

Received: 2014.05.06
Accepted: 2015.08.25
Published: 2016.03.04

Rak trzustki – przyczyny oporności na chemioterapię

Pancreatic cancer- mechanisms of chemoresistance

Barbara Borowa-Mazgaj

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

Streszczenie

Mimo ogromnego postępu jaki dokonał się w ciągu ostatnich dekad w diagnostyce, leczeniu i zapobieganiu wielu typom nowotworów, współczynnik przeżywalności w przypadku raka trzustki nadal pozostaje bardzo niski. Rak trzustki należy do bardzo źle rokujących i opornych na leczenie nowotworów. Wynika to w głównej mierze z braku skutecznej diagnostyki na wczesnym etapie rozwoju nowotworu oraz nieefektywnej terapii. U większości pacjentów choroba jest diagnozowana w stadium zaawansowanym, z przerzutami i tylko 15-20% chorych kwalifikuje się do chirurgicznego usunięcia guza, które wciąż pozostaje jedyną szansą na całkowite wyleczenie. Badania ostatnich lat nie przyniosły znacznego postępu w leczeniu, a standardowo stosowanym lekiem wciąż pozostaje gemcytabina lub jej kombinacje z innymi chemioterapeutykami, takimi jak erlotinib, czy kapecytabina. Mimo bardzo dobrego poznania mechanizmów śmierci komórkowej indukowanych w wyniku działania gemcytabiny i innych stosowanych chemioterapeutyków, ich skuteczność jest ograniczona, ze względu na nabywanie przez komórki nowotworowe trzustki lekooporności. Do tej pory większość mechanizmów oporności badana była pod kątem mutacji w licznych genach, podstawowych do prawidłowego funkcjonowania szlaków sygnalizacyjnych w zmienionej nowotworowo komórce. Jednak ostatnie badania sugerują istotną rolę mikrośrodowiska guza w rozwoju i utrzymaniu oporności na klasycznie stosowane chemioterapeutyki i terapie celowane. Lekooporność raka trzustki wynika z wielu mechanizmów, do których można zaliczyć: mutacje w głównych dla prawidłowego funkcjonowania komórki genach, nieprawidłową ekspresję genów, rozregulowanie podstawowych szlaków sygnalizacyjnych oraz szlaków apoptozy, zdolność do tranzycji epithelialno-mezenchymalnej (EMT), nasilony proces angiogenezy, występowanie populacji nowotworowych komórek macierzystych, czy obecność we wnętrzu guza hipoksyjnego mikrośrodowiska.

Słowa kluczowe:

rak trzustki • lekooporność • chemioterapia • cele molekularne

Summary

Despite the enormous progress made over the past decades in diagnosis, treatment and prevention of many types of tumor, the survival rate for pancreatic cancer still remains poor. Pancreatic cancer is one of the most malignant and chemotherapy-resistant tumors. That is mainly due to the lack of effective diagnosis at an early stage of tumor development and ineffective therapy. In most patients the disease is diagnosed at an advanced, metastatic stage and only 15-20% of patients are eligible for surgical removal of the tumor, which still remains the only chance for radical treatment. Studies in recent years have not yielded significant progress in the treatment of disease, and gemcitabine or its combinations with other chemotherapeutics such as erlotinib or capecitabine still remains the standard therapy. Although mechanisms of cell death induced by gemcitabine and other chemotherapeutic agents are well known, their

	effectiveness is limited due to the acquisition of drug resistance by pancreatic cancer cells. So far, mechanisms of resistance have been tested for mutations in many genes – the key to proper functioning of signaling pathways in cancer cells. However, recent studies suggest a significant role of the tumor microenvironment in the development and maintaining resistance to conventionally used chemotherapeutic and targeted therapies. Drug resistance of pancreatic cancer results from multiple mechanisms, which may include the following: mutations in key genes, aberrant gene expression, deregulation of key signaling pathways, apoptotic pathways, the capacity for epithelial-mesenchymal transition (EMT), increased angiogenesis, the presence of cancer stem cells or the presence of a hypoxic microenvironment inside the tumor.
Key words:	pancreatic cancer • drug resistance • chemotherapy • molecular targets
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1196387
Word count:	3358
Tables:	1
Figures:	1
References:	92

Adres autorki: mgr inż. Barbara Borowa-Mazgaj, Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Technologii Leków i Biochemii, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk; e-mail: barborow@pg.gda.pl

Wykaz skrótów: **5-FU** - 5-fluorouracyl; **ABC1/MDR1** – białko błonowe z kasetą wiążącą ATP z podrodziny B1/białko oporności wielolekowej 1 (ATP-binding cassette, subfamily B, member 1; multidrug resistance 1); **Akt** – serynowo-treoninowa kinaza białkowa; **AP-1** – jądrowy czynnik transkrypcyjny; **BCRP** – białko oporności lekowej w raku piersi (breast cancer resistance protein); **BRCA-2** – ludzki gen umiejscowiony na chromosomie 13; **COX -2**- cyklooksygenaza 2; **CSC** – nowotworowe komórki macierzyste (cancer stem cells); **DPC4** – znany również jako Smad4 gen supresorowy; **EGFR** – naskórkowy czynnik wzrostu; **EMT** – tranzycja epitelialno-mezenchymalna; **HIF-1 α** – czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją; **KRAS** – wirusowy onkogen szczurzego mięsaka Kirstena (Kirsten rat sarcoma virus oncogene); **NF- κ B** – jądrowy czynnik transkrypcyjny; **TGF- β** – transformujący czynnik wzrostu β ; **uPa** – tkankowy aktywator plazminogenu typu urokinazy.

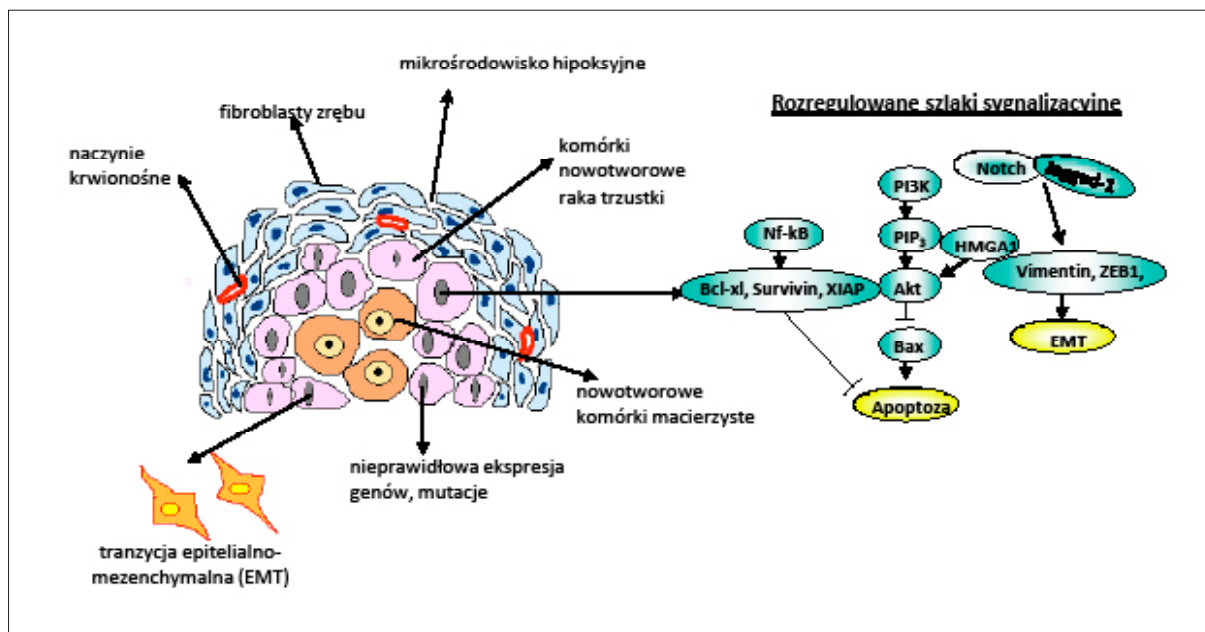
WSTĘP

Rak trzustki, należący do bardzo źle rokujących i opornych na leczenie nowotworów, znajduje się obecnie na czwartym miejscu pod względem umieralności spowodowanej nowotworami w Stanach Zjednoczonych i według najnowszych prognoz, do 2020 r. będzie już drugą przyczyną zgonów [2,86]. Szacuje się, że prawie 73% pacjentów cierpiących na ten nowotwór umrze w ciągu pierwszego roku od zdiagnozowania choroby, a pięcioletni współczynnik przeżywalności wynosi jedynie 5% [2]. Tak złe rokowania wynikają m.in. z późnej diagnozy, gdyż ten typ nowotworu zazwyczaj nie daje specyficznych objawów przez wiele lat.

Etiologia raka trzustki nie jest do końca poznana, jednak wiadomo, że na rozwój choroby ma wpływ wiele czynników, zarówno środowiskowych jak i genetycznych. Środowiskowymi czynnikami ryzyka zachorowania na raka trzustki są przede wszystkim: podeszły wiek, palenie tytoniu, cukrzyca, wysokobiałkowa i wysokotłuszczowa dieta (otyłość), ekspozycja na węglowodory i pochodne ropy,

przewlekłe stany zapalne, infekcje, czy przebyta cholecystektomia [68]. Genetyczne predyspozycje do raka trzustki przejawiają się: wcześniej występujące zmiany w obrębie trzustki, takie jak dziedziczne zapalenie trzustki oraz cystis fibrosis, występowanie zespołów genetycznych, takich jak zespół zespół Peutza-Jeghersa, FAMMM, czy zespół HBOC i w końcu rodzinny rak trzustki, w rodzinach w których wystąpiły dwa lub więcej przypadków raka trzustki wśród krewnych pierwszego stopnia [45].

Obecna terapia nowotworu obejmuje: operacyjne usunięcie guza, radioterapię i chemioterapię. Najbardziej zadowalające rezultaty daje chirurgiczne usunięcie guza, które z powodu braku wczesnej diagnozy jest możliwe jedynie u 15% pacjentów. Najważniejszymi chemioterapeutykami stosowanymi w walce z chorobą od wielu lat pozostają 5-fluorouracyl i gemcytabina oraz ich kombinacje z innymi lekami, takimi jak: cisplatyna, kapecytabina, dokso-rubicyna czy erlotinib [48,63]. W związku z tym, że wyniki leczenia nadal są niezadowalające, do priorytetowych obszarów badawczych związanych z terapią raka trzustki należą: identyfikacja biomarkerów umożliwiających



Ryc. 1. Główne przyczyny lekooporności raka trzustki [58]

wczesne wykrycie nowotworu (wykorzystując próbki od pacjentów, u których w rodzinie zanotowano przypadki wystąpienia raka trzustki), poszukiwanie leków, dla których celem molekularnym będą konkretne geny, których mutacje odpowiadają za rozwój choroby, lepsze poznanie wpływu mikrośrodowiska guza na działanie leków i rozwój lekooporności oraz wykorzystanie układu immunologicznego pacjenta w walce z nowotworem.

LEKOOPORNÓŚĆ RAKA TRZUSTKI

Lkooporność raka trzustki wynika z wielu mechanizmów, do których można zaliczyć m.in.: mutacje w podstawowych dla prawidłowego funkcjonowania komórki genach, nieprawidłową ekspresję genów, rozregulowanie najważniejszych szlaków sygnalizacyjnych, takich jak: NF-κB, Notch, Akt, czy szlaków apoptozy, tranzycję epithelialno-mezenchymalną (EMT) odpowiedzialną za zdolność nowotworu do przerzutowania i obecność nowotworowych komórek macierzystych, nasilony proces angiogenezy, czy obecność we wnętrzu guza hipoksyjnego mikrośrodowiska [ryc.1] [58]. W pracy omówiono główne mechanizmy odpowiedzialne za lekooporność raka trzustki i wskazano próby jej przełamania.

Mutacje w głównych genach

Rak trzustki jest chorobą, w której mutacje w genach supresorowych, onkogenach i genach mutatorowych prowadzą do nowotworowej transformacji komórek nabłonka gruczołowego przewodów trzustkowych. Mutacje i inaktywacja genów supresorowych wywołują niestabilność genetyczną i zwiększoną proliferację komórek. Najczęstsze mutacje w raku trzustki dotyczą onkogenów: *K-RAS* (75-100% przypadków), *HER-2/neu* (30%), *Akt-2* (10-20%),

COX-2, *Notch 1* oraz genów supresorowych: *p16INK4a* (do 80%), *p53* (60%), *DPC4/SMAD4* (około 50%) oraz *BRCA-2* (7-10%) [54,84]. Rola mutacji wybranych genów w rozwoju raka trzustki i leczeniu choroby przedstawiono w tabeli 1.

MikroRNA

MiRNA (mikroRNA) są jednoniciowymi cząsteczkami niekodującego RNA o długości 18-24 nukleotydów, których rolą jest obniżenie ekspresji genów na etapie translacji informacji genetycznej. Wykazano, że różne rodzaje miRNA odgrywają istotną rolę w patogenezie nowotworów [13]. Zaburzenie regulacji miRNA zaobserwowano również w komórkach nowotworowych trzustki. Bloomston i wsp. wykazali, że na podstawie poziomu mikroRNA możliwe jest odróżnienie raka trzustki od przewlekłego zapalenia trzustki [8]. Ponadto określenie poziomu ekspresji 95 miRNA w guzie trzustki, liniach komórkowych raka trzustki, tkance trzustki oraz w komórkach nabłonka przewodów trzustkowych wskazało na zaburzoną ekspresję ośmiu miRNA w tkance i w komórkach nowotworowych, w porównaniu do zdrowej tkanki i komórek przewodów trzustkowych [92].

Biorąc pod uwagę, że odmienna ekspresja miRNA pozwala zróżnicować tkankę zmienioną nowotworowo od prawidłowej tkanki trzustki, spekulowano, że na tej podstawie będzie można również przewidzieć rokowania pacjentów i odpowiedź na leczenie. Badania przeprowadzone na tkankach pozyskanych z nowotworu trzustki wykazały, że 6 rodzajów miRNA ulega odmiennie ekspresji u pacjentów z dłuższym czasem przeżycia (ponad 2 lata). Na przykład pacjenci z nadekspresją miR-196a-2 wykazywali średnią medianę przeżycia 14,3 miesiąca w porównaniu z 26,5 miesiąca dla pacjentów z niską ekspresją miR-196a-2. Po-

Tabela 1. Geny najczęściej zmutowane w raku trzustki i ich rola w rozwoju choroby

Gen	Lokalizacja	Mutacje [%]	Funkcje genu	Rola mutacji w raku trzustki
<i>K-RAS</i>	12p13	>90	<i>K-RAS</i> pełni rolę molekularnego „przełącznika”. W stanie aktywnym jest związany z GTP, co skutkuje aktywacją efektorów RAS: RAF-MEK-ERK i PI3K. W prawidłowych warunkach układ RAS aktywowany jest chwilowo ze względu na niską wewnętrzną aktywność GTP-azy. Działanie białka GAP stymuluje hydrolizę GTP, przekształcając go w GDP, co doprowadza do inaktywacji białka [5,12]	Mutacje w genie <i>K-RAS</i> należą do najwcześniejszych i najczęściej spotykanych mutacji związanych z rozwojem raka trzustki. Są czynnikiem prognozującym skuteczność leczenia gemcytabiną w połączeniu z erlotinibem. Wykazano, że wyciszenie <i>K-RAS</i> techniką siRNA prowadziło do zmniejszenia proliferacji komórek nowotworowych i objętości guza u myszy. Ponadto, komórki raka trzustki ze zmutowaną postacią genu cechują się wysokim, konstytutywnym poziomem autofagii, nawet w przypadku wystarczającej liczby składników odżywczych. Jest to mechanizm promujący przeżycie komórki, a jego blokowanie z użyciem inhibitorów, takich jak chlorochina czy hydroksychlorochina w połączeniu z innymi chemioterapeutykami jest obecnie przedmiotem wielu badań klinicznych [22,48]
<i>p16</i>	9p21	80	Produkt genu <i>16INK4a</i> hamuje oddziaływanie cykliny D z kinazami CDK4 i CDK6 oraz zatrzymuje komórki w fazie G1/S cyklu komórkowego. W prawidłowych komórkach kompleks cyklinyD/CDK4 fosforyluje białko Rb1, nie dopuszczając do utworzenia kompleksu E2F-Rb1. W wyniku uszkodzenia DNA dochodzi do zablokowania przez <i>p16</i> kompleksu kinazy z cykliną, białko Rb1 nie ulega fosforylacji, co ostatecznie hamuje cykl komórkowy w fazie G1/S [84]	Mutacje genu <i>p16</i> wśród wszystkich nowotworów z największą częstotliwością spotykane są w rakach trzustki. Utrata aktywności genu przyczynia się do złośliwości nowotworu (mniej zróżnicowane komórki), krótszego przeżycia pacjentów i obecności przerzutów. Polimorfizm genu związany jest z szybszą progresją nowotworu i słabszą odpowiedzią na terapię [65]. Przywrócenie prawidłowych funkcji genu <i>p16</i> rozpatrywane jest jako jedna ze strategii terapeutycznych, bowiem wprowadzenie funkcjonalnego genu w ksenoprzeszczepach komórek linii AsPC-1 u myszy przyczyniło się do wydłużenia czasu przeżycia gryzoni i zmniejszenia objętości guza [35]
<i>p53</i>	17p13	50-75	Produkt genu, białko <i>p53</i> jest czynnikiem transkrypcyjnym o właściwościach supresora nowotworowego. Zaangażowane jest w regulację wielu procesów związanych z aktywacją mechanizmów naprawy DNA czy indukcją apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Stężenie białka w komórce podlega ciągłej regulacji, głównie przez ligazę Mdm2 [24,47,49]	Badania wykazały krótszy czas przeżycia pacjentów noszących mutacje w genie <i>p53</i> w porównaniu do pacjentów <i>p53</i> (-). Inaktywacja genu <i>p53</i> wiąże się również z opornością na leczenie 5-fluorouracylem i gemcytabiną [21], a także sprzyja tworzeniu przerzutów i nabyciu oporności na indukcję przyspieszonego starzenia komórkowego i zahamowanie cyklu życiowego [61]
<i>SMAD4</i>	18q21	50	<i>SMAD4</i> jest genem supresorowym i uczestniczy w przekazywaniu sygnału na szlaku transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β) i jego ligandów [17]	Inaktywacja genu <i>SMAD4</i> w raku trzustki jest związana z jego złośliwością. Przywrócenie prawidłowej funkcji genu w ksenoprzeszczepach raka trzustki na nagie myszy powodowało zahamowanie angiogenezy i zmniejszenie inwazyjności nowotworu [68]
<i>HER-2</i>	17q21	20-25	Gen ludzkiego receptora-2 dla naskórkowego czynnika wzrostu (<i>HER2</i> znany także jako <i>neu</i> i <i>c-erbB-2</i>) koduje przezbłonową glikoproteinę o aktywności kinazy tyrozynowej, która bierze udział w kontroli wzrostu i różnicowania się komórek [40]	W prawidłowych komórkach przewodów trzustkowych nadekspresja <i>HER-2</i> występuje sporadycznie. Stopniowy wzrost częstości jej występowania obserwuje się począwszy od hiperplazji (55%) i dysplazji przewodów trzustkowych (67%) do raka inwazyjnego włącznie (80%). W raku naciekającym średnio zróżnicowanym obserwowano ją w 69% przypadków, a w nisko zróżnicowanym nie stwierdzono jej wcale. Wskazuje to na udział genu we wczesnych etapach onkogenezy i jego związek ze stopniem zróżnicowania guza [13]
<i>BRCA2</i>	13q12	7	Białko kodowane przez <i>BRCA-2</i> bierze udział w naprawie DNA (naprawie przez rekombinację uszkodzeń obu nici DNA) [54]	U nosicieli mutacji w genie <i>BRCA2</i> zaobserwowano zwiększone ryzyko rozwoju raka trzustki [91]

dobnie średni czas przeżycia pacjentów z wysoką ekspresją miR-219 wynosił około 13 miesięcy w porównaniu z 24 miesiącami u osób z obniżoną ekspresją [88].

Przykładem mikroRNA, wykazującego podwyższoną ekspresję w komórkach nowotworowych trzustki jest miR21 będący negatywnym regulatorem ekspresji PTEN (phosphatase and tensin homolog), PDCD4 (programmed cell death protein 4) oraz TIMP3 (metallopeptidase inhibitor 3). Nadekspresja miR21 prowadzi więc do zahamowania apoptozy i wzrostu inwazyjności nowotworu [88]. Skutkiem inhibicji jego ekspresji jest m.in. spadek proliferacji i chemiooporności komórek oraz zahamowanie cyklu komórkowego i indukcja apoptozy [64]. Shao i wsp., po przywróceniu prawidłowej ekspresji miR-132 w komórkach raków trzustki obserwowali zahamowanie proliferacji i zdolności do tworzenia kolonii [88]. Yu i wsp. wykazali, że miR-96 ulega obniżonej ekspresji w tkance nowotworowej trzustki w porównaniu do prawidłowej tkanki, a jego celem molekularnym jest szlak sterowany przez białko KRAS. Przywrócenie prawidłowej ekspresji miR-96 silnie hamowało proliferację komórek, inwazyjność nowotworu, indukowało apoptozę i ograniczało wzrost guza [91]. Podejmowano również udane próby wyciszenia genu kodującego miR-34a, bezpośrednio regulowanego przez p53 i odgrywającego istotną rolę w zdolności nowotworowych komórek macierzystych trzustki do samoodnawiania się [17].

Nowotworowe komórki macierzyste

Guz nowotworowy nie jest jednorodną strukturą. W jego obrębie można znaleźć subpopulacje komórek różniących się genotypem i fenotypem. Jedną z subpopulacji są komórki, które mimo ograniczonej zdolności do podziałów, mogą odpowiadać za inicjację i progresję procesu nowotworzenia. Ze względu na ich zdolność do różnicowania i nieograniczonej liczby podziałów, nazwano je nowotworowymi komórkami macierzystymi (cancer stem cells - CSC). Nowotworowe komórki macierzyste, podobnie jak prawidłowe komórki macierzyste mają unikalne zdolności do proliferacji, multipotencji i samoodnawiania. Ponadto, cechują się dużą aktywnością transporterów ABC, odpowiadających za usuwanie poza komórkę czynników szkodliwych, w tym i leków przeciwnowotworowych [56]. Obecnie z coraz większym sukcesem izoluje się macierzyste komórki nowotworowe, a następnie bada ich genotyp i fenotyp, co przekłada się na rozwój nowych strategii terapeutycznych, pozwalających zniwelować zjawisko chemiooporności wywołane przez właściwości tych komórek [75].

W przypadku raka trzustki w wyniku stosowania radioterapii i chemioterapii obserwowano wzrost populacji komórek o charakterze nowotworowych komórek macierzystych. Na podstawie ekspresji określonych markerów na powierzchni komórki, wyizolowano komórki o fenotypie: CD44, CD24, CD133 i ESA [33,53]. Shah i wsp. wykazali, że w komórkach niewrażliwych na działanie gemcytabiny dochodzi do ekspresji markerów charak-

terystycznych dla komórek macierzystych, takich jak: CD44, CD24 i ESA [79]. Inni badacze obserwowali zwiększenie populacji komórek linii L3.6p z markerem CD133+ po traktowaniu gemcytabiną. Podwyższoną ekspresję tych markerów stwierdzono również w ksenoprzeszczepach raków trzustki u myszy, poddanych działaniu gemcytabiny i promieniowania jonizującego [82]. W innym eksperymencie z użyciem linii komórkowej raka trzustki Panc-1 wykazano, że komórki z markerami powierzchniowymi CD24 i CD44 miały wyższy potencjał tumorogenny niż komórki CD24- i CD44- [35].

CSC trzustki wykazują pewne podobieństwa do komórek macierzystych innych nowotworów, aczkolwiek wykazano wiele cech swoistych tylko dla tego typu nowotworu. Powszechnie stosowane terapie przeciwnowotworowe, takie jak radioterapia, czy chemioterapia zwalczają jedynie szybko rosnące komórki nowotworowe, nie uszkadzając inicjujących ich powstawanie, czego następstwem jest nabywanie przez pozostałe komórki oporności na leczenie i nawrót choroby. Niezbędne są terapie nakierowane na nowotworowe komórki macierzyste trzustki, a dokładne zbadanie szlaków sygnalizacyjnych w tych komórkach pozwoli wskazać najlepszy cel molekularny. Do tej pory zidentyfikowano kilka szlaków sygnalizacyjnych i genów ulegających wybiórczej ekspresji w CSC w porównaniu do pozostałych komórek nowotworowych trzustki. Jednym z przykładów jest gen *c-Met*. *C-Met* jest protoonkogenem kodującym białko HGFR (hepatocyte growth factor receptor) mające aktywność kinazy tyrozynowej. Poziom *c-Met* jest znacznie wyższy w tkance nowotworowej trzustki niż w prawidłowej tkance i jest związany z inwazyjnością i wzrostem nowotworu. Zastosowanie chemicznego inhibitora *c-Met*: XL-184 lub wyciszenie genu z użyciem techniki siRNA prowadziło do indukcji apoptozy i zahamowania progresji komórek w cyklu życiowym, co wskazuje na istotną rolę genu *c-Met* w utrzymaniu populacji CSC w raku trzustki [34]. Podobną sytuację, w warunkach *in vivo* obserwowano po zahamowaniu receptorów Nodal/Activin: Alk-4 i Alk-7 przez inhibitor SB431542. Komórki nowotworowe L3.6pl traktowane wstępnie inhibitorem SB431542, a następnie gemcytabiną, przeszczepiono na bezgraniczne myszy, co skutkowało wyraźnym wzrostem populacji komórek apoptotycznych o fenotypie CD133⁺ i ograniczeniem wzrostu guza u myszy. Traktowanie komórek samym inhibitorem lub gemcytabiną, nie dawało podobnego wyniku [57]. Zastosowanie takiego schematu leczenia może być wyzwaniem, biorąc pod uwagę obfite podścielisko pierwotnej tkanki nowotworowej trzustki i utrudniony dostęp chemioterapeutyków do wnętrza guza [70]. Ponadto 50% pacjentów cierpiących na raka trzustki nosi mutacje w genie *Smad 4*, znajdującym się pod kontrolą genów Nodal/Activin. Wyciszenie genu *Smad 4*, techniką siRNA w komórkach nowotworowych z aktywną postacią tego genu powodowało zmniejszenie populacji komórek nowotworowych, głównie w wyniku zahamowania szlaku Nodal/Activin. Z tego powodu, gen *Smad 4* jest niezbędnym elementem szlaku sygnalizacyjnego Nodal/Activin, a mutacje w jego obrębie czynią komórki niewrażliwe na inhibitory receptorów Alk-4 i Alk-7.

Wykazano również, że nie wszystkie mutacje powodują dysfunkcję genu i część nowotworów ze zmutowanym genem *Smad 4* ma aktywny szlak sygnalizacyjny *Smad2/3*, co warunkuje wrażliwość pacjentów o takim genotypie na tego typu terapię [57].

Tranzycja epithelialno-mezenchymalna

Podczas, gdy większość nowotworów złośliwych wywodzi się z tkanki nabłonkowej, już dawno potwierdzono, że zdolne do migracji i przerzutowania komórki tych nowotworów wykazują cechy komórek mezenchymalnych, co świadczy o istnieniu tranzycji fenotypu komórek w czasie rozwoju nowotworu [87]. Podczas tranzycji epithelialno-mezenchymalnej (EMT) dochodzi do utraty markerów nabłonkowych, takich jak: E-kadheryna, niektóre cytokeratyny, kładyny czy okładyny. Pojawiają się natomiast markery mezenchymalne, takie jak: N-kadheryna, wimentyna czy fibronektyna [44].

EMT występuje podczas prawidłowego płodowego procesu rozwojowego i jest niezbędna do tworzenia mezodermy. W ostatnich latach EMT obserwuje się również w procesach chorobowych, zwłaszcza w gojeniu się ran, regeneracji narządu, zwłóknieniu tkanki czy rozwoju nowotworu [44]. EMT odgrywa istotną rolę w kilku etapach rozwoju nowotworu [39]. Po pierwsze, komórki nabywają zdolności do migracji, dzięki czemu mogą oderwać się od reszty populacji komórek. Po drugie, tranzycja umożliwia komórkom dostęp do węzłów chłonnych, czy naczyń krwionośnych, a po trzecie umożliwia ponowne opuszczenie krwiobiegu i utworzenie mikroprzerzutów [40].

Obecnie istnieją dowody na występowanie EMT w kilku nowotworach przewodu pokarmowego [67]. W przypadku raka trzustki badania wykazały sprzeczne wyniki. Javle i wsp. [43] obserwowali związek między niskim przeżyciem pacjentów a markerami EMT (wysoki poziom fibronektyny, wimentyny i niski E-kadheryny) w 36 próbkach operacyjnie usuniętych guzów trzustki. W związku z tym wykazano, że niski poziom E-kadheryny może być markerem prognozującym przerzutowanie raka trzustki, jednak tylko z tkankowym aktywatorem plazminogenu typu urokinazy (uPa) [81]. W innych badaniach wykazano obecność N-kadheryny nieulegającej ekspresji w prawidłowej tkance trzustki w 13 spośród 30 próbek [66]. Niestety dane na temat markerów EMT w raku trzustki nie są tak jednoznaczne jak w przypadku innych nowotworów. Wynika to z niejednorodnej grupy pacjentów, małej liczby próbek, czy różnych podejść metodologicznych. Ponadto, trzeba wziąć pod uwagę trudną detekcję komórek o fenotypie EMT i ich zdolność do szybkiej rewersji [42].

Od pewnego czasu coraz więcej danych wskazuje na znaczenie EMT w lekooporności nowotworów. Przemawiają za tym badania, na podstawie których wykazano, że komórki, które zostały poddane EMT są bardziej odporne na leki, a zahamowanie tranzycji prowadzi nie tylko do zmniejszenia potencjału inwazyjnego, ale również zwiększonej wrażliwości na lek [77]. I tak np. komórki raka

trzustki linii AsPC-1 i L3.6pl inkubowane ze wzrastającymi stężeniami gemcytabiny wykazywały cechy charakterystyczne dla EMT [78]. Ponadto, po wykonaniu profilu ekspresji genów w komórkach opornych i wrażliwych na działanie gemcytabiny, 5-fluorouracylu czy cisplatyny, w przypadku komórek opornych obserwowano cechy charakterystyczne dla EMT [4]. Dodatkowo wykazano, że EMT jest indukowana w warunkach niedotlenienia, które są również związane z lekoopornością nowotworów [14] oraz występowaniem zależności między EMT, a nabyciem przez komórki właściwości macierzystych komórek nowotworowych [78].

Hipoksja

Mikrośrodowisko hipoksyjne jest cechą guzów litych, w których podaż tlenu jest zmniejszona lub całkowicie zniesiona. Większość guzów o średnicy przekraczającej 1mm³ zawiera regiony niedotlenienia, powstałe na skutek nieuporządkowanej struktury naczyń krwionośnych i utrudnionej dyfuzji [36]. Liczne badania potwierdziły, że guzy lite mające regiony niedotlenienia mają znacznie gorsze rokowania niż guzy prawidłowo utlenowane, niezależnie od zastosowanej metody leczenia [37]. Przyczyną tego są zmiany genetyczne zachodzące w komórkach, które umożliwiają im przeżycie w warunkach niedoboru tlenu i skutkują nabyciem bardziej złośliwego fenotypu. Do szlaków biologicznych regulowanych przez geny aktywowane hipoksją, znajdujące się głównie pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego indukowanego hipoksją (HIF-1 α) zaliczyć można: apoptozę, cykl komórkowy, angiogenezę, glikolizę i regulację pH, a część z nich jest związana z nabyciem przez komórki lekooporności [15,59].

Hipoksja w guzie trzustki po raz pierwszy została potwierdzona przez Koonga i wsp. w 2000 r., kiedy zmierzono poziom utlenowania wewnątrz guza trzustki w czasie jego resekcji u siedmiu pacjentów. W obrębie guza pO₂ wahało się w granicach 0-5,3 mmHg, podczas gdy w sąsiadującej, prawidłowej tkance trzustki mieściło się w granicach 24-92,7 mm Hg [47]. Inni naukowcy potwierdzili aktywację HIF-1 α w raku trzustki, w odpowiedzi na niską podaż tlenu zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Zastosowanie selektywnego inhibitora HIF-1 α w połączeniu z radioterapią powodowało wzmożoną śmierć komórek nowotworowych trzustki [23]. W linii komórkowej raka trzustki Capan-2 wstępnie zidentyfikowano trzy geny aktywowane *in vitro* w warunkach hipoksji: *GPI/NLK/AMF* (glucose phosphate isomerase/interleukin/autocrine motility factor), *DEC 1* (deleted in esophageal cancer 1), i *heksokinazę II*. Obecnie trwają badania mające na celu wyjaśnienie ich roli w rozwoju i progresji raka trzustki [23]. Hipoksja jest uważana za jedną z przyczyn oporności raka trzustki na gemcytabinę, co wynika m.in. z aktywacji NF- κ B indukowanego niedotlenieniem. Ponadto, warunki niedotlenienia mogą indukować tranzycję epithelialno-mezenchymalną komórek raka trzustki związaną z inwazyjnością nowotworu, przerzutowaniem oraz powstawaniem nowotworowych komórek macierzystych [76]. Najnowsze badania wskazują, że w warunkach niedotlenienia docho-

dzi również do wzrostu cytokin prozapalnych. Shi i wsp. wykazali, że komórki nowotworowe trzustki, w których dochodziło do wzrostu ekspresji IL-8 tworzyły większe guzy z odleglejszymi przerzutami w ortotopowym modelu mysim. Immunohistochemiczne analizy guzów wykazały, że do wzrostu ekspresji IL-8 dochodziło w pobliżu martwicy nowotworu, o kwaśnym pH i obniżonym poziomie tlenu dyfuzyjnego i składników odżywczych. Zahamowanie ekspresji IL-8 w wyniku zastosowania antysensownych oligonukleotydów zmniejszało wzrost guza i angiogenezy w warunkach *in vivo* [80]. W innych badaniach określono wpływ niedotlenienia guza na zdolność do przerzutowania i ekspansję raka trzustki. Wykazano obecność niedotlenienia nie tylko we wnętrzu guza, ale również jego wpływ na inwazyjność komórek położonych w peryferyalnych częściach guza [10].

Oporność wielolekowa

Zjawisko oporności wielolekowej (MDR – multidrug resistance) jest głównym mechanizmem, dzięki któremu komórki nowotworowe stają się niewrażliwe na powszechnie stosowane chemioterapeutyki. Oporność na chemioterapię wynika m.in. z obecności w błonie komórek nowotworowych pomp, odpowiedzialnych za aktywny transport leków na zewnątrz lub do wnętrza komórek, przez co m.in. lek lub jego aktywny metabolit zbyt wczesnie usunięty z komórki nie wywiera zamierzonego działania terapeutycznego. Białka transportowe z rodziny białek ABC (ATP-binding cassette transporters), do których zaliczyć można: ABCB1 (białko oporności wielolekowej 1, MDR1), ABCC (białko oporności wielolekowej, MRP), ABCG2 (białko oporności lekowej w raku piersi - breast cancer resistance protein, BCRP) są uważane za główne białka odpowiedzialne za chemiooporność komórek nowotworowych [16]. Część z tych pomp bierze udział w wydalaniu na zewnątrz komórki nowotworowej, takich leków jak gemcytabina i 5-fluorouracyl, które od lat pozostają jednymi z podstawowych chemioterapeutyków wykorzystywanych w leczeniu chorych z rakiem trzustki [85].

Białka transportowe ABC ulegające podwyższonej ekspresji w raku trzustki to m.in. MRP 1, 3, 4 oraz 5, a także BCRP. Wykazano znacznie wyższy poziom mRNA dla MRP5 (białko odpowiedzialne za oporność na 5-FU) w tkance nowotworowej trzustki w porównaniu z tkanką prawidłową [46]. Wewnątrz komórki 5-FU przekształcany jest do 5'-fluoro-2'-deoxyuridy (5-FdUrd), która ulega fosforylacji z udziałem kinazy tymidynowej do monofosforanu 5'-fluoro-2'-deoxyuridy (5-FdUMP), będącego jednym z aktywnych metabolitów 5-fluorouracylu. Badania z wykorzystaniem pęcherzyków błonowych wyizolowanych z komórek transfekowanych genem MRP5, wykazały, że białko to w sposób zależny od ATP transportuje 5-FdUMP na zewnątrz komórki, uniemożliwiając tym samym dostateczną ekspozycję komórek na chemioterapeutyk [73]. Wyciszenie genu MRP5 z zastosowaniem techniki siRNA przywracało wrażliwość komórek nowotworowych trzustki na 5-fluorouracyl [29]. Obecnie dostarczenie siRNA do docelowego organu jakim jest np. trzustka może przyspa-

rać wiele trudności i tego typu leczenie jest jeszcze nie-realne. Większy potencjał w odniesieniu do zastosowania klinicznego zdają się wykazywać małowcząsteczkowe inhibitory transporterów ABC. W ciągu ostatnich dziesięciu lat, ponad 70% znanych inhibitorów ABC transporterów stanowiły związki pochodzenia naturalnego oraz ich syntetyczne pochodne [82]. Jednym z przykładów związków fitochemicznych, będących silnymi inhibitorami kilku transporterów ABC (m.in. Pgp, MRP1 i BCRP) jest kurkumina [3,55]. Gemcytabina, oraz 5-fluorouracyl skojarzone w terapii z kurkumina wykazywały większą aktywność przeciwnowotworową zarówno na modelach *in vitro* jak i *in vivo* [7,50,71]. W innych badaniach nad opornością komórek nowotworowych trzustki na gemcytabinę i 5-FU wykazano, że

- długotrwałe traktowanie komórek nowotworowych trzustki gemcytabiną lub gemcytabiną skojarzoną z 5-fluorouracylem w dawkach stosowanych klinicznie wpływa na poziom ekspresji transporterów błonowych,
- nabyta oporność komórek nowotworowych na gemcytabinę jest związana z obniżoną lub zwiększoną ekspresją odpowiednich transporterów, w zależności od rodzaju komórek oraz że
- MRP5 odpowiada za oporność komórek na gemcytabinę, co wykazano na modelach komórek nowotworowych z nadekspresją tego genu i po jego wyciszeniu.

Komórki z nadekspresją MRP5 były bardziej odporne na gemcytabinę, podczas gdy wyciszenie genu skutkowało zwiększoną wrażliwością komórek na chemioterapeutyk [30].

Metabolizm komórek nowotworowych

Komórki nowotworowe mają zdolność do syntezy niezbędnej puli aktywnych biologicznie lipidów, niezależnie od szlaków regulujących ich syntezę w prawidłowych komórkach [22]. Mają zdolność zwłaszcza do syntezy dużej ilości niezbędnych produktów pośrednich wykorzystywanych następnie do syntezy aktywnych biologicznie związków wspomagających proliferację komórek [5] i zdolnych do generowania kwasów tłuszczowych, sfingolipidów, lizolipidów, fosfoinozytów błonowych oraz cholesterolu w wyniku lipogenezy *de novo* (synteza lipidów z substratów nielipidowych) [5,61]. Aktywność biologiczna tych związków jest związana ze szlakami sygnalizacyjnymi zaangażowanymi w rozwój nowotworu i proces przerzutowania, a więc przyczyny ich nietypowej syntezy w komórkach nowotworowych są przedmiotem wielu badań [5]. Wiele cech charakterystycznych dla komórek nowotworowych, takich jak: odmienny metabolizm glukozy, synteza kwasów tłuszczowych, czy glutaminoliza są związane z ich opornością na leczenie. Biorąc to pod uwagę, wykorzystanie metabolizmu komórek nowotworowych jako nowego celu terapeutycznego przez zastosowanie np. kombinacji chemioterapeutyków z inhibitorami metabolizmu komórkowego może stanowić obiecującą stra-

tegię przewycięzania lekooporności wielu nowotworów, w tym raka trzustki.

W przypadku raka trzustki wykazano pozytywną korelację między ekspresją FASN, a opornością na chemio- i radioterapię [90]. Syntaza kwasów tłuszczowych (FASN) jest enzymem katalizującym syntezę kwasu palmitynowego, niezbędnego do syntezy fosfolipidów – lipidowych składników błon komórkowych. Ekspresja genu kodującego FASN w tkankach osób dorosłych jest bardzo niska lub prawie niewykrywalna. Zwiększoną ekspresję enzymu obserwuje się natomiast w komórkach nowotworowych, a produkty metaboliczne kompleksu FASN bardzo szybko są zużywane przez proliferujące komórki nowotworowe, co potwierdza, że ekspresja FASN jest ważnym czynnikiem warunkującym wzrost i przeżycie komórek nowotworowych, a sam FASN określany jest mianem metabolicznego onkogenu [25]. Wpływ nadekspresji FASN na oporność komórek nowotworowych trzustki potwierdzono wyciszając gen kodujący enzym techniką siRNA lub stosując inhibitor enzymu – orlistat, czego skutkiem było przywrócenie wrażliwości komórek nowotworowych trzustki na gemcytabinę i radioterapię [90].

Innym podejściem terapeutycznym mogącym mieć zastosowanie w raku trzustki jest zmniejszenie puli lipidów komórkowych w wyniku działania chemioterapeutyków, czy nadekspresji enzymów odpowiedzialnych za ich metabolizm. Liczne badania wykazały, że lipidy są niezbędne do proliferacji komórek nowotworowych trzustki, co jest związane m.in. z mutacją w genie *K-RAS* [6,18,60]. Enzymami odpowiedzialnymi m.in. za metabolizm lipidów są UDP - glukuroniltransferazy (UGTs). UGTs są enzymami II fazy metabolizmu, przeprowadzającymi glukuronidację substratów, a co za tym idzie zwiększającymi ich polarność i umożliwiającymi ich wydalenie z organizmu [27]. UGTs metabolizują i detoksyfikują nie tylko ksenobiotyki i związki pochodzenia endogennego, ale przede wszystkim

biorą udział w regulacji poziomu lipidów komórkowych odgrywających istotną rolę we wzroście i różnicowaniu się komórek nowotworowych [11,62,74]. Określenie poziomu ekspresji enzymów metabolizujących lipidy w komórkach nowotworowych trzustki i transfekcja komórek enzymami UGT, których ekspresji nie stwierdzono, powoduje zahamowanie proliferacji komórek w wyniku zmniejszenia puli lipidów niezbędnych do ich prawidłowego wzrostu [20].

PODSUMOWANIE

Rak trzustki jest wyniszczającą chorobą charakteryzującą się agresywnym przebiegiem, dużą inwazyjnością, szybką progresją i opornością na konwencjonalnie stosowane terapie. Rozwój nowych metod biologii molekularnej pozwolił lepiej poznać patogenezę choroby i wskazała główne geny związane z jej rozwojem. Coraz więcej wiadomo również na temat molekularnych mechanizmów leżących u podstaw lekooporności raka trzustki, a wiedza ta może pomóc naukowcom opracowywać nowe strategie w celu pokonania zjawiska lekooporności. Obiecującymi regulatorami lekooporności w raku trzustki mogą się okazać mikroRNA, gdyż przez regulację ekspresji swoistych miRNA możliwa byłaby selektywna i ukierunkowana eliminacja komórek o fenotypie EMT, czy nowotworowych komórek macierzystych. Wydaje się, iż konieczne jest prowadzenie dalszych badań podstawowych, poświęconych rozszerzeniu wiedzy na temat przyczyn lekooporności raka trzustki, jak i podejmowanie prób wykorzystania zdefiniowanych już obserwacji eksperymentalnych i klinicznych do wdrażania nowych terapii u chorych cierpiących na ten nowotwór.

PODZIĘKOWANIA

Serdeczne podziękowania składam paniom dr Ewie Augustin i dr inż. Annie Skwarskiej za pomoc redakcyjną w trakcie pisania pracy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abel E.V., Simeone D.M.: Biology and clinical applications of pancreatic cancer stem cells. *Gastroenterology*, 2013; 144: 1241-1248
- [2] American Cancer Society: Cancer Facts & Figures 2014. Atlanta: Am. Cancer Soc., 2014
- [3] Anuchapreeda S., Leechanachai P., Smith M.M., Ambudkar S.V., Limtrakul P.N. Modulation of P-glycoprotein expression and function by curcumin in multidrug-resistant human KB cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2002; 64: 573-582
- [4] Arumugam T., Ramachandran V., Fournier K.F., Wang H., Marquis L., Abbruzzese J.L., Gallick G.E., Logsdon C.D., McConkey D.J., Choi W.: Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res.*, 2009; 69: 5820-5828
- [5] Baenke F., Peck B., Miess H., Schulze A.: Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis. Model. Mech.*, 2013; 6: 1353-1363
- [6] Barnes D., Sato G.: Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal. Biochem.* 1980; 102: 255-270
- [7] Bisht S., Mizuma M., Feldmann G., Ottenhof N.A., Hong S.M., Pramanik D., Chenna V., Karikari C., Sharma R., Goggins M.G., Rudek M.A., Ravi R., Maitra A., Maitra A.: Systemic administration of polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (NanoCurc) blocks tumor growth and metastases in preclinical models of pancreatic cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 2010; 9: 2255-2264
- [8] Bloomston M., Frankel W.L., Petrocca F., Volinia S., Alder H., Hagan J.P., Liu C.G., Bhatt D., Taccioli C., Croce C.M.: MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*, 2007; 297: 1901-1908
- [9] Bryant K.L., Mancias J.D., Kimmelman A.C., Der C.J.: KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends Biochem. Sci.*, 2014; 39: 91-100
- [10] Büchler P., Reber H.A., Lavey R.S., Tomlinson J., Büchler M.W., Friess H., Hines O.J.: Tumor hypoxia correlates with metastatic tumor growth of pancreatic cancer in an orthotopic murine model. *J. Surg. Res.*, 2004; 120: 295-303
- [11] Burchell B., Brierley C.H., Rance D.: Specificity of human UDP-

- glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. *Life Sci.*, 1995; 57: 1819-1831
- [12] Burris H.A.3rd, Moore M.J., Andersen J., Green M.R., Rothenberg M.L., Modiano M.R., Cripps M.C., Portenoy R.K., Storniolo A.M., Tarassoff P., Nelson R., Dorr F.A., Stephens C.D., Von Hoff D.D.: Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.*, 1997; 15: 2403-2413
- [13] Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C.M.: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 15524-15529
- [14] Cannito S., Novo E., Compagnone A., Valfre di Bonzo L., Busletta C., Zamara E., Paternostro C., Povero D., Bandino A., Bozzo F., Cravanzola C., Bravoco V., Colombatto S., Parola M.: Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis*, 2008; 29: 2267-2278
- [15] Carmeliet P., Dor, Y., Herbert J.M., Fukumura D., Brusselmans K., Dewerchin M., Neeman M., Bono F., Abramovitch R., Maxwell P., Koch C.J., Ratcliffe P., Moons L., Jain R.K., Collen D., Keshert E.: Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 1998; 394: 485-490
- [16] Cascorbi I.: Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol. Ther.*, 2006; 112: 457-473
- [17] Chang T.C., Wentzel E.A., Kent O.A., Ramachandran K., Mullen-dore M., Lee K.H., Feldmann G., Yamakuchi M., Ferlito M., Lowenstein C.J., Arking D.E., Beer M.A., Maitra A., Mendell J.T.: Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol. Cell*, 2007; 26: 745-752
- [18] Clerc P., Bensaadi N., Pradel P., Estival A., Clemente F., Vaysse N.: Lipid-dependent proliferation of pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res.*, 1991; 51: 3633-3638
- [19] Court H., Philips M.R., Bar-Sagi D.: *Molecular Genetics of Pancreatic Cancer*, Springer, 2013
- [20] Czernik P., Radomska-Pandya A.: Uses of human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 to detect and treat cancer. Patent nr. US20020198167 A1, Data publikacji: 26.12.2002
- [21] Day J.D., Diguseppe J.A., Yeo C., Lai-Goldman M., Anderson S.M., Goodman S.N., Kern S.E., Hruban R.H.: Immunohistochemical evaluation of HER-2/*neu* expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum. Pathol.*, 1996; 27: 119-124
- [22] DeBerardinis R.J., Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism? New angles on an old idea. *Genet. Med.*, 2008; 10: 767-777
- [23] Duffy J.P., Eibl G., Reber H.A., Hines O.J.: Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. *Mol. Cancer*, 2003; 2: 12
- [24] Elliott R.L., Blobel G.C.: Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23: 2078-2093
- [25] Flavin R., Peluso S., Nguyen P.L., Loda M.: Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol.*, 2010; 6: 551-562
- [26] Giovannetti E., Mey V., Nannizzi S., Pasqualetti G., Del Tacca M., Danesi R.: Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in pancreatic cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 2006; 5: 1387-1395
- [27] Guillemette C.: Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J.*, 2003; 3: 136-158
- [28] Guo J.Y., Chen H.Y., Mathew R., Fan J., Strohecker A.M., Karli-Uzumbas G., Kamphorst J.J., Chen G., Lemons J.M., Karantza V., Collier H.A., Dipaola R.S., Gelinas C., Rabinowitz J.D., White E.: Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev.*, 2011; 25: 460-470
- [29] Hagmann W., Jesnowski R., Faissner R., Guo C., Lohr J.M.: Atp-binding cassette C transporters in human pancreatic carcinoma cell lines. Upregulation in 5-fluorouracil-resistant cells. *Pancreatology*, 2009; 9: 136-144
- [30] Hagmann W., Jesnowski R., Lohr J.M.: Interdependence of gemcitabine treatment, transporter expression, and resistance in human pancreatic carcinoma cells. *Neoplasia*, 2010; 12: 740-747
- [31] Hahn S.A., Greenhalf B., Ellis I., Sina-Frey M., Rieder H., Korte B., Gerdes B., Kress R., Ziegler A., Raeburn J.A., Campra D., Grützmann R., Rehder H., Rothmund M., Schmiegel W. i wsp.: BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003; 95: 214-221
- [32] Harms K.L., Chen X.: The C terminus of p53 family proteins is a cell fate determinant. *Mol. Cell Biol.*, 2005; 25: 2014-2030
- [33] Hermann P.C., Huber S.L., Herrler T., Aicher A., Ellwart J.W., Guba M., Bruns C.J., Heeschen C.: Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 2007; 1: 313-323
- [34] Herreros-Villanueva M., Zubia-Olascoaga A., Bujanda L.: c-Met in pancreatic cancer stem cells: therapeutic implications. *World J. Gastroenterol.*, 2012; 18: 5321-5323
- [35] Hindriksen S., Bijlsma M.F.: Cancer stem cells, EMT, and developmental pathway activation in pancreatic tumors. *Cancers*, 2012; 4: 989-1035
- [36] Höckel M., Vaupel P.: Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001; 93: 266-276
- [37] Höckel M., Vorndran B., Schlenger K., Bausmann E., Knapstein P.G.: Tumor oxygenation: a new predictive parameter in locally advanced cancer of the uterine cervix. *Gynecol. Oncol.*, 1993; 51: 141-149
- [38] Hosotani R., Miyamoto Y., Fujimoto K., Doi R., Otaka A., Fujii N., Imamura M.: Trojan p16 peptide suppresses pancreatic cancer growth and prolongs survival in mice. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 1271-1276
- [39] Huber M.A., Kraut N., Beug H.: Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2005; 17: 548-558
- [40] Hugo H., Ackland M.L., Blick T., Lawrence M.G., Clements J.A., Williams E.D., Thompson E.W.: Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J. Cell. Physiol.*, 2007; 213: 374-383
- [41] Hung M.C., Lau Y.K.: Basic science of HER-2/*neu*: a review. *Semin. Oncol.*, 1999; 26 (Suppl. 12): 51-59
- [42] Iwatsuki M., Mimori K., Yokobori T., Ishi H., Beppu T., Nakamori S., Baba H., Mori M.: Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci.*, 2010; 101: 293-299
- [43] Javle M.M., Gibbs J.F., Iwata K.K., Pak Y., Rutledge P., Yu J., Black J.D., Tan D., Khoury T.: Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and activated extracellular signal-regulated kinase (p-Erk) in surgically resected pancreatic cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 2007; 14: 3527-3533
- [44] Kalluri R., Weinberg R.A.: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.*, 2009; 119: 1420-1428
- [45] Klein A.P.: Genetic susceptibility to pancreatic cancer. *Mol. Carcinog.*, 2012; 51: 14-24
- [46] Konig J., Hartel M., Nies A.T., Martignoni M.E., Guo J., Buchler M.W., Friess H., Keppler D.: Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2005; 115: 359-367

- [47] Koong A.C., Mehta V.K., Le Q.T., Fisher G.A., Terris D.J., Brown J.M., Bastidas A.J., Vierra M.: Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2000; 48: 919-922
- [48] Kroep J.R., Pinedo H.M., van Groeningen C.J., Peters G.J.: Experimental drugs and drug combinations in pancreatic cancer. *Ann. Oncol.*, 1999; 10 (Suppl. 4): 234-238
- [49] Kubbutat M.H., Jones S.N., Vousden K.H.: Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 1997; 387: 299-303
- [50] Kunnumakkara A.B., Guha S., Krishnan S., Diagaradjane P., Gelovani J., Aggarwal B.B.: Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor- κ B-regulated gene products. *Cancer Res.*, 2007; 67: 3853-3861
- [51] Laghi L., Orbetegli O., Bianchi P., Zerbi A., Di Carlo V., Boland C.R., Malesci A.: Common occurrence of multiple K-RAS mutations in pancreatic cancers with associated precursor lesions and in biliary cancers. *Oncogene*, 2002; 21: 4301-4306
- [52] Levine A.J., Momand J., Finlay C.A.: The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 1991; 351: 453-456
- [53] Li C., Heidt D.G., Dalerba P., Burant C.F., Zhang L., Adsay V., Wicha M., Clarke M.F., Simeone D.M.: Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.*, 2007; 67: 1030-1037
- [54] Li D., Xie K., Wolff R., Abbruzzese J.L.: Pancreatic cancer. *Lancet*, 2004; 363: 1049-1057
- [55] Limtrakul P., Chearwae W., Shukla S., Phisalpong C., Ambudkar S.V.: Modulation of function of three ABC drug transporters, P-glycoprotein (ABCB1), mitoxantrone resistance protein (ABCG2) and multidrug resistance protein 1 (ABCC1) by tetrahydrocurcumin, a major metabolite of curcumin. *Mol. Cell. Biochem.*, 2007; 296: 85-95
- [56] Lobo N.A., Shimono Y., Qian D., Clarke M.F.: The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2007; 23: 675-699
- [57] Lonardo E., Hermann P.C., Mueller M.T., Huber S., Balic A., Miranda-Lorenzo I., Zagorac S., Alcalá S., Rodríguez-Arabaolaza I., Ramirez J.C., Torres-Ruiz R., García E., Hidalgo M., Cebrián D.Á., Heuchel R. i wsp.: Nodal/Activin signaling drives self-renewal and tumorigenicity of pancreatic cancer stem cells and provides a target for combined drug therapy. *2011*; 9: 433-446
- [58] Long J., Zhang Y., Yu X., Yang J., LeBrun D.G., Chen C., Yao Q., Li M.: Overcoming drug resistance in pancreatic cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2011; 15: 817-828
- [59] Maxwell P.H., Dachs G.U., Gleadle J.M., Nicholls L.G., Harris A.L., Stratford I.J., Hankinson O., Pugh C.W., Ratcliffe P.J.: Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 8104-8109
- [60] McKeehan W.L.: The role of nutrients in control of normal and malignant cell growth. W: *Molecular Interrelations of Nutrition and Cancer*, red.: M.S. Arnott, J. Van Eys, Y.M. Wang. Raven Press, New York 1982; 249-263
- [61] Medes G., Thomas A., Weinhouse S.: Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices *in vitro*. *Cancer Res.*, 1953; 13: 27-29
- [62] Meech R., Mackenzie P.I.: Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1997; 24: 907-915
- [63] Moore M.J., Goldstein D., Hamm J., Figer A., Hecht J.R., Gallinger S., Au H.J., Murawa P., Walde D., Wolff R.A., Campos D., Lim R., Ding K., Clark G., Voskoglou-Nomikos T. i wsp.: Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.*, 2007; 25: 1960-1966
- [64] Moriyama T., Ohuchida K., Mizumoto K., Yu J., Sato N., Nabae T., Takahata S., Toma H., Nagai E., Tanaka M.: MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance. *Mol. Cancer Ther.*, 2009; 8: 1067-1074
- [65] Morton J.P., Timpson P., Karim S.A., Ridgway R.A., Athineos D., Doyle B., Jamieson N.B., Oien K.A., Lowy A.M., Brunton V.G., Frame M.C., Evans T.R., Sansom O.J.: Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 246-251
- [66] Nakajima S., Doi R., Toyoda E., Tsuji S., Wada M., Koizumi M., Tulachan S.S., Ito D., Kami K., Mori T., Kawaguchi Y., Fujimoto K., Hosotani R., Imamura M.: N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 4125-4133
- [67] Natalwala A., Spychal R., Tselepis C.: Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract. *World J. Gastroenterol.*, 2008; 14: 3792-3797
- [68] Nitsche C., Simon P., Weiss F.U., Fluhr G., Weber E., Gärtner S., Behn C.O., Kraft M., Ringel J., Aghdassi A., Mayerle J., Lerch M.M.: Environmental risk factors for chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig. Dis.*, 2011; 29: 235-242
- [69] Ohtsubo K., Watanabe H., Yamaguchi Y., Hu Y.X., Motoo Y., Okai T., Sawabu N.: Abnormalities of tumor suppressor gene p16 in pancreatic carcinoma: immunohistochemical and genetic findings compared with clinicopathological parameters. *J. Gastroenterol.*, 2003; 38: 663-671
- [70] Olive K.P., Jacobetz M.A., Davidson C.J., Gopinathan A., McIntyre D., Honess D., Madhu B., Goldgraben M.A., Caldwell M.E., Allard D., Frese K.K., Denicola G., Feig C., Combs C., Winter S.P. i wsp.: Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*, 2009; 324: 1457-1461
- [71] Patel B.B., Sengupta R., Qazi S., Vachhani H., Yu Y., Rishi A.K., Majumdar A.P.: Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating EGFR and IGF-1R. *Int. J. Cancer*, 2008; 122: 267-273
- [72] Peng B., Fleming J.B., Breslin T., Grau A.M., Fojioka S., Abbruzzese J.L., Evans D.B., Ayers D., Wathen K., Wu T., Robertson K.D., Chiao P.J.: Suppression of tumorigenesis and induction of p15^{ink4b} by Smad4/DPC4 in human pancreatic cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 3628-3638
- [73] Pratt S., Shepard R.L., Kandasamy R.A., Johnston P.A., Perry W.3rd, Dantzig A.H.: The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Mol. Cancer Ther.*, 2005; 4: 855-863
- [74] Radominska-Pandya A., Czernik P.J., Little J.M., Battaglia E., Mackenzie P.I.: Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Rev.*, 1999; 31: 817-899
- [75] Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L.: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001; 414: 105-111
- [76] Salnikow A.V., Liu L., Platen M., Gladkikh J., Salnikova O., Ryschich E., Mattern J., Moldenhauer G., Werner J., Schemmer P., Büchler M.W., Herr I.: Hypoxia induces EMT in low and highly aggressive pancreatic tumor cells but only cells with cancer stem cell characteristics acquire pronounced migratory potential. *PLoS One*, 2012; 7: e46391
- [77] Sarkar F.H., Li Y., Wang Z., Kong D.: Pancreatic cancer stem cells and EMT in drug resistance and metastasis. *Minerva Chir.*, 2009; 64: 489-500
- [78] Shah A.N., Summy J.M., Zhang J., Park S.I., Parikh N.U., Gallick G.E.: Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. *Ann. Surg. Oncol.*, 2007; 14: 3629-3637
- [79] Shah U.A., Saif M.W.: Tumor markers in pancreatic cancer: 2013. *JOP*, 2013; 14: 318-321
- [80] Shi Q., Abbruzzese J.L., Huang S., Fidler I.J., Xiong Q., Xie K.:

Constitutive and inducible interleukin 8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cells more tumorigenic and metastatic. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 3711-3721

[81] Shin S.J., Kim K.O., Kim M.K., Lee K.H., Hyun M.S., Kim K.J., Choi J.H., Song H.S.: Expression of E-cadherin and uPA and their association with the prognosis of pancreatic cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 2005; 35: 342-348

[82] Shukla S., Wu C.P., Ambudkar S.V.: Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2008; 4: 205-223

[83] Simeone D.M.: Pancreatic cancer stem cells: implications for the treatment of pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2008; 14: 5646-5648

[84] Strimpakos A., Saif M.W., Syrigos K.N.: Pancreatic cancer: from molecular pathogenesis to targeted therapy. *Cancer Metastasis Rev.*, 2008; 27: 495-522

[85] Szakacs G., Paterson J.K., Ludwig J.A., Booth-Genthe C., Gottesman M.M.: Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006; 5: 219-234

[86] The Alarming Rise of Pancreatic Cancer Deaths in the United States, Pancreatic Cancer Action Network, 2012

[87] Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A.: Epithelial-me-

senchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009; 139: 871-890

[88] Wang J., Sen S.: MicroRNA functional network in pancreatic cancer: from biology to biomarkers of disease. *J. Biosci.*, 2011; 36: 481-491

[89] Xia F., Taghian D.G., DeFrank J.S., Zeng Z.C., Willers H., Iliakis G., Powell S.N.: Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 8644-8649

[90] Yang Y., Liu H., Li Z., Zhao Z., Yip-Schneider M., Fan Q., Schmidt C.M., Chiorean E.G., Xie J., Cheng L., Chen J.H., Zhang J.T.: Role of fatty acid synthase in gemcitabine and radiation resistance of pancreatic cancers. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, 2011; 2: 89-98

[91] Yu S., Lu Z., Liu C., Meng Y., Ma Y., Zhao W., Liu J., Yu J., Chen J.: miRNA-96 suppresses KRAS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer. *Cancer Res.*, 2010; 70: 6015-6025

[92] Zhang Y., Li M., Wang H., Fisher W.E., Lin P.H., Yao Q., Chen C.: Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J. Surg.*, 2009; 33: 698-709

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.