

Tanja Prunk<sup>1</sup>, Špela Šalamon<sup>2</sup>

## Rakaste matične celice: ključ do uspešnejšega zdravljenja malignega melanoma?

*Cancer Stem Cells: Key to Improved Treatment of Malignant Melanoma?*

### IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: maligni melanom, matične celice, rakaste matične celice, ABCB5, CD271, Sox-10, možna klinična uporabnost

Maligni melanom je nepredvidljiva, hitro napredujoča bolezen z najhitreje rastočo incidenco od vseh rakavih bolezni. Zanj je značilna velika zmožnost zasevanja in pogoste ponovitve, kar obstoječa sistemska terapija nezadovoljivo preprečuje. Kljub navidezni ozdravitvi malignega melanoma z zdravljenjem po sodobnih smernicah se bolezen pogosto ponovi. Razlog za to so verjetno rakaste matične celice, ki s svojo plastičnostjo, samoobnovo in hkratno odpornostjo na to terapijo preprečujejo ozdravitev bolnikov. Rakaste matične celice so posebna, maloštevilna populacija celic v rakastem tkivu, ki delujejo kot sprožilci nastanka, invazije in zasevanja tumorjev. Čeprav nekatere raziskovalne skupine še vedno dvomijo v njihov obstoj, zanimanje za raziskovanje teh celic naglo narašča in prinaša vedno več dokazov o njihovi pomembni vlogi pri rakavih obolenjih. Prav razumevanje molekularnih mehanizmov njihovega delovanja lahko vodi do odkritja učinkovitejše diagnostike in terapije malignega melanoma. Zaradi vprašljive objektivnosti dermatoskopije se kot boljša diagnostična možnost ponuja nekaj površinskih bioloških označevalcev, ki predstavljajo tudi možne tarče za ciljno imunsko diagnostiko in zdravljenje malignega melanoma.

### ABSTRACT

KEY WORDS: malignant melanoma, stem cells, cancer stem cells, ABCB5, CD271, Sox-10, potential clinical applications

Malignant melanoma is an unpredictable, aggressive disease with the fastest growing incidence among all cancers. Its high metastatic potential and the tendency to relapse are poorly prevented with existing systemic therapy. In spite of apparent eradication through treatment in accordance with most recent clinical guidelines, the disease is likely to recur. Cancer stem cells with their plasticity, self-renewal ability and drug resistance represent a highly probable culprit for these relapses. This special subpopulation of cancer cells is relatively small in number, but harbors uncanny tumor initiation, invasion and metastasis potential. While their very existence remains a controversy among

<sup>1</sup> Asist. Tanja Prunk, dr. med., Inštitut za anatomijo, histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor; tanja.prunk@gmail.com

<sup>2</sup> Asist. Špela Šalamon, dr. med., Inštitut za anatomijo, histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

research groups, the evidence for their prominent role in malignancies has multiplied with the number of studies performed in this area in the past few years. Unraveling the molecular mechanisms behind these cells' unique abilities could lead to novel strategies in the diagnostics and treatment of malignant melanoma. Since the objectivity of dermoscopy has been proven questionable, certain recently discovered biomarkers offer a promising alternative. They may also serve as targets for immunotherapy and reprogramming that could lead to improving patient survival and potentially finally curing this insidious disease.

## **MALIGNI MELANOM KOT JAVNOZDRAVSTVENI PROBLEM**

Maligni melanom (MM) je smrtonosna rakava bolezen, ki po podatkih Pimienta in sodelavcev vsako uro ubije enega bolnika (1). Je najnevarnejši tumor v dermatologiji in hkrati velik javnozdravstveni problem, saj se njegova letna incidenca povečuje za 5–7 %, kar je najhitreje med vsemi rakavimi obolenji (2). Pri obeh spolih skupaj predstavlja 3,7 % vseh rakov in je po pogostosti na osmem mestu (3). Še bolj zaskrbljujoče je dejstvo, da pogosto prizadene tudi mlajšo, aktivno populacijo in s tem povzroča veliko socialno breme (4).

MM nastane iz maligno spremenjenih melanocitov, najpogosteje na soncu izpostavljeni koži (5). Teorija rakastih matičnih celic (ki bo opisana v nadaljevanju) pa navaja, da MM nastane iz maligno spremenjenih mezenhimskih matičnih celic, predhodnic melanocitov.

Melanociti so pigmentne celice, ki razvojno izvirajo iz celic nevrnalne cevi in izdelujejo pigment melanin. Najdemo jih v bazalni plasti epidermisa, v lasnih mešičkih, dermalnem vezivu, v nekaterih sluznicah (usta, spolovila, zadnjično področje, požiralnik), v bazalni plasti očesne mrežnice in na možganskih ovojnicah (leptomeningah), zato se lahko MM pojavi v kateremkoli od teh organov. Večina MM se vendarle razvije v koži, kjer je število melanocitov neprimerno večje kakor v drugih tkivih. Najpogosteje vznikne v intraepidermalnih, redkeje v intradermalnih melanocitih. Poja-

vi se lahko na novo, neredko pa se razvije iz predhodno obstoječega melanocitnega nevusa (6). Tveganje za razvoj MM linearno narašča s številom melanocitnih nevusov, tako da je pri tistih, ki imajo v srednjih letih na koži več kot 50 melanocitnih nevusov, 4,8-krat večje kot pa pri posameznikih z manj kot 10 melanocitnimi nevusi (7). Kot dejavnike tveganja ocenjujemo tudi gensko dispozicijo, starost nad 50 let, svetlo kožo (tip I in II), sindrom atipičnih nevusov, pojav lentigo maligna, že diagnosticiran MM v preteklosti in nemelanomske kožne rake ter kot najpomembnejši nevarnostni dejavnik MM – čezmerno sončenje. Razvoj MM je verjetno povezan z večkratnimi sončnimi opeklinami v mladosti, a tudi s celokupno dozo ultravijoličnih žarkov (8).

Pri 8 % bolnikov odkrijemo družinsko obliko, za katero je značilno, da se pojavlja 10–20 let prej kot sporadična oblika, prav tako se večkrat opazi sinhrono/metahrono multiple melanome ali prisotnost melanoma in raka trebušne slinavke v isti družini (7). Sindrome družinskega melanoma povzroča mutacija genov *CDKN2A* (inhibitor od ciklinov odvisne kinaze 2A, angl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), ki kodira proteina p16 in ARF (angl. *alternate reading frame*), ter *CDK4* (od ciklinov odvisna kinaza 4, angl. *cyclin-dependent kinase 4*). Nosilci teh genov imajo več kot 67-odstotno tveganje za MM (5). Sporadična in družinska oblika MM se histopatološko in prognostično v ničemer ne razlikujeta (9).

Če je MM odkrit v zgodnji fazi, preden tumor predre bazalno membrano povrhnjice, je petletno preživetje bolnikov približno 99-odstotno. Stopnja petletnega preživetja pada z naraščanjem debeline melanoma in je manj kot 10-odstotna pri bolnikih s sistemskim razsojem (10). MM sam ne povzroča splošnih bolezenskih znakov, dokler ne zaseva. Navadno zaseva najprej limfogeno v področne bezgavke, nato pa hematogeno na oddaljena mesta, predvsem v pljuča, jetra, možgane in kosti. Pri sumljivih znamenjih morajo biti le-ta kirurško izrezana z diagnostičnim varnostnim robom 2–5 mm. Pri tumorjih, ki so debelejši od 1 mm, napravimo tudi biopsijo varovalne bezgavke. Za dodatno zdravljenje z interferonom se odločimo glede na debelino tumorja, globino invazije in patohistološki izvid varovalne bezgavke. Učinki kemoterapije pri zdravljenju razsejanega MM so nezadovoljivi, saj standardno zdravljenje s kemoterapijo omogoča popolne odgovore pri manj kot 5 % bolnikov in delne odgovore pri 25 % bolnikov (7). Pri razsejani bolezni se lahko poslužujemo dodatnih operativnih posegov in tudi obsevanja zasevkov, vendar je glavna vloga radioterapije le v lajšanju težav. V zadnjih treh letih so pri zdravljenju razsejanega MM na voljo tudi tarčna zdravila (ipilimumab in vemurafinib), s katerimi lahko dosežemo popoln odgovor, ki pa običajno zaradi razvoja odporosti traja le nekaj mesecev.

Izredno pomembno je, da tumor spoznamo in ga zdravimo v zgodnji fazi bolezni, saj je v kasnejših fazah MM zelo nepredvidljiva bolezen s pestro klinično sliko od spontanega začasnega izboljšanja bolezni do zasevanja in hitre smrti. MM žal ostaja tumor, katerega zdravljenje je še vedno dokaj neuspešno in smrtnost velika. V zadnjih letih smo priča izrazitemu napredku na področju raziskovanja matičnih celic (MC) in možnostim, ki jih le-te ponujajo za uspešnejše zdravljenje številnih bolezni, vključno z MM.

## GLAVNE LASTNOSTI MATIČNIH CELIC

Matične celice so funkcionalno nediferencirane celice. V tkivih so maloštevilne, po obliki podobne majhnim limfocitom, sposobne dolgotrajnega asimetričnega deljenja, pri čemer na eni strani tvorijo v procesu samoobnavljanja popolnoma enake kopije celic, na drugi strani pa tvorijo nove linije bolj diferenciranih celic (11). Glede na njihovo sposobnost diferenciacije jih lahko razdelimo na toti-, pluri-, multi- in unipotentne (12, 13). Totipotentne celice so sposobne tvoriti celoten organizem, vključno z ekstraembrionalnim tkivom. Pluripotentne celice so sposobne tvoriti vse telesne celice, vključno s spolnimi celicami, ne morejo pa tvoriti celotnega zarodka in ekstraembrionalnih tkiv. Multipotentne celice (tudi oligopotentne) lahko tvorijo različne tipe celic, ki pa vse pripadajo isti zarodni plasti. Unipotentne MC so sposobne diferenciacije le v eno celično vrsto. Imenujemo jih tudi celice prednice (progenitorji). Poseben tip MC je inducirana pluripotentna matična celica (iPS). To je reprogramirana, že diferencirana telesna celica, ki jo preko aktivacije specifičnih prepisovalnih dejavnikov spremenimo v pluripotentno MC (14). Za odkritje, da je takšna preobrazba mogoča, sta Yamanaka in Gurdon prejela Nobelovo nagrado za medicino leta 2012.

Pomembna lastnost MC je plastičnost (slika 1). To pomeni sposobnost prilagoditve MC na novo mikrookolje. Pridobijo namreč lastnosti celic mikrookolja, v katerega jih presadimo. Plastičnost oz. spremenljivost MC zajema štiri sposobnosti (15, 16):

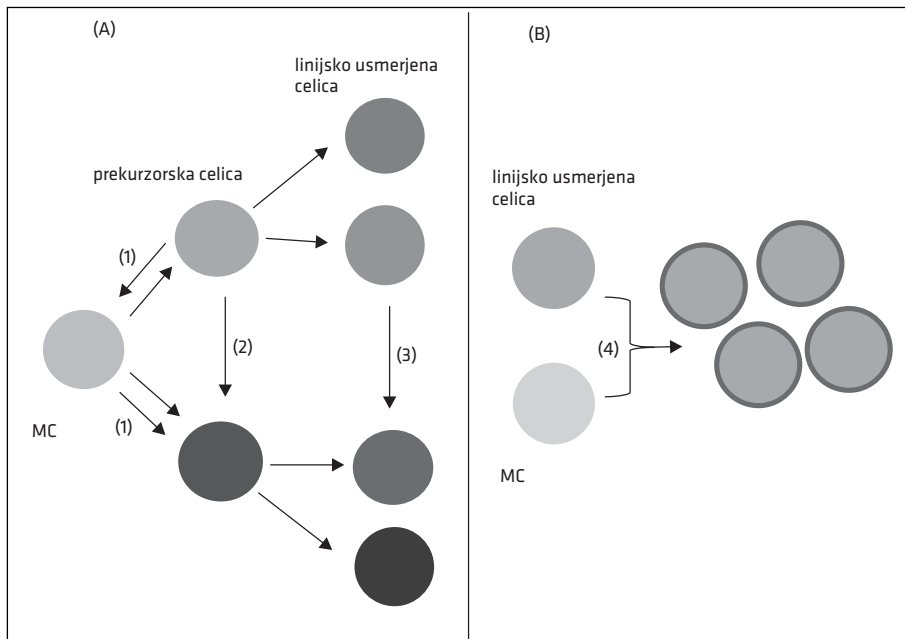
- sposobnost za dediferenciacijo, tj. sposobnost razvoja odrasle ali linijsko usmerjene celice prednice v primitivnejše oblike,
- sposobnost za transdeterminacijo, tj. spremembo iz ene v drugo predniško celično linijo,
- sposobnost za transdiferenciacijo, tj. sposobnost, ki omogoči diferencirani celici, da pridobi fenotipske značilnosti druge diferencirane celice, in

- sposobnost za fuzijo z drugimi, že diferenciranimi celicami v tkivu, iz česar lahko nastane popolnoma nov tip celic.

MC lahko osamimo iz zarodka peti dan po oploditvi (embrionalne MC), iz popkovnične krvi novorojenca in iz kostnega mozga odraslega človeka. Šele v zadnjem desetletju je postalo jasno, da se MC nahajajo tudi v različnih drugih tkivih odraslega človeka. Imenujemo jih tkivne MC oz. mezenhimске matične celice (MMC). Odgovorne so za obnavljanje odmrlih celic in popravljanje tkivnih poškodb (18). MMC so morfološko in fenotipsko zelo raznolika populacija MC (19). Najdemo jih v epiteliju, prebavilih, skeletnih mišicah, očeh, jetrih, dojkah, zobni pulpi, koži, lasnih mešičkih, periferni krvi, maščobnem tkivu, testisih, prostati, ovarijih, možganih, pljučih in nekaterih drugih organih (20–22). V vsakem od teh organov imajo MMC svoje mikrookolje ali nišo, ki jim nudi podporo in dražljaje za uravnavanje njihove aktivnosti (23). Celice, ki tvori-

jo nišo, imajo ključno vlogo pri nameščanju, rasti, razmnoževanju in diferenciaciji MMC.

Številni geni igrajo vlogo pri narekovanju usode MC in pri določanju njene funkcije. Ti geni so: *BMI1*, *NOTCH*, *SHH* in *WNT* in ravno oni vodijo tudi signalne poti, ki so vključene v razvoj malignih bolezni. Klasična definicija malignosti vključuje sposobnost rakavih celic, da preživijo in se množijo v nedogled, njihovo sposobnost, da vdrejo v sosednje tkivo in da zasevajo v oddaljena področja v telesu. Izgleda, da rakave celice zaobidejo pravila, ki strogo omejujejo življenjsko dobo celic in njihovo rast ter razmnoževanje. Podobno velja za MC, saj so zaradi sposobnosti samoobnove nesmrtni, vendar pri zdravih MC stroga genetska regulacija omejuje njihovo zmožnost neomejene rasti in diferenciacije. Podobnosti med MC in rakavimi celicami nakazujejo, da je okvara v genetski regulaciji MC način, kako se mnogo malignomov prične, obnavlja in širi (24).



**Slika 1.** Mehanizmi, ki omogočajo izredno plastičnost matičnih celic (17). 1 – dediferenciacija, 2 – transdeterminacija, 3 – transdiferenciacija, 4 – celična fuzija, MC – matična celica.

## **RAKASTE MATIČNE CELICE – RESNIČNI KRIVCI ZA NASTANEK RAKA**

Začetki raziskovanja MC segajo v leta med 1950 in 1960, ko so bili odkriti temeljni principi razvoja zdravih tkiv. Takrat so odkrili tudi, da pri rakavih celicah obstaja podobna hierarhija kot pri zdravih in podprli teorijo, da so celice, podobne matičnim, krive za nastanek številnih rakavih bolezni. Prve rakaste matične celice (RMC) so prepoznali leta 1994 pri levkemiji, prvi dokaz o prisotnosti RMC pri solidnih tumorjih pa so objavili leta 2003. RMC predstavljajo majhen delež tumorskih celic v rakavem tkivu in imajo vse lastnosti normalnih MC, razen sposobnosti natančnega uravnavanja celičnih delitev (24, 25).

Teorija rakaste matične celice pravi, da so RMC izvor malignosti in edine celice v rakavem tkivu, ki so sposobne obsežne rasti, razmnoževanja in tvorbe novega rakavega tkiva. Razvijajo se iz normalnih MC ali njihovih nezrelih potomcev z maligno preobrazbo (24). Možno je tudi, da MC nosijo genetske napake, ki se fenotipsko izrazijo le pri celicah potomkah, te pa se nato obnašajo kot RMC (26). Trditev, da je rak bolezen MC, nadgrajujejo raziskave, ki dokazujejo, da se fenotip RMC v celoti izrazi le ob specifičnem medsebojnem delovanju s tumorskim mikrookoljem (pomanjkljiva oskrba s kisikom, uravnavanje RMC s presnovki stromalnih celic itd.) v nišah RMC (27, 28). Nekateri raziskovalci poudarjajo nišo MC kot najpomembnejši dejavnik pri nastanku raka.

Dolgo je veljalo, da lahko vsaka rakava celica, ki ostane v telesu, ponovno sproži bolezen. Zaradi tega so obstoječe terapije (kemo- in radioterapija) usmerjene v uničenje čim večjega števila rakastih celic, vendar je kljub temu prognoza bolnikov slaba, še posebej pri tistih s solidnimi tumorji, kot je MM. Na podlagi teorije RMC lahko pridemo do zaključka, da bi usmerjeno uničenje RMC predstavljalo mnogo učinkovitejši način zdravljenja številnih rakavih obolenj, tudi MM.

## **RAKASTE MATIČNE CELICE PRI MALIGNEM MELANOMU** **Splošne lastnosti melanomskih rakastih matičnih celic**

Prvič so bile opisane leta 2002 (29). Že leto kasneje so opazovali nenavadno plastičnost tumorskih celic v MM in njihovo fenotipsko heterogenost, ki jo je težko razložiti drugače kot s prisotnostjo RMC (30). Prvi konkretni podatki o RMC pri MM segajo v leto 2005, ko so odkrili, da MM ni nobena izjema glede lastnosti mnogih tumorjev, da vsebujejo populacije, ki so sposobne samoobnove in diferenciacije v melanogene, osteogene, hondrogene in adipogene celice. To odkritje je bilo možno zaradi ugodne lastnosti teh celic, da v kulturi tvorijo kroglice, ki med seboj niso zraščene in jih je zato enostavno ločiti od drugih celic (31). Zlati standard za preučevanje sposobnosti tvorjenja tumorjev RMC je presaditev celične populacije, prečiščene iz vzorca bolnikovega tumorja, v imunsko oslavljen mišji model. Ti poskusi so se v primeru MM izkazali za nekoliko težavne zaradi visoke imunogenosti melanomskih RMC (MRMC). Bolj kot je model imunsko zavrt, bolj različno bo tumorsko mikrookolje od fiziološkega, kar lahko vodi v drugačno obnašanje presajenega tumorja in vprašljivo uporabnost prenosa rezultatov na človeški model (32).

Kot vse RMC so tudi MRMC sposobne rasti, razmnoževanja, diferenciacije in samoobnove. Poleg tega imajo višjo sposobnost tvorjenja tumorjev od drugih RMC, kar bi lahko razložilo visoko malignost in nagnjenost MM k zasevanju (29). Po fenotipski heterogenosti MM lahko sklepamo, da izvirajo iz celic, ki so sposobne diferenciacije v več različnih linij (30, 31). Tudi po dolgotrajni delitvi celice MM ohranjajo svojo morfološko in biološko plastičnost ter naprej izražajo razvojne gene in receptorje NOTCH, WNT, CD133, CD34, C-KIT, nestin in kostni morfogeni protein (angl. *bone morphogenic protein*) (30, 33, 34). Terapevtsko morda najpomembnejša značilnost RMC je njihovo

va odpornost na kemo- in radioterapijo ter hkratna sposobnost tvorbe novih tumorjev, kar se kaže s pogostimi ponovitvami po še tako popolnem izboljšanju. Bolniki z MM so namreč pogosto navidezno popolnoma ozdravljeni s pomočjo kirurgije, kemoterapije in/ali radioterapije, nato pa se bolezen čez nekaj časa ponovi, največkrat v razsejani obliki. To se sklada s splošno znanimi lastnostmi MC – njihovo odpornostjo na kemične in fizikalne škodljive dejavnike, ki izvirajo iz njihove fenotipske tihosti (angl. *quiescence*) ter sposobnosti diferenciacije, rasti in razmnoževanja (35). Tako lahko kljub uničenju večjega dela tumorja, v kar je usmerjena sodobna terapija, te celice ponovno sprožijo pojav bolezni. V teh primerih je prognoza običajno slaba, zato bi bilo ključnega pomena, da zdravljenje zajame tudi RMC.

Zaradi že omenjene težnje, da oblikujejo kroglice, ki med seboj niso zraščene, nekatere raziskave MRMC imenujejo tudi sferoidne celice (angl. *spheroid cells*). To je sicer značilno na primer tudi za RMC živčnega sistema, kar ni presenečenje, saj naj bi MC tako v koži kot tudi v živčnem tkivu imele skupni izvor v embrionalnih celicah nevrnalne cevi (29). Vemo namreč, da so multipotentne celice, ki izvirajo iz nevrnalne cevi, prisotne v koži sesalcev (2, 30). Poleg tega MRMC izražajo receptor za rastni dejavnik nevrnalne cevi CD271, kar bi lahko predstavljalo dodaten dokaz skupnega izvora teh celic (36, 37). Med razvojem predhodniki melanocitov nastanejo v nevrnalni cevi, od koder migrirajo do bazalne plasti kože, lasnih foliklov in drugih lokacij, kjer jih najdemo v odraslem organizmu. Pri tem prepotujejo velike razdalje (38). Morda je prav ta sposobnost migracije tista, ki omogoča tako veliko zmožnost zasevanja MM (39). Tudi nagnjenje MM, da tvori smrtno nevarne zasevke v možganih, verjetno izvira prav iz sorodnosti melanocitov s celicami živčnega sistema in mehanizmov, ki jim omogočajo mobilnost po nevrnalni cevi med embriogenezo.

V lasnih foliklih so opisani zreli melanociti, ki skrbijo za pigmentacijo las in melanocitne MC, ki so odgovorne za vzdrževanje melanocitnega sistema (40). Slednje so fenotipsko nezrele (slabo diferencirane), nepigmentirane celice s počasnim celičnim ciklom in so sposobne diferenciacije v pigmentirane melanocite ter migracije iz lasnih foliklov v epidermis. Prav seštevek različnih signalov niše, v kateri se te celice znajdejo, odloča o njihovi končni usodi (29).

### **Označevalci melanomskih rakastih matičnih celic**

Kot vse MC so tudi MRMC slabo diferencirane, zato je prepoznavanje specifičnih bioloških označevalcev težavno. Do sedaj poznani možni označevalci za MRMC so ALDH1A, CXCR6, Oct4, CD271, CD133 in ABCG2, CD20, ABCB5 in morda še drugi (31, 37, 41–45).

Od teh je mogoče posebej zanimiv ABCB5, transporter ABC in član družine glikoproteinov P, ki posreduje odpornost MM na kemoterapijo z doksorubicinom (46). Poleg tega se ABCB5 izraža predvsem v posebni skupini na kemoterapijo odpornih CD133-pozitivnih celic, kar pomeni, da morda označuje primitivnejše melanomske celice (44, 46, 47). Melanomske celice, ki so ABCB5-pozitivne, imajo večjo sposobnost tvorjenja tumorjev kot celice, ki so za ta označevalec negativne, imajo pa tudi večjo sposobnost samoobnove in diferenciacije. Izražanje ABCB5 se povečuje z napredovanjem bolezni, sistemska imunoterapija s protitelesi proti ABCB5 pa je pri miših znatno zavrla rast tumorjev in izboljšala preživetje (45). ABCB5 izražajo tudi tumorske celice, ki so prisotne v krvi bolnikov z razsejanim MM in po ksenotransplantaciji v imunsko oslABLJENE miši tvorijo zasevke, hkrati pa je njihova koncentracija v krvi pacientov povezana z napredovanjem bolezni in preživetjem (48).

Drug dejavnik, ki zadnje čase vzbuja zanimanje, je CD271, znan tudi kot nevro-

tropski receptor z nizko afiniteto p75. CD271-pozitivne celice namreč tako v imunsko oslABLjenih miših kot tudi v gojeni človeški koži tvorijo tumorje in imajo sposobnost zasevanja, medtem ko je pri CD271-negativnih celicah ta sposobnost neprimerno manjša (37). Celice, ki izražajo ta dejavnik, so tudi multipotentne in sposobne tvoriti celice z lastnostmi melanocitov, nevronov, gladkih mišic in celic glije. Torej so po definiciji MC (49).

### **VLOGA MELANOMSKIH RAKASTIH MATIČNIH CELIC PRI NASTANKU, RASTI, ŠIRJENJU IN PONOVI TVI MALIGNEGA MELANOMA**

MM je ena izmed najagresivnejših oblik raka z veliko zmožnostjo zasevanja. Funkcionalne genomske raziskave so v zadnjih letih pokazale, da so za zasevanje tumorjev odgovorne predvsem specifične, maloštevilne subpopulacije rakastih celic v primarnem tumorju, ki tvorijo le približno 1 % mase tumorja (50). Te populacije se v svojih značilnostih zanimivo ujemajo z značilnostmi fizioloških MC in RMC. Tipi celic in signalne poti, ki so pomembne v fiziološki rasti in razmnoževanju ter migraciji, igrajo pomembno vlogo tudi pri invaziji in zasevanju tumorskih celic (51, 52). Ena izmed takšnih signalnih poti je pot Wnt, po kateri se sproži prenos katenina  $\beta$  od celičnih stikov k celičnemu jedru in posledično prekinitev celičnih stikov (53, 54). Takšna prekinitev medceličnih vezi vodi v uničenje neokrnjenosti epitelija in njegovo pretvorbo v mezenhimsko tkivo, kar imenujemo tranzicija epitelija v mezenhim (angl. *epithelial to mesenchymal transition*, EMT). EMT je pomemben mehanizem v embrionalnem razvoju pa tudi v napredovanju rakavih bolezni, saj pri prekinitvi medceličnih stikov ne pride le do uničenja neokrnjenosti epitelija, ampak tudi do odstopa celic od njihove podlage in posledično raznosa teh celic v bližnja ali oddaljena tkiva, kar lahko povzroča invazijo in zasevke (55). Vzorci izra-

žanja regulatorja EMT Slug so povezani z vzorci izražanja preostalih genov, ki so pomembni pri oblikovanju in migraciji nevrnalne cevi med razvojem, hkrati pa je Slug nujen za sposobnost zasevanja primarnih človeških melanocitov, ki so bili *in vitro* genetsko preobraženi v rakasto stanje. Ta sposobnost je pri rakastih kožnih celicah drugega izvora (fibroblasti, epidermalne celice) mnogo manjša (56). Še en mehanizem torej, ki MM omogoča tako veliko zmožnost zasevanja in ki je skupen melanocitom in drugim celicam izvora nevrnalne cevi. MM je, tako kot rak nasplošno, v svoji osnovi genetska bolezen.

Poleg drugih onkogenov, ki jih povezu- jemo z nastankom raka, pri MM poznamo gen *NEDD9*, ki povzroča invazijo in zasevanje melanocitov, prav tako pa je njegovo izražanje v vzorcih bolnikov povezano z napredovanjem MM (57). Zanimivo je, da povečano izražanje *NEDD9* najdemo tudi v človeških fizioloških CD133-pozitivnih popkovničnih MC, ki so bile izpostavljene pomanjkljivi oskrbi s kisikom (58). Znano je, da pomanjkljiva oskrba s kisikom poveča zmožnost zasevanja rakastih celic (59). Žal je pomanjkljiva oskrba s kisikom vse prej kot redko stanje v malignih tumorjih, v katerih ožiljenost tumorja pogosto nezadostno sledi njegovi rasti, povzročijo pa jo lahko tudi različne vrste terapije, ki tako ali drugače spreminjajo stanje oskrbe tumorja s kisikom (kirurgija, obsevanje itd.).

Obstajajo tudi nasprotujoči dokazi, ki nam dajo misliti, da MRMC morda niso tako pomembne za nastanek tumorjev: kar približno 25 % vseh celic MM je namreč sposobnih tvoriti tumorje v imunsko oslABLjenih miših NOD/SCID IL2R c null (60). Tvorba tumorjev v imunsko oslABLjenih miših in ljudeh z vsaj delno zmožnim imunskim sistemom se ne srečuje z enakimi ovirami. Vprašljivo je torej, ali bi tudi v ljudeh vseh teh 25 % celic MM tvorilo nove tumorje. Še posebej zato, ker MM sodi med bolj imunogene vrste tumorjev in zaradi odsotno-

sti mnogih normalnih človeških imunskih mehanizmov v teh miših ni presenetljivo, da je tako velik delež celic sposoben tvoriti tumorje. Protitumorskim imunskim mehanizmom so se sicer sposobne izogniti le redke celice, ki imajo prav lastnosti RMC, kar potrjujejo poskusi na miših, ki so manj izrazito imunsko oslABLjene (61).

## **MOŽNA KLINIČNA UPORABNOST** **Možnosti za diagnostiko** **malignega melanoma**

Zlati standard za diagnostiko MM danes predstavlja klinični pregled z (digitalno) dermatoskopijo, ki ji sledi histopatološka preiskava za dokončno potrditev, če je kožno znamenje sumljivo za MM. Usposobljeni dermatologi lahko z zanesljivostjo prepoznajo napredovale stopnje MM na podlagi meril ABCDE, vendar MM pri svojih zgodnjih in najbolj ozdravljivih fazah pogosto posnema histološko benigne lezije (62). Dermatoskopija izboljša diagnostično natančnost za MM za 5–30 % (63). Vendar pa so raziskave tudi potrdile, da je diagnostična natančnost dermatoskopije močno odvisna od izkušenj izvajalca, da je tehnika zelo subjektivna, brez kvantitativnih meril in da mnogokrat vodi tudi do nepotrebnih kirurških izrezov (62, 63). Navadno je samo eno kožno znamenje od 30–40 izrezanih dejansko MM (63). Raziskave kažejo, da skoraj enega od treh MM ni mogoče diagnosticirati z uporabo dermatoskopije (64). Tako zdravniki kot bolniki bi imeli koristi od natančnejše in zanesljivejše diagnostične metode, ki bi lahko podala objektivno in kvantitativno oceno lezij ter bila dovolj občutljiva in specifična, da bi lahko zaznala MRCM in s tem MM *in situ*, torej začetno fazo bolezni, ki jo lahko v 100 % ozdravimo že s kirurškim izrezom.

Zgornja meja za zaznavo cirkulirajočih rakavih celic s pretočno citometrijo je približno ena rakava celica na 100,000 levkocitov (65). Zavedati se je treba, da je sama prisotnost rakavih celic v krvnem obtoku znanilka sistemske bolezni, torej bi bila tudi

pri teoretično neomejeni občutljivosti preiskava negativna pri resnično lokalno omejeni bolezni. Logaritemska krivulja padanja števila rakavih celic pri sistemskem zdravljenju se močno razlikuje med populacijama RMC in preostalih rakavih celic. Ker so RMC odpornejše na zdravljenje od drugih populacij rakavih celic, njihova koncentracija verjetno manj izrazito – če sploh – pade med zdravljenjem, po zaključku zdravljenja pa verjetno naraste. RMC so namreč, sodeč po dosedanjih raziskavah, vir repopulacije rakavih celic po zdravljenju. Težava nastane, ker so populacije RMC tako majhne, da jih je z metodami, kot je pretočna citometrija, težko meriti. Prav tako imamo težave, ko jih poskušamo ločiti od preostalih rakavih celic, saj za to potrebujemo specifične označevalce, ki se razlikujejo pri različnih vrstah RMC.

Z vezavo označenih protiteles, specifičnih za površinske biološke označevalce MRMC, bi lahko določali rakaste celice, ki so ostale po kirurški terapiji (preprečevanje zasevkov) kot tudi oddaljene zasevke (angl. *staging*). Izražanje že omenjenega ABCB5 je povezano z napredovanjem bolezni in s preživetjem bolnikov z MM, zato je zanimiv kot možen diagnostični označevalec. Izvedba bi bila mogoča z uporabo imunohistokemije na tkivnih rezinah, pridobljenih z izrezom tumorja. Tako bi lahko zaznali tudi mikroskopske ponovitve v kirurškem robu. Klinično bi lahko imunoscintigrafsko iskali lokalne ponovitve bolezni z radioaktivno označenimi protitelesi in gamakamerom. Lahko bi uporabili tudi lokalno fluorescenčno barvanje v času izreza.

Za natančnejše preučevanje dinamike populacij RMC in njihovega vpliva na populacije drugih rakastih celic bi bilo treba razviti občutljivejše metode za njihovo zaznavanje.

## **Možnosti za terapijo malignega melanoma**

Morda je eden izmed osnovnih razlogov za nezadostnost dosedanjih sistemskih terapij



MM in rakavih boleznih na splošno uničenje večjega dela tumorja, ne pa tudi RMC. Te so potem sposobne obnoviti celotni tumor ali, še slabše, zasevati v oddaljene dele telesa in tako namesto lokaliziranega tumorja bolezen postane sistemska. Na osnovi našega poznavanja RMC obstajata dve možnosti za terapijo: te celice popolnoma odstraniti z uporabo protiteles in površinskih antigenov kot tarč (možna tarča je na primer površinski označevalec CD271) ali pa jim vzeti sposobnost samoobnove z reprogramiranjem specifičnih signalnih in prepisovalnih poti (66). To lahko dosežemo z uporabo nekaterih prepisovalnih dejavnikov kot je Sox-10. Zmanjšanje aktivnosti Sox-10 vodi v zmanjšano rast in razmnoževanje, upočasnjen celični cikel, zmanjšano preživetje celic in apoptozo, kar popolnoma ustavi tvorbo melanomov v ksenotransplantiranih miših, izrazito pa zmanjša tudi število CD271-pozitivnih celic *in vitro*, torej prav Sox-10 morda regulira število MRMC v MM (67, 68).

Ne ostaja pa le pri poskusih *in vitro* in na imunsko oslabljenih miših. Leta 2012 je bila izvedena pilotska študija na devetih bolnikih z razsejanim MM v IV. stadiju, ki so jih z ustaljeno terapijo (kirurgija, kemoterapija, obsevanje) ozdravili vidnih znakov bolezni, a so jih uvrstili v skupino z visokim tveganjem za njeno ponovitev. Bolnike so zdravili z rituksimabom, protitelesu proti CD20. Po dveh letih zdravljenja in opazovalni dobi 42 mesecev sta bili dve tretjini bolnikov brez znakov ponovitve bolezni in brez pomembnejših neželenih učinkov ali znakov toksičnosti (69).

## RAZPRAVA

Bolnikom ne smemo vlivati lažnega upanja glede ozdravitve s ciljanjem izvornih celic MM. V rokah še nimamo takšnega zdravila. Obetavni rezultati raziskav, ki jih omenjava v članku, podžigajo veliko dodatnih vprašanj na nivoju molekularne biologije in odgovori nanje bi lahko prinesli dodaten

pomen za zdravljenje raka. Za sedaj pa predstavljajo zgolj podlago za klinične raziskave in razvoj novih tarčnih zdravil. Prav tako ne moremo pričakovati, da bi na primer zgolj določeno protitelo delovalo kot samostojna terapija za uničenje vseh MM. Večjo učinkovitost bi lahko pričakovali s kombinirano terapijo, na primer kemoterapija in protitelo, usmerjeno v MRMC, kar bi lahko predstavljalo za MM usoden dvojni udarec.

Glede na vlogo RMC kot sprožilca ponovnega pojava bolezni po odstranitvi vseh njenih vidnih znakov bo v prihodnosti vloga ciljanja RMC v terapiji raka verjetno predvsem v preventivi ponovitve rakave bolezni po uspešnem zdravljenju, kar danes predstavlja enega največjih izzivov v onkologiji. Ta problem je v primeru MM še toliko izrazitejši, zato bo vloga odstranitve preostalih RMC verjetno prav tu prišla najbolj do izraza.

## ZAKLJUČEK

Področje RMC nasploh je izrazito nova, toda v zadnjih letih zelo vroča tema v bioznanosti. To prav tako velja za MC pri MM. Morda še bolj kot pri kakšni drugi vrsti raka, saj je MM izjemno nepredvidljiva, smrtonosna in zahrbtna bolezen. Predvsem njegovo nagnjenje, da se kljub navidezni ozdravitvi pogosto ponavlja, nas je stalo že mnogo življenj, žal neredko tudi mladih. Številna odkritja najnovejših raziskav so pomembno prispevala k našemu razumevanju molekularnih mehanizmov te bolezni, priča pa smo bili tudi že prvim poskusom uporabe njihovih izsledkov na ljudeh.

Pomembno vprašanje je, kako bomo odkritje melanomskih rakastih celic uporabili v prid bolnikom, ki so že oboleli za tem smrtonosnim tumorjem, in preprečili ponovitev bolezni ter kako bomo to odkritje uporabili za diagnosticiranje MM *in situ*, ko je uspešno zdravljenje še mogoče. Najobetavnejši možen biološki označevalec za diagnostiko je morda prav ABCB5, ki označuje

nezrele melanomske celice in izražanje kate-  
rega je povezano z napredovanjem bolezn-  
ni. V raziskavah na miših se je izkazal tudi  
kot zelo učinkovita tarča za sistemsko imu-  
noterapijo s protitelesi. Druga obetavna tar-  
ča je površinski antigen CD271. Naslednjo  
možnost zdravljenja predstavlja reprogra-  
miranje specifičnih signalnih in prepiso-  
valnih poti, na primer s prepisovalnim dejavn-  
nikom Sox-10, z namenom odvzeti MRMC  
sposobnost samoobnove. Samo z zdravlje-  
njem, ki bi zajelo tudi RMC, bi bili kemo-

in radioterapija lahko uspešni in popolna  
ozdravitev bolnikov v napredovanih stadi-  
jih bolezni sploh mogoča.

Upajmo, da bo v prihodnosti čim več  
pilotskih raziskav na ljudeh in bodo tako  
izsledki poskusov na živalih lahko pokazali  
svojo vrednost tudi v klinični praksi. S tem  
bi lahko končno dosegli napredek v zdravl-  
ljenju MM in rakavih bolezni nasploh ter  
omogočili ozdravitev tudi bolnikom z raz-  
sejano boleznijo.

---

## LITERATURA

1. Pimiento JM, Larkin EM, Smalley KS, et al. Melanoma genotypes and phenotypes get personal. *Lab Invest.* 2013; 93 (8): 858–67.
2. Bartenjev I. Melanom. In: Kansky A, Miljković J, eds. *Kožne in spolne bolezni.* 2nd ed. Ljubljana: Združenje slovenskih dermatovenerologov; 2009. p. 268–71.
3. Rak v Sloveniji 2010 [internet]. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana. 2010 [citirano 2014 Mar 22]. Dosegljivo na: [http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP\\_2010.pdf](http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP_2010.pdf)
4. Desandes E, Lacour B, Belot A, et al. Cancer incidence and survival in adolescents and young adults in France, 2000–2008. *Pediatr Hematol Oncol.* 2013; 30 (4): 291–306.
5. Primic - Žakelj M, Žagar T, Zadnik V. Epidemiologija malignega melanoma. *Radiol Oncol.* 2007; 41 Suppl 1: S1–S12.
6. Bračko M. Patologija malignega melanoma. *Radiol Oncol.* 2007; 41 Suppl 1: S13–S17.
7. Strojnan P, Ahčan U, Snoj M, et al. Smernice in klinična pot za obravnavo bolnikov z melanomom. Ljubljana: Onkološki inštitut; 2010.
8. Ivry GB, Ogle C, Shim EK. Role of sun exposure in melanoma. *Dermatol Surg.* 2006; 32 (4): 481–92.
9. Pho L, Grossman D, Leachman SA. Melanoma genetics: a review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. *Curr Opin Oncol.* 2006; 18 (2): 173–9.
10. Herman C. Emerging technologies for the detection of melanoma: achieving better outcomes. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2012; 5: 195–212.
11. Bongso A, Lee EH. Stem cells: their definition, classification and sources. In: Bongso A, Lee EH, Brenner S, eds. *Stem cells: from benchtop to bedside.* Singapore: World Scientific Publishing; 2005. p. 1–13.
12. Scholer HR. The potential of stem cells: An inventory. In: Nikolaus K, Dagman S, Stefan LS, eds. *Human biotechnology as social challenge.* Farnham: Ashgate Publishing; 2007. p. 28.
13. Ražman P, Kregar - Velikonja N, Jež M. Uporaba matičnih celic pri naprednem zdravljenju – celični terapiji, tkivnem inženirstvu in genski terapiji. In: Flis V, Miksić K, Gadžijev E. 5. Črničevi dnevi – Matične celice in tkivni inženiring v sodobni kirurgiji. 2013 Okt 25; Maribor, Slovenija. Maribor: UKC, Klinika za kirurgijo: Katedra za kirurgijo Medicinske fakultete; 2013. p. 17–34.
14. Gregorič M. Vloga matičnih celic in tkivnega inženirstva v plastični, rekonstrukcijski in estetski kirurgiji. In: Flis V, Miksić K, Gadžijev E. 5. Črničevi dnevi – Matične celice in tkivni inženiring v sodobni kirurgiji. 2013 Okt 25; Maribor, Slovenija. Maribor: UKC, Klinika za kirurgijo: Katedra za kirurgijo Medicinske fakultete; 2013. p. 41–51.
15. Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther.* 2002; 9 (11): 754–8.
16. Martin-Rendon E, Watt SM. Stem cell plasticity. *Br J Haematol.* 2003. 122 (6): 877–91.

17. Rožman P, Strbad M, Knežević M. Uporaba matičnih celic v medicini. [internet]. Ljubljana: Biološka znanost in družba. 2007 [citirano 2014 Feb 9]. Dosegljivo na: <http://www.zrss.si/bzid/geni/pdf/knezevic-clanek.pdf>
18. Can A. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turkish Journal of Hematology*. 2008; 25: 57–9.
19. Hvala P. Primerjava fenotipskih lastnosti mezenhimskih matičnih celic in glioblastomskih celičnih linij v indirektni ko-kulturi [diplomsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2011.
20. Zipori D. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells*. 2005; 23 (6): 719–26.
21. Strbad M, Rožman P. Uporaba matičnih celic v medicini. *Proteus*. 2008; 67 (8): 340–48.
22. Jackson L, Jones DR, Scotting P, et al. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med*. 2007; 53 (2): 121–27.
23. Ho AD, Wagner W. The beauty of asymmetry-asymmetric divisions and self-renewal in the hematopoietic system. *Curr Opin Hematol*. 2007; 14 (4): 330–36.
24. Clarke MF, Becker MW. Stem Cells: The real culprits in cancer? *Sci Am*. 2006; 295 (1): 52–9.
25. Keber R. Vloga matičnih celic pri nastanku raka mlečne žleze. *Acta Agriculturae Slovenica*. 2010; 96 (1): 43–51.
26. Ponti D, Zaffaroni N, Capelli C, et al. Breast cancer stem cells: an overview. *Eur J Cancer*. 2006; 42 (9): 1219–24.
27. Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, et al. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin*. 2010; 60 (3): 166–93.
28. Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, et al. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5 (11): 899–904.
29. Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature*. 2002; 416 (6883): 854–60.
30. Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, et al. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3 (6): 411–21.
31. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*. 2005; 65 (20): 9328–37.
32. Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res*. 2012; 22 (3): 457–72.
33. Balint K, Xiao M, Pinnix CC, et al. Activation of Notch1 signaling is required for beta-catenin-mediated human primary melanoma progression. *J Clin Invest*. 2005; 115 (11): 3166–76.
34. Klein WM, Wu BP, Zhao S, et al. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2006; 20 (1): 102–7.
35. Harrison DE, Lerner CP. Most primitive hematopoietic stem cells are stimulated to cycle rapidly after treatment with 5-fluorouracil. *Blood*. 1991; 78 (5): 1237–40.
36. Boiko AD, Razorenova OV, van de Rijn M, et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature*. 2010; 466 (7302): 133–7.
37. Civenni G, Walter A, Kobert N, et al. Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer Res*. 2011; 71 (8): 3098–109.
38. Mayer TC. The migratory pathway of neural crest cells into the skin of mouse embryos. *Dev Biol*. 1973; 34 (1): 39–46.
39. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414 (6859): 105–11.
40. Yonetani S, Moriyama M, Nishigori C, et al. In vitro expansion of immature melanoblasts and their ability to repopulate melanocyte stem cells in the hair follicle. *J Invest Dermatol*. 2008; 128 (2): 408–20.
41. Luo Y, Dallaglio K, Chen Y, et al. ALDH1A isozymes are markers of human melanoma stem cells and potential therapeutic targets. *Stem Cells*. 2012; 30 (10): 2100–13.
42. Taghizadeh R, Noh M, Huh YH, et al. CXCR6, a newly defined biomarker of tissue-specific stem cell asymmetric self-renewal, identifies more aggressive human melanoma cancer stem cells. *PLoS One*. 2010; 5 (12): e15183.
43. Kumar SM, Liu S, Lu H, et al. Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. *Oncogene*. 2012; 31 (47): 4898–911.
44. Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, et al. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *Eur J Cancer*. 2007; 43 (5): 935–46.
45. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*. 2008; 451 (7176): 345–9.
46. Frank NY, Margaryan A, Huang Y, et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res*. 2005; 65 (10): 4320–33.

47. Lai CY, Schwartz BE, Hsu MY. CD133+ melanoma subpopulations contribute to perivascular niche morphogenesis and tumorigenicity through vasculogenic mimicry. *Cancer Res.* 2012; 72 (19): 5111–8.
48. Ma J, Lin JY, Alloo A, et al. Isolation of tumorigenic circulating melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 402 (4): 711–7.
49. Shakhova O, Sommer L. Testing the cancer stem cell hypothesis in melanoma: the clinics will tell. *Cancer Lett.* 2013; 338 (1): 74–81.
50. Chin L. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev.* 2006; 20 (16): 2149–82.
51. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature.* 2006; 441 (7097): 1075–9.
52. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis the seed and soil hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3 (6): 453–8.
53. Espada J, Calvo MB, Diaz-Prado S, et al. Wnt signalling and cancer stem cells. *Clin Transl Oncol.* 2009; 11 (7): 411–27.
54. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 2005; 434 (7035): 843–50.
55. Thiery JP. La transition épithéliomésenchymateuse au cours du développement dans la fibrose et dans la progression tumorale. *Bull Cancer.* 2010; 97.
56. Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet JP, et al. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet.* 2005; 37 (10): 1047–54.
57. Kim M, Gans JD, Nogueira C, et al. Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell.* 2006; 125 (7): 1269–81.
58. Martin-Rendon E, Hale SJ, Ryan D, et al. Transcriptional profiling of human cord blood CD133+ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia. *Stem Cells.* 2007; 25 (4): 1003–12.
59. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature.* 2006; 441 (7092): 437–43.
60. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, et al. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature.* 2008; 456 (7222): 593–8.
61. Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest.* 2010; 120 (1): 41–50.
62. Wang SQ, Rabinovitz H, Kopf AW, et al. Current technologies for the in vivo diagnosis of cutaneous melanomas. *Clin Dermatol.* 2004; 22 (3): 217–22.
63. Herman C. Emerging technologies for the detection of melanoma: achieving better outcomes. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2012; 5: 195–212.
64. Patel JK, Konda S, Perez OA, et al. Newer technologies/techniques and tools in the diagnosis of melanoma. *Eur J Dermatol.* 2008; 18 (6): 617–31.
65. Hu Y, Fan L, Zheng J, et al. Detection of circulating tumor cells in breast cancer patients utilizing multiparameter flow cytometry and assessment of the prognosis of patients in different CTCs levels. *Cytometry A.* 2010; 77 (3): 213–9.
66. Murphy GF, Wilson BJ, Girouard SD, et al. Stem cells and targeted approaches to melanoma cure. *Mol Aspects Med.* 2013.
67. Paratore C, Goerich DE, Suter U, et al. Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development.* 2001; 128 (20): 3949–61.
68. Shakhova O, Zingg D, Schaefer SM, et al. Sox10 promotes the formation and maintenance of giant congenital naevi and melanoma. *Nat Cell Biol.* 2012; 14 (8): 882–90.
69. Pinc A, Somasundaram R, Wagner C, et al. Targeting CD20 in melanoma patients at high risk of disease recurrence. *Mol Ther.* 2012; 20 (5): 1056–62.