Review of molecular mechanisms underlying gemcitabine resistance in pancreatic cancer

A. Rajabpour[1], L. Teimoori Toolabi[2], F. Rajaei[1]

[1] Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
[2] Department of Molecular Medicine, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Corresponding Address: Farzad Rajaei, Department of Anatomy, Qazvin University of Medical Sciences, Shahid Bahonar Blvd., Qazvin, Iran
Tel: +98-281-3324970, Email: farzadraj@yahoo.co.uk
Received: 5 Mar 2017; Accepted: 8 Jul 2017

Abstract

Pancreatic cancer is one the most malignant cancers in human. A great percentage of patients die annually due to lack of early detection as well as efficient treatment strategies. Only five-year survival rate is still only seen in 5% of patients. Major problem of this deadly disease is the intrinsic and acquired resistance to current chemotherapeutic agents such as gemcitabine. So far, different molecular mechanisms are attributed to gemcitabine resistance. For instance, genetic mechanisms, aberrant gene expression in cellular signaling pathways, cancer stem cells, impaired apoptosis related genes, epigenetic changes and potential role of microRNAs have been identified in gemcitabine resistance of pancreatic cancer. Improving the drug efficacy and overcoming to drug resistance is the current goal in treatment of pancreatic cancer. Understanding the cellular and molecular mechanisms of resistance can help us to develop novel therapeutic approaches leading to increased effectiveness of current treatments. In this review, we summarized the molecular mechanisms involved in gemcitabine resistance in pancreatic cancer.

Keywords: Pancreatic cancer, Drug resistance, Gemcitabine, MicroRNAs
Citation: Rajabpour A, Teimoori Toolabi L, Rajaei F. Review of molecular mechanisms underlying gemcitabine resistance in pancreatic cancer. J Qazvin Univ Med Sci. 2017; 21 (4): 65-77.

مروری بر ساز و کارهای مولکولی ایجاد مقاومت نسبت به داروی جمسیتابین در سرطان لوزالمعده

اعظم رجب‌پور[۱]، دکتر لادن تیموری طولابی[۲]، دکتر فرزاد رجایی[۱]

[۱] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
[۲] بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور تهران، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: قزوین، بلوار شهید باهنر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، گروه آناتومی، تلفن ۳۳۲۴۹۷۰– ۰۲۸
تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۷

چکیده

سرطان لوزالمعده یکی از بدخیم‌ترین انواع سرطان‌ها در انسان است. سالانه درصد فراوانی از مبتلایان به این بیماری به‌دلیل عدم تشخیص به‌موقع و نیز عدم وجود روش‌ها و داروهای درمانی مؤثر از بین می‌روند. به طوری‌که هنوز هم میزان بقای پنج ساله فقط در ۵ درصد از بیماران دیده می‌شود. از نکات قابل تأمل در این بیماری مهلک، مقاومت ذاتی و اکتسابی آن نسبت به داروهای رایج شیمی‌درمانی از جمله جمسیتابین است. تاکنون ساز و کارهای مولکولی مختلفی را مسئول این مقاومت دانسته‌اند. از جمله عوامل دخیل در مقاومت به این دارو در سرطان لوزالمعده، فرایندهای متنوع ژنتیکی، بیان نابجای مولکول‌ها در مسیرهای پیام‌رسان سلولی، حضور سلول‌های بنیادی سرطان، نقص ژن‌های شرکت‌کننده در مسیر مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، تغییرات اپی‌ژنتیکی و نقش ریز RNA ها در کنترل روند ترجمه شناسایی شده است. هدف فعلی در درمان سرطان لوزالمعده و حتی سرطان‌های دیگر افزایش کارایی داروها و کاهش مقاومت در برابر آن‌ها می‌باشد. شناخت اساس سلولی و مولکولی مقاومت در این بیماری می‌تواند به توسعه رویکردهای نوین درمانی و افزایش اثربخشی درمان‌های رایج منجر شود. در این مقاله مروری، ساز و کار مولکولی دخیل در مقاومت نسبت به داروی جمسیتابین در سرطان لوزالمعده مورد بررسی قرار گرفته است.

کلیدواژه‌ها: سرطان لوزالمعده، مقاومت دارویی، جمسیتابین، ریز RNA

مقدمه:

سرطان لوزالمعده چهارمین دلیل مرگ ناشی از سرطان در ایالات متحده با میانگین بقای کم‌تر از شش ماه است و میزان بقای پنج ساله تنها در ۵ درصد بیماران دیده می‌شود. با وجود بهبود روش‌های تشخیصی و توسعه هدفمند درمان، میزان بقای بیماران خیلی بیش‌تر از دهه گذشته نیست و همچنان سرطان لوزالمعده از علل مرگ و میر ناشی از سرطان در ایالات متحده به‌شمار می‌رود.[۱] با این که در ایران آمار دقیقی از مبتلایان به این بیماری وجود ندارد، گزارش‌های اخیر از افزایش تعداد مبتلایان خبر می‌دهد.[۲] به‌دلیل عدم وجود علایم جدی هشداردهنده، بیماری در مبتلایان به سرطان لوزالمعده در حالتی پیشرفته و همراه با دست‌اندازی تشخیص داده می‌شود که امکان جراحی را محدود می‌کند. حتی در بسیاری از موارد بیماری بعد از جراحی هم عود می‌کند. بنابراین شیمی‌درمانی و پرتودرمانی برای مدیریت سرطان لوزالمعده ضروری به‌نظر می‌رسد، اگرچه برخی معتقدند که درمان‌های چندداروییی و پرتودرمانی قبل از عمل جراحی هم لازم است.[۳]

ویژگی اصلی سرطان لوزالمعده مقاومت بالای آن در برابر روش‌های رایج شیمی‌درمانی و پرتودرمانی است. این خاصیت هم به‌صورت ذاتی و هم به‌صورت اکتسابی در سلول‌های سرطان لوزالمعده دیده می‌شود. داروی اصلی برای درمان این بیماری جمسیتابین است، ولی تأثیر بالینی این دارو به‌دلیل بروز مقاومت در اکثر موارد خیلی امیدوارکننده نیست.[۴] عوامل مؤثر در ایجاد مقاومت نسبت به داروی جمسیتابین در سرطان لوزالمعده در

مطالعات بی‌شماری مورد بررسی قرار گرفته است. این تحقیقات به مطالعه مسیرهای مولکولی و ژن‌های فراوانی که در فرایندهای مختلف سلولی نقش دارند پرداخته‌اند.[۵] این ژن‌ها اغلب در ترابری دارو، سوخت و ساز و تنظیم چرخه سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول فعالیت می‌کنند. این پژوهش‌ها در زمینه مطالعه ساز و کارها و تغییرات ایجاد شده در این مسیرها و ژن‌های شرکت‌کننده است که خود شامل؛ پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی، جهش‌ها، تغییرات اپی‌ژنتیکی و اصلاحات پس از رونویسی می‌باشند. این اطلاعات تحولی چشمگیر در شاخه‌ای از علوم پزشکی به‌نام فارماکوژنتیک فراهم می‌آورد که در زمینه مطالعه و آزمایش‌های بالینی تنوع پاسخ‌گویی نسبت به داروها فعالیت می‌کند.[۶] البته فارماکوژنتیک به تنهایی نمی‌تواند دلیل این تنوع در پاسخ‌گویی را شرح دهد چرا که شواهد نشان می‌دهند که تغییرات اپی‌ژنتیکی هم در میزان بیان ژن‌های پاسخ‌گو به دارو نقش ایفا می‌کنند. بنابراین مطالعه اپی‌ژنتیکی هم مانند بررسی‌های ژنتیکی در زمینه پاسخ‌گویی دارویی و مقاومت به آن ضروری به‌نظر می‌رسد. در این مقاله جزییات مولکولی ساز و کارهای دخیل در ایجاد مقاومت نسبت به داروی جمسیتابین در سلول‌های سرطان لوزالمعده آورده شده است.

❋مواد و روش‌ها:

این مطالعه با مرور چهل و هشت مقاله که بین سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۷ منتشر شده‌اند، ساز و کارهای مقاومت به جمسیتابین در سرطان لوزالمعده را با رویکرد مولکولی مورد بررسی قرار داده است. برای تعیین مسیر ساز و کار مولکولی دارو از بانک‌های اطلاعاتی ژنتیکی و مولکولی مختلف مانند Database KEGG Pathway و نیز از DIANA mirPath، miRWALK و microRNA برای یافتن ریز RNA هایی که تاکنون در ارتباط با مقاومت نسبت به جمسیتابین در سرطان لوزالمعده شناخته شده‌اند استفاده شد.

ساز وکار عمل جمسیتابین در سلول

جمسیتابین به عنوان یک پیش دارو توسط ناقلین نوکلئوزیدی وارد سلول می‌شود. این ناقلین در دو گروه وابسته به سدیم و مستقل از آن قرار می‌گیرند که شامل hENTs (human equilibrative sodium independent) و hCNTs (human concentrative sodium dependent) می‌باشند. بعد از ورود، این پیش دارو دستخوش یک‌سری از واکنش‌های فسفریلاسیون قرار می‌گیرد. ابتدا دارو توسط آنزیم‌های دئوکسی سیتیدین کیناز (Deoxy cytidine kinase, dCK) به مونوفسفات تبدیل می‌شود، سپس آنزیم پیریمیدین نوکلئوزید مونوفسفات کیناز (Pyrimidine nucleoside monophosphate kinase, UMP-CMP kinase) آن را به جمسیتابین دی‌فسفات (dFdCDP) تغییر داده و در آخر هم توسط فعالیت آنزیم نوکلئوزید دی فسفات کیناز (NDPK) به جمسیتابین سه فسفاته (dFdCTP) تبدیل می‌شود. یکی از روش‌های غیرفعال‌سازی جمسیتابین از طریق د- آمیناسیون است که با آنزیم سیتیدین د- آمیناز (Cytidine Deaminase, CDA) انجام می‌شود.[۷] به‌علاوه د- فسفریلاسیون این دارو و تبدیل آن به‌شکل مونوفسفات هم توسط ۵’- نوکلئوتیداز (5'-nucleotidases, 5’-NTs) انجام و هم با عملکرد آنزیم دئوکسی سیتیدیلات د- آمیناز (Deoxycytidylate deaminase, dCTD) صورت می‌گیرد، نوکلئوتیدها را به نوکلئوزید تبدیل کرده و موجب غیرفعال شدن این دارو می‌شود.[۵و۸] فعالیت فرم دی‌فسفاته این دارو باعث مهار فعالیت آنزیم ریبونوکلئوتید ردوکتاز (Ribonucleotide reductase, RNR) می‌شود که وظیفه آن تبدیل سیتیدین دی فسفات (cytidine diphosphat, CDP) به دئوکسی سیتیدین دی فسفات (Deoxycytidine diphosphate, dCDP) است که منجر به کاهش منابع dCTP و ممانعت از ورود dCTP به مولکول DNA هنگام همانندسازی می‌شود.[۵]

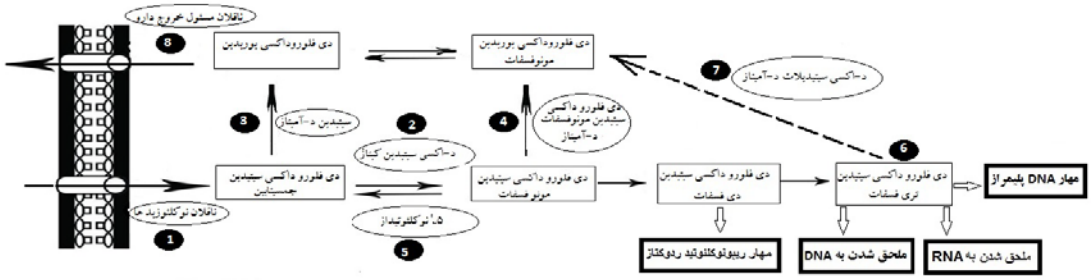
عملکرد اصلی این دارو مهار کردن ساخت DNA

است. هنگام همانندسازی، پس از الحاق dFdCTP به DNA، نوکلئوتید بعدی به زنجیره اضافه نمی‌شود چون وجود این جفت مانع طولانی شدن زنجیره DNA می‌شود و در این حالت که نقاب نامیده می‌شود مانع شناسایی جمسیتابین توسط آنزیم‌های ترمیم‌کننده DNA می‌شود.[۹] همچنین غلظت بالای اشکال دو و سه فسفاته جمسیتابین باعث می‌شود که در رقابت با اسیدهای نوکلئیک شرکت‌کننده در ساختن DNA و RNA موفق شوند (خودالقایی). این ویژگی به‌دلیل مهار کردن آنزیم ریبونوکلئوتید ردوکتاز است که از نوکلئوزید دی فسفات، دزوکسی نوکلئوزید ۵- فسفات را می‌سازد. بنابراین dNTP مورد نیاز برای رشد سلول تأمین نمی‌شود و در نهایت موجب آغاز مرگ سلولی می‌شود.[۱۰]

از طرف دیگر به‌نظر می‌رسد که dFdCTP از متابولیت‌های جمسیتابین است و به مولکول RNA ملحق می‌شود. جمسیتابین با اثر کردن بر توپوایزومراز I، موجب فعال‌سازی مسیر خارجی مرگ برنامه‌ریزی شده و نهایتاً مرگ سلول می‌شود. وقتی جمسیتابین به مولکول DNA ملحق می‌شود، مجموعه‌هایی که با توپوایزومراز برش خورده‌اند به‌مدت طولانی آزاد می‌مانند که این خود منجر به تجمع این برش‌ها و نهایتاً مرگ سلولی می‌شود.[۱۱] همچنین در پاسخ به تنش سلولی مثل شرایط انجماد و حضور ماده شیمیایی سمی به‌طور مثال اغلب داروها واکنش مرگ سلولی از طریق فعال شدن کاسپازها مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول فعال می‌شود.[۱۲و۱۳] نتایج یک مطالعه نشان داد که برای القای مرگ سلول‌ها در اثر جمسیتابین، فعالیت پروتئین کیناز ۲ فعال شده با MAPK (MAPK-activated protein kinase: MK2) که در واقع القاکننده فعالیت p38-MAPK می‌باشد، ضروری است. p38-MAPK از مولکول‌های مؤثر در مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده شناخته می‌شود (شکل شماره ۱).[۵]

علل مقاومت نسبت به داروی جمسیتابین

۱- ویژگی بافت بستره لوزالمعده: یکی از علت‌های عدم پاسخ مناسب به دارو، مقاومت ذاتی سلول‌های سرطان پانکراس نسبت داده می‌شود که به خاصیت خون‌رسانی اندک سلول‌های بستر پانکراس بستگی دارد. هنگام سرطانی شدن بافت پانکراس تغییراتی در این بافت ایجاد می‌شود که به تحریک و حفاظت سلول‌های تومور کمک می‌کند. استرومای بافت پانکراس فیبروتیک بوده و دارای کلاژن و هیالورونان فراوان می‌باشد که موجب کاهش نفوذ دارو به بافت می‌شود.[۱۴] در مطالعه انیشی و همکارانش تأثیر فشار کم اکسیژن در مقاومت این بافت نسبت به جمسیتابین بررسی شد. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که افزایش بیان ژن *smo* که خود در شرایط کمبود اکسیژن القا می‌شود موجب مقاومت نسبت به جمسیتابین در مرحله ساخت مولکول DNA در چرخه سلول می‌شود (شکل شماره ۲).[۱۵]



شکل ۱- دگرگشت، ساز وکار عملکرد جمسیتابین در سلول ۱- انتقال با ناقلین نوکلئوزیدها (hNTs)؛ ۲- فسفریلاسیون؛ ۳ و ٤ د- آمیناسیون؛ ۵- د-فسفریلاسیون؛ ٦- تجمع تری فسفات؛ ۷- عمل غیرفعال شدن dFdCTP با فعالیت دئوکسی سیتیدین مونوفسفات د- آمیناز (dCTD)؛ ۸- ناقلان مسئول خروج دارو (MRPs)

شکل۲- ساز و کارهای ایجاد مقاومت نسبت به جمسیتابین در سرطان لوزالمعده

۲- جهش‌های ژنتیکی: مقاومت دارویی در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان لوزالمعده به جهش‌های ژنتیکی در برخی ژن‌های کلیدی نسبت داده می‌شود. ساختار ژنتیکی به‌عنوان یک عامل کلیدی تنوع در پاسخ‌گویی به دارو و تحمل آن شمرده می‌شود. این گوناگونی اغلب به‌دلیل تغییرات ژنتیکی کُدکننده و غیرکُدکننده آنزیم‌های متابولیزه‌کننده، ناقلان داروها، اهداف سلولی و مسیرهای پیام‌رسانی سلول می‌باشد.[۱۶] تنوع ژنتیکی در پروتئین‌های مسئول حمل و نقل این دارو مورد بررسی قرار گرفته‌اند. چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی در پروموتر *hENT1* که احتمالاً در بیان ژن نقش دارند شامل؛ 1345C>G- و 1050G>A- می‌باشند که گفته می‌شود در ناحیه اتصال عوامل رونویسی تغییر ایجاد می‌کنند. هاپلوتایپ‌های CAG، CGC وGAG به‌ترتیب مقدار بیان ۲، ۴/۱ و ۱/۱ برابری نسبت به هاپلوتایپ CGG دارند. به‌نظر می‌رسد که جایگزینی والین به‌جای ایزولوسین در موقعیت ۱۸۹ باعث کاهش عملکرد این ناقل می‌شود.[۱۷] در میان واریانت‌های شناخته شده برای گروه *CNT* از ناقلین جمسیتابین، واریته *CNT-1Val189Ile* نسبت به ژن مرجع تمایل کم‌تری نسبت به دارو داشته که نتیجه آن مقاومت نسبت به جمسیتابین در بیماران می‌باشد.[۱۸]

کارایی درمان با جمسیتابین علاوه بر میزان ورود دارو به مقدار زمانی که دارو در معرض سلول‌ها قرار می‌گیرند هم وابسته است. در این راستا تنوع ژنتیکی در پروتئین‌های غشایی خانواده (MRP; Multidrug resistance protein) که در خارج کردن دارو و کاهش مجاورت سلول با دارو نقش ایفا می‌کنند، مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج بررسی مقایسه تاناکا و همکارانش نشان داد که جمعیت دارای ژنوتیپ‌های G40A و MRP5 A2G پاسخ‌گویی کم‌تری به دارو نشان دادند.[۱۹] DCK به‌دلیل فراهم کردن دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs) نقش تعیین‌کننده در تنظیم سرعت همانندسازی و ترمیم DNA دارد. از میان واریانت‌های متعددی که برای این ژن شناخته شده تنها سه واریته مسئول اختلاف در مقدار فعالیت آنزیمی این پروتئین می‌شوند. به‌طور مثال در افراد با ژنوتیپ 1205C>T- و 984A>G- پاسخ کم‌تری نسبت به جمسیتابین گزارش شده است (جدول شماره ۱).[۲۰]

از آنجایی‌که جمسیتابین به فرم دو فسفاته مهارکننده آنزیم ریبونوکلئوتید ردوکتاز است، می‌تواند در ساخت دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات داخل سلولی نقش مهارکنندگی ایفا کند.[۸]

جدول ۱- تغییرات نوکلئوتیدی دخیل در مقاومت نسبت به جمسیتابین در سرطان لوزالمعده

ژن	محل نوکلئوتید واریانت	تغییرات	مرجع
ENT-1	-1345C>G -1050G>A	بیان متفاوت mRNA بین هاپلوتایپ‌ها	۱۸
CNT-1	-	جایگزینی والین بجای ایزولوسین در جایگاه کدون ۸۹	۱۹
DCK	-1050G>A -201C>T	بیش بیان mRNA	۲۰
	-1205C>T -984A>G	پاسخ‌گویی کم‌تر به داروی جمسیتابین	
CDA	-79A>G	جایگزینی لیزین به‌جای گلیسین در جایگاه ۲۷	۲۰
	-208G>A	جایگزینی آلانین به‌جای ترئونین در جایگاه ۷۰	
RRM1	-33A>G -27C>A -42G>A	بقای بدون بازگشت بیماری بعد از مصرف دارو	۲۳و۲۲،۲۱
	-2232G>A	حساسیت به داروی شیمی‌درمانی	
	-524T>C	فعالیت متفاوت مابین هاپلوتایپ	
MRP5	-40G>A -2A>G	پاسخ‌گویی کم‌تر به داروی جمسیتابین	۱۹

از میان واریانت‌های شناخته شده برای زیرواحد بزرگ این آنزیم (RRM1)، حساسیت بیش‌تر نسبت به جمسیتابین در سویه‌های 2462G>A در رده‌های سلول سرطانی دیده شده است.[۸] طول عمر بیش‌تر در بیماران با ژنوتیپ 33A>G ، 42G>A و 27C>A در ناحیه کُدگذار و ژنوتیپ‌های and_524T>C and - 37C>A 37CC/ -524TT در پروموتر این ژن می‌تواند حاکی از این باشد که پاسخ‌گویی بهتری به جمسیتابین دارند.[۲۱و۲۲] همچنین ارتباط میان مقدار بیان زیرواحد بزرگ این ژن با مقاومت نسبت به جمسیتابین هم در برخی رده‌های سلولی سرطان لوزالمعده تأیید شده است.[۲۲]

با وجود اختلاف نظر در نقش ژن CDA در ایجاد مقاومت دارویی، موارد زیادی از مقاومت به دارو در بیماران که با این ژن ارتباط دارند گزارش شده است. پلی‌مورفیسم‌های این ژن اغلب با سمیت این دارو در بیماران مرتبط است که به فعالیت ناقص این ژن در غیرفعال‌سازی دارو در بدن نسبت داده می‌شود اما از طرف دیگر نشان داده شده که ژنوتیپ CDA208G>A حساسیت بیش‌تری به جمسیتابین دارند.[۲۲]

۳- عملکرد نامناسب مسیرهای پیام‌رسان سلول و ایجاد مقاومت: از آنجا که مکانیسم اثر برخی داروهای شیمی‌درمانی و برخی مواد شیمیایی توکسیک القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول باشد، به‌نظر می‌رسد که عوامل تنظیم‌کننده این واقعه سلولی می‌توانند نقش مهمی در ایجاد مقاومت به این مواد داشته باشند. عناصر مختلف اتوکرین و پاراکرین در کنار محرک‌های مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌توانند سبب فعال یا مهار شدن عوامل رونویسی در مسیرهای Notch، Hedghog، AKT و NF-kB شوند. این مسیرها کنترل چرخه سلول را به‌عهده دارند.[۲۳] به‌طور مثال مسیر NF-KB مرگ برنامه‌ریزی سلول، تومورزایی و التهاب را از طریق فعال‌سازی ژن‌های مهارکننده مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی مثل برخی اعضای Bcl-2، عامل ۱ و ۲ وابسته به گیرنده TNF (TRAF1 و TRAF2)،c-IAP1 و c-IAP2 تنظیم می‌کند. افزایش فعالیت این مسیر که در نتیجه عملکرد جمسیتابین اتفاق می‌افتد باعث القای مقاومت در سرطان لوزالمعده می‌شود.[۱]

از طرف دیگر نتایج وسترن بلات آزمایش‌های سیلویا

و همکارانش توانایی بالقوه مسیر فسفواینوزیتید۳-کیناز (3-kinase (PI3K)/Akt) در افزایش مقاومت نسبت به جمسیتابین در رده‌های سلولی سرطان پانکراس را آشکار کرد. آن‌ها نشان دادند که مصرف مهارکننده‌های فسفواینوزیتید۳-کیناز (3-kinase (PI3K)/Akt) که در بقای سلولی نقش دارد، افزایش مرگ سلولی در اثر مصرف جمسیتابین را امکان‌پذیر می‌کند.[۲۴] عملکرد اجزای مختلف مسیر Notch در خاصیت تهاجمی سرطان پانکراس به اثبات رسیده است. در مطالعه‌ای جون یائو و همکارانش نشان دادند که مهار Notch3 از طریق غیرفعال‌سازی مسیر فسفواینوزیتید۳-کیناز 3-kinase (PI3K)/Akt باعث افزایش حساسیت سلول‌های سرطان پانکراس نسبت به جمسیتابین می‌شود.[۲۵و۲۶]

مسیر Hedgehog یکی دیگر از عوامل دخیل در مقاومت دارویی سرطان لوزالمعده است که عملکرد آن وابسته به محیط می‌باشد. این مسیر واکنش دسموپلاستیک بین تومور و سلول‌های استروما را فعال کرده و باعث می‌شود فیبروبلاست‌های استروما کلاژن بیش‌تری ترشح کرده که موجب فیبروزه شدن بافت اطراف استروما و کاهش انتقال دارو به ناحیه می‌شود.[۲۷] نتایج آزمایش الیو و همکارانش بر روی موش‌های مهندسی شده نشان داد که مهار کردن این مسیر با القای واکنش دسموپلاستیک که سبب افزایش چگالی عروق خونی در اطراف بافت توموری می‌شود و انتقال جمسیتابین به آن را تسهیل می‌کند.[۲۸]

۴- نقش سلول‌های بنیادی سرطانی در مقاومت به جمسیتابین: از مشخصه سرطان‌های پیشرونده و مقاوم به دارو وجود سلول‌های بنیادی در بافت مبتلا می‌باشد، مانند دیگر سرطان‌ها، سلول‌های بنیادی در مقاومت سرطان پانکراس نیز نسبت به داروهای شیمی‌درمانی و افزایش میزان عود آن پس از بهبود بالینی نقش مهمی دارند. تاکنون نشان‌گرهای مختلفی برای این سلول‌های مقاوم گزارش شده است. چنان‌که در مطالعات ونگ و همکارانش نشان داده شد که در رده‌های سلولی سرطان پانکراس مقاوم به جمسیتابین، نشان‌گرهای مولکولی سلول‌های بنیادی از قبیل CD24، CD44 و ESA افزایش بیان دارند. بعدها او و همکارانش نتایج بررسی‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT) و ارتباط فعالیت c-Met با مقاومت و تهاجم در این سلول‌ها را گزارش کردند. آن‌ها ادعا کردند که سلول‌های سرطان لوزالمعده مقاوم به شیمی‌درمانی مشابه سلول‌های بنیادی هستند و تمایل به نشان دادن ویژگی حالت‌گذار اپی‌تلیال به مزانشیمی از خود هستند. همه این ویژگی‌ها با ایجاد سلول‌های بنیادی سلول‌های سرطانی ارتباط دارد.[۲۹] مقایسه مقدار بیان Oct4 و ABCG2 که از نشان‌گرهای سلول بنیادی هستند نشان داد که در سلول‌های مقاوم به دارو این ژن‌ها بیان بیش‌تری دارند.[۳۰]

۵- تغییرات اپی‌ژنتیکی: به‌نظر می‌رسد ساز و کارهای اپی‌ژنتیکی با خاموش کردن و یا افزایش بیان ژن‌های دخیل در سوخت و ساز جمسیتابین می‌توانند در ایجاد مقاومت به آن نقش ایفا کنند. این تغییرات بیان ژن را از طریق دو مکانیسم اصلی متیلاسیون نواحی غنی از CpG موجود در DNA ژنومی و یا متیلاسیون و استیلاسیون هیستون‌های H3 و H4 تحت تأثیر قرار می‌دهند.[۳۱] به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای خاموشی ژن TMS1 با متیلاسیون پروموتر آن در سلول‌های سرطان لوزالمعده باعث افزایش مقاومت این سلول‌ها نسبت به جمسیتابین شد. در حالی‌که افزایش بیان آن حساسیت نسبت به دارو را در سلول‌های سرطان لوزالمعده برانگیخته است. این ژن به‌عنوان یک مولکول القاکننده مرگ برنامه‌ریزی شده سلول از مسیر کاسپاز-۹ شناخته شده است.[۳۲]

در یک مطالعه سلول‌های سرطان لوزالمعده به‌صورت دوره‌ای با مقادیر صعودی در مجاورت جمسیتابین قرار گرفتند. نتایج این بررسی افزایش بیان گام به گام ژن-*14-3-3σ* و در نهایت کاهش حساسیت به دارو را نشان دادند. این ژن به اعضای خانواده هفت عضوی 3-3-14 از

پروتئین‌های متصل‌شونده بـه فسفوسـرین/ فسـفوترئونین تعلق دارد که میزان بیان آن نقش مهمی در پـیش‌آگهـی بیماران ایفا مـی‌کنـد. بـا مجـاورت سـلول‌هـای سـرطان لوزالمعـده بـا جمسـیتابین و بـا عملکـرد DNA متیـل ترانسفراز I و تحـت تنظـیم ژن *Uhf1* افـزایش بیـان ژن *14-3-3σ* رخ مـی‌دهـد کـه عامـل مقاومـت بـه داروی جمسیتابین است.[۳۳] از طرف دیگر بیش بیان *MUC4* که عضوی از خانواده O–گلیکوپروتئین است در سـلول‌هـای سرطان لوزالمعده مقاوم دیده شده است. این مولکـول بـا الیگـومریزه شـدن و تشـکیل سـاختار موکوسـی لایـه محافظتی برای سلول‌های اپی‌تلیال فراهم مـی‌آورد.[۳۴] از روش‌های مؤثر در تغییر بیان این ژن تغییرات اپی‌ژنتیکـی اعمال شـده توسـط DNA متیـل ترانسـفراز و هیسـتون د– استیلاز است.[۳۵و۳۶] به‌عنوان مثال در تحقیقات انصاری مصرف آپیسیدین که مهارکننده هیستون د– استیلاز است به‌طور چشم‌گیری بیان MUC4 کاهش داده و مانع رشـد سلول‌های Capan-1 گردید.[۳۷]

۶– نقص مرگ سلولی برنامـه‌ریـزی شـده سـلول: مـرگ سلولی نقش مهمی در کنترل رونـدهای سـلولی از قبیـل تشـکیل جنـین و انـدام‌زایـی دارنـد.[۳۸] اکثـر داروهـای شیمی‌درمانی مثل جمسیتابین عملکـرد خـود را از طریـق القای مرگ سلولی اعمال می‌کنند. بـه‌نظـر مـی‌رسـد کـه نقـص ایـن واقعـه مهـم سـلولی از مؤلفـه‌هـای اصـلی سلول‌های مقاوم بـه دارو باشـد و حساسـیت سـلول‌هـای سـرطانی وابسـته بـه اعضـای خـانواده بـزرگ مـرگ برنامه‌ریزی شده سلول باشد.[۳۹] در آزمایشاتی که بر روی رده‌های سلولی سرطان لوزالمعـده مقـاوم بـه جمسـیتابین انجام شده بیش بیان ژن‌های ضدمرگ برنامه‌ریزی شـده مثل؛ bcl-xL، mcl1، survivin و *cIAP-1* مشاهده شده است.[۴۰] همچنـین کـاهش بیـان *bax* و *BNIP3* کـه از اعضای خانواده ژن‌های مرگ برنامـه‌ریـزی شـده سـلول هستند در رده‌های مقاوم این سلول‌ها دیده شـده اسـت و خاموشی ژن *S100A4* که مهارکننده *BNIP3* است باعـث فعال‌سـازی مسیـر مـرگ برنامه‌ریـزی شـده سلـول و حساسیت نسبت به جمسیتابین در رده‌های سلول سرطـان پانکراس شد.[۴۱]

۷– نقش ریزRNA ها به‌عنوان نشان‌گرهای حساسـیت و مقاومت به جمسیتابین: به تازگی ریـز RNA هـا کـه بـه گروه RNA های کوچک غیرکُدکننده با حدود ۱۹ تـا ۲۵ نوکلئوتید تعلق دارند، توجه دانشـمندان را بـه خـود جلـب کرده‌اند. این مولکول‌های کوچک که از عناصر اپی‌ژنتیکی هستند و بسته به این که به‌طور نسبی و یا کامـل مکمـل مولکول mRNA هستند به‌عنوان مهارکننده‌های ترجمـه و یـا تخریـب‌کننـده‌هـای مولکـول RNA ایفـای نقـش می‌کنند. بیش از نیمی از این مولکول‌ها در نواحی شکست کروموزومی و یا نقاط غیرطبیعی کروموزوم‌ها قـرار دارنـد که در سرطان‌ها دیـده شـده اسـت.[۴۲] تحقیـق‌هـا نشـان داده‌اند در بدخیمی‌های خون و تومورهـای جامـد الگـوی بیان این مولکول‌ها در مقایسه با RNA، اختصاصی بافت بوده و حتی می‌توان گفت که این ویژگـی بـا جنبـه‌هـای بالینی مثل؛ وضعیت بقای سلول و حساسـیت بـه داروهـا ارتبـاط مسـتقیم دارد.[۴۳] بررسـی‌هـای بـالینی بـر روی نمونه‌های بیماران و رده‌هـای سـلولی سـرطان لوزالمعـده نشان دادند که بیان نابجای تعداد زیادی از این ریزRNA ها با پیش‌آگهی بیماران و میزان پاسخ‌گویی به داروها مرتبط است. از جمله ریز RNAهای شناسایی شده در مقاومـت نسـبت بـه جمسـیتابین در سـرطان لوزالمعـده مـی‌تـوان miR-15a، miR-21، miR-34، miR-200b، miR-200c، miR-214، miR-221 و اعضـای خـانواده let-7 را نـام برد.[۴۴] به‌طور مثال؛ مطالعات ژنگ و همکارانش نشان داد، miR-214 با تأثیر بر کاهش بیان ژن سرکوب‌گـر تومـور *ING4* موجـب بقـای سـلول‌هـا در مقابـل داروهـای شیمی‌درمانی مثل جمسـیتابین مـی‌شـود. از طـرف دیگـر آن‌ها نشان دادند که در همـین سـلول‌هـا افـزایش بیـان miR-15a از طریـق کـاهش بیـان دو ژن *WNT3A* و *FGF7* که در تکثیر و بقای سلول نقـش دارنـد، موجـب مهار رشد سلول‌های مقاوم به درمان مـی‌شـود.[۴۵] نتـایج مطالعه جیوانتی و همکارانش در مورد نقش افزایش بیـان

miR-21 در کاهش بقای بیماران مبتلا به سرطان لوزالمعده که با جمسیتابین تحت درمان قرار گرفته بودند، اهمیت بررسی بیان این مولکول را در هنگام انتخاب دارو در بیماران آشکار کرد. بررسی آن‌ها نشان داد که افزایش بیان این مولکول از طریق فعال کردن مسیر وابسته به PI3K)/Akt kinase) منجر به کاهش بیان ژن سرکوب‌گر تومور به‌نام PTEN می‌شود.[۴۶] لی و همکارانش نشان دادند که کاهش بیان miR-200b ، miR-200c ، let-7b ، let-7c ، let-7d و let-7f در رده‌های سلولی مقاوم به جمسیتابین با ویژگی‌های EMT آن‌ها همخوانی دارد. این خصوصیات شامل تغییر سلول‌ها به شکل فیبروبلاستویید، کاهش بیان نشان‌گر سلول‌های اپی‌تلیال مثل E-cadherin و افزایش بیان نشان‌گر سلول‌های مزانشیمی مانند *vimentin* و *ZEB1* است.[۴۷] نتایج بررسی جی نشان داد که بیش بیان miR-34 موجب کاهش ۸۷ درصدی سلول‌های بنیادی سرطانی با نشان‌گر +CD44+/CD133 در سلول‌های سرطان لوزالمعده سبب ایجاد حساسیت نسبت به جمسیتابین و مهار رشد آن‌ها در محیط شیشه و زیوه شد. انتقال ساختار لنتی ویروس حامل miR-3 به سلول‌های سرطان لوزالمعده موجب فعالیت مجدد ژن سرکوب‌گر تومور p53 در سلول‌های دارای نقص این ژن شد.[۴۸] به‌نظر می‌رسد که استفاده از ابزارها و موادی که موجب مهار و یا فعال‌سازی این مولکول‌های کوچک می‌شود در پیدایش روش‌های مقابله با مقاومت دارویی و یا رشد سلول‌های سرطانی، تهاجم و یا دست‌اندازی آن‌ها نقش داشته باشد. با توجه به نقش دوگانه این مولکول‌ها در ایجاد مقاومت دارویی، دو رویکرد متفاوت برای استفاده از آن‌ها در این حوزه وجود دارد. نخست می‌توان با استفاده از الیگونوکلئوتیدهایی که ۲-O'– متیل آن‌ها اصلاح شده است ریزRNA های آنکوژن را در آزمایشگاه مهار کرده و یا این مولکول را به کلسترول ملحق کرده و آن را به درون بدن جاندار قرار می‌دهند. در روش دیگر می‌توان ریز RNA های سرکوب‌گر تومور را به‌صورت مصنوعی تولید کرده و توسط حامل وارد بدن جاندار مورد نظر کرد.[۴۹] این دستاوردها می‌تواند افق‌های جدیدی در مورد درمان و غلبه بر مقاومت دارویی این بیماری مهلک پیش‌روی دست اندرکاران حوزه سلامت قرار دهند.

❋بحث و نتیجه‌گیری:

مقاومت ذاتی و اکتسابی سرطان لوزالمعده نسبت به درمان یکی از مشکلات جامعه پزشکی است. با وجود پیدایش راهکارهای درمانی متفاوت، اغلب آن‌ها به‌دلیل نفوذ کم دارو به داخل بافت لوزالمعده و عدم پاسخ‌گویی تومورهای آن به درمان هنوز از مسایل حل نشده علم پزشکی می‌باشد. اولویت درمان در سرطان لوزالمعده افزایش کارایی روش‌های انتقال دارو و کاهش مقاومت به داروها می‌باشد که می‌تواند در درمان سایر بیماری‌ها از جمله انواع سرطان‌ها کمک‌کننده باشد.[۱]

شناخت اساس سلولی و مولکولی مقاومت دارویی سرطان لوزالمعده می‌تواند در بهبود روش‌های درمانی و افزایش کارایی درمان‌های رایج این بیماری مهلک کمک‌کننده باشد. تاکنون نقش ژن‌ها و مسیرهای زیادی که در مقاومت دارویی سرطان لوزالمعده نقش دارند و می‌توانند به‌عنوان اهداف دارویی به‌کار گرفته شوند، آشکار شده است. با این وجود اکثر آن‌ها مختص این نوع سرطان نبوده و نقش بالینی آن‌ها کاملاً مشخص نیست.[۲۳] برای غلبه بر مقاومت نسبت به داروی جمسیتابین تلاش‌های بیش‌تری برای یافتن روش‌های درمانی هدفمند لازم است. برای این کار تهیه مجموعه عوامل دخیل در ایجاد مقاومت و طبقه‌بندی بیماران براساس نیمرخ بیانی ژنتیکی آن‌ها و دریافت روش درمانی مناسب با آن ضروری به‌نظر می‌رسد. همچنین استفاده از داروها و روش‌های ترکیبی درمانی هم می‌تواند در بهبود درمان مؤثر باشد. عملی کردن چنین برنامه‌ای نیازمند تلاش‌های تحقیقاتی بنیادی در دو حوزه ژن‌های هدف و سیستم‌های انتقال کارآمد باشد.

محدودیت بررسی‌های انجام شده در زمینه بررسی

علت‌های مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی این است که علی‌رغم شناسایی نقش ژن‌های متنوع در ایجاد مقاومت در سرطان لوزالمعده، مسأله اپی‌ژنتیک و اهمیت آن در پیدایش مقاومت در این بیماری از نظرها دور مانده است. پیشرفت و تمرکز روی مسایل اپی‌ژنتیکی می‌تواند رویکرد استفاده از داروهای اپی‌ژنتیکی را در حوزه سلامت نهادینه سازد و امکان غلبه بر مقاومت نسبت به این دارو و یا حتی آنالوگ‌های نوکلئوزیدی دیگر را فراهم کند. همچنین نگاهی عمیق‌تر بر نقش پیچیده اعضای خانواده مولکول‌های کوچک RNA بر پاسخ‌گویی به داروها، مطالعه مسیرهای داخل سلولی که تحت تأثیر این مولکول‌ها قرار می‌گیرند، بیش از پیش ضروری به‌نظر می‌رسد تا با تحقیقات بعدی بر روی نمونه‌های بالینی نقش تغییرات ایجاد شده در بیان این ریزRNA ها و ژن‌ها در پیش‌آگهی به‌طور دقیق‌تری آشکار شود. این‌گونه مطالعات به‌ویژه زمانی که بر روی نمونه های انسانی اجرا می‌شوند مستلزم صرف هزینه و زمان فراوانی است. از طرف دیگر با توجه به مشکلات خاص مطالعات مرحله انسانی دقت و تلاش‌های بیش‌تر محققان در این زمینه مورد نیاز است است تا بروز هرگونه خطا به حداقل برسد.

❋مراجع:

1. Long J, Zhang Y, Yu X, Yang J, LeBrun DG, Chen C, et al. Overcoming drug resistance in pancreatic cancer. Expert Opin Ther Targets 2011; 15(7): 817-28. doi: 10. 1517/14728222.2011.566216.

2. Jamali A, Kamgar M, Massarrat S, Sotoudeh M, Larijani B, Adler G, et al. Pancreatic cancer: state of the art and current situation in the Islamic Republic of Iran. Govaresh. 2009; 14(3): 189-97. [In Persian]

3. Sarkar FH, Banerjee S, Li Y. Pancreatic cancer: pathogenesis, prevention and treatment. Toxicol Appl Pharmacol 2007; 224(3): 326-36.

4. Nakano Y, Tanno S, Koizumi K, Nishikawa T, Nakamura K, Minoguchi M, et al. Gemcitabine chemoresistance and molecular markers associated with gemcitabine transport and metabolism in human pancreatic cancer cells. Br J Cancer 2007; 96(3): 4. 57-63.

5. de Sousa Cavalcante, L. and G. Monteiro, Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. European j pharmacology, 2014. 741: p. 8-16.

6. Rukov JL, Shomron N. MicroRNA pharmacogenomics: post - transcriptional regulation of drug response. Trends Mol Med 2011; 17(8): 412-23. doi: 10.1016/j.molmed. 2011.04.003.

7. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular pharmacology of gemcitabine. Ann Oncol 2006; 17 Suppl 5: v7-12.

8. de Sousa Cavalcante L, Monteiro G. Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. Eur J Pharmacol 2014; 741: 8-16. doi: 10.1016/j. ejphar.2014.07.041.

9. Kwon WS, Rha SY, Choi YH, Lee JO, Park KH, Jung JJ, et al. Ribonucleotide reductase M1 (RRM1) 2464G> A polymorphism shows an association with gemcitabine chemosensitivity in cancer cell lines. Pharmacogenet Genomics 2006; 16(6): 429-38.

10. Lowery MA, O'Reilly EM Genomics and pharmacogenomics of pancreatic adenocarcinoma. Pharmacogenomics J 2012; 12(1): 1-9. doi: 10.1038/tpj.2011.52.

11. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T: Cellular pharmacology of gemcitabine. Ann Oncol 2006, 17(suppl 5): v7-v12.

12. Rajaei F, Otoi T. Effect of cryoprotectants on DNA fragmentation in porcine blastocysts. J Reprod Infertil 2007; 5: 37-43.
13. Rajaei F, Karja NW, Agung B, Wongsrikeao P, Taniguchi M, Murakami M, et al. Analysis of DNA fragmentation of porcine embryos exposed to cryoprotectants. Reprod Domest Anim 2005; 40(5): 429-32.
14. Whatcott C, Han H, Posner RG, Von Hoff DD. Tumor-stromal interactions in pancreatic cancer. Crit Rev Oncog 2013; 18(1-2): 135-51.
15. Onishi H, Morifuji Y, Kai M, Suyama K, Iwasaki H, Katano M. Hedgehog inhibitor decreases chemosensitivity to 5-fluorouracil and gemcitabine under hypoxic conditions in pancreatic cancer. Cancer Sci 2012; 103(7): 1272-9. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012. 02297.x.
16. Myers SN, Goyal RK, Roy JD, Fairfull LD, Wilson JW, Ferrell RE. Functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the human equilibrative nucleoside transporter 1. Pharmacogenet Genomics 2006; 16(5): 315-20.
17. Okazaki T, Javle M, Tanaka M, Abbruzzese JL, Li D. Single nucleotide polymorphisms of gemcitabine metabolic genes and pancreatic cancer survival and drug toxicity. Clin Cancer Res 2010; 16(1): 320-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1555.
18. Gray JH, Mangravite LM, Owen RP, Urban TJ, Chan W, Carlson EJ ,et al. Functional and genetic diversity in the concentrative nucleoside transporter, CNT1, in human populations. Mol Pharmacol 2004; 65(3): 512-9
19. Tanaka M, Javle M, Dong X, Eng C, Abbruzzese JL, Li D. Gemcitabine metabolic and transporter gene polymorphisms are associated with drug toxicity and efficacy in patients with locally advanced pancreatic cancer. Cancer 2010; 116(22): 5325-35. doi: 10.1002/cncr.25282.
20. Soo RA, Yong WP, Innocenti F. Systemic therapies for pancreatic cancer-the role of pharmacogenetics. Curr Drug Targets 2012; 13(6): 811-28.
21. Mann K, Melling J, Costello E, Halloran C, Ghaneh P, Greenhalf W. Changes in expression of the subunits of Ribonucleotide Reductase induce gemcitabine resistance in the Suit-2 Pancreatic Cancer Cell Line. Pancreatology 2016; 16(3): S27-8. doi: 10. 1016/j.pan.2016.05.095.
22. Fukunaga AK, Marsh S, Murry DJ, Hurley TD, McLeod HL. Identification and analysis of single-nucleotide polymorphisms in the gemcitabine pharmacologic pathway. Pharmacogenomics J 2004; 4(5): 307-14.
23. Bhardwaj V, Bhushan A, Lai JC, Tadinada SM. Failure of pancreatic cancer chemotherapy: consequences of drug resistance mechanisms. In: Srivastava SK, editor. Pancreatic cancer. molecular mechanism and targets. Rijeka, Croatia: InTech; 2012. p. 144–60.
24. Sylvia S. W. Ng, Tsao MS, Chow S, Hedley DW. Inhibition of phosphatidylinositide 3-kinase enhances gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. Cancer Res 2000; 60(19): 5451-5.
25. Yao J, Qian C. Inhibition of Notch3 enhances sensitivity to gemcitabine in pancreatic cancer through an inactivation of PI3K/Akt-dependent pathway. Med Oncol 2010; 27(3): 1017-22. doi: 10.1007/s12032-009-9326-5.
26. Jia Y, Xie J. Promising molecular mechanisms responsible for gemcitabine resistance in cancer. Genes Dis. 2015; 2(4):

2(4): 299-306.
27. Xie D, Xie K. Pancreatic cancer stromal biology and therapy. Genes Dis 2015; 2(2): 133-43.
28. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ , Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. Science 2009; 324(5933): 1457-61. doi: 10.1126/science. 1171362.
29. Wang HC, Hou YC, Shan YS. Advances in pancreatic cancer stem cells , tumor-associated macrophages, and their interplay. Cancer Cell Microenviron 2014; 1(3): 1: e304. doi: 10.14800/ccm.304.
30. Du Z, Qin R, Wei C, Wang M, Shi C, Tian R, et al. Pancreatic cancer cells resistant to chemoradiotherapy rich in “stem-cell-like” tumor cells. Dig Dis Sci 2011; 56(3): 741-50. doi: 10.1007/s10620-010-1340-0.
31. Candelaria M, De la Cruz-Hernández E, Pérez-Cárdenas E, Trejo-Becerril C, Gutiérrez-Hernández O, Dueñas-González A. Pharmacogenetics and pharmacoepigenetics of gemcitabine. Med Oncol 2010; 27(4): 1133-43. doi: 10.1007/s12032-009-9349-y.
32. Ramachandran K, Miller H, Gordian E, Rocha-Lima C, Singal R. Methylation-mediated silencing of TMS1 in pancreatic cancer and its potential contribution to chemosensitivity. Anticancer Res 2010; 30(10): 3919-25.
33. Qin L, Dong Z, Zhang JT. Reversible epigenetic regulation of 14-3-3σ expression in acquired gemcitabine resistance by Uhrf1 and DNA methyltransferase 1. Mol Pharmacol 2014; 86(5): 561-9. doi: 10.1124/ mol.114.092544.
34. Jonckheere N, Skrypek N, Van Seuningen I. Mucins and pancreatic cancer. Cancers 2010; 2(4): 1794-812. doi: 10.3390/ cancers2041794.
35. Vincent A, Ducourouble MP, Van Seuningen I. Epigenetic regulation of the human mucin gene MUC4 in epithelial cancer cell lines involves both DNA methylation and histone modifications mediated by DNA methyltransferases and histone deacetylases. FASEB J 2008; 22(8): 3035-45. doi: 10.1096/fj.07-103390.
36. Samulitis BK, Pond KW, Pond E, Cress AE, Patel H, Wisner L, et al. Gemcitabine resistant pancreatic cancer cell lines acquire an invasive phenotype with collateral hypersensitivity to histone deacetylase inhibitors. Cancer Biol Ther 2015; 16(1): 43-51. doi: 10.4161/15384047.2014.986967.
37. Ansari D, Urey C, Hilmersson KS, Bauden MP, Ek F, Olsson R. Apicidin sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine by epigenetically regulating MUC4 expression. Anticancer Res 2014; 34(10): 5269-76.
38. Borhani N, Rajaei F, Salehi Z, Javadi A. Analysis of DNA fragmentation in mouse embryos exposed to an extremely low-frequency electromagnetic field. Electromagn Biol Med 2011; 30(4): 246-52. doi: 10.3109/ 15368378.2011.589556.
39. Westphal S, Kalthoff H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer. Mol Cancer 2003; 2: 6.
40. Shi X, Liu S, Kleeff J, Friess H, Büchler MW. Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-Fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes. Oncology 2002; 62(4): 354-62.
41. Akada M, Crnogorac-Jurcevic T, Lattimore S, Mahon P, Lopes R, Sunamura M, et al. Intrinsic chemoresistance to

gemcitabine is associated with decreased expression of BNIP3 in pancreatic cancer. Clin Cancer Res 2005; 11(8): 3094-101.

42. Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. Curr Opin Pharmacol 2010; 10(5): 543-50. doi: 10.1016/j.coph.2010.05.010.

43. Li M, Marin-Muller C, Bharadwaj U, Chow KH, Yao Q, Chen C. MicroRNAs: control and loss of control in human physiology and disease. World J Surg 2009; 33(4): 667-84. doi: 10.1007/s00268-008-9836-x.

44. Rajabpour A, Rajaei F, Teimoori-Toolabi L. Molecular alterations contributing to pancreatic cancer chemoresistance. Pancreatology 2017; 17(2): 310-20. doi: 10.1016/j.pan.2016.12.013.

45. Zhang XJ, Ye H, Zeng CW, He B, Zhang H, Chen YQ. Dysregulation of miR-15a and miR-214 in human pancreatic cancer. J Hematol Oncol 2010; 3: 46. doi: 10.1186/1756-8722-3-46.

46. Giovannetti E, Funel N, Peters GJ, Del Chiaro M, Erozenci LA, Vasile E, et al. MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. Cancer Res 2010; 70(11): 4528-38. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4467.

47. Li Y, VandenBoom TG, Kong D, Wang Z, Ali S, Philip PA, et al. Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. Cancer Res 2009; 69(16): 6704-12. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1298.

48. Ji Q, Hao X, Zhang M, Tang W, Yang M, Li L, et al. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. PLoS One 2009; 4(8): e6816. doi: 10.1371/journal.pone.0006816.

49. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. EMBO Mol Med 2012; 4(3): 143-59. doi: 10.1002/emmm.201100209.