

VLOGA PRENAŠALCA ABCB5 V INICIACIJI, INVAZIJI IN ZASEVANJU MALIGNEGA MELANOMA IN MOŽNOSTI RAZVOJA NOVIH TARČNIH UČINKOVIN

THE ROLE OF ABCB5 TRANSPORTER IN THE INITIATION, INVASION AND METASTATIC SPREAD OF MALIGNANT MELANOMA AND PROSPECTS FOR DEVELOPMENT OF NEW TARGET SUBSTANCES

AVTOR / AUTHOR:

asist. Tanja Prunk, dr. med.¹

doc. dr. Mojca Lunder, mag. farm.²

doc. dr. Polonca Ferik, mag. farm.³

¹ Zdravstveni dom dr. Adolfa Drolca Maribor,
Ulica talcev 9, 2000 Maribor

² Katedra za farmacevtsko biologijo, Fakulteta za
farmacijo Univerze v Ljubljani, Aškerčeva cesta 7,
1000 Ljubljana

³ Katedra za farmakologijo in eksperimentalno
toksikologijo, Medicinska fakulteta Univerze v
Mariboru, Taborska 8, 2000 Maribor.

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: tanja.prunk@gmail.com

POVZETEK

Incidenca malignega melanoma, ene izmed najagresivnejših oblik raka, strmo narašča. Žal pa trenutno še ne poznamo učinkovite terapije, ki bi lahko bistveno izboljšala potek zdravljenja bolnikov z malignim melanomom. Razlog za veliko odpornost na obstoječo terapijo in slabo prognozo bolnikov v veliki meri pripisujemo prenašalcu ABCB5, ki zaradi svoje večfunkcionalnosti igra pomembno vlogo pri iniciaciji, invaziji in zasevanju te vrste raka. Celice, ki izražajo ABCB5, imajo lastnosti matičnih celic ter številne prednosti pri preživetju v primerjavi z ostalimi celicami, ki tvorijo tumorsko maso. To vodi do kliničnega relapsa bolezni pri bolnikih z navidezno ozdravljenim malignim melanomom tudi nekaj let po prestali kemoterapiji, radioterapiji ali imunoterapiji. Da bi lahko dosegli željeno ozdravitev bolnikov, bo potrebno usmerjeno uničenje te agresivne subpopulacije celic. V članku opisujemo tudi nekaj obetavnih rezultatov predkliničnih študij, ki predstavljajo podlago za nadaljnje klinične raziskave in razvoj novih tarčnih zdravil.

KLJUČNE BESEDE:

maligni melanom, prenašalec ABCB5, rakaste matične celice, partenolid, IgG monoklonsko protitelo proti ABCB5

ABSTRACT

The incidence of malignant melanoma, one of the most aggressive cancers, is rising steeply. Unfortunately, we currently do not have an effective therapy which could significantly improve the medical treatment outcomes of patients with malignant melanoma. The reason for the current therapeutical resistance and poor prognosis is largely attributed to the ABCB5 transporter. ABCB5 with its multifunctionality plays an important role in the initiation, invasion and metastatic spread of cancer. Cells expressing ABCB5 have properties of stem cells as well as a number of advantages in survival compared with other cells that form the tumor mass. This leads to a clinical relapse in patients with supposedly cured malignant melanoma even some years after treatment with chemotherapy, radiotherapy or immunotherapy. In order to really cure these patients we would need a targeted destruction of this



aggressive subpopulation of cells. In this paper we also describe some promising results of preclinical studies, which form the basis for further clinical research and development of new targeted drugs.

KEYWORDS:

malignant melanoma, ABCB5 transporter, cancer stem cells, parthenolide, IgG anti-ABCB5 monoclonal antibody

1 MALIGNI MELANOM

1.1 OPREDELITEV MALIGNEGA MELANOMA

Maligni melanom (MM) je ena izmed najagresivnejših oblik raka z veliko zmožnostjo zasevanja [1]. Gre za hitro napredujočo bolezen z najhitreje rastočo incidenco med vsemi rakavimi obolenji. Incidenca MM se večja po vsem svetu, še posebej pri ljudeh s svetlim tipom kože, ki so bili prekomerno izpostavljeni sončnim žarkom [2]. Če se diagnozo postavi preden rak zaseva, ga lahko ozdravimo s kirurškim izrezom [3]. Stopnja 5-letnega preživetja pada z naraščanjem debeline melanoma in je manj kot 5 % pri bolnikih s sistemskim razsojem [4]–[6]. Metastatski MM ostaja bolezen z zelo slabo prognozo (mediana preživetja je 6-9 mesecev), zlasti zaradi njegove velike odpornosti na obstoječo radioterapijo in kemoterapijo [2], [6]. Z zdravljenjem MM po sodobnih smernicah se kljub navidezni ozdravitvi bolezen pogosto ponovi [1]. Eden od razlogov za to so verjetno rakaste matične celice (RMC).

1.2 RAKASTE MATIČNE CELICE PRI MALIGNEM MELANOMU

Teorija RMC pravi, da so RMC izvor malignosti in edine celice v rakavem tkivu, ki so sposobne obsežne proliferacije in tvorbe novega rakavega tkiva [7]. Razvile naj bi se iz normalnih matičnih celic (MC) ali njihovih nezrelih potomcev z maligno preobrazbo [8]. RMC so našli v številnih tumorjih, vključno z MM [3]. Melanomske RMC (MRMC) imenujemo tudi melanosfere, in sicer zaradi lastnosti teh celic, da v kulturi tvorijo kroglice, ki med seboj niso zraščene; MRMC je zato enostavno ločiti od ostalih celic v kulturi [9]. MRMC so sprožilke invazije in zasevanja MM [1].

Pomembna lastnost MC je njihova plastičnost, tj. sposobnost prilagoditve na novo okolje s pridobitvijo novih lastnosti, ustreznih temu okolju. Plastičnost predstavljajo sposobnosti za dediferenciacijo (tj. razvoja odrasle ali linijske usmerjene celice prednice v bolj primitivne oblike), transdeterminacijo (tj. spremembo iz ene v drugo predniško celično linijo), transdiferenciacijo (tj. sposobnost, ki omogoči diferencirani celici, da pridobi fenotipske značilnosti druge diferencirane celice) ter sposobnosti za celično fuzijo [10]. Pri slednji gre za združitev MC z že diferencirano celico v nekem tkivu, iz česar nastane večjedrni celični hibrid, iz katerega lahko med drugimi nastanejo tudi enojedrne diferencirane celice potomke z novimi lastnostmi [11].

Kot vse MC so tudi MRMC slabo diferencirane, zato je prepoznavanje njihovih specifičnih bioloških označevalcev težavno [1]. Do sedaj poznani možni označevalci za MRMC so ALDH1A (angl. *aldehyde dehydrogenase 1A*), CXCR6 (angl. *C-X-C chemokine receptor type 6*), Oct4 (angl. *octamer-binding transcription factor 4*), LNGFR (angl. *low-affinity nerve growth factor receptor*), CD133 (prominin-1), ABCG2 (angl. *ATP-binding cassette sub-family G member 2*), CD20 (angl. *B-lymphocyte antigen*), ABCB5 (angl. *ATP-binding cassette sub-family B member 5*) ter nekateri drugi [9], [12]–[17]. Zaradi izražanja transmembranskega proteina ABCB5 in svojih lastnosti plastičnosti, samoobnove ter hkratne odpornosti na obstoječo terapijo, MRMC preprečujejo ozdravitev bolnikov z MM.

1.2 ZDRAVLJENJE MALIGNEGA MELANOMA

Zdravljenje primarnega melanoma je kirurško - ekscizija celotne lezije z varnostnim robom, ki je odvisen od debeline primarnega melanoma, ter v primeru metastatskih bezgavk radikalna odstranitev le-teh v posameznih področnih bezgavčnih ložah. Tako pri primarni, regionalno razširjeni ali sistemsko razširjeni bolezni se lahko poslužujemo tudi radioterapije. Pri razširjeni bolezni se dodatno priporoča tudi imunoterapija z velikimi odmerki interferona alfa[5].

Bolnike s sistemsko razširjeno boleznijo zdravimo s kemoterapijo. Kemoterapija je polno učinkovita pri manj kot 5% bolnikov in delno učinkovita pri 25% bolnikov [5]. Kot edina priporočena farmakoterapija se v Sloveniji v monoterapiji uporablja alkilirajoči citostatik dakarbazin (dimetil-triazenoimidazol-karboksamid - DTIC), s katerim dosežemo odgore pri 5%-20% bolnikov [5]. Dakarbazin velja za referenčno zdravilo pri zdravljenju metastatskega MM. Ob

odpornosti na dakarbazin se poslužujemo terapije z drugim alkilirajočim citostatikom, tj. s cisplatinom oz. z njegovimi analogi v kombinaciji z drugimi citostatiki [5]. Uporablja se tudi temozolamid, alkilirajoči citostatik, ki deluje citostatično še na metastaze v osrednjem živčnem sistemu [5], [6]. Mnogokrat se pri razširjeni bolezni kemoterapija kombinira z imunoterapijo, s čimer dosegajo sicer več polnih odgovorov, vendar prognoza bolezni ostaja enaka [5]. Obetajoči so rezultati manjših kliničnih raziskav s tarčnimi zdravili, kot so monoklonska protitelesa (mAb) proti integrinom (npr. proti CD137 in proti CTLA-4 (angl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), antigeni, ki jih kodirajo geni družine *MAGE* (angl. *melanoma-associated antigen*), peptidne vaccine ter vaccine iz dendritičnih celic [5], vendar nobeno izmed naštetih zdravil še ni v redni klinični uporabi.

Pri veliki odpornosti na obstoječo terapijo MM in izjemno slabi prognozi bolezni naj bi imel pomembno vlogo prenašalec ABCB5, ki je označevalec MRMC in zaradi svoje večfunkcionalnosti verjetno pomembno vpliva na iniciacijo, invazijo in zasevanje MM [18].

2 TRANSMEMBRANSKI PROTEIN ABCB5

2.1 OPREDELITEV PROTEINA ABCB5

Protein ABCB5 je ATP vezavni transmembranski protein iz družine P-glikoproteinov, z molekularno maso 89,7 kDa. Izraža se predvsem v koži, torej tkivu, kjer se nahaja obilo multipotentnih MC [11], [19]. Izražanje ABCB5 so ugotovili tudi pri jetrnem in kolorektalnem raku, raku dojke, ploščatoceličnem karcinomu ustne votline, horiokarcinomu ter trofoblastnem tumorju placentalnega ležišča [2], [19]–[21]. Gen za protein ABCB5, ki leži na kromosomski lokaciji 7p21-15.3, je prvič kloniral Frank s sodelavci leta 2003 [20].

2.2 PROTEIN ABCB5 KOT BIOLOŠKI OZNAČEVALEC MALIGNEGA MELANOMA

Melanomske celice, ki so ABCB5-pozitivne (ABCB5+), imajo večjo sposobnost tvorjenja tumorjev ter večjo sposobnost samoobnove, diferenciacije in metastaziranja, kot celice, ki so za ta označevalec negativne (ABCB5-) [1]. RMC so z izražanjem proteina ABCB5, ki med drugim pre-

naša tudi zdravila iz celice, zavarovane pred vplivom ksenobiotikov [19] ter tako odporne na obstoječo kemoterapijo [20]. Medtem ko po kemoterapiji ostale melanomske celice odmrejo in pride do navidezne ozdravitve bolezni, se čez čas le-ta mnogokrat ponovi, saj preživele celice ABCB5+ zaradi vseh lastnosti MC ponovno rekonstruirajo tumorsko maso [2]. Tudi zato ostaja MM, v kolikor predre bazalno membrano povrhnjice, bolezen z zelo slabo prognozo. Natančnejše razumevanje molekularnih mehanizmov delovanja proteina ABCB5 bi lahko predstavljalo osnovo za razvoj učinkovitejše diagnostike in terapije MM.

Protein ABCB5 predstavlja biološki označevalec tumorskega napredovanja, saj se izraža v večji meri pri primarnih in metastatskih MM kot pri benignih nevusih, pri debelejših primarnih MM bolj kot pri tanjših ter pri zasevkih v bezgavke bolj kot pri primarnih MM [17]. Možno je, da z maligno transformacijo pride do obsežnejšega izražanja proteina ABCB5 [20]. Obsežnejša ekspresija proteina ABCB5 pri MM je verjetno povezana tudi s hitrejšim metastaziranjem tega raka oz. z agresivnostjo tumorja [2]. S poskusi na miših so ugotovili, da celice ABCB5+ tvorijo potomce ABCB5+ in ABCB5-, medtem ko celice ABCB5- tvorijo le potomce ABCB5- [17]. Značilnost MC je, da lahko tvorijo sebi enake ali pa bolj diferencirane potomce, torej je potemtakem ABCB5 tudi biološki označevalec za MC, tako fiziološke kot patološke [11].

2.3 VLOGA PROTEINA ABCB5 V NADZORU CELIČNE FUZIJE

Celična fuzija je fiziološki mehanizem, ki prispeva k tkivni diferenciaciji ter tudi obnovi bolnega tkiva z zdravimi celicami [11]. Nadzoruje jo med drugim tudi protein ABCB5, in sicer z ohranjanjem transmembranskega potenciala MC [11].

Frank s sodelavci je s svojo raziskavo dokazal, da približno 13% melanocitov v človeški povrhnjici izraža protein ABCB5 in da več kot polovico od teh izraža tudi označevalec prednjic melanocitov, tj. protein CD133, ki je običajno prisoten v manj kot enem odstotku melanocitov povrhnjice [11]. Transmembranski glikoprotein CD133 se heterogeno izraža v melanocitnih tumorjih, v 17% benignih nevusov, v 39% primarnih melanomov in v 46% metastatskih melanomov ter nima znane fiziološke vloge [3]. Zaradi nasprotujočih si rezultatov različnih študij, protein CD133 ni potrjen kot univerzalni označevalec za povečan tumorogeni potencial pri MM človeka [3]. Študije na mišjih modelih so



pokazale, da CD133-pozitivne RMC pri gliomu izražajo več molekul žilnega endotelijskega ravnega dejavnika VEGF (angl. *Vascular Endothelial Growth Factor*) [3]. VEGF aktivira endotelne celice, kar vodi do oblikovanja novih žilnih struktur, ki se pričnejo razraščati v smeri rakaste novotvorbe [3].

Tiste celice, ki so izražale tako protein ABCB5 kot protein CD133, so imele več kot eno jedro, torej so bile hibridi, nastali s celično fuzijo. Po blokadi proteina ABCB5 z mAb so opazili, da so MC izrazito depolarizirane, kar je predpogoja za celično fuzijo [11]. Protein ABCB5 torej lahko preprečuje celično fuzijo MC z zdravimi diferenciranimi celicami in s tem obnovo rakastega tkiva z zdravimi celicami. Lahko pa dopusti fuzijo celic, ki imajo lastnosti MC, z diferenciranimi rakastimi celicami ter tako vodi do nastanka celičnih hibridov s specifično gensko ekspresijo ter zmožnostjo proliferacije, kar so dokazali na celični liniji raka dojke ter celični liniji epiteljskega tkiva dojke z lastnostmi MC [22].

Celična fuzija, ki lahko prispeva k obnovi tkiva, ima lahko torej tudi pomembno vlogo pri iniciaciji in napredovanju tumorjev. Fuzija med somatsko celico, ki je bila podvržena specifičnim mutacijam, in normalno MC lahko pojasni obsežne kromosomske nepravilnosti, opažene v začetnih fazah tumorjev [23].

2.4 VLOGA PROTEINA ABCB5 V ZAŠČITI PRED IMUNSKO ZAVRNITVIJO

Poleg tega, da protein ABCB5 uravnava celično fuzijo, prispeva tudi k zaščiti celic pred imunskim sistemom in pred apoptozo [20]. Celice ABCB5+ RMC imajo fenotipske in funkcionalne lastnosti, s katerimi se lahko izognejo delovanju imunskega sistema in posledični imunski zavrnitvi; uravnavajo lahko namreč delovanje T-limfocitov. Frank je s sodelavci dokazal, da te celice zavirajo od IL-2 odvisno aktivacijo T-limfocitov ter spodbudijo izločanje IL-10, ki zavira nastajanje citokinov v T-limfocitih CD4 [3].

2.5 VLOGA PROTEINA ABCB5 PRI ODPORNOSTI NA ZDRAVILA

Protein ABCB5 omogoča odpornost celic na zdravila s transportom le-teh iz znotrajceličnega v zunajcelični prostor [20]. Kemorezistenca subpopulacije celic ABCB5+ je resen problem pri bolnikih z MM, saj vodi do kliničnega relapsa bolezni [2]. Pri melanomskih celicah so poleg proteina ABCB5 v mehanizmu odpornosti vključeni tudi melano-

somi, ki lovijo molekule učinkovine v celici in jih izvažajo iz celice [2]. Chartrain s sodelavci je v svoji študiji dokazal, da imajo celice ABCB5+ prednost pri preživetju v primerjavi s celicami ABCB5- pri zdravljenju MM s kemoterapijo ter da se po takšni terapiji število celic ABCB5+ celo poveča [2]. V poskusih *in vivo* na miših, ki so bile zdravljene s temozolomidom (alkilirajočim citostatikom, ki je predzdravilo in po presnovi deluje s podobnim molekularnim mehanizmom in učinkovitostjo kot dakarbazin), so ugotovili povečan delež ABCB5+, sočasno z učinkovitim zaviranjem tumorske rasti in zmanjšanjem mase tumorja [2]. V poskusu *in vitro* na WM-266-4, G-361 in SK-MEL-28 celičnih linijah so bile celice izpostavljene dakarbazinu v toksičnih odmerkih. Z večanjem odmerka dakarbazina se je skupno število vseh tumorskih celic zmanjševalo, število celic ABCB5+ (ki so na začetku poskusa predstavljale 3-5% vseh tumorskih celic) pa se je povečalo nad izhodiščno število, najbolj v primerih 50-75% citotoksičnosti za skupno število vseh tumorskih celic. Težava tega pojava je, da lahko preživele celice ABCB5+ zaradi svojih lastnosti MC ponovno rekonstruirajo tumorsko maso [2]. Pri koncentracijah dakarbazina, ki so povzročile citotoksičnost pri > 75% vseh tumorskih celic, pa se je število celic ABCB5+ zmanjšalo na izhodiščno število. Izguba sposobnosti za preživetje, katero so dokazali pri večjih odmerkih dakarbazina, nakazuje, da postanejo mehanizmi, ki sprožijo zaščito celic ABCB5+ pred citotoksičnim stresom, preobremenjeni ter zato neučinkoviti [2]. Podobne rezultate so dobili tudi v poskusu *in vitro* z vemurafenibom (zaviralcem proteinskih kinaz), le da je maksimalni porast celic ABCB5+ pri slednjem večji. Vemurafenib je inhibitor kinaze Braf in se je izkazal za učinkovitega pri MM z mutacijo BRAF V600E (gre za substitucijo glutaminske kisline z valinom na poziciji 600) [24]. Mutacije BRAF so odkrili pri 41% kožnih MM in so pogosto povezane z akutno prekomerno izpostavljenostjo soncu in površinsko rastočim MM [24]. Vemurafenib sicer poveča preživetje bolnikov, žal pa zaradi razvoja rezistence ne vodi do daljšega kliničnega odziva ali ozdravitve [24].

V nasprotju s predhodnimi študijami pa se je v *in vitro* poskusu z antraciklinskim antibiotikom doksorubicinom pokazalo, da tudi število celic ABCB5+ pada z naraščajočim odmerkom zdravila. Četudi so imele celice ABCB5+ majhno prednost glede preživetja v primerjavi s skupnim številom tumorskih celic, ti rezultati nakazujejo, da so lahko tudi celice ABCB5+ občutljive na zdravljenje s citostatiki [2]. Po dveh tednih zdravljenja z doksorubicinom je število celic ABCB5+ ponovno naraslo na izhodiščno število, kar vendarle dokazuje dolgoročno preživetje teh celic tudi v tej

študiji. Že leta 2005 je Frank s sodelavci nakazal vlogo ABCB5 pri rezistenci na doksorubicin. Z blokado ABCB5 so namreč onemogočili transport zdravila iz melanomskih celic v zunajcelični prostor in povečali znotrajcelično kopičenje doksorubicina, zaradi česar se rezistenca nanj ni razvila. S tem so dokazali, da je transport molekul doksorubicina iz celice podlaga za razvoj rezistence na to zdravilo [25].

2.6 VLOGA PROTEINA ABCB5 PRI ZAVIRANJU DIFERENCIACIJE MATIČNIH CELIC

Pri MRMC, ABCB5 nadzoruje tudi sekrecijo signalne molekule IL1 β , ki služi za vzdrževanje počasnega celičnega cikla, značilnega za MC. To opravlja preko citokinske signalne poti IL1 β / IL8 / CXCR1. Interlevkin 8 (IL8) je posrednik klinične agresivnosti pri MM in pospešuje karcinogenezo. CXCR1 je receptor za IL8 in zelo pomemben za progresijo MM. Tako ABCB5 tudi neodvisno od funkcije prenašalca zdravil iz celice prispeva k rezistenci na protirakava zdravljenja, ki ciljajo hitrodeleče se celice, in sicer zaradi zaviranja diferenciacije celic v bolj zrele potomke s hitrejšim celičnim ciklom od MC [21]. Dokazano je, da so RMC odporne na kemoterapijo in radioterapijo [26]. Wilson s sodelavci je dokazal, da ABCB5 označuje počasi deleče se celice, ki izražajo CXCR1 in da blokada ABCB5 povzroča celično diferenciacijo in oslabi rast tumorja *in vivo* [21]. Malignost tumorjev se povečuje s stopnjo dediferenciacije in zmanjšuje s stopnjo diferenciacije, torej ABCB5 kot regulator diferenciacije močno pogojuje biologijo RMC ter tumorjev [27].

3 IMUNOGENOST MALIGNEGA MELANOMA

Nekateri rezultati raziskav nakazujejo nasprotno možnost, in sicer, da MM ni hierarhično organiziran v fenotipsko različne subpopulacije celic, med katerimi bi bile samo maloštevilne MRMC, ki izražajo ABCB5, tumorogene [28]. Quintana s sodelavci je dokazal, da je približno 25% oz. 28% vseh celic MM sposobnih tvoriti tumorje v imunsko oslabljenih miših NOD/SCID IL2R [29], [30]. Rezultati verjetno niso neposredno prenosljivi na ljudi, še posebej zato, ker MM sodi med bolj imunogene vrste tumorjev, v miših pa so mnogi za človeka normalni imunski mehanizmi od-

sotni [1]. Protitumorskim imunskim mehanizmom so se sicer sposobne izogniti le redke celice, to so celice, ki imajo lastnosti RMC, kar potrjujejo poskusi na miših, ki so manj izrazito imunsko oslABLJENE [1].

4 MOŽNOSTI RAZVOJA NOVIH SPECIFIČNIH UČINKOVIN ZA TARČNO ZDRAVLJENJE MALIGNEGA MELANOMA

4.1 SPLOŠNI PRISTOPI K RAZVOJU NOVIH SPECIFIČNIH UČINKOVIN ZA TARČNO ZDRAVLJENJE MALIGNEGA MELANOMA

Obstoječa terapija, s katero zdravimo bolnike z napredovalo obliko MM, lahko uniči samo že diferencirane melanomske celice, MRMC pa ne. Tako žal trenutno še ni učinkovite terapije, ki bi lahko bistveno izboljšala potek zdravljenja bolnikov z MM in zato ostaja potreba po razvoju novih terapij [3].

Zaradi pomembne vloge RMC (celice ABCB5+) kot izvora malignosti in zaradi njihovih sposobnosti, s katerimi prispevajo k obsežni rasti rakastega tkiva in k sproženju ponovnega pojava bolezni po navidezni ozdravitvi, bo potrebno usmerjeno uničenje te agresivne subpopulacije celic, da bi lahko dosegli želeno ozdravitev bolnikov z MM [8]. To bi bilo možno s ciljanjem molekularnih označevalcev teh celic, z inhibicijo samoobnove, ki jim omogoča nesmrtnost, ali pa s stimulacijo njihove diferenciacije [31]. Toda ugotovili so, da lahko zaradi sposobnosti prilagoditve na novo mikrookolje bolj diferencirane celice v procesu dediferenciacije pridobijo lastnosti matičnih celic [10], [31], zaradi česar bi bilo potrebno sočasno ciljanje tako matičnih kot bolj diferenciranih rakastih celic.

4.2 MONOKLONSKO PROTITELO PROTI PROTEINU ABCB5

Sistemeski vnos mAb, usmerjenega proti ABCB5 (IgG prot-ABCB5 mAb), je pri poskusih na miših sprožil od protitelesa odvisno celično posredovano citotoksičnost proti MRMC ABCB5+ ter s tem znatno zavrl nadaljnjo tumorsko rast [17]. V tkivu tako zdravljenih miših so na mestu celic ABCB5+ opazili predele, infiltrirane z makrofagi, ki so pogosto mejili na področja celične degeneracije in nekroze [3]. Ti obetavni rezultati predstavljajo podlago za klinične



raziskave in razvoj novih tarčnih zdravil. Npr. z uporabo mAb ali s tehnologijo siRNA (angl. *small interfering RNA*), s katero utišajo translacijo s komplementarno vezavo siRNA na mRNA, bi sprožena inhibicija mRNA za protein ABCB5 lahko v človeku senzibilizirala melanomske celice za uničenje z doksorubicinom, 5-fluorouracilom (citostatik-antimetabolit, analog pirimidina) ali za uničenje s kamptotekini (inhibitorji topoizomerase I) [3]. 5-fluorouracil in kamptotekini niso navedeni v Slovenskih smernicah za obravnavo bolnikov z MM [5].

4.3 PARTENOLID V CILJANEM ZDRAVLJENJU MALIGNEGA MELANOMA

V številnih predkliničnih študijah *in vitro* ter *in vivo* se je partenolid (PN), seskviterpenski lakton, pridobljen iz listov belega vratiča (*Tanacetum parthenium*), izkazal za učinkovitega zaviralca tumorske aktivnosti pri levkemijah ter solidnih tumorjih [31]. Njegova specifična značilnost je, da izzove celično smrt pri tumorskih celicah, pri zdravih pa ne, ter da zmanjša sposobnost preživetja RMC, kar so dokazali pri RMC osteosarkoma, akutne mieloične levkemije, multiplega mieloma, raka dojke, tumorja prostate ter MM [31].

Sztiller-Sikorska s sodelavci je s svojo študijo *in vitro* na melanomskih celičnih kulturah, pridobljenih iz vzorcev tkiva pacientov z nodularnim MM stadija III in IV po klasifikaciji TNM, odobreni s strani AJCC (angl. *American Joint Committee on Cancer*), dokazala, da PN zmanjša preživetje vseh melanomskih celic ter MRMC [31]. Celice ABCB5+ so bile celo bolj občutljive na zdravljenje s PN v primerjavi z ostalimi melanomskimi celicami. Pri 20% MRMC, ki so zdravljenje preživele, pa je PN zmanjšal proliferacijski potencial ter omejil njihovo zmožnost samoobnove. V primerjavi iz zpostavljenostjo melanomskih celic dakarbazinu so ugotovili, da je bilo preživetje v obeh skupinah celic po dveh dneh izpostavljenosti PN ter dakarbazinu podobno, vendar se je po treh tednih v skupini, ki je bila izpostavljena dakarbazinu, število melanomskih celic ponovno zvečalo, v skupini, izpostavljeni PN, pa ne. Ta rezultat nakazuje, da lahko zdravljenje s 6 μ M PN v treh tednih povzroči izumrtje melanomskih celic [31].

Ugotovili pa so tudi, da ima PN slabo penetracijsko sposobnost, zaradi česar ima omejeno delovanje na lahko dostopne melanomske celice, bodisi v krvnem obtoku ali tiste v bližini krvnih žil tumorja [31]. PN deluje samo na površju

melanosfer ter zaradi tega najbrž ne bi bil uspešen kot samostojno zdravilo [31]. Njegovo penetracijsko sposobnost bi morda lahko izboljšali s drugimi kemikalijami, nanodelci ali polimeri. PN bi lahko tudi inkapsulirali v modificirane liposome, ki bi prešli celično membrano in dostavili zdravilo v celico. Lahko bi tudi modificirali samo strukturo zdravila, z namenom pridobiti derivate z izboljšanimi farmakokinetičnimi lastnostmi in posledično z izboljšano farmakološko učinkovitostjo za klinično aplikacijo [31].

5 SKLEP

Transmembranski protein ABCB5 je biološki označevalec za fiziološke in patološke MC ter za napredovanje MM, saj se njegovo izražanje povečuje z razsojem bolezni. Njegova pomembna vloga pri agresivnosti ter neozdravljivosti MM se kaže v njegovi večfunkcionalnosti. Protein ABCB5 lahko z nadzorom celične fuzije preprečuje obnovo rakavega tkiva z zdravimi celicami ter lahko omogoča proliferacijo rakastih celic. Z vlogo pri zaviranju od IL-2 odvisne aktivacije T-limfocitov ter spodbujanju izločanja IL-10 omogoča celicam ABCB5+, da se lahko izognejo delovanju imunskega sistema gostitelja in posledični imunski zavrnitvi. Z vlogo v odpornosti na zdravlila daje celicam ABCB5+ prednost pri preživetju po kemoterapiji, radioterapiji in imunoterapiji v primerjavi s celicami ABCB5-. To vodi do kliničnega relapsa bolezni zaradi preživelih celic ABCB5+ pri bolnikih z navidezno ozdravljenim MM tudi nekaj let po prestali kemoterapiji, radioterapiji ali imunoterapiji [31]. Protein ABCB5 torej predstavlja povezavo med RMC, neoplastičnim napredovanjem pri MM ter rezistenco za obstoječo terapijo [3].

V prihodnosti bodo potrebne tudi klinične raziskave. Inhibicija ABCB5 z mAb bi npr. lahko v človeku senzibilizirala MRMC za uničenje s citostatiki, ki jih uporabljamo pri kemoterapevtskem zdravljenju. To bi za MM lahko predstavljalo usodni dvojni udarec, ki bi lahko prispeval k dokončni ozdravitvi tudi pri bolnikih z razsejano boleznijo. Drugo obetavno rešitev predstavlja PN, ki bi lahko zmanjšal preživetje vseh melanomskih celic v telesu, še posebej celic ABCB5+, in torej uničil tumor ter hkrati preprečil možnost ponovitve bolezni, v kolikor bi uspeli izboljšati njegove farmakokinetične lastnosti, zlasti njegovo penetracijsko sposobnost v notranjost melanomskih celic.

6 LITERATURA

- [1] Prunk T, Šalamon Š. Rakaste matične celice: ključ do uspešnejšega zdravljenja malignega melanoma? *Med. Razgl.*, vol. 53, no. 2, pp. 75–86, 2014.
- [2] Chartrain M, Rioud J, Stennevin A, et al. Melanoma chemotherapy leads to the selection of ABCB5-expressing cells. *PLoS One*, vol. 7, no. 5, p. e36762, Jan. 2012.
- [3] Ma J, Frank MH. Tumor initiation in human malignant melanoma and potential cancer therapies. *Anticancer. Agents Med. Chem.*, vol. 10, no. 2, pp. 131–6, Feb. 2010.
- [4] Herman C. Emerging technologies for the detection of melanoma: achieving better outcomes. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, vol. 5, pp. 195–212, Jan. 2012.
- [5] Hočevar M, Strojani P, Ocvirk J, et al. Smernice in klinična pot za obravnavo bolnikov z melanomom. http://www.onko-i.si/uploads/media/Melanom_smernice_in_klinicna_pot_2010.p df. Dostop: 26-03-2014.
- [6] Zorka I. Melanom kože - dijagnostika i terapija. http://www.sanamed.rs/sanamed_pdf/sanamed_5/Zorka_inic.p df Dostop: 11-06-2014.
- [7] Keber R. Vloga matičnih celic pri nastanku raka mlečne žleze. *Acta Agric. Slov.*, vol. 96, no. 1, pp. 43–51, 2010.
- [8] Clarke MF, Becker MW. Stem cells: the real culprits in cancer? *Sci. Am.*, vol. 295, no. 1, pp. 52–9, Jul. 2006.
- [9] Fang D, Nguyen TK, Leishner K, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.*, vol. 65, no. 20, pp. 9328–37, Oct. 2005.
- [10] Rožman P, Strbad M, Knežević M. Uporaba matičnih celic v medicini. <http://www.zrss.si/bzid/geni/pdf/knezevic-clanek.pdf> Dostop: 08-05-2014.
- [11] Frank NY, Pendse SS, Lapchak PH, et al. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 47, pp. 47156–65, Nov. 2003.
- [12] 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.*, vol. 71, no. 8, pp. 3098–109, Apr. 2011.
- [13] Luo Y, Dallaglio K, Chen Y, et al. ALDH1A isozymes are markers of human melanoma stem cells and potential therapeutic targets. *Stem cells.*, vol. 30, no. 10, pp. 2100–2113.
- [14] 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*, vol. 5, no. 12, p. e15183, Jan. 2010.
- [15] Kumar S, Liu S, Lu H, et al. Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. *Oncogene*, vol. 31, no. 47, pp. 4898–4911, 2012.
- [16] Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, et al. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *Eur. J. Cancer*, vol. 43, no. 5, pp. 935–46, Mar. 2007.
- [17] Schatton T, Murphy GF, Frank NY, et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, vol. 451, no. 7176, pp. 345–9, Jan. 2008.
- [18] Girouard SD, Murphy GF. Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Lab. Invest.*, vol. 91, no. 5, pp. 647–64, May 2011.
- [19] Grimm M, Krimmel M, Polligkeit J, et al. ABCB5 expression and cancer stem cell hypothesis in oral squamous cell carcinoma. *Eur. J. Cancer*, vol. 48, no. 17, pp. 3186–97, Nov. 2012.
- [20] Volpicelli ER, Lezcano C, Zhan Q, et al. The multidrug-resistance transporter ABCB5 is expressed in human placenta. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, vol. 33, no. 1, pp. 45–51, Jan. 2014.
- [21] Wilson B, Saab K, Ma J, et al. ABCB5 Maintains Melanoma-Initiating Cells through a Proinflammatory Cytokine Signaling Circuit. *Cancer Res.*, 2014.
- [22] Ozel C, Seidel J, Meyer-Staeckling S, et al. Hybrid cells derived from breast epithelial cell/breast cancer cell fusion events show a differential RAF-AKT crosstalk. *Cell Commun. Signal.*, vol. 10, no. 1, p. 10, Jan. 2012.
- [23] Tysnes BB, Bjerkvig R. Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1775, no. 2, pp. 283–97, Jun. 2007.
- [24] Bis S, Tsao H. Melanoma genetics: the other side. *Clin. Dermatol.*, vol. 31, no. 2, pp. 148–55, 2013.
- [25] Frank N, Margaryan A, Huang Y. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res.*, pp. 4320–4333, 2005.
- [26] Zipori D. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells*, vol. 23, no. 6, pp. 719–26.
- [27] Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat. Med.*, vol. 15, no. 9, pp. 1010–2, Sep. 2009.
- [28] Kawanobe T, Kogure S, Nakamura S, et al. Expression of human ABCB5 confers resistance to taxanes and anthracyclines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 418, no. 4, pp. 736–741, Feb. 2012.
- [29] Quintana E, Shackleton M, Foster HR, et al. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell*, vol. 18, no. 5, pp. 510–23, Nov. 2010.
- [30] Quintana E, Shackleton M, Sabel M. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, vol. 456, no. 7222, pp. 593–598, 2008.
- [31] Czyz M, Koprowska K, Sztiller-Sikorska M. Parthenolide reduces the frequency of ABCB5-positive cells and clonogenic capacity of melanoma cells from anchorage independent melanospheres. *Cancer Biol. Ther.*, vol. 14, no. 2, pp. 135–45, Feb. 2013.