

BÖLÜM 4

KOLOREKTAL KANSER KÖK HÜCRE İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE KÜLTÜRÜ

Dr. Öğrt. Üyesi Şeyda BERK¹

¹ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Sivas, Türkiye. e-posta:sberk@cumhuriyet.edu.tr
ORCID ID: 0000-0003-4687-0223

GİRİŞ

Kolorektal kanser (KRK), kanser ölümlerinin üçüncü nedeni olarak bilinir ve dünya çapında en yaygın malignite türleri arasındadır (Inamura, 2018). Bu hastalık için farklı tedavi yöntemleri ile çeşitli cerrahi ve medikal tedaviler uygulanmaktadır (Pellino ve ark., 2018). Kanser tedavisinde hastanın sağ kalımını ve yaşam kalitesini artırmak çok önemlidir ve bu alanda önemli gelişmeler olmuştur. Buna rağmen kansere bağlı ölümlerde sürekli artışlar gözlenmektedir (Yadav ve ark., 2017). Genel olarak, kolon epitel hücrelerinin iç duvarlarında kolorektal kanser erken tespit edildiğinde cerrahi olarak çıkarılabilmektedir. Ancak hasta bu aşamada tedavi edilmezse kanser kemoterapiye bile duyarsız hale gelir ve kanser hücreleri farklı organlarda farklı bölgelere metastaz yapabilmektedir (Gothai ve ark., 2018). Kansere bağlı ölümlerin sadece %10'u birincil tümörlerden kaynaklanmaktadır; çoğu metastatik tümörlerden kaynaklanır. Tümör hücrelerinin metastatik gücünün, kanser kök hücreleri (KKH'ler) olarak bilinen tümör hücrelerinin kök hücre benzeri bir alt popülasyonunun özelliklerine atfedildiğine inanılmaktadır (Moghbeli ve ark., 2014). Kanser kök hücreleri kemoterapötik tedavilere dirençlidir ve tümör hücrelerinde uzun süre uyku halini indükleyebilmektedirler. Katı tümörlerde KKH'lerin tespiti, izolasyonu ve karakterizasyonu, son yıllarda kanser hedefli tedavilerin ayırt edici özellikleridir (Moghbeli ve ark., 2014). Normal ve kanser kök hücreleri arasında kaçınılmaz benzerlikler vardır; bu nedenle, bunları ayırt etmek için spesifik yöntemler veya belirteçler bulmak kanser tedavileri için kritik öneme sahiptir. KKH'lerin tümör nüksü ve kemoterapötik dirençle ilgisi göz önüne alındığında, bu tür hücrelerin tümörlerde tanımlanması, etkili hedefe yönelik tedavi için zorunludur. KKH'leri *in vitro* izole etme ve yayma olasılığı, KKH popülasyonundaki seçici olarak aktive edilmiş sinyal iletim yolları üzerinde daha fazla çalışmaya, onların hayatta kalma stratejilerinin altında yatan mekanizmayı daha iyi anlamak ve anti-tümör tedavisinde yeni yaklaşımlar tanımlamak için olanak sağlayacaktır. Bu bölümde, kolorektal kanser kök hücrelerin tanımlanmasında ve izolasyonunda kullanılan hücre yüzey reseptörleri

ve bazı izolasyon yöntemler ile birlikte izolasyon sonrası kök hücrelerin kültür koşulları açıklanmaktadır.

1. KOLOREKTAL KANSER

1.1. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi

Kolorektal kanser, başladığı yere bağlı olarak kolon kanseri veya rektum kanseri olarak da adlandırılabilir. Kolon kanseri ve rektum kanseri, birçok açıdan ortak özelliklere sahip oldukları için sıklıkla birlikte gruplandırılmaktadır. Kolorektal kanser, dünya çapında en önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasında sayılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından 2021 yılında yapılan araştırmanın sonuçlarına göre, Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2020 yılında dünya genelinde kolorektal kanser vaka sayısı 1931590 olarak belirlenmiştir (Sung ve ark., 2021). Yine bu araştırma sonucuna göre kolon kanseri dünyadaki yeni kanser vakalarının %10,7'sini oluşturmakla birlikte, malign tümörler arasında her iki cinsiyette meme kanseri (%12,5) ve akciğer kanserinden (%12,2) sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Kolorektal kanser, 2020'de meydana gelen 935173 ölümle, akciğer kanserinden (%18,2) sonra dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir ve her iki cinsiyet için toplam kanser ölümlerinin yaklaşık %9,5'ini oluşturmaktadır (Sung ve ark., 2021). Kolorektal kanser (%11,4) erkeklerde insidans açısından akciğer (%15,4) ve prostat (%15,1) kanser türlerinden sonra en sık görülen kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerde akciğer (%21,6) ve karaciğer (%10,5) kanser tiplerinden sonra üçüncü (%9,4) sırada yer almaktadır. Kadınlarda ise kolorektal kanser (%9,9) meme kanserinden (%25,8) sonra en sık tanı konulan kanser türü olmakla birlikte kansere bağlı ölümler arasında ise meme (%15,6) ve akciğerden (%13,8) sonra üçüncü (%9,5) kansere bağlı ölüm nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Sung ve ark., 2021). Beş yıllık sağkalım oranına bakıldığında ise kolorektal kanser (%65,7) için bu oran prostat (%92,9) ve meme (%89,6) gibi önde gelen birçok kanser türünden daha düşük olduğu kaydedilmiştir (Petrelli ve ark., 2017). Ayrıca hastalık kolonda oluştuğunda bu oran %91, rektumda oluştuğunda ise %89 olarak

kaydedilmiştir. Metastaz durumunda ise bu oranlar %14 (kolon) ve %16 (rektum) olarak tespit edilmiştir (Petrelli ve ark., 2017).

1.2. Kolorektal Kanser Etiyolojisi

Kolon kanseri sporadik (%70), ailesel (%20) ve kalıtsal (%10) sendromlar şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Sporadik kolon kanserinin ortalama tanı yaşı genellikle 50 yaş üstüdür ve çoğunlukla çevresel faktörlere bağlı olarak 50 yaş altında görülebilmektedir, geriye kalan %20'lik kısım ise bilinen kalıtsal sendromun yokluğunda ailesel faktörlerden kaynaklanarak ortaya çıkabilmektedir. Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve Lynch sendromu (kalıtsal polip dışı kolorektal kanser-HNPCC) en yaygın kalıtsal KRK sendromları arasındadır (Allen & Sears, 2019; Snyder & Hampel, 2019). Tüm KRK'ın yaklaşık %5'i bu iki kalıtsal sendromla karakterize edilmektedir, ancak seçilmemiş KRK hastalarının %10 ila %15'inin FAP veya HNPCC ile ilgili olmayan yüksek riskli bir mutasyona sahip olması mümkündür (Recio-Boiles & Cagir, 2022).

Kolorektal mukozada hiperplastik ve adenomatöz polip olmak üzere iki ana histolojik tipte polip bulunabilmektedir. Hiperplastik poliplerde başlayan karsinogenez, tırtıklı adenomlar yoluyla gelişir ve mikrosatelit kararsızlığından (MSI) kaynaklandığı öne sürülmüştür (Jass, 2005; Thorstensen ve ark., 2005). Çoğu kolon karsinomu, tübüler (%75), villus (%10) ve tübülovillöz (%15) olmak üzere histolojik olarak üç farklı tipe ayrılan adenomlardan kaynaklanmaktadır. Displazinin derecesi, villusun boyutu ve yapısının artması, malignite riskinin artmasıyla ilişkilidir (Atkin ve ark., 1992; Thiis-Evensen ve ark., 1999). Villöz veya tubulovillöz displazili polipler, kişisel veya ailesel kolorektal kanser ve adenomatöz polipler, rezeksiyondan sonra (5 yıl veya daha uzun) bir tarama aralığı gerektiren senkron ve metakron kolorektal primer kanser için %3 ila %5 artmış riskin göstergesidir. Ülseratif kolit gibi inflamatuvar bağırsak hastalıkları (IBD), kolon kanseri ile yüksek oranda ilişkilidir. Öte yandan Crohn hastalığı, özellikle ileokolik kısımda ise kolon kanseri riskini artırabilir (Recio-Boiles & Cagir, 2022). Abdominal radyasyon (30 Gy'den fazla) aldıktan sonra çocukluk çağında kanserden kurtulanlar kolorektal

kanser için risk altındadır ve 10 veya 35 yaşından sonra tarama önerilmektedir. Diabetes mellitus/insülin direnci, uzun süreli bağışıklığı baskılanmış böbrek nakli ve kontrolsüz akromegali, KRK riskini artıran diğer hastalıklar arasında sayılabilir (Recio-Boiles & Cagir, 2022). Epidemiyolojik çalışma sonucunda çevresel koşullar ve yaşam tarzının KRK ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. Özellikle tütün, alkol ve kırmızı/işlenmiş et tüketimi, obezite, kolesistektomi ve androjen yoksunluğu tedavisi, KRK riskini artırmaktadır. Öte yandan, geniş popülasyon çalışmaları sonucunda diyet (meyve ve sebzeler, balık, lif), sarımsak ve kahve tüketimi, fiziksel aktivite, vitamin takviyeleri (D vitamini, folat, kalsiyum, piridoksin B6, magnezyum) ve ilaçlar [steroid olmayan antienflamatuar ilaçlar (NSAID'ler), aspirin, postmenopozal hormon replasman tedavisi, bifosfonat ve anjiyotensin inhibitörleri ve statinler] KRK için koruyucu faktörler olarak tanımlanmıştır (Recio-Boiles & Cagir, 2022).

1.3. Kolorektal Kanseri Tedavisi

Tedaviye genellikle Modifiye Astler-Coller (MAC) veya Dukes sınıflandırma sistemine göre karar verilir. Aşamalar tercihen Tümör Nodu Metastazı (TNM) sınıflandırması ile belirlenmesi gerekmektedir (Eisenberg ve ark., 1982; Newland ve ark., 1981; Olson ve ark., 1980). International Union Against Cancer (UICC) ve American Joint Committee on Cancer'a (AJCC) göre, TNM sistemi kolorektal kanser için uluslararası klinikopatolojik evreleme sistemi olarak kabul edilmektedir (Tablo 1) (Edge & Compton, 2010; Greene, 2002; Wittekind ve ark., 2002). TNM sistemi, yaygın anatomik hastalığın üç bileşenine dayanmaktadır ve bunlar şu şekildedir: Primer tümörün lokal yaygınlığı için T, bölgesel lenf nodu metastazlarının kapsamı için N ve diğer organlara metastazların yokluğu veya varlığı için M (Edge & Compton, 2010). TNM sınıflandırma sistemi, klinik (tedavi öncesi) ve patolojik (ameliyat sonrası histopatolojik) sınıflandırmayı içermektedir ve bu iki sınıflandırma farklı araştırma yöntemlerine dayandığından ve farklı amaçlara hizmet ettiğinden, ikisini birbirinden ayırmak gerekmektedir (Sobin ve ark., 2011). Evre I, Dukes A veya MAC A veya B1 ile aynıdır ve tümör bağırsak duvarı ile sınırlıdır (mukoza,

muskularis mukoza, submukoza ve muskularis propria). Evre II, Dukes B veya MAC B2 veya B3 ile aynıdır ve tümör ektramural dokuya yayılmıştır. Aşama III, Dukes' C (MAC C1-C3) ile aynıdır ve bölgesel dükümler içermektedir (Lbianca ve ark., 2010).

Tablo 1: Kolorektal Kanser için AJCC/UICC'nin TNM Evreleme Sistemi (Edge & Compton, 2010)

Primer Tümör (T)	Bölgesel Lenf Nodu (N)	Uzak Metastaz (M)
TX: Primer tümör değerlendirilemez	NX Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez	M0 Uzak metastaz yok
T0: Primer tümör kanıtı yok Tis Carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelyal veya lamina propria invazyonu	N0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok	M1 Uzak metastaz
T1: Tümör submukozayı istila eder	N1 1-3 bölgesel lenf nodlarında metastaz	M1a Bir organ veya bölgeyle sınırlı metastaz (örneğin karaciğer, akciğer)
T2: Tümör muskularis propriaya invaze	N1a Bir bölgesel lenf nodlarında metastaz	M1b Peritonun birden fazla organında/bölgesinde metastazlar
T3: Tümör, muskularis propria yoluyla perikolorektal dokulara invaze olur.	N1b 2-3 bölgesel lenf nodlarında metastaz	
T4a: Tümör visseral peritonun yüzeyine nüfuz eder	N1c Bölgesel nodal metastaz olmaksızın subseroza, mezenter veya peritonealize olmayan perikolik veya perirektal dokulardaki tümör birikintileri	
T4b: Tümör, diğer organ veya yapılara doğrudan invaze olmuş veya yapışıktır.	N2 4 veya daha fazla bölgesel lenf nodunda metastaz	
	N2a 4-6 bölgesel lenf nodunda metastaz	
	N2b 7 veya daha fazla bölgesel lenf nodunda metastaz	

Cerrahi rezeksiyon, uygun başarı etkinliği ve optimize edilmiş komorbiditeler ile her yaşta metastatik olmayan kolon kanseri evrelemesi için birincil tedaviyi oluşturmaktadır. Bir polipte (cT0-1) seçilmiş riskli ve erken evre kolon karsinomlarında endoskopik rezeksiyon (ER) uygulanırken, neoadjuvan tedavide kolon kanseri için standart uygulama yerine ileri hastalık cerrahi müdahale uygulanmaktadır. Adjuvan tedavi ise patolojik evreleme ile

öngörülebilir nüks ve ölüm riskini azaltmak için uygulanan sistemik bir tedavi yöntemidir (Sobin ve ark., 2011). Ayrıca evre III hastalarda adjuvan kemoterapi standart olarak uygulanırken evre II'de rolü daha az belirgindir. Metastatik durumda kemoterapi, sağkalımı uzatmak ve yaşam kalitesini iyileştirmek ve sürdürmek için ilk tedavi seçeneğini sunar. Ayrıca oligo-metastatik akciğer ve karaciğer hastalığında perikemoterapi ile birlikte cerrahi küratif bir tedavi yöntemi olabilir. Bu aşamadaki hastalar, oksaliptatin ve 5FU/LV (FOLFOX4 veya FLOX) içeren ikili bir programla tedavi edilir. Bazı durumlarda, çoğunlukla infüzyon programları (DeGramont, AIO rejimleri) veya oral floropirimidinler (kapesitabin veya UFT) ile birlikte FU/LV monoterapisi önerilebilir (Alvarez-Gonzalez ve ark., 2019; Board, 2002; Peters, 2019).

1.4. Kolorektal Kanserde Genomik Kararsızlık

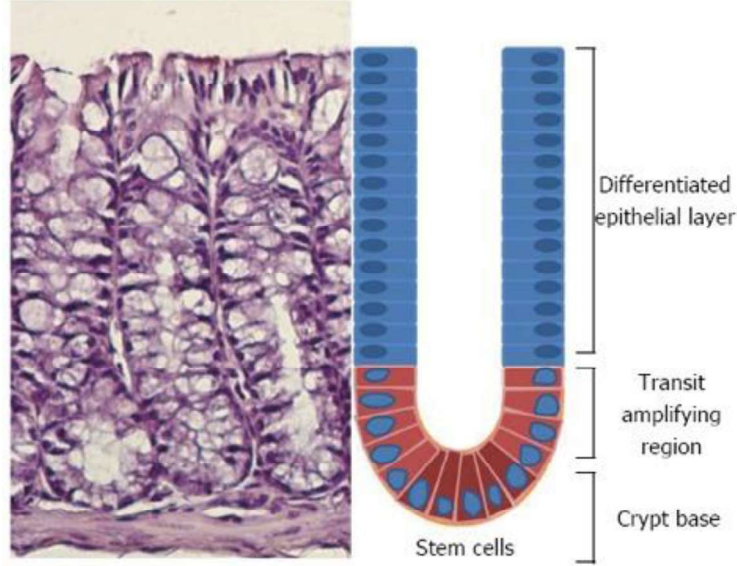
Kanser gelişimi, mutajenik olayların teşviki ile başlayan çok adımlı bir süreçtir. Bu tümör başlangıcını, ek mutajenik olaylar ve epigenetik olaylar takip etmektedir. Bu çoklu mutasyonlar, tümör hücrelerinin proliferasyonunu uyarır ve bu süreç, kanserin ilerlemesinin izlediği tümör gelişimi olarak bilinmektedir. Kolon kanseri, tümör gelişiminin bu farklı aşamalarını keşfetmek için benzersiz bir modeli temsil etmektedir (Scatena ve ark., 2011). Adenom → karsinoma dizi modeli adı verilen bir model ilk olarak Fearon ve Vogelstein tarafından önerilmiştir ve mutasyonların kanser ilerlemesinin farklı aşamalarına bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir (Fearon & Vogelstein, 1990). Bu modele uygun olarak, tümör başlangıcı, adenom oluşumundan ve “displastik kriplerin” gelişiminden sorumlu olan *APC* geni seviyesinde meydana gelen mutasyonlar tarafından tetiklenmektedir. Daha sonra, adenomun artan büyüme hızı ile *K-ras* (v-Ki-ras2 Kirsten sıçan sarkom viral onkogen homologu), *p53* (protein 53) ve *SMAD4* (small mothers against decapentaplegic 4) düzeyindeki ek mutasyonlar, tümör gelişimi ve ilerlemesi sürecinde ortaya çıkmaktadır. Sonunda, tümör invazyonu ve metastaz, bireysel özellikle malign klonların genişlemesiyle meydana gelmektedir (Scatena ve ark., 2011). İnsan kolon hücreleri üzerinde yapılan son çalışmalar, *APC* kaybının bağırsak farklılaşmasına

neden olduğunu göstermiştir. Öte yandan, çoğalma kusurları ve β -katenin nükleer birikimi, *K-ras*'ın ek aktivasyonunu gerektirmektedir (Phelps ve ark., 2009). *APC* mutasyonunun neden olduğu bağırsak farklılaşma kusurlarının etkileri, transkripsiyonel korpresör C-terminal bağlayıcı protein-1'e (*CtBPI*) bağlıdır. Bu nedenle, *CtBPI*, ilk adım olarak kanserin başlamasına katkıda bulunurken, K-ras aktivasyonu ve β -katenin nükleer lokalizasyonu, ikinci adım olarak adenomun karsinomlara ilerlemesini teşvik etmektedir (Phelps ve ark., 2009). Bu nedenle, adenom \rightarrow karsinom dizi modeli, büyüyen genomik kararsızlığın kolon kanseri tümör ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını gösterir. Daha sonraki çalışmalar kolon kanserinde gözlenen mutasyonların genomik kararsızlık, kromozomal kararsızlık ve mikro uydu kararsızlığı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Scatena ve ark., 2011). Kromozomal instabilite kolon kanserlerinin yaklaşık %70'inde gözlenmiştir ve adenom \rightarrow karsinom dizi modelini izleyen gen setindeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (Miyazaki ve ark., 1999). Öte yandan, mikro uydu kararsızlığı kolon kanserlerinin yaklaşık %15'inde gözlendi ve kusurlu DNA uyumsuzluğu onarım genlerinin bir sonucu olarak meydana gelen mikro uydu dizilerinin uzunluğundaki mutasyonlar veya varyasyonlar ile karakterize edildi. DNA uyumsuzluğu onarım genlerindeki kusurların yanı sıra, mikro uydu kararsızlığı, *BAX* (*BCL2* ile ilişkili X proteini), insülin benzeri büyüme faktörü 2 reseptörü (*IGF2R*) ve dönüştürücü büyüme faktörü reseptörü 2'yi (*TGF β R2*) içeren özel bir gen setinin mutasyonlarıyla ilişkilendirilmiştir (Walther ve ark., 2009). Mikro uydu kararsızlığı ile ilişkili kolon kanserleri, kromozomal kararsızlık ile bağlantılı kolon kanserleriyle karşılaştırıldığında daha iyi bir prognoza sahiptir. Bununla birlikte, kromozomal kompozisyonda değişikliklere, mikro uydularda kararsızlıklara veya farklı proliferasyon, istila ve metastaz paternleri ile malign transformasyonu indükleyebilen epigenetik değişikliklere neden olan KRK'nin gelişiminde birçok başka gen yer almaktadır (Conlin ve ark., 2005; Frigola ve ark., 2006; Jass, 2007; Smith ve ark., 2006; Soreide ve ark., 2006).

2. KOLOREKTAL KANSER KÖK HÜCRELERİ (KRK-KH)

Kök hücreler kendilerini uzun süre koruyabilme (kendini yenileme) özelliğine sahiptir ve farklılaşmış tüm hücreleri üretebilirler (multipotens). Kolon epitelinin tüm terminal olarak farklılaşmış hücreleri, multipotent kök hücrelerden türetilmektedir (Barker ve ark., 2008). Kolon çok yapılandırılmış bir organdır. Bağırsak epiteli, bir dizi invaginasyon veya kript oluşturmak için katlanır. Bu kriptler, epitelin kapladığı yüzey alanını artırarak besleyici bileşiklerin etkin bir şekilde adsorpsiyonunu sağlar. Günümüzde, kolon kript hücre değişiminin, her kript tabanında bulunan multipotent kök hücreler tarafından sağlandığı yaygın olarak kabul edilmektedir (Cammarelli ve ark., 2008). Kök hücreler, kolon epitelinin parmak benzeri invaginasyonları olan kriptlerin alt kısmında yer alır (Şekil 1). Asimetrik bir bölünme yoluyla kök hücreler kendi kendini yeniler ve geçişi güçlendiren hücreler üretir (Fanali ve ark., 2014). Kolonda terminal olarak farklılaşmış dört epitel soy vardır ve bunlar kolonositler, goblet hücreleri, enteroendokrin hücreler ve Paneth hücreleridir (Sancho ve ark., 2003) (Şekil 1).

Kök hücre nişlerinin, hücresel bileşenler ve belirli bir mikroçevre oluşturan hücre dışı matris tarafından oluşturulduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Bu özel mikro çevre, kök hücre nişi, kök hücre özelliklerini korumak, kök hücreleri farklılaşan ve apoptotik uyarılardan korumak ve çeşitli sitokinlerin büyüme faktörlerinin etkileşimi ve salgılanması yoluyla doğrudan çoğalma ve farklılaşma arasındaki dengeyi düzenlemek için önemlidir (Moore & Lemischka, 2006). Kök hücrelerin kendini yenilemesi ve farklılaşması ayrıca bağırsak alt epitelyal miyofibroblastları tarafından salgılanan morfogenetik faktörlerin yanı sıra bakteri veya epitel hücrelerinden türetilen kript lümenindeki bileşenlerden de etkilenmektedir (Medema & Vermeulen, 2011).



Şekil 1: Farklı hücre tiplerinin konumunu gösteren tek bir kolon kriptinin şematik gösterimi. Kök hücreler kriptin altında bulunur ve asimetric bir bölünme yoluyla kript-villus eksenini boyunca tüm epitel hücre tiplerinin üretilmesinden sorumludur (Fanali ve ark., 2014).

2.1. Kolorektal Kanser Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Tanımlanması

Kolon kök hücreleri, spesifik belirteçlerin ekspresyonu yoluyla tanımlanabilmektedir. Musashi 1 (Msi-1) proteini, ilk kolon kök hücre belirteci olarak tanımlanmıştır. Msi-1, başlangıçta duyu organı öncü hücrelerinin erken asimetric bölümlerinde önemli bir rol oynadığı *Drosophila*'da tanımlanan bir RNA bağlayıcı proteindir (Nakamura ve ark., 1994). Msi-1, Notch sinyal yolunu pozitif olarak etkileyen mRNA hedefi olan m-Numb'ı bastırmaktadır (Imai ve ark., 2001). Yapılan bir çalışmada, Msi-1 pozitif hücrelerin, çoğalan bölgede, kolon kriptinin daha derin üçte ikisi içinde lokalize olduğu bulunmuştur (Nishimura ve ark., 2003). Bu nedenle, Msi-1, insan kolon epiteli için yararlı bir kök hücre belirteci olabileceği ön görülebilir. Diğer bir çalışmada ise, Wnt hedef geni *Lgr5*'in ifadesinin, farelerin kolon kriptlerinde olduğu kadar ince bağırsakta da daha güçlü bir kök hücre işareti olarak öne sürülmüştür (Barker ve ark., 2007).

Bağlı kolon hücrelerinin hızlı devir hızı, proliferasyon, yaşlanma ve apoptozun düzenlenmesinde kök hücreler tarafından homeostatik bir dengenin korunması gerektiği anlamına gelmektedir. Diğer tüm epitel hücre tipleri kısa ömürlü olduğundan, kolon epitel kök hücrelerinin karsinomaya yol açan bir dizi somatik mutasyona maruz kalma riski taşıyan başlıca hücre tipi olduğu varsayılmaktadır (Cammarelli ve ark., 2008). Kolorektal kanser kök hücreleri (KRK-KH) ve ayrıca diğer tümörler üzerine yapılan araştırma, bu hücrelerin izolasyonu, amplifikasyonu ve bu hücrelerin karakterizasyonu için faydalı hücre zarı yüzey belirteçlerinin tanımlanması ve *in vivo* deneylerin geliştirilmesi ile karakterize edilmiştir. Kolorektal kanser kök hücrelerinin tanımlanması için en yararlı olarak iki membran belirteci seti birleştirilmiştir. Bunlar CD133 (Prominin-1) (Marzesco ve ark., 2005; O'Brien ve ark., 2007; Puglisi ve ark., 2009; Ricci-Vitiani ve ark., 2007) ve CD44 (Nagano & Saya, 2004; Sreaton ve ark., 1992; Sneath & Mangham, 1998) hücre yüzey belirteçleridir. EpCAM, CD166, CD29, CD24 ve Lgr5 dahil olmak üzere KRK kök hücrelerinin diğer potansiyel belirteçleri de tanımlanmıştır (Tablo 6). KRK-KH'ler için biyobelirteçlerin tanımlanması, temel tümör büyümesi ve ilerlemesi mekanizmasını aydınlatılması açısından oldukça önem taşımaktadır (Corbeil ve ark., 2000).

Tablo 2: Kolorektal kanserde varsayılan kanser kök hücre belirteçleri olarak önerilen hücre yüzeyi ve hücre içi moleküller ve en önemli özellikleri (Fanali ve ark., 2014)

Marker	Diğer ismi	Gen Lokasyonu	İşlevi	Referans
EpCAM	ESA, CD326, MK-1, KSA, HEA125, BerEp4, 17-1A, GA733-2, KS1/4, EGP-2, EGP34, TROP-1	Chr 2 (p21)	Epitel hücre yapışma molekülü	(Bauerle & Gires, 2007)
CD29	B1 Integrin	Chr 10 (p11.2)	Hücre dışı matris proteinleri için reseptör; hücre göçü, çoğalma, hayatta kalma, farklılaşma ve ölümün düzenlenmesinde yer alır	(Brizzi ve ark., 2012)

CD24	HSA	Chr 6 (q21)	Müsin benzeri hücre yapışma molekülü	(Kristiansen ve ark., 2004)
CD133	Prominin-1, AC133	Chr 4 (p15.32)	Plazma zarı mikro alanlarını içeren kolesterolü bağlayan bir pentaspan transmembran glikoproteininin kodlanması	(Miraglia ve ark., 1997)
Lgr5	GPR49	Chr 12 (q22-q23)	R-spondin proteinleri için reseptör; yetişkin kök hücreler için işaretleyici	(Van der Flier ve ark., 2007)
CD44	PGP-1, HUTCH-1, GP90, EPICAN, CDW44, MIC4	Chr 11 (p13)	Hücre yapışma molekülü; Lenf düğümü ve lenfosit aktivasyonu ile ilgili	(Screaton ve ark., 1992; Sneath & Mangham, 1998)
CD166	ALCAM	Chr 3 (q13.1)	Hücre yapışma molekülü	(Lehmann ve ark., 1989)

2.2. Kolorektal Kanser Kök Hücre İzolasyon Yöntemleri

Kanser kök hücreleri çeşitli yöntemlerle saptanır ve izole edilir. Seçim yöntemi her zaman tümör tipine özgü yüzey belirteçlerini kullanmıştır ve hem pozitif hem de negatif hücre seçimi için kullanılabilen manyetik veya akış sitometrik hücre sınıflandırmasına dayanmaktadır (Takaishi ve ark., 2009; Tirino ve ark., 2009). Bununla birlikte, mesane geçiş hücresi kanseri gibi bazı kanserler için hiçbir kanser kök hücre belirteci mevcut değildir ve bu da diğer izolasyon yöntemlerinin önemini vurgulamaktadır (Wu & Alman, 2008). Kolorektal kanseri için Tablo 2’de de belirtildiği üzere kök hücre belirteçleri tanımlandığından dolayı genellikle manyetik veya akış sitometrik hücre sınıflandırmasına bağlı olarak izolasyon gerçekleştirilmektedir.

Manyetik-aktive edilmiş hücre ayırma (MACS) teknolojisi, kolon karsinomu dokusunun mekanik ve enzimatik ayrışmasından hemen sonra ya da hücre hatlarının pasajı sonrası, CD133 gibi belirli bir kök hücre belirtecinin ekspresyonuna dayalı hücreleri seçmek için en sık kullanılan tekniklerden biridir (www.miltenyibiotec.com). Bu

teknolojyi kullanarak, ilgili hücreler, pozitif bir seçim stratejisiyle ayrılmaktadır. Optimum performans için, manyetik ayırmadan önce ayrışma yoluyla tek hücreli bir süspansiyon elde etmek oldukça önemlidir. Hedef hücreler, karşılık gelen antijeni eksprese eden yüksek oranda saf hücreleri izole etmek için yüksek düzeyde spesifik bir monoklonal antikör veya kök belirteçleri ile konjuge edilmiş süper paramanyetik MACS MicroBeads ile özel olarak etiketlenir. MACS MicroBeads, ökaryotik bir hücreden hacim olarak yaklaşık bir milyon kat daha küçüktür ve hücreler kültürlendiğinde biyolojik olarak parçalanabilir. Manyetik etiketlemeden sonra hücreler, güçlü bir kalıcı mıknatısa yerleştirilmiş bir ayırma kolonundan geçirilir. Manyetik olarak etiketlenmiş hücreler kolonda tutulur ve içinden geçen etiketlenmemiş hücrelerden ayrılır. Kolonu manyetik alandan çıkardıktan sonra, fraksiyon belirli bir tamponla ayrıştırılabilir. Manyetik ayırmadan sonra hücre canlılığı, tripan mavisi dışlama yöntemi ile değerlendirilir. Pozitif olarak seçilen hücreler, spesifik kök hücre ortamında kültürlenme için veya daha sonraki uygulamalar için hemen kullanılabilir. İzole edilen pozitif hücreler, bir yıldan fazla bir süre boyunca serumsuz ortamda farklılaşmamış tümör küreleri olarak *in vitro* olarak katlanarak büyüyebilmektedirler.

Kök hücreleri izole etmek için alternatif bir yöntem Floresan Etkinleştirilmiş Hücre Sıralama veya FACS akış sitometrik sıralamadır. FACS, süspansiyon halindeki hücreleri yüksek saflık ve geri kazanımlarla iki veya daha fazla kapta ayırabilen bir tür akış sitometrisidir. Farklı emisyon dalga boylarına sahip florokromlar, çok parametreliliğe izin vererek aynı anda kullanılabilir. Doğrudan bir immünofloresan boyamada hücreler, doğrudan fikoeritrin veya floresein izotiyosiyanat gibi florokroma konjuge edilmiş kök hücre belirteç antikoru ile inkübe edilir; dolaylı bir immünofloresan boyamada, etiketlenmemiş antikör, daha sonra bir florokrom konjuge sekonder antikör ile muamele edilen hücrelere doğrudan uygulanır. Etiketli hücreler, akış sitometresinde analiz edilir ve sınıflandırılır. Bu hücreler ayrı ayrı saptanabilir ve elde edilen hücresel havuz, spesifik kök hücre ortamında yetiştirilebilir veya sonraki analizler için kullanılabilir. FACS'in dezavantajları, geri kazanılan hücrelerin düşük

canlılığı, yüksek maliyeti ve karmaşık bir ekipman kullanmanın zorluğudur. MACS, FACS'den daha basit olmasına ve daha az karmaşık ekipman gerektirmesine rağmen, monoparametrik ve aynı anda birden fazla işaretleyici yoluyla hücreleri izole edemez. Ancak MACS-MultiSort tekniği ile ard arda yapılan MACS ile iki farklı kök hücre yüzey belirteci ekspresyon eden hücreleri seçilebilmektedir.

Aldehit dehidrojenaz (ALDH), Aldefluor yöntemi yoluyla akış sitometrisi ile KKH'leri izole etmek için kullanılabilen bir hücre içi belirteçtir. Bu teknik, bazı durumlarda süspansiyonda görüntülemeye daha faydalı olabilen tek katmanlı kültürlerde tek hücreli görüntülemeye izin verir (Almanaa ve ark., 2013). Diğer bir yöntem, Hoechst 33342 boya boyama kullanılarak ABC taşıyıcılarının ekspresyonu ile hücre tarafı popülasyonlarına (SP) dayanmaktadır. Bu yöntemde, SP hücreleri, boyayı ABC taşıyıcıları aracılığıyla dışlar ve zayıf boyanır. Bu tür taşıyıcılar ayrıca kemoterapötik tedavilere direnç gösteren ilaçları da dışlar (Song ve ark., 2010). Akış sitometrisi, Hoechst ile muamele edilen hücrelerde tipik olarak < %2 olan küçük bir çift negatif SP'yi tespit edebilir (Gilbert & Ross, 2009). Her yöntemin avantajları ve dezavantajları vardır. Hiçbir yöntem tek başına kanser kök hücre izolasyonunu garanti edemez, bu da kombinasyonel tekniklerin önemini vurgulamaktadır.

2.3. Kolorektal Kanser Kök Hücre Kültürü

Kolorektal kanser kök hücre izolasyonu sonrasında en önemli karar kanser kök hücrelerin verimli bir şekilde kültürlenme yönteminin ne olacağıdır. Literatürde pek çok çalışma olmakla birlikte kanser kök hücrelerin daha etkili kültür koşullarının geliştirilmesi gerekmektedir. KKH'lerin yakın zamanda bildirilen bir özelliği, ankradan bağımsız koşullar altında serumsuz tanımlanmış bir ortamda (büyüme faktörleriyle desteklenmiş) sınırlı sayıda kaplandığında *in vitro* küresel koloniler oluşturabilmeleridir. Nörosferler (Bar ve ark., 2010), mammosferler (Rappa & Lorico, 2010) ve kolonosferler (Kanwar ve ark., 2010) için bildirildiği gibi, küre oluşturan deneyleri kullanarak büyümlerine ve çalışmalarına izin veren yöntemler artık geliştirilmiştir. Bununla birlikte, kolonosferlerin biyolojisi ve genetiği

hakkında çok az şey bilinmektedir. Sferoid hücrelerin biyolojik karakter özellikleri ayrıca kolon kanseri kemo direnci ve metastazında yer alan mekanizmaları incelemek için iyi bir model sağlamaktadır ve KKH'lerin kolon kanserindeki rolünü daha fazla açıklamaya yardımcı olabilir.

Küre oluşturan kültür ilk olarak Reynold ve Weiss tarafından kök hücreleri izole etmek için kullanılmış ve o zamandan beri yaygın olarak kullanılmaktadır (Reynolds & Weiss, 1992). Bu teknikte hücreler, hücrelerin büyümesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını sınırlayan hücre dışı matrise (ECM) bağlanır. Hücreler ECM'ye tutunamaz ve süspansiyon halinde büyüemezse anoikis yoluyla ölürlür (Frisch & Francis, 1994; Ruoslahti & Reed, 1994). Ancak kök hücrelere benzer özelliklere sahip hücreler ECM'den etkilenmez ve sadece hücre-hücre etkileşimi yoluyla çoğalabilirler. Bu özellikleri kullanarak Reynold ve Weiss, insan beyninden elde edilen kök hücreleri kullanarak nörosfer kültürü adı verilen serbest yüzen bir küre kültürü elde etmişlerdir (Reynolds & Weiss, 1992). Küre oluşturan kültürün en önemli bileşenlerinden biri optimal kültür ortamıdır. Tek katmanlı kültürde kullanılan kültür ortamı genellikle küre oluşturan kültürde kullanılanı farklıdır. Küre oluşturan kültür ortamı serumsuzdur ve epidermal büyüme faktörü (EGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), b27 takviyesi ve diğerleri dahil olmak üzere çeşitli büyüme faktörleri ile desteklenir. Eklenen büyüme faktörlerinin konsantrasyonu, farklı hücre türleri için farklıdır ve her büyüme faktörünün etkisi de farklıdır. Örneğin, EGF sinyali, EGF reseptörleri tarafından aktive edilir ve nörogloma kök hücrelerinde pluripotensi sürdürmede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Soeda ve ark., 2008). FGF'nin, tümör küreleri oluşturmada ve kullanılan belirteçler temelinde ana popülasyondan farklı olan hücrelerin alt popülasyonu olan yan popülasyonu artırmada önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Kondo ve ark., 2004). B27, tümör küreleri oluşturmada ve küre oluşturan hücrelerin özelliklerini korumada rol oynar (Gu ve ark., 2011).

Kolorektal kanser kök hücreleri uygun izolasyon yöntemiyle elde edildikten sonra hücre süspansiyonu, klonal yapışmayan küresel kümeler olarak kapsamlı çoğalmayı teşvik etmek için düşük yapışkan koşullarda "kök hücre ortamı" adı verilen özel ortamda düşük yoğunlukta yetiştirilir. Kök hücre ortamı, fetal bovine serumdan (FBS) yoksundur ve temel fibroblast büyüme faktörü ve epidermal büyüme faktörü (EGF) dahil olmak üzere kök hücre büyümesini destekleyen çeşitli faktörlerle desteklenir. Kök hücre proliferasyonunu indüklediği bilinen hidrokortizon, insülin ve progesteron, temel fibroblast büyüme faktörü ile reseptörü arasındaki ilişkiyi stabilize eden heparinde olduğu gibi ortama eklenebilir. Kolorektal kanser kök hücrelerin bu uygun kök hücre kültür koşullarında birçok çalışmada yetiştirilmiş ve başarılı olmuşlardır (Chen ve ark., 2014; Leng ve ark., 2013; Todaro ve ark., 2007; Weiswald ve ark., 2015)

SONUÇ

Miyeloid lösemi, meme ve beyin tümörlerinde olduğu gibi, tümör oluşumundan ve sürdürülmesinden sorumlu, kök hücre özelliklerine sahip nadir bir hücre popülasyonu, kolon veya kolorektal karsinomunda da karakterize edilmiştir. Kolorektal KKH'lerinin saflaştırılması, kültürü ve çoğaltılması için ana unsurların özeti bu bölümde sunulmuştur. Kısaca, kolorektal kanser kök hücrelerin izolasyonu sonrasında, büyüme faktörleri ve hormonlar, KKH'lerin seçimine ve karakteristik kürelerin oluşumuna izin veren tüm bileşikleri içeren spesifik bir serumsuz ortamda yetiştirilmektedir. Ayrıca, kolorektal KKH'leri CD133 veya diğer belirteçlerin ifadesi yoluyla tanımlanabilir ve MACS ve FACS teknolojileri olmak üzere iki farklı teknikle izole edilebilmektedir. KKH'leri *in vitro* izole etme ve genişletme olasılığı, önemli terapötik etkilere sahiptir. Elde edilen hücreler moleküler düzeyde karakterize edilebilir ve bu bilgi, mevcut olanlardan daha seçici bir şekilde yeni terapötik stratejiler geliştirmek için kullanılabilir. KKH'leri *in vitro* izole etme ve yayma olasılığı, hayatta kalma stratejilerinin altında yatan mekanizmayı daha iyi anlamak ve anti-tümör tedavisinde yeni yaklaşımlar tanımlamak için KKH popülasyonundaki seçici olarak aktive edilmiş sinyal iletim

yollarının daha fazla araştırılmasına izin verecektir. Ayrıca KRK-KH'lerin kanser gelişimindeki etkileri net olarak belirlenmemiş olmakla birlikte kök hücreleri hedef alan yeni yaklaşımlar, metastaz ve nüksün tedavisi için yeni ilaç adayların geliştirilmesine öncülük edebilir.

KAYNAKÇA

- Allen, J., & Sears, C. L. (2019). Impact of the gut microbiome on the genome and epigenome of colon epithelial cells: contributions to colorectal cancer development. *Genome Med*, *11*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0621-2>
- Almanaa, T. N., Geusz, M. E., & Jamasbi, R. J. (2013). A new method for identifying stem-like cells in esophageal cancer cell lines. *J Cancer*, *4*(7), 536-548. <https://doi.org/10.7150/jca.6477>
- Alvarez-Gonzalez, M. A., Pantaleon, M. A., Flores-Le Roux, J. A., Zaffalon, D., Amorós, J., Bessa, X., Seoane, A., & Pedro-Botet, J. (2019). Randomized Clinical Trial: A Normocaloric Low-Fiber Diet the Day Before Colonoscopy Is the Most Effective Approach to Bowel Preparation in Colorectal Cancer Screening Colonoscopy. *Dis Colon Rectum*, *62*(4), 491-497. <https://doi.org/10.1097/dcr.0000000000001305>
- Atkin, W. S., Morson, B. C., & Cuzick, J. (1992). Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med*, *326*(10), 658-662. <https://doi.org/10.1056/nejm.199203053261002>
- Baeuerle, P. A., & Gires, O. (2007). EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer*, *96*(3), 417-423. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603494>
- Bar, E. E., Lin, A., Mahairaki, V., Matsui, W., & Eberhart, C. G. (2010). Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol*, *177*(3), 1491-1502. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091021>
- Barker, N., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev*, *22*(14), 1856-1864. <https://doi.org/10.1101/gad.1674008>
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegerbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., & Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small

- intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, *449*(7165), 1003-1007. <https://doi.org/10.1038/nature06196>
- Board, P. D. Q. A. T. E. (2002). Colon Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. In *PDQ Cancer Information Summaries*. National Cancer Institute (US).
- Brizzi, M. F., Tarone, G., & Defilippi, P. (2012). Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr Opin Cell Biol*, *24*(5), 645-651. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.07.001>
- Cammareri, P., Lombardo, Y., Francipane, M. G., Bonventre, S., Todaro, M., & Stassi, G. (2008). Isolation and culture of colon cancer stem cells. *Methods Cell Biol*, *86*, 311-324. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)00014-9](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)00014-9)
- Chen, X., Wei, B., Han, X., Zheng, Z., Huang, J., Liu, J., Huang, Y., & Wei, H. (2014). LGR5 is required for the maintenance of spheroid-derived colon cancer stem cells. *Int J Mol Med*, *34*(1), 35-42. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1752>
- Conlin, A., Smith, G., Carey, F. A., Wolf, C. R., & Steele, R. J. (2005). The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut*, *54*(9), 1283-1286. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.066514>
- Corbeil, D., Röper, K., Hellwig, A., Tavian, M., Miraglia, S., Watt, S. M., Simmons, P. J., Peault, B., Buck, D. W., & Huttner, W. B. (2000). The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem*, *275*(8), 5512-5520. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5512>
- Edge, S. B., & Compton, C. C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, *17*(6), 1471-1474. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-0985-4>
- Eisenberg, B., Decosse, J. J., Harford, F., & Michalek, J. (1982). Carcinoma of the colon and rectum: the natural history reviewed in 1704 patients. *Cancer*, *49*(6), 1131-1134.

- Fanali, C., Lucchetti, D., Farina, M., Corbi, M., Cufino, V., Cittadini, A., & Sgambato, A. (2014). Cancer stem cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy: controversies and perspectives. *World J Gastroenterol*, 20(4), 923-942. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i4.923>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i)
- Frigola, J., Song, J., Stirzaker, C., Hinshelwood, R. A., Peinado, M. A., & Clark, S. J. (2006). Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet*, 38(5), 540-549. <https://doi.org/10.1038/ng1781>
- Frisch, S. M., & Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 124(4), 619-626. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.4.619>
- Gilbert, C. A., & Ross, A. H. (2009). Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies. *J Cell Biochem*, 108(5), 1031-1038. <https://doi.org/10.1002/jcb.22350>
- Gothai, S., Muniandy, K., Mohd Esa, N., Subbiah, S., & Arulselvan, P. (2018). Anticancer potential of *Alternanthera sessilis* extract on HT-29 human colon cancer cells [Basic Research]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(8), 394-402. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.239427>
- Greene, F. L. (2002). The American Joint Committee on Cancer: updating the strategies in cancer staging. *Bull Am Coll Surg*, 87(7), 13-15.
- Gu, Y., Fu, J., Lo, P.-K., Wang, S., Wang, Q., & Chen, H. (2011). The effect of B27 supplement on promoting in vitro propagation of Her2/neu-transformed mammary tumorspheres.
- Imai, T., Tokunaga, A., Yoshida, T., Hashimoto, M., Mikoshiba, K., Weinmaster, G., Nakafuku, M., & Okano, H. (2001). The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its

- mRNA. *Mol Cell Biol*, 21(12), 3888-3900. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.12.3888-3900.2001>
- Inamura, K. (2018). Colorectal Cancers: An Update on Their Molecular Pathology. *Cancers (Basel)*, 10(1), 26. <https://www.mdpi.com/2072-6694/10/1/26>
- Jass, J. R. (2005). Serrated adenoma of the colorectum and the DNA-methylator phenotype. *Nat Clin Pract Oncol*, 2(8), 398-405. <https://doi.org/10.1038/ncponc0248>
- Jass, J. R. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50(1), 113-130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x>
- Kanwar, S. S., Yu, Y., Nautiyal, J., Patel, B. B., & Majumdar, A. P. (2010). The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer*, 9, 212. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-212>
- Kondo, T., Setoguchi, T., & Taga, T. (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(3), 781-786. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307618100>
- Kristiansen, G., Sammar, M., & Altevogt, P. (2004). Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol*, 35(3), 255-262. <https://doi.org/10.1023/b:hijo.0000032357.16261.c5>
- Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M. A., Prochilo, T., Quadri, A., Gatta, G., de Braud, F., & Wils, J. (2010). Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 74(2), 106-133. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.01.010>
- Lehmann, J. M., Riethmüller, G., & Johnson, J. P. (1989). MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(24), 9891-9895. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.9891>

- Leng, Z., Tao, K., Xia, Q., Tan, J., Yue, Z., Chen, J., Xi, H., Li, J., & Zheng, H. (2013). Krüppel-like factor 4 acts as an oncogene in colon cancer stem cell-enriched spheroid cells. *Plos One*, *8*(2), e56082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056082>
- Marzesco, A. M., Janich, P., Wilsch-Bräuninger, M., Dubreuil, V., Langenfeld, K., Corbeil, D., & Huttner, W. B. (2005). Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci*, *118*(Pt 13), 2849-2858. <https://doi.org/10.1242/jcs.02439>
- Medema, J. P., & Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, *474*(7351), 318-326. <https://doi.org/10.1038/nature10212>
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A. H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J. T., Bray, R. A., Waller, E. K., & Buck, D. W. (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, *90*(12), 5013-5021.
- Miyazaki, M., Furuya, T., Shiraki, A., Sato, T., Oga, A., & Sasaki, K. (1999). The relationship of DNA ploidy to chromosomal instability in primary human colorectal cancers. *Cancer Res*, *59*(20), 5283-5285.
- Moghbeli, M., Moghbeli, F., Forghanifard, M. M., & Abbaszadegan, M. R. (2014). Cancer stem cell detection and isolation. *Medical Oncology*, *31*(9), 69. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0069-6>
- Moore, K. A., & Lemischka, I. R. (2006). Stem cells and their niches. *Science*, *311*(5769), 1880-1885. <https://doi.org/10.1126/science.1110542>
- Nagano, O., & Saya, H. (2004). Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci*, *95*(12), 930-935. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03179.x>
- Nakamura, M., Okano, H., Blendy, J. A., & Montell, C. (1994). Musashi, a neural RNA-binding protein required for *Drosophila*

- adult external sensory organ development. *Neuron*, 13(1), 67-81. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90460-x](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90460-x)
- Newland, R., Chapuis, P., Pheils, M., Chir, M., & Macpherson, J. (1981). The relationship of survival to staging and grading of colorectal carcinoma: a prospective study of 503 cases. *Cancer*, 47(6), 1424-1429.
- Nishimura, S., Wakabayashi, N., Toyoda, K., Kashima, K., & Mitsufuji, S. (2003). Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig Dis Sci*, 48(8), 1523-1529. <https://doi.org/10.1023/a:1024763723240>
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445(7123), 106-110. <https://doi.org/10.1038/nature05372>
- Olson, R., Perencevich, N., Malcolm, A., Chaffey, J., & Wilson, R. (1980). Patterns of recurrence following curative resection of adenocarcinoma of the colon and rectum. *Cancer*, 45(12), 2969-2974.
- Pellino, G., Warren, O., Mills, S., Rasheed, S., Tekkis, P. P., & Kontovounisios, C. (2018). Comparison of Western and Asian Guidelines Concerning the Management of Colon Cancer. *Dis Colon Rectum*, 61(2), 250-259. <https://doi.org/10.1097/dcr.0000000000001012>
- Peters, W. R. (2019). What Every Colorectal Surgeon Should Know About the New American Cancer Society's Colorectal Cancer Screening Guidelines. *Dis Colon Rectum*, 62(4), 397-398. <https://doi.org/10.1097/dcr.0000000000001302>
- Petrelli, F., Tomasello, G., Borgonovo, K., Ghidini, M., Turati, L., Dalleria, P., Passalacqua, R., Sgroi, G., & Barni, S. (2017). Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*, 3(2), 211-219. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.4227>

- Phelps, R. A., Chidester, S., Dehghanizadeh, S., Phelps, J., Sandoval, I. T., Rai, K., Broadbent, T., Sarkar, S., Burt, R. W., & Jones, D. A. (2009). A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell*, *137*(4), 623-634. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.037>
- Puglisi, M. A., Sgambato, A., Saulnier, N., Rafanelli, F., Barba, M., Boninsegna, A., Piscaglia, A. C., Lauritano, C., Novi, M. L., Barbaro, F., Rinninella, E., Campanale, C., Giuliani, F., Nuzzo, G., Alfieri, S., Doglietto, G. B., Cittadini, A., & Gasbarrini, A. (2009). Isolation and characterization of CD133+ cell population within human primary and metastatic colon cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *13 Suppl 1*, 55-62.
- Rappa, G., & Lorico, A. (2010). Phenotypic characterization of mammosphere-forming cells from the human MA-11 breast carcinoma cell line. *Exp Cell Res*, *316*(9), 1576-1586. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.01.012>
- Recio-Boiles, A., & Cagir, B. (2022). Colon Cancer. In *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, *255*(5052), 1707-1710. <https://doi.org/10.1126/science.1553558>
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., & De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, *445*(7123), 111-115. <https://doi.org/10.1038/nature05384>
- Ruoslahti, E., & Reed, J. C. (1994). Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell*, *77*(4), 477-478. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90209-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90209-7)
- Sancho, E., Batlle, E., & Clevers, H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol*, *15*(6), 763-770. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.012>
- Scatena, R., Mordente, A., & Giardina, B. (2011). *Advances in cancer stem cell biology*. Springer Science & Business Media.

- Screaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Gerth, U., & Bell, J. I. (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(24), 12160-12164. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.12160>
- Smith, D., Ballal, M., Hodder, R., Selvachandran, S. N., & Cade, D. (2006). The adenoma carcinoma sequence: an indoctrinated model for tumorigenesis, but is it always a clinical reality? *Colorectal Dis*, *8*(4), 296-301. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2005.00936.x>
- Sneath, R. J., & Mangham, D. C. (1998). The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol*, *51*(4), 191-200. <https://doi.org/10.1136/mp.51.4.191>
- Snyder, C., & Hampel, H. (2019). Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. *Semin Oncol Nurs*, *35*(1), 58-78. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2018.12.011>
- Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2011). *TNM classification of malignant tumours*. John Wiley & Sons.
- Soeda, A., Inagaki, A., Oka, N., Ikegame, Y., Aoki, H., Yoshimura, S., Nakashima, S., Kunisada, T., & Iwama, T. (2008). Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells. *J Biol Chem*, *283*(16), 10958-10966. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704205200>
- Song, J., Chang, I., Chen, Z., Kang, M., & Wang, C. Y. (2010). Characterization of side populations in HNSCC: highly invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. *Plos One*, *5*(7), e11456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011456>
- Soreide, K., Janssen, E. A., Körner, H., & Baak, J. P. (2006). Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis. *J Pathol*, *209*(2), 147-156. <https://doi.org/10.1002/path.1999>
- Sung, H., Ferlay, J., & Siegel, R. L. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality

- Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *71*(3), 209-249.
<https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S. S., Shibata, W., Vigneshwaran, R., Gordon, S. A., Shimada, Y., & Wang, T. C. (2009). Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*, *27*(5), 1006-1020.
<https://doi.org/10.1002/stem.30>
- Thiis-Evensen, E., Hoff, G. S., Sauar, J., Langmark, F., Majak, B. M., & Vatn, M. H. (1999). Population-based surveillance by colonoscopy: effect on the incidence of colorectal cancer. Telemark Polyp Study I. *Scand J Gastroenterol*, *34*(4), 414-420.
<https://doi.org/10.1080/003655299750026443>
- Thorstensen, L., Lind, G. E., Løvig, T., Diep, C. B., Meling, G. I., Rognum, T. O., & Lothe, R. A. (2005). Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability. *Neoplasia*, *7*(2), 99-108. <https://doi.org/10.1593/neo.04448>
- Tirino, V., Camerlingo, R., Franco, R., Malanga, D., La Rocca, A., Viglietto, G., Rocco, G., & Pirozzi, G. (2009). The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*, *36*(3), 446-453. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2009.03.063>
- Todaro, M., Alea, M. P., Di Stefano, A. B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., Tripodo, C., Russo, A., Gulotta, G., Medema, J. P., & Stassi, G. (2007). Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. *Cell Stem Cell*, *1*(4), 389-402. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.001>
- Van der Flier, L. G., Sabates-Bellver, J., Oving, I., Haegbarth, A., De Palo, M., Anti, M., Van Gijn, M. E., Suijkerbuijk, S., Van de Wetering, M., Marra, G., & Clevers, H. (2007). The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology*, *132*(2), 628-632.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.08.039>

- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., & Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, *9*(7), 489-499. <https://doi.org/10.1038/nrc2645>
- Weiswald, L. B., Bellet, D., & Dangles-Marie, V. (2015). Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*, *17*(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004>
- Wittekind, C., Compton, C. C., Greene, F. L., & Sobin, L. H. (2002). TNM residual tumor classification revisited. *Cancer*, *94*(9), 2511-2516. <https://doi.org/10.1002/cncr.10492>
- Wu, C., & Alman, B. A. (2008). Side population cells in human cancers. *Cancer Lett*, *268*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.048>
- Yadav, N. K., Arya, R. K., Dev, K., Sharma, C., Hossain, Z., Meena, S., Arya, K. R., Gayen, J. R., Datta, D., & Singh, R. K. (2017). Alcoholic Extract of *Eclipta alba* Shows In Vitro Antioxidant and Anticancer Activity without Exhibiting Toxicological Effects. *Oxid Med Cell Longev*, *2017*, 9094641. <https://doi.org/10.1155/2017/9094641>