут. Осадок ресуспендировали в 10 мл 0,9% NaCl с добавлением 5% коровьей сыворотки. Полученную суспензию вновь центрифугировали и удаляли надосадочную жидкость. В осадок вносили 10 мл 0,9% NaCl с добавлением 5% коровьей сыворотки и 1,5% NaHCO₃ (pH=8,0). Полученную суспензию инкубировали 1 час при 39°C на водяной бане. По прошествии времени инкубации суспензию центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли и вносили 3 мл 0,25% раствора трипсина, предварительно разогретого до 39°C. Трипсинизацию выполняли в течение 20 минут, затем повторно центрифугировали и насухо удаляли надосадочную жидкость. Остаточные эритроциты лизировали раствором PharmLyse (BD, США) по инструкции производителя. После лизиса пробу центрифугировали, отбирали надосадочную жидкость, вносили физиологический раствор с 5% коровьей сывороткой до 100 мкл.

Пробы окрашивали моноклональными антителами: CD133 VioBright-FITC (Milteniy, США), CD24 PE, CD26 ECD, CD184 PC5 и CD44 PC7 (BD, США) в соответствии с инструкцией производителя. После окрашивания проводили цитометрию (FC500, Beckman Coulter), гейтирование показано на рисунке 1. Определяли среднюю интенсивность флуоресценции указанных маркеров на CD133+ клетках. Статистическая обработка результатов включала построение дескриптивных статистик (медиана, интерквартильный размах), значимость различий оценивали на основании U-критерия Манна-Уитни; корреляции исследовали с помощью коэффициента Пирсона (η).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровень экспрессии поверхностного CD133 у пациентов с опухолями прямой и сигмовидной кишки составил 7,24-12,8 ед. флуор., что достоверно ($p < 0,001$) выше экспрессии маркера у пациентов с локализацией процесса в слепой, восходящей, поперечной или нисходящей ободочной кишке (2,71-4,22 ед. флуор.) (Рис. 2А). Экспрессия CD184 также была повышена в группе больных с опухолями прямой и сигмовидной кишки и составляла 1,46-5,54 ед. флуор. по сравнению с 0,67-1,54 для слепой и ободочной кишки ($p < 0,05$) (Рис. 2Б). Подтвержденное вовлечение мезентериальных лимфоузлов (N2) спрово-

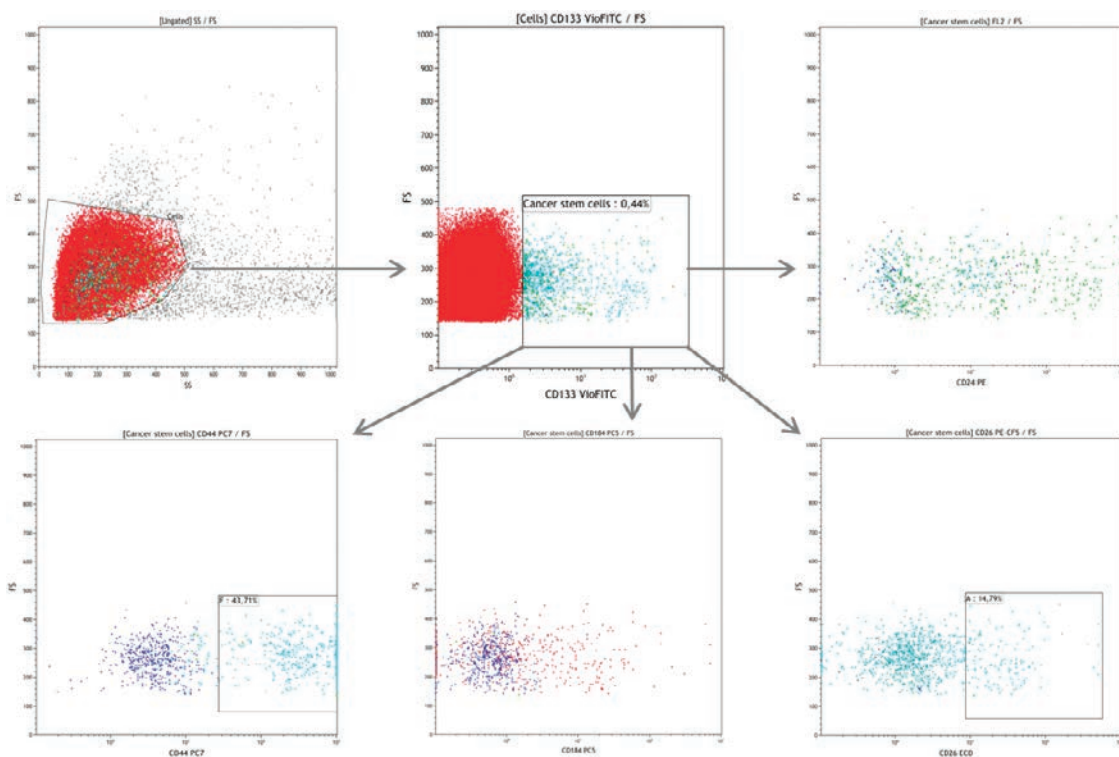


Рисунок 1. Стратегия гейтирования

ждалось увеличением уровня экспрессии CD26 на CD133-позитивных свободных опухолевых клетках до 9,97-20,85 ед. флуор. по сравнению с 3,54-7,47 ед. флуор. в группе N0 ($p < 0,05$) (Рис. 3А). У пациентов с ПК определялось повышение экспрессии CD44 и снижение CD26. Так, уровень экспрессии CD26 в группах с карциноматозом и без составил, соответственно, 3,77-7,5 и 8,93-15,68 ед. флуор., уровень экспрессии CD44 – 14,8-56,2 и 8,33-17,0 ед. флуор. Определяли соотношение интенсивности экспрессии CD44 / CD26: в группе больных с карциноматозом этот показатель составил 3,87-10,8 ед. по сравнению с 0,635-1,53 у пациентов без поражения брюшины, $p < 0,05$ (Рис. 3Б). В группе пациентов с отдалёнными метастазами CD44 / CD26 соотношение также было повышено и составило 0,975-5,64 ед. по сравнению с 0,648-1,57 для пациентов с раками без отдалённых метастазов.

Корреляционный анализ выявил обратную взаимосвязь умеренной силы между размером опухоли и уровнем экспрессии CD24, CD184 и CD44 (η Пирсона составляет -0,489, -0,422 и -0,457, соответственно, $p < 0,05$). Кроме того, показана координация между уровнями экспрессии всех обследованных опухолевых маркеров, кроме CD44; определяется сильная сопряжённость между экспрессией CD184 с одной стороны и CD133 и CD26, с другой (η Пирсона 0,772 и 0,712, соответственно, $p < 0,01$) (Рис. 4).

При исследовании воздействия ВБГХТ на экспрессию поверхностных антигенов свободных внутрибрюшных опухолевых клеток показан разнонаправленный эффект. Доля CD133 – положительных раковых клеток перед ВБГХТ составляла 0,32-13,6% (25,2% максималь-

но). После ВБГХТ содержание этих клеток находилось в диапазоне 0,5-1,82%; наблюдалось снижение доли CD133+ событий на 44,2-92,8%. В двух случаях из обследованных 10 отмечен рост содержания CD133+ клеток на 5,7 и 170,6%. ВБГХТ воздействовала также и на уровень экспрессии CD133 свободными раковыми клетками. Инициальный уровень экспрессии маркера составлял 4,03-12,8 ед. флуор., после выполнения терапии – 4,38-7,88 ед. флуор. ВБГХТ способствовала снижению экспрессии CD133 на 11,0-52,0% в 8 случаях; 2 случая характеризовались ростом экспрессии CD133 на 11,0 и 166,1%. Уровень экспрессии CD24 также снижался под воздействием ВБГХТ: до проведения значение показателя варьировало в пределах 3,83-15,3 ед. флуор., после терапии – 2,49-4,91 ед. флуор. ($p < 0,05$, Рис. 5).

Потеря экспрессии CD24 раковыми стволовыми клетками на фоне ВБГХТ наблюдалась в 9 случаях и составила 27,8-77,7%; в одном случае уровень экспрессии CD24 вырос на 16,8%. CD26 и CD184 раковых стволовых клеток неоднозначно реагируют на митомицин С. Начальный уровень экспрессии CD26 составлял 4,8-24,4 ед. флуор., а после проведения терапии лежал в пределах 4,96-12,2 ед. флуор. Падение экспрессии CD26 в ответ на лечение наблюдалось у 6 человек и составило 13,6-76,1%; рост на 87,7-147,5% был выявлен в 4 случаях. Экспрессия CD184 крайне гетерогенно изменялась под действием ВБГХТ: инициально показатель находился в диапазоне 1,56-4,43 ед. флуор., после лечения в общей группе пациентов не менялся и составлял 1,99-3,83 ед. флуор. При этом у 6 пациентов значение показателя увеличивалось на 14,5-322,0%, а у 4 больных падало на 35,6-76,4%.

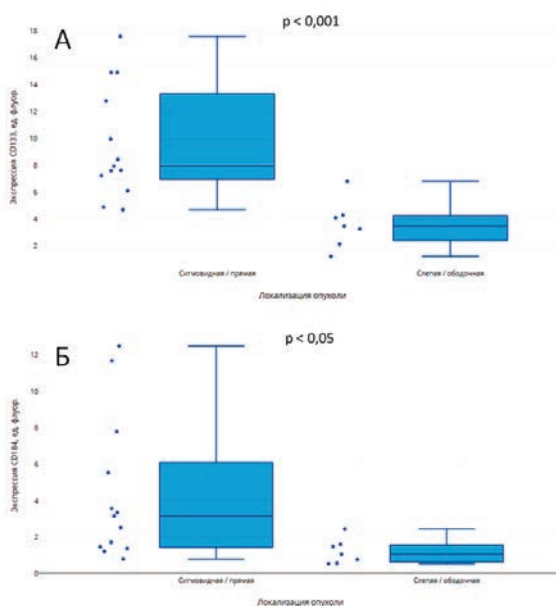


Рисунок 2. Экспрессия опухолевых антигенов при различной локализации КРР. А – CD133. Б – CD184

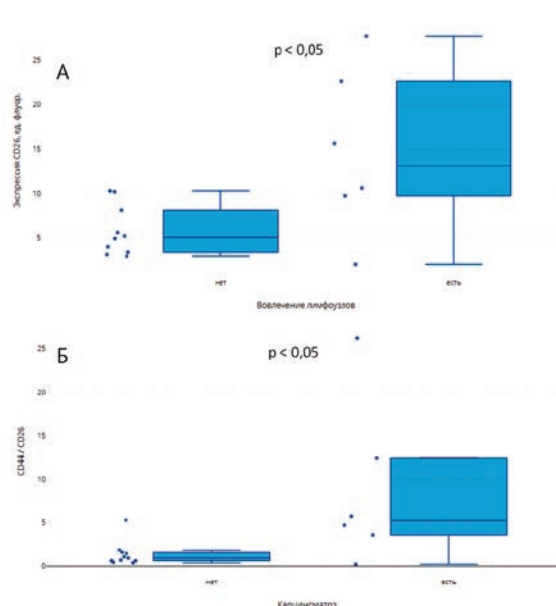


Рисунок 3. Экспрессия опухолевых антигенов при различной распространённости КРР

ВБГХТ также не влияла на экспрессию CD44: перед процедурой уровень экспрессии маркера составлял 5,56-19,79 ед. флуор., после – 5,66-11,12 ед. флуор. У 8 пациентов наблюдалось падение показателя на 20,2-68,6%; у двух – рост на 13,2 и 144,2%. Показатель CD44 / CD26 соотношения перед ВБГХТ составлял 0,64-1,44; после – 0,63-0,87. Воздействие ВБГХТ на CD44 / CD26 соотношение неоднородно: у трёх пациентов с исходным показателем CD44 / CD26 соотношения выше 1 зафиксировано снижение показателя на 47-59%; у остальных больных выполнение процедуры приводило к увеличению показателя на 0-31%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Предложенный в работе метод концентрации и очищения опухолевых эксфолиантов перитонеальной лаважа пригоден для клинического применения с целью оценки рисков развития перитонеального карциноматоза. Сложная многостадийная пробоподготовка призвана решить проблему значительного количества фибрина в лаважной жидкости, делающего невозможным проведение цитометрического анализа напрямую. Высокую концентрацию фибрина следует ожидать при наличии перифокального воспаления, встречающегося у 76% пациентов с местнораспространённым КРР [16]. Предлагаемый в работе метод трипсинизации, основанный на принципе, изложенном Vernon Н.М. [17], позволяет лизировать микросгустки фибрина, связывающие антитела и вызывающие появление неспецифического сигнала при анализе. Исследование свободных интраперитонеальных опухолевых клеток методом проточной цитометрии даёт

возможность оценить степень их злокачественности прямым количественным образом на основе анализа статистически релевантного количества событий, что невозможно при работе цитологическими, иммуноцитохимическими и ПЦР методами. Предлагаемая панель позволяет выделить стволовые клетки опухоли на основании экспрессии CD133, причём наиболее ярко окрашиваемые клетки являются менее дифференцированными. Поэтому следует отметить, что эксфолианты опухолей, локализованных в прямой и сигмовидной кишке, являются менее дифференцированными по сравнению с клетками опухолей вышележащих отделов. Кроме того, свободные клетки опухолей прямой и сигмовидной кишки интенсивнее экспрессируют CXCR4, что свидетельствует о более высокой склонности к эпителиально-мезенхимальному переходу и метастазированию. Таким образом, можно заключить, что раки прямой и сигмовидной кишки характеризуются более высокой степенью злокачественности и риском развития перитонеального карциноматоза. Выявленное увеличение экспрессии дипептидил-пептидазы 4 (CD26) на свободных раковых стволовых клетках у пациентов с лимфогенными метастазами согласуется с литературными данными [18,19] о более высоком риске метастазирования опухолей, экспрессирующих эту молекулу. Таким образом, высокую экспрессию CD26 также следует отнести к неблагоприятным прогностическим факторам КРР, ассоциированным с развитием гематогенных и лимфогенных метастазов. При этом CD26, напротив, препятствует контактному метастазированию, в особенности, при отсутствии экспрессии CD44, что подтверждается результатами анализа CD44 / CD26 соотношения у пациентов с карциноматозом брюшины. Поскольку CD44 является регуляторной молекулой для раковой стволовой клетки, активизирующей её метаболизм, деление, дифференцировку и выживание [20], высокие показатели CD44 / CD26 соотношения в настоящем исследовании оказались ассоциированы как с перитонеальным, так и с гематогенным метастазированием. Особенную роль CD44 в регуляции подтверждают также результаты корреляционного анализа. Координация между экспрессией CD133, CD24, CD26 и CD184 характерна для мезенхимального

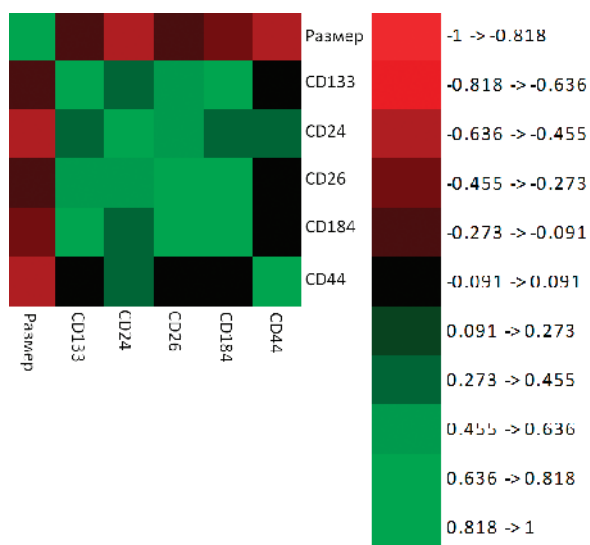


Рисунок 4. Сопряжённость фенотипических показателей и размера опухоли, на основе коэффициента корреляции Пирсона

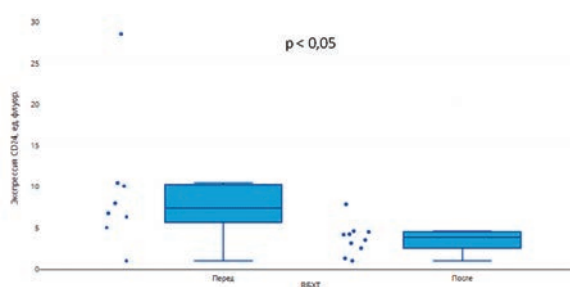


Рисунок 5. Влияние ВБГХТ на экспрессию CD24

фенотипа опухоли и обусловлена накоплением мутаций, приводящих к де-дифференцировке и усилению злокачественного потенциала. Отрицательная взаимосвязь между размером опухоли и экспрессией опухолевых антигенов может свидетельствовать о положительном прогностическом значении размера опухоли при колоректальном раке, однако этот факт требует дальнейшего изучения.

Согласно полученным данным по 10 пациентам, ВБГХТ в большинстве случаев способствует снижению содержания свободных интраперитонеальных CD133+ клеток. Стволовые клетки в свободном состоянии весьма чувствительны к воздействию повреждающих агентов, поэтому при использовании химиопрепаратов в первую очередь наступает гибель наиболее низкодифференцированных клеток, высоко экспрессирующих CD133. Поэтому проведение ВБГХТ оказалось связано также и со снижением уровня экспрессии этого маркера в общей популяции CD133+ событий. Достоверное падение интенсивности экспрессии CD24, а также снижение CD26, под действием ВБГХТ свидетельствует о подавлении функциональной активности опухолевых клеток в результате лече-

ния. При этом неоднородный ответ по экспрессии CD44 и CD184 говорит о гетерогенности обследованной группы пациентов, что делает необходимым дальнейшее расширение обследуемой совокупности.

ВЫВОДЫ

Отработан и апробирован способ выделения малой популяции свободных опухолевых клеток из перитонеальной лаважной жидкости. Методика выделения позволяет проводить дальнейшую работу с изолированными клетками КРР: определение экспрессии различных поверхностных и внутриклеточных маркеров, выделение нуклеиновых кислот с последующим молекулярно-генетическим исследованием, культивирование. Предложенная панель позволяет эффективно фенотипировать стволовые клетки КРР для оценки их функциональной активности, а также эффективности ВБГХТ. На обследованной группе больных показано угнетение свободных внутрибрюшинных клеток КРР под действием ВБГХТ, проявляющееся в потере экспрессии CD24.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rathore, R. Colorectal Cancer. / R.Rathore //In: Ferri's Clinical Advisor. New York: Elsevier. – 2018 – p. 314-316.e1.
2. Klaver, C.E. Recommendations and consensus on the treatment of peritoneal metastases of colorectal origin: a systematic review of national and international guidelines. / C.E.Klaver, H.Groenen, D.G.Morton et al.// Colorectal Dis. – 2017 Mar. – №19 (3). – p. 224-236.
3. Gelli, M. Strategies to prevent peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer. / M.Gelli, J.F.Huguenin, C.Cerebelli et al. // Future Oncol. – 2017 Apr. – №13 (10). – p. 907-918.
4. Sibio, S. Detection methods and clinical significance of free peritoneal tumor cells found during colorectal cancer surgery. / S.Sibio, C.Fiorani, C.Stolfi et al. // World J. Gastrointest. Surg. – 2015 Sep. 27. – №7 (9). – p. 178-84.
5. Passot, G. Intra-operative peritoneal lavage for colorectal cancer. / G.Passot, K.Mohkam, E.Cotte et al. // World J. Gastroenterol. – 2014. – №20. – p. 1935-1939.
6. Tsouma, A. Circulating tumor cells in colorectal cancer: detection methods and clinical significance. / A.Tsouma, C.Aggeli, N.Pissimissis et al. // Anticancer Res. – 2008. – №28. – p. 3945-3960.
7. Szaryńska, M. Cancer stem cells as targets for DC-based immunotherapy of colorectal cancer. / M.Szaryńska, A.Olejniczak, J.Kobiela et al. // Sci. Rep. – 2018 Aug 13. – №8 (1). – p. 12042.
8. Rosiq, S. Colonic Stem Cells Expression of Lgr5 and CD133 Proteins as Predictive Markers in Colorectal Cancer among Egyptian Patients. / S.Rosiq, O.Hammam, A.Abdelalim et al. // Open Access Maced. J. Med. Sci. – 2018 Jun 7. – №6 (6). – p. 968-974.
9. Xi, J. Suppression of GRP78 sensitizes human colorectal cancer cells to oxaliplatin by downregulation of CD24. / J.Xi, Y.Chen, S.Huang et al. // Oncol. Lett. – 2018 Jun. – №15 (6). – p. 9861-9867.
10. Wang, X. CD24 promoted cancer cell angiogenesis via Hsp90-mediated STAT3/VEGF signaling pathway in colorectal cancer. / X.Wang, Y.Zhang, Y.Zhao et al. // Oncotarget. – 2016 Aug 23. – №7 (34). – p. 55663-55676.
11. Larrinaga, G. Dipeptidyl-peptidase IV activity is correlated with colorectal cancer prognosis. / G.Larrinaga, I.Perez, B.Sanz et al. // PLoS One. – 2015 Mar 19. – №10 (3). – e0119436.
12. Amara, S. Stromal cell derived factor-1 and CXCR4 expression in colorectal cancer promote liver metastasis. / S.Amara, I.Chaar, M.Khiari et al. // Cancer Biomark. – 2015. – №15 (6). – p. 869-79.
13. Jin, J. CXCR3 expression in colorectal cancer cells enhanced invasion through preventing CXCR4 internalization. / J.Jin, Z.Zhang, H.Wang et al.// Exp. Cell Res. – 2018 Aug 7. – pii: S0014-4827(18)30657-8.
14. Mohamed, S.Y. The Prognostic Value of Cancer

- Stem Cell Markers (Notch1, ALDH1, and CD44) in Primary Colorectal Carcinoma. / S.Y.Mohamed, R.M.Kaf M.M.Ahmed et al. // *J. Gastrointest. Cancer.* – 2018 Aug 23. – doi: 10.1007/s12029-018-0156-6.
15. Jing, F. Colon cancer stem cell markers CD44 and CD133 in patients with colorectal cancer and synchronous hepatic metastases. / F.Jing, H.J.Kim, C.H.Kim et al. // *Int. J. Oncol.* – 2015 Apr. – №46 (4). – p. 1582-8.
16. Сушков, О.И. Перитонеальный карциноматоз при раке толстой кишки. подходы к лечению (обзор литературы). / О.И.Сушков, С.И.Ачкасов // *Колопроктология.* – 2016. – №4 (58). – с. 69-79.
17. Vernon, H.M. The conditions of action of «trypsin» on fibrin *J Physiol.* / H.M.Vernon // 1901. – Jun 14. – №26 (6). – p. 405-426.
18. Lam, C.S. Prognostic significance of CD26 in patients with colorectal cancer. / C.S.Lam, A.H.Cheung, S.K.Wong et al. // *PLoS One.* – 2014 May 28. – №9 (5). – e98582.
19. Pang, R. A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. / R.Pang, W.L.Law, A.C.Chu et al. // *Cell Stem. Cell.* – 2010 Jun 4. – №6 (6). – p. 603-15.
20. Yanm Y. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells. / Yan Y., Zuo X., Wei D. // *A Promising Biomarker and Therapeutic Target Stem Cells Transl Med.* – 2015 Sep. – №4 (9). – p. 1033-43.

REFERENCES

1. Rathore R. Colorectal Cancer. In: *Ferri's Clinical Advisor. New York: Elsevier.* 2018; p. 314-316.e1.
2. Klaver CE, Groenen H, Morton DG et al. Recommendations and consensus on the treatment of peritoneal metastases of colorectal origin: a systematic review of national and international guidelines. *Colorectal Dis.* 2017 Mar;19(3):224-236.
3. Gelli M, Huguenin JF, Cerebelli C et al. Strategies to prevent peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer. *Future Oncol.* 2017 Apr;13(10):907-918.
4. Sibio S, Fiorani C, Stolfi C et al. Detection methods and clinical significance of free peritoneal tumor cells found during colorectal cancer surgery. *World J Gastrointest Surg.* 2015 Sep. 27;7(9):178-84.
5. Passot G, Mohkam K, Cotte E et al. Intra-operative peritoneal lavage for colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20:1935-1939.
6. Tsouma A, Aggeli C, Pissimissis N et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer: detection methods and clinical significance. *Anticancer Res.* 2008;28:3945-3960.
7. Szaryńska M, Olejniczak A, Kobiela J et al. Cancer stem cells as targets for DC-based immunotherapy of colorectal cancer. *Sci. Rep.* 2018 Aug 13;8(1):12042.
8. Rosiq S, Hammam O, Abdelalim A et al. Colonic Stem Cells Expression of Lgr5 and CD133 Proteins as Predictive Markers in Colorectal Cancer among Egyptian Patients. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018 Jun 7;6(6):968-974.
9. Xi J, Chen Y, Huang S et al. Suppression of GRP78 sensitizes human colorectal cancer cells to oxaliplatin by downregulation of CD24. *Oncol Lett.* 2018 Jun;15(6):9861-9867.
10. Wang X, Zhang Y, Zhao Y et al. CD24 promoted cancer cell angiogenesis via Hsp90-mediated STAT3/VEGF signaling pathway in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016 Aug 23;7(34):55663-55676.
11. Larrinaga G, Perez I, Sanz B et al. Dipeptidyl-peptidase IV activity is correlated with colorectal cancer prognosis. *PLoS One.* 2015 Mar 19;10(3):e0119436.
12. Amara S., Chaar I., Khiari M et al. Stromal cell derived factor-1 and CXCR4 expression in colorectal cancer promote liver metastasis. *Cancer Biomark.* 2015;15(6):869-79.
13. Jin J, Zhang Z, Wang H et al. CXCR3 expression in colorectal cancer cells enhanced invasion through preventing CXCR4 internalization. *Exp Cell Res.* 2018 Aug 7; pii: S0014-4827(18)30657-8.
14. Mohamed SY, Kaf RM, Ahmed MM et al. The Prognostic Value of Cancer Stem Cell Markers (Notch1, ALDH1, and CD44) in Primary Colorectal Carcinoma. *J Gastrointest Cancer.* 2018 Aug 23; doi: 10.1007/s12029-018-0156-6.
15. Jing F, Kim HJ, Kim CH et al. Colon cancer stem cell markers CD44 and CD133 in patients with colorectal cancer and synchronous hepatic metastases. *Int J Oncol.* 2015 Apr;6(4):1582-8.
16. Sushkov OI, Achkasov SI. Peritoneal colorectal carcinomatosis. Approaches to treatment (review). *Koloproktologia.* 2016; no. 4 (58), p. 69-79. (in Russ.)
17. Vernon HM. The conditions of action of «trypsin» on fibrin. *J Physiol.* 1901 Jun 14; no. 26 (6), p. 405-426.
18. Lam CS, Cheung AH, Wong SK et al. Prognostic significance of CD26 in patients with colorectal cancer. *PLoS One.* 2014 May 28;9(5):e98582.
19. Pang R, Law WL, Chu AC et al. A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell.* 2010 Jun 4;6(6):603-15.
20. Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells. *A Promising Biomarker and Therapeutic Target Stem Cells Transl Med.* 2015 Sep;4(9):1033-43.