



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ
ΠΡΩΤΟΒΑΘΜΙΑ ΦΡΟΝΤΙΔΑ ΥΓΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***Διερεύνηση των συστατικών των στεγανών συνδέσμων ως
γονιδιακών βιοδεικτών σε ασθενείς με μεσοθηλίωμα μετά
απο έκθεση σε αμίαντο***

ΡΟΥΚΑ ΕΡΑΣΜΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σωτήρης Ζαρογιάννης, Λέκτορας, Επιβλέπων Καθηγητής

Χρύσα Χατζόγλου, Αν. Καθηγήτρια, Μέλος Τριμελούς Επιτροπής

Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης, Καθηγητής, Μέλος Τριμελούς Επιτροπής

ΛΑΡΙΣΑ, 2014



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ
ΠΡΩΤΟΒΑΘΜΙΑ ΦΡΟΝΤΙΔΑ ΥΓΕΙΑΣ



Investigation of tight junctions components as gene biomarkers in malignant mesothelioma after asbestos exposure

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Abstract	5
Εισαγωγή	6
Γενικό μέρος	7
1. Κακόηθες μεσοθηλίωμα	7
1.1. Επιδημιολογικά στοιχεία (επίπτωση/θνησιμότητα).....	7
1.2. Αιτιολογικοί παράγοντες.....	9
1.2.1 Αμίαντος.....	
1.2.2. Συν-παράγοντες κινδύνου.....	
1.2.2.1. Γενετική προδιάθεση και Εριονίτης.....	
1.2.2.2. Ίικη Καρκινογένεση.....	
1.2.2.3. Ιοντίζουσα ακτινοβολία.....	
1.2.2.4 Άλλες Ορυκτές ίνες.....	
1.2.2.5. Νανοσωλήνες Άνθρακα.....	
1.3. Ιστολογία και Σταδιοποίηση του κακοήθους μεσοθηλιώματος.....	16
1.4. Η ποιότητα ζωής των πασχόντων από κακόηθες μεσοθηλίωμα.....	18
2. Σύσταση και λειτουργία των στενοσυνδέσμων	20
3. Εφαρμογές της γενωμικής και βιοπληροφορικής στην κλινική ογκολογία και τη δημόσια υγεία	22
Ειδικό μέρος	24
1. Σκοπός	24
2. Υλικά και Μέθοδοι	24
3. Αποτελέσματα	27
4. Συζήτηση	44
5. Συμπεράσματα	53
Βιβλιογραφία	54

Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στα πλαίσια του ΜΠΣ 'Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας'. Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Σωτήρη Ζαρογιάννη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα αλλά και για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και συμπαράσταση σε κάθε βήμα της ερευνητικής διαδικασίας.

Κ. Ζαρογιάννη σας ευχαριστώ θερμά.

Θα ήθελα επιπρόσθετα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κ. Χρύσα Χατζόγλου και κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη για το διδακτικό τους έργο κατά τη διάρκεια των μαθημάτων και για την προθυμία τους να συζητήσουν οποιαδήποτε απορία ή άλλο θέμα προέκυπτε.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω την γραμματέα του μεταπτυχιακού κ. Κωνσταντίνα Τζερεμέ που πάντα μας εξυπηρέτησε με χαμόγελο στα δύο χρόνια του προγράμματος.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ,

Στην Ιωάννα και την Κατερίνα που πάντα βρίσκουν τρόπους να εκμηδενίζουν 140 χιλιόμετρα...

Στην Μαρία που με ανέχεται καθημερινά...

Στην οικογένεια μου, το μεγαλύτερο στήριγμα μου..

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κακόηθη μεσοθηλίωματα είναι εξαιρετικά επιθετικοί όγκοι με αυξανόμενη επίπτωση και κακή πρόγνωση. Αν και στη παθογένεια τους συμμετέχουν πολλαπλοί παράγοντες, περιβαλλοντικοί, ιικοί και γενετικοί, η έκθεση στον αμιάντο αποτελεί τον πρωταρχικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη τους. Η πρόωμη ανίχνευση των μεσοθηλιωμάτων περιορίζεται από τη μακρά λανθάνουσα περίοδο εκδήλωσης τους, την αδυναμία των απεικονιστικών τεχνικών να τα εντοπίσουν σε αρχικά στάδια, αλλά και από την απουσία μη επεμβατικών δεικτών με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των συστατικών των στεγανών συνδέσμων ως γονιδιακών βιοδεικτών στο κακόηθες μεσοθηλίωμα μετά από έκθεση σε αμιάντο. Ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε την εφαρμογή σύγχρονων εργαλείων πληροφορικής. Χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρονικές πλατφόρμες συλλογής δεδομένων μικροσυστοιχιών καθώς και βάσεις αποθήκευσης γνωστών αλλά και προβλεπόμενων βιολογικών αλληλεπιδράσεων. Τα αποτελέσματα της μελέτης είναι ενδεικτικά ενός ιδιαίτερου μοτίβου έκφρασης των συστατικών των στεγανών συνδέσμων στο κακόηθες μεσοθηλίωμα και αναδεικνύουν την αρχιτεκτονική του δικτύου των γονιδίων που αλληλεπιδρούν με τα παραπάνω συστατικά καθώς και τις μεταξύ τους ρυθμιστικές σχέσεις. Ταυτόχρονα, υποδεικνύουν την επιγενετική επίδραση του αμιάντου στο επίπεδο μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων. Η ενδοποίηση των ευρημάτων παρέχει ενδείξεις για τη πιθανή χρησιμότητα των υπό-μελέτη απορρυθμισμένων γονιδίων ως βιοδεικτών κινδύνου, διάγνωσης αλλά και πρόγνωσης της νόσου. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω καθώς είναι επιτακτική η ανάγκη ανεύρεσης βιοδεικτών με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα για το κακόηθες μεσοθηλίωμα ώστε τα άτομα υψηλού κινδύνου να κατευθυνθούν στους κατάλληλους προληπτικούς και/ή θεραπευτικούς χειρισμούς.

Λέξεις κλειδιά: αμιάντος, βιοδείκτες, κακόηθες μεσοθηλίωμα, στεγανοί σύνδεσμοι

ABSTRACT

Malignant mesotheliomas are highly aggressive tumors with a rising incidence and a poor prognosis. They are primarily associated with asbestos exposure although other factors, environmental, viral and genetic contribute to the pathogenesis. Early detection of mesotheliomas is restricted by the long latency period, the ineffectiveness of imaging techniques in detecting them at an early stage and by the lack of non-invasive biomarkers with high sensitivity and specificity. The aim of this study was the investigation of tight junction components as gene biomarkers in malignant mesothelioma after asbestos exposure. Contemporary bioinformatic tools were employed as part of the experimental design. A cancer microarray platform was used along with integrated databases of known and predicted biological functions. The results of the study are indicative of a distinct gene expression profile of tight junctions components in malignant mesothelioma and reveal the architecture of their gene interaction network as well as their regulatory relationships. The results are also suggestive of the epigenetic effect of asbestos in the transcriptional level of specific genes. The integration of findings provides indications for the potential utility of the under-study deregulated genes as biomarkers of risk, diagnosis and prognosis of the disease. The results should be further investigated as it is imperative to find biomarkers with high sensitivity and specificity for malignant mesothelioma so that individuals at high risk be directed to the appropriate preventive and/or therapeutic treatments.

Key words: asbestos, biomarkers, malignant mesothelioma, tight junctions

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα κακοήθη μεσοθηλιώματα (ΚΜ) είναι εξαιρετικά επιθετικοί όγκοι, ανθεκτικοί στις υπάρχουσες θεραπείες και σχετιζόμενοι πρωταρχικά με την έκθεση σε ίνες αμιάντου ως αποτέλεσμα της εκτεταμένης εμπορικής χρήσης του κατά τον 20^ο αιώνα. Παρά τις προσπάθειες απαγόρευσης της χρήσης αμιάντου, η επίπτωση του μεσοθηλιώματος έχει παραμείνει σταθερή στις Ηνωμένες Πολιτείες από το 1994 και μετά ενώ υπολογίζεται ότι θα συνεχίσει να αυξάνεται κατά 5-10%/έτος στην Ευρώπη κατά την επόμενη 25ετία. Αξιοσημείωτη αύξηση της επίπτωσης αναμένεται στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου η χρήση του αμιάντου εξακολουθεί να αυξάνεται εκθετικά (1). Ο εριονίτης που μοιράζεται παρόμοια φυσικά χαρακτηριστικά με τον αμιάντο επίσης προκαλεί μεσοθηλιώμα (1) ενώ τελευταία μελετάται εντατικά και ο ρόλος των νανοσωλήνων άνθρακα στην παθογένεια της νόσου (2). Καθώς το ΚΜ του υπεζοκώτα χαρακτηρίζεται από μη ειδικά κλινικά σημεία και συμπτώματα (θωρακικός πόνος, πλευριτική συλλογή), η πρώιμη διάγνωση του καθίσταται εξαιρετικά δύσκολη. Μέχρι σήμερα οι τεχνικές απεικόνισης (ακτινογραφία θώρακα, αξονική τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων) αποτελούν τα κύρια εργαλεία για τη διάγνωση και πρόγνωση της νόσου καθώς και για τον έλεγχο της θεραπευτικής ανταπόκρισης. Ωστόσο αυτές οι μέθοδοι δεν είναι πάντα αποτελεσματικές και δεν θεωρούνται κατάλληλες για μαζικό προ-συμπτωματικό έλεγχο. Ως εκ τούτου τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην ανεύρεση μη επεμβατικών διαγνωστικών δεικτών που θα μπορούσαν να μετρηθούν σε δείγματα ορού, πλάσματος ή πλευριτικού υγρού (3). Η συμβολή των σύγχρονων εργαλείων της γενωμικής και υπολογιστικής βιολογίας ήταν καθοριστική σε αυτήν την κατεύθυνση και οδήγησε στην ανακάλυψη της οστεοποντίνης και της φιμπουλίνης-3 (4-5). Ωστόσο μέχρι και σήμερα δεν έχουν ανακαλυφθεί υψηλής ειδικότητας και ευαισθησίας δείκτες για το κακόηδες μεσοθηλιώμα. Οι κυριότεροι περιορισμοί προκύπτουν από τα μικρά δειγματοληπτικά μεγέθη των μελετών, τα συστηματικά λάθη επιλογής που ευνοούν την ανάλυση του επιθηλιοειδούς τύπου του όγκου καθώς και από την έλλειψη εξωτερικής επικύρωσης (6). Η ανεύρεση νέων δεικτών και η ενσωμάτωση τους σε διαγνωστικούς αλλά και θεραπευτικούς αλγόριθμους θα βοηθήσει τους κλινικούς γιατρούς να κατευθύνουν τους ασθενείς στους κατάλληλους θεραπευτικούς χειρισμούς. Ταυτόχρονα, οι αναδυόμενες

πληροφορίες αναφορικά με τις αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ των γονιδίων όσο και μεταξύ των γονιδίων και των περιβαλλοντικών καρκινογόνων θα προσφέρουν μία πρόβλεψη του ατομικού κινδύνου εκδήλωσης της νόσου και θα δύναται να αξιοποιηθούν για τη χάραξη νέων στρατηγικών πρόληψης με απώτερο στόχο την επιτήρηση της δημόσιας υγείας (7).

Γενικό Μέρος

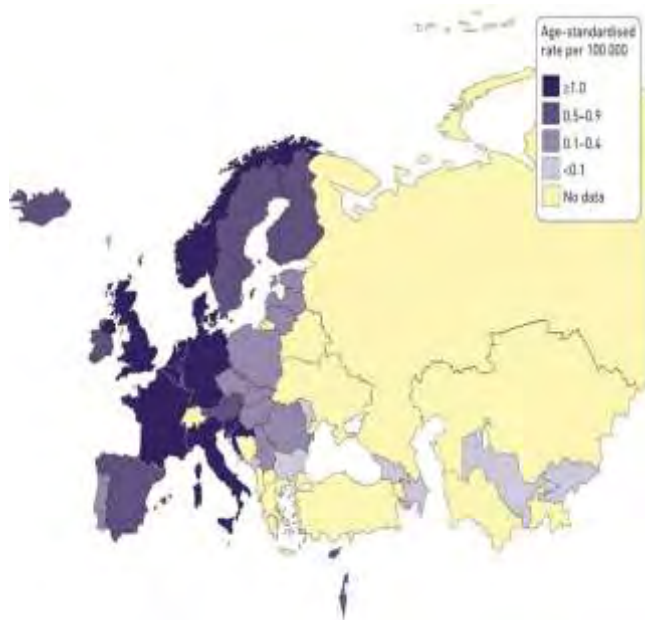
1. Κακόηθες Μεσοθηλιώμα

Το κακόηθες μεσοθηλιώμα είναι ένας επιθετικός και ανθεκτικός στη θεραπεία όγκος που αναπτύσσεται σε κοιλότητες επενδυμένες με μεσοθηλιακά κύτταρα. Οι μεσοθηλιακοί ιστοί προέρχονται από το μεσόδερμα και καλύπτουν τις κοιλότητες κατά όμοιο τρόπο με τα επιθηλιακά κύτταρα εξού και ο όρος μεσοθήλιο. Τα κακοήθη μεσοθηλιώματα εντοπίζονται συνήθως στον υπεζωκότα και το περιτόναιο ενώ σπανιότερα εμφανίζονται στην περικαρδιακή κοιλότητα και στον χιτώνα των όρχεων (8).

1.1. Επιδημιολογικά στοιχεία (επίπτωση/θνησιμότητα)

Η επίπτωση καθώς και η θνησιμότητα από κακόηθες μεσοθηλιώμα έχει αυξηθεί κατακόρυφα στις βιομηχανικές χώρες τα τελευταία χρόνια. Σήμερα, στις Ηνωμένες Πολιτείες διαγιγνώσκονται 2.000-3.000 νέα περιστατικά ανά έτος και υπολογίζεται ότι τα επόμενα είκοσι χρόνια ο αριθμός τους θα φτάσει τις 70.000. Στην Ευρώπη, αναμένεται αύξηση του αριθμού των θανάτων από 5.000 το 1998 σε περίπου 9.000 το 2018 ενώ προβλέπεται ότι τα επόμενα τριάντα χρόνια θα υπάρξουν 250.000 νέα περιστατικά (9) (**Εικόνες 1-2**). Επιπλέον εκτιμάται ότι λόγω της δυσκολίας στη διάγνωση του μεσοθηλιώματος παραβλέπεται το ένα στα τέσσερα με πέντε νέα περιστατικά που καταγράφονται, επομένως η πραγματική επίπτωση της νόσου είναι μεγαλύτερη από την υπολογιζόμενη (10). Στην Ελλάδα, μελέτη κατά την εικοσαετία 1983-2003 έδειξε ότι ο ειδικός δείκτης θνησιμότητας από κακόηθες μεσοθηλιώμα σχεδόν τριπλασιάστηκε τη δεκαετία 1994-2003 σε σχέση με την χρονική περίοδο 1983-1993 (11). Παράλληλα, ο υπολογισμός του ειδικού δείκτη θνησιμότητας ανά γεωγραφική περιοχή έδειξε ότι ο τελευταίος είναι μεγαλύτερος στην Ήπειρο και μικρότερος στη Θεσσαλία γεγονός που αντανακλά τις τοπικές διαφορές στην επίπτωση και θνησιμότητα της νόσου τόσο μεταξύ διαφορετικών χωρών όσο και ανάμεσα σε περιοχές της ίδιας χώρας (11-12). Τέλος, η περιγραφική ανάλυση των δεδομένων θανάτου από μεσοθηλιώμα που

αναφέρθηκαν στον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας στο χρονικό διάστημα 1994-2008 έδειξε ότι η μέση ηλικία θανάτου από τη νόσο είναι τα 70 έτη με αναλογία αντρών γυναικών 3.6:1 και κατανομή ανά ανατομική θέση, 41.3% στον υπεζωκότα, 4.5% στο περιτόναιο, 0.3% στο περικάρδιο και 43.1% σε μη ειδικές ανατομικές περιοχές (13).



Εικόνα 1. Το προτυπωμένο κατά ηλικία ηλικιακό θνησιμότητας από κακήθες μεσοθελίωμα. Στοιχεία από τη βάση δεδομένων θνησιμότητας του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Νοέμβριος 2011).

Πηγή: European Lung white book.

<http://www.erswhitebook.org/chapters/occupational-lung-diseases/>



Εικόνα 2. Θάνατοι από κακήθες μεσοθελίωμα στην Ελλάδα.

Πηγή: WHO mortality database

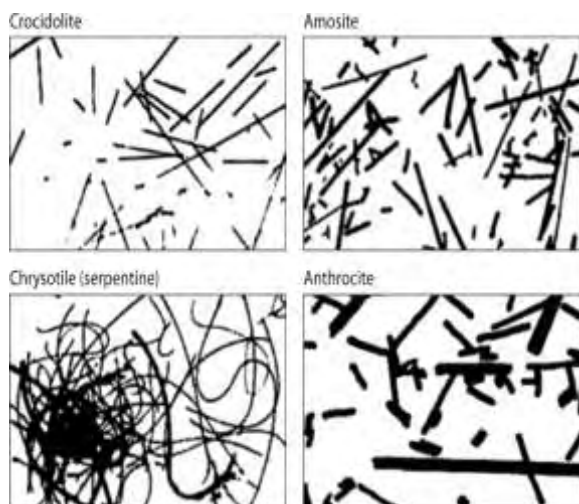
http://www.who.int/healthinfo/mortality_data/en/

1.2. Αιτιολογικοί παράγοντες

1.2.1. Αμίαντος

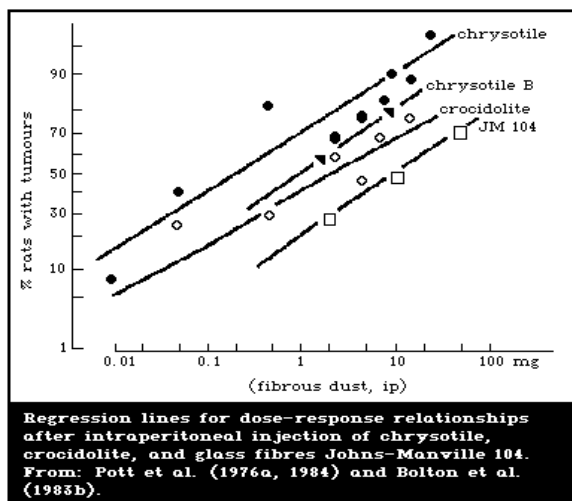
Η αιτιολογική σύνδεση μεταξύ της έκθεσης σε αμίαντο και της ανάπτυξης μεσοθηλιώματος περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1960 από τους Wagner et al. που παρατήρησαν την εμφάνιση του όγκου σε ανθρώπους που δούλευαν ή ζούσαν κοντά σε ορυχεία κροκιδολίτη στην επαρχία Cape της Νοτίου Αφρικής (14). Έκτοτε, πλήθος ερευνητικών μελετών επιβεβαίωσε τη παραπάνω σχέση (15-16) και σήμερα ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας κατατάσσει τον αμίαντο στα σημαντικότερα επαγγελματικά καρκινογόνα (13). Ο όρος αμίαντος αναφέρεται σε πολυάριθμα, φυσικά απαντώμενα ινώδη πυριτικά ορυκτά που χαρακτηρίζονται από μεγάλη αντοχή στον εφελκυσμό, στη θερμότητα και στις περισσότερες χημικές ουσίες (17). Απαντάται σε δύο μορφές, τον σερπεντινικό και τον αμφιβολιτικό ενώ στη χημική του δομή μπορεί να συμμετέχουν το μαγνήσιο, το ασβέστιο, ο σίδηρος και το νάτριο (18). Ο χρυσοτίλης, είναι ο μοναδικός της κατηγορίας των σερπεντινικών και υφίσταται ως μακριά, σγουρή, εύπλαστη ίνα, διαλυτή σε ιστούς (17, 19) (**Εικόνα 3**). Λόγω των ιδιοτήτων του αποτέλεσε τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη μορφή αμιάντου (περίπου 95% της παγκόσμιας παραγωγής και χρήσης) (16) ειδικά στην υφαντουργία (19). Οι αμφιβολιτικοί (κροκιδολίτης, αμοσίτης, τρεμολίτης, ακτινολίτης και ανθοφυλλίτης) υφίστανται ως κοντές, ίσιες, άκαμπτες ίνες με εξαιρετική αντίσταση στα χημικά και βιολογικά διαλύματα (17, 19) (**Εικόνα 3**). Έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή σωλήνων και πλακιδίων. Μίγματα των δύο μορφών, σερπεντινικού και αμφιβολιτικού έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή υλικών στέγασης, μόνωσης και πυρασφάλειας (19). Κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα ο αμίαντος αποτέλεσε αναπόσπαστο μέρος της διαδικασίας εκβιομηχάνισης. Έχει υπολογιστεί ότι κατά το χρονικό διάστημα 1900-2003 εξορύχτηκαν 182.2 εκατομμύρια μετρικοί τόνοι (Mt) αμιάντου ενώ η παγκόσμια παραγωγή κορυφώθηκε το 1975 με την εξόρυξη 5 Mt. Στα τέλη του 20^{ου} αιώνα οι κυβερνήσεις των ανεπτυγμένων χωρών απαγόρευσαν ή περιόρισαν σημαντικά τη χρήση αμιάντου. Αντιθέτως, η κατανάλωση του εξακολουθεί να αυξάνεται στην Ασία, τη Λατινική Αμερική και τη Κοινοπολιτεία των ανεξάρτητων κρατών (20). Η έκθεση στον αμίαντο μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε άμεση-επαγγελματική και έμμεση (21). Η τελευταία προκύπτει: **α.** κατά τη διαμονή σε περιοχές που γειτνιάζουν με ορυχεία αμιάντου ή με εργοστάσια που τον χρησιμοποιούν στην παραγωγική τους διαδικασία **β.** μέσω της επαφής των συζύγων και παιδιών με τα ρούχα του εκτεθειμένου—λόγω εργασίας—στον αμίαντο γονέα (ο κίνδυνος ανάπτυξης μεσοθηλιώματος σε αυτόν τον τύπο έκθεσης έχει καλά τεκμηριωθεί) (21) και **γ.** μέσω του περιβάλλοντος καθώς ο

αμιάντος μπορεί να απελευθερωθεί στην ατμόσφαιρα μέσω της φυσικής διαδικασίας της διάβρωσης αλλά και μέσω της ανθρωπογενούς δραστηριότητας σε περιοχές με φυσικά κοιτάσματα αμιάντου (21-22). Η τοξικότητα των ινών αμιάντου εξαρτάται από πολλαπλούς παράγοντες όπως η δόση, οι διαστάσεις των ινών, η ταχύτητα απομάκρυνσης τους από τους πνεύμονες και το γενετικό υπόστρωμα του εκτεθειμένου ξενιστή (17). Γενικά, οι ίνες με μήκος μεγαλύτερο των 10 μm θεωρούνται οι πιο καρκινογόνες ενώ οι ίνες με μήκος μεγαλύτερο των 20μm σχετίζονται με το φαινόμενο της ασβέστωσης. Υπάρχουν ωστόσο και ενδείξεις ότι ίνες με μήκος μικρότερο των 5 μm μπορούν να προκαλέσουν πνευμονική ίνωση και κακοήθεια ιδιαίτερα σε καταστάσεις υπερφόρτωσης του πνεύμονα όπως μπορεί να συμβεί κατά την έκθεση σε σύννεφα σκόνης (17) (**Εικόνα 4**). Η παραγωγή και κατανάλωση, σε εθνικό επίπεδο, του αμιάντου συσχετίζεται άμεσα με την επίπτωση του μεσοθηλιώματος (19-20) (**Εικόνα 5**).



Εικόνα 3. Οι διάφοροι τύποι αμιάντου: Ο χρυσοσίλης, ο μοναδικός της κατηγορίας των σερπεντινικών, ξεχωρίζει από την καμπυλόγραμμη μορφή των ινών του.

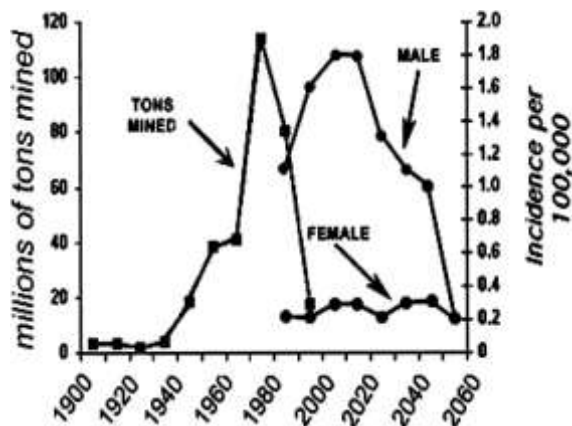
Πηγή: Annu Rev Pathol 2013; 8: 161–187



Εικόνα 4. Οι γραμμές παλινδρόμησης της σχέσης μεταξύ δόσης του χρυσοσίλης, του κροκιδολίτη και των ινών υάλου με την ανάπτυξη όγκου σε αρουραίους μετά από ενδοπεριτοναϊκή έγχυση.

Πηγή: International programme on chemical safety

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc53.htm>



Εικόνα 5. Η παραγωγή αμιάντου στις Ηνωμένες Πολιτείες κατά τον τελευταίο αιώνα και η επίπτωση του μεσοθηλιώματος από το 1980 έως το 2055 (αναμενόμενη επίπτωση)

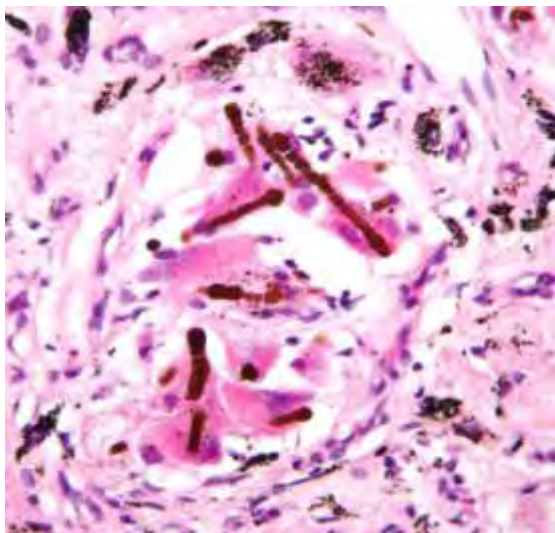
Πηγή: Chest 2004; 125:1103-1117

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ο αμιάντος επάγει την ανάπτυξη μεσοθηλιώματος περιλαμβάνουν:

1. Τον ερεθισμό του υπεζωκότα. Οι φυσικές ιδιότητες των ινών, κυρίως το σχήμα τους αλλά και η αναλογία μήκους/πλάτους καθορίζουν το βάθος εισπνοής αλλά και την ικανότητα των ινών να διεισδύσουν στο πνευμονικό επιθήλιο και να ερεθίσουν τον υπεζωκότα. Οι μακριές και λεπτές ίνες είναι οι πιο επικίνδυνες καθώς μπορούν να διεισδύσουν στον πνεύμονα ερεθίζοντας επανειλημμένα την επιφάνεια του μεσοθηλίου και προκαλώντας παρατεταμένους κύκλους βλάβης, επιδιόρθωσης και φλεγμονής που τελικά οδηγούν στο σχηματισμό πλακών ή στην ανάπτυξη μεσοθηλιώματος (23).
2. Την παρεμβολή στη μίτωση. Οι ίνες μπορούν να τραυματίσουν ή να τρυπήσουν τη μιτωτική άτρακτο διαταράσσοντας την διαδικασία της μίτωσης με αποτέλεσμα την πρόκληση χρωμοσωμικών βλαβών και παθολογικών καρυοτύπων (8, 21, 23). Η απώλεια του χρωμοσώματος 22 αποτελεί την συνηθέστερη βλάβη αλλά συχνά παρατηρούνται και δομικές ανακατατάξεις των χρωμοσωμικών περιοχών 1p, 3p, 9p και 6p. Η απώλεια του γονιδίου της νευροϊνωμάτωσης τύπου 2 (NF2), το οποίο εδράζει στη περιοχή 22q12, έχει παρατηρηθεί στο σύνολο (100%) των κυτταρικών σειρών μεσοθηλιώματος και μαζί με την απώλεια των P16^{INK4A} και P14^{ARF} που εδράζουν στον γενετικό τόπο CDKN2A της χρωμοσωμικής περιοχής 9p21 αποτελούν τις πιο κοινές μεταβολές (8, 19, 23-25).
3. Την δημιουργία τοξικών ριζών οξυγόνου. Κατά τη φαγοκυττάρωση των ινών αμιάντου από τα μακροφάγα οι τελευταίες καλύπτονται από πρωτεΐνες πλούσιες σε σίδηρο. Οι νέοι σχηματισμοί που προκύπτουν (ferruginous bodies) ευθύνονται για την αύξηση των τοξικών ριζών οξυγόνου που με τη σειρά τους προκαλούν μεταλλάξεις στο DNA και άρα προάγουν

την καρκινογένεση (8, 21, 23) (**Εικόνα 6**). Τα μακροφάγα τελικά αποτυγχάνουν να επιτελέσουν την φαγοκυττάρωση των ινών αμιάντου, στον εξωκυτταρικό χώρο απελευθερώνεται η δεσμευμένη στο DNA κυτοκίνη HMGB1 και ξεκινά μία χρόνια φλεγμονώδης απόκριση. Τα μακροφάγα συσσωρεύονται, απελευθερώνουν IL1 β και TNF α που με τη σειρά τους ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα NF κ B. Αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας είναι να επιβιώνουν τα μεσοθηλιακά κύτταρα που συσώρευσαν γενετικές βλάβες λόγω της έκθεσης στον αμιάντο (8, 21).

4. Τη συνεχή, διαμεσολαβούμενη από τις κινάσες σηματοδότηση. Ο υποδοχέας του επιδερμικού παράγοντα αύξησης (EGFR), υπερεκφράζεται σε πολλούς επιθηλιακούς όγκους συμπεριλαμβανομένου και του μεσοθηλιώματος. Η ενεργοποίηση αυτού του υποδοχέα πυροδοτεί σηματοδοτικά μονοπάτια που προωθούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετασχηματισμό ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν την έκφραση πρώτο-ογκογονιδίων όπως τα FOS και JUN (17, 23, 25).



Εικόνα 6. Μικρογραφία ασβέστωσης, διακρίνονται τα σωμάτια σιδήρου.

Πηγή: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/40/Ferruginous_body.jpg

1.2.2. Συν-παράγοντες κινδύνου

Ενώ το 80% των ασθενών με κακόηθες μεσοθηλιώμα έχει αποδεδειγμένα εκτεθεί στον αμιάντο, ποσοστό μικρότερο του 5% των εκτεθειμένων ατόμων τελικά εκδηλώνουν το νόσημα. Ως εκ τούτου και άλλοι παράγοντες συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου, είτε μόνοι τους, είτε σε συνδυασμό με τον αμιάντο (26-27).

1.2.2.1. Γενετική Προδιάθεση και Εριονίτης

Οι πρώτες ενδείξεις για τη πιθανή συμβολή των γενετικών παραγόντων στην αιτιοπαθογένεια του κακοήθους μεσοθηλιώματος προήλθαν κατά τη μελέτη της επιδημίας μεσοθηλιώματος στα χωριά Karain, Tuzkoy και Sarihidir της Καππαδοκίας. Η επιδημία συνδέθηκε αιτιολογικά με την έκθεση στον εριονίτη, ένα ινώδες ορυκτό της οικογένειας των ζεόλιθων που έχει παρόμοιες φυσικές ιδιότητες με τον κροκιδολίτη και αποτελεί ισχυρό καρκινογόνο για τα ζώα και τον άνθρωπο (21, 26, 28). Ενδοπεριτοναϊκές και ενδοϋπεζωκοτικές εγχύσεις εριονίτη σε αρουραίους και ποντικούς είχαν σαν αποτέλεσμα την επαγωγή κακοήθους μεσοθηλιώματος σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% έναντι του 48% που παρατηρήθηκε κατά την έγχυση αμιάντου και προτάθηκε ότι η ισχυρότερη, σε σχέση με τον αμιάντο, δράση του εριονίτη στην επαγωγή μεσοθηλιώματος οφείλεται στην μεγαλύτερη εγγενή του επιφάνεια (29). Παρατηρήθηκε ωστόσο μία ομαδοποίηση των περιστατικών κακοήθους μεσοθηλιώματος σε ορισμένες οικογένειες και απουσία της νόσου σε μέλη γειτονικών οικογενειών. Το εύρημα αυτό οδήγησε στην διατύπωση της υπόθεσης ότι η επιδημία κακοήθους μεσοθηλιώματος στην Καππαδοκία οφείλεται στην αλληλεπίδραση της περιβαλλοντικής έκθεσης στον εριονίτη με γενετικούς παράγοντες (28). Έκτοτε, οικογενειακά περιστατικά κακοήθους μεσοθηλιώματος παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν στην Καππαδοκία, έχουν αναφερθεί σε οικογένειες στην Ευρώπη και στις Ηνωμένες Πολιτείες (21, 26). Το 2011 βρέθηκε ότι βλαστικές μεταλλάξεις του γονιδίου BAP1 αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθους μεσοθηλιώματος και μελανώματος (1). Σήμερα, ο κλινικός φαινότυπος του κληρονομικού, προδιαθεσικού για καρκίνο BAP1 συνδρόμου, περιλαμβάνει και το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα ενώ εκτιμάται ότι ο καρκίνος του μαστού και το χολαγγειοκαρκίνωμα μπορεί να αποτελούν έκφραση του ίδιου συνδρόμου (30). Τα παραπάνω ευρήματα είναι ιδιαίτερα σημαντικά για το πεδίο της γενετικά καθοδηγούμενης προληπτικής ιατρικής καθώς παρέχουν τη δυνατότητα πρόβλεψης του κινδύνου νοσηρότητας και τη συνακόλουθη εφαρμογή των κατάλληλων παρεμβάσεων.

1.2.2.2. *Ιική Καρκινογένεση*

Οι πρώτες πειραματικές αποδείξεις της ικανότητας των ιών να επάγουν τον νεοπλασματικό μετασχηματισμό των κυττάρων του μεσοθηλίου σε ποντικούς και χάμστερ καταγράφηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1960 κατά τη μελέτη της πιθανής καρκινογόνου δράσης του ιού SV40 ενώ το 1970 ο ιός της λεύκωσης των πτηνών MC29 προκάλεσε κακόηθες μεσοθηλίωμα στο 35% των κοτόπουλων μετά από εμβολιασμό της περιτοναϊκής και περικαρδιακής κοιλότητας καθώς και των αεροφόρων κοιλοτήτων (29, 31). Ο SV40 είναι DNA ιός της οικογένειας Polyomaviridae, ενδημικός στους Ασιατικούς πιθήκους του γένους Macaque. Στο χρονικό διάστημα 1954-1978 εκατομμύρια άνθρωποι εκτέθηκαν στον ιό μέσω των επιμολυσμένων εμβολίων polio Salk και Sabin. Πειραματικά, ο SV40 προκαλεί κακόηθες μεσοθηλίωμα στο 60% των χάμστερ μετά από ενδοκαρδιακή έγχυση ενώ η ενδοϋπεζωκοτική έγχυση οδηγεί στην εκδήλωση της νόσου στο σύνολο (100%) των ζώων εντός 4-6 μηνών (21). Στα ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα ο SV40 αντιγράφεται προκαλώντας ελάχιστη κυτταρική λύση. Η παρατεταμένη έκφραση των ογκογόνων αντιγόνων του ιού (του μεγάλου T αντιγόνου, Tag και του μικρού t αντιγόνου, tag) στο σύνολο των μολυσμένων κυττάρων προκαλεί έναν αρκετά υψηλό ρυθμό κακοήθους μετασχηματισμού, περίπου $1/10^3$ κύτταρα (27). Ωστόσο, το 2002, μετά από ανασκόπηση των διαθέσιμων επιδημιολογικών ερευνών, η επιτροπή ασφάλειας εμβολίων της Εθνικής Ακαδημίας Επιστημών των ΗΠΑ κατέληξε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν επαρκείς αποδείξεις υπέρ ή κατά της υπόθεσης ότι τα επιμολυσμένα με τον ιό SV40 εμβόλια προκάλεσαν κακόηθες μεσοθηλίωμα και αυτό γιατί θεωρούνται ανεπαρκείς οι επιδημιολογικές μελέτες (27, 29).

1.2.2.3. *Ιοντίζουσα ακτινοβολία*

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία αποτελεί εδραιωμένο παράγοντα κινδύνου για διάφορους τύπους καρκίνου όπως οι αιματολογικές κακοήθειες αλλά και οι συμπαγείς όγκοι. Περιστατικά κακοήθους μεσοθηλιώματος έχουν αναφερθεί σε ανθρώπους χρονίως εκτεθειμένους σε χαμηλά επίπεδα ακτινοβολίας όπως οι εργαζόμενοι σε εργοστάσια ατομικής ενέργειας καθώς και σε ασθενείς μετά από θεραπευτική ακτινοβολήση και/ή χορήγηση διοξειδίου του θορίου που αποτελεί αδιάλυτο και μη απεκκρινόμενο διαγνωστικό σκιαγραφικό μέσο γνωστό ως Thorotrast. Η έκθεση στο Thorotrast έχει βρεθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθους μεσοθηλιώματος του υπεζωκότα και του περιτοναίου σε πληθυσμούς στη Δανία, τη Σουηδία, την Ιαπωνία, τη Γερμανία και τις Ηνωμένες Πολιτείες. Η

απόδειξη που συνδέει τη θεραπευτική ακτινοβολήση με την εμφάνιση μεσοθηλιώματος προήλθε τόσο από αναφορές περιστατικών όσο και από μεγάλης κλίμακας αναδρομικές μελέτες κοόρτης. Η λανθάνουσα περίοδος κυμαινόταν από τα 7 έως τα 50 έτη, με μέσο τα 21 χρόνια και με ίση αναλογία αντρών γυναικών (29).

1.2.2.4. Άλλες ορυκτές ίνες

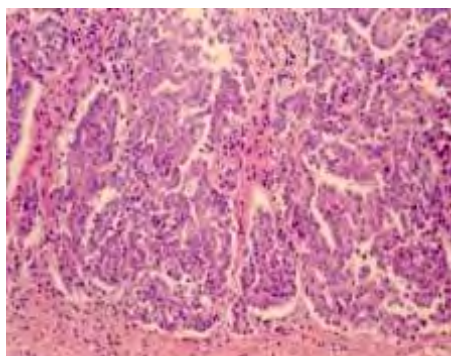
Στη πόλη Biancavilla της ανατολικής Σικελίας παρουσιάστηκε μία σωρεία περιστατικών κακοήθους μεσοθηλιώματος που συνδέθηκε αιτιολογικά με την ανεύρεση στα γειτονικά λατομεία του φθοριούχου εδενίτη, ενός ορυκτού παρόμοιου σε μορφολογία και σύνθεση με τον ακτινολίτη και τρεμολίτη. Ορυκτές ίνες του φθοριούχου εδενίτη με μήκος 20-40μm ανευρέθηκαν στα δείγματα πτυέλου του 50% των κατοίκων καθώς και στον πνεύμονα και τους λεμφαδένες προβάτων της περιοχής. Η έκθεση σε οργανικές ίνες έχει επίσης αναφερθεί ως αιτία ανάπτυξης κακοήθους μεσοθηλιώματος σε εργαζόμενους στη βιομηχανία ζαχαροκαλάμου που ήρθαν σε επαφή με κρυσταλλικές ίνες πυριτίου φυτικής προέλευσης. Ωστόσο προς το παρόν δεν έχουν δημοσιευτεί μελέτες που να επιβεβαιώνουν τη παραπάνω υπόθεση (29).

1.2.2.5. Νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs)

Οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) είναι σημαντικά προϊόντα της νανοτεχνολογίας που χρησιμοποιούνται σε πλήθος εφαρμογών όπως στην ιατρική και ηλεκτρονική (2, 29). Ανευρίσκονται είτε ως συμπαγή συμπλέγματα είτε ως μακριές, ίσιες ίνες (29) και καθώς είναι σωματίδια με τουλάχιστον μία διάσταση μικρότερη από 100nm κατατάσσονται στα νανοσωματίδια με υψηλή αναλογία διαστάσεων (HARN) (2). Η πειραματική εμφύτευση των CNTs στη περιτοναϊκή κοιλότητα των ποντικών προκάλεσε παρόμοιο βαθμό φλεγμονής και ίνωσης με αυτόν που επάγουν οι μακριές ίνες του αμοσίτη. Το αναγκαίο μήκος για παθογονικότητα εκτιμήθηκε στα 15-20μm. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και κατά την πειραματική εμφύτευση των CNTs στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Ωστόσο λόγω της ετερογένειας των CNTs αλλά και της διαφορετικής χρήσης τους, οι τοξικολογικές μελέτες θα πρέπει να διεξάγονται λαμβάνοντας υπόψη τις πιθανές αλληλεπιδράσεις των CNTs με τον ιστό-στόχο και τη πιθανή τους βιοκατανομή ενώ θα πρέπει να εκτιμώνται και οι συνθήκες καθώς και ο τύπος της έκθεσης (2).

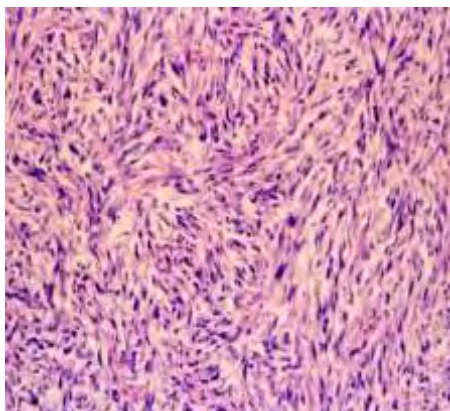
1.3. Ιστολογία και Σταδιοποίηση του Κακοήθους Μεσοθηλιώματος

Ιστολογικά, το κακόηθες μεσοθηλίωμα αντιπροσωπεύεται από τρία κυρίως πρότυπα ανάπτυξης: το επιθηλιοειδές, το σαρκωματώδες και το διφασικό ή μικτό με αναλογία που κυμαίνεται μεταξύ 50-70%, 10-40% και 10-15% για κάθε τύπο αντίστοιχα (8). Ο δεσμοπλαστικός φαινότυπος είναι εξαιρετικά σπάνιος, με αναλογία μεταξύ 1-2% (**Εικόνες 7-10**) (32). Ωστόσο, τα παραπάνω ποσοστά επηρεάζονται από τη διαγνωστική τεχνική αλλά και τον αριθμό των εξετασθέντων βιοψιών (8, 32). Οι τρεις κύριοι φαινότυποι συνδέονται στενά με την επιβίωση των πασχόντων. Η διάμεση επιβίωση ελαττώνεται σημαντικά από τους 12 μήνες για τον επιθηλιοειδή τύπο, στους 4 μήνες για τον σαρκωματώδη (8). Η ακριβής διάγνωση του μεσοθηλιώματος και η διάκριση του από άλλες νοσολογικές οντότητες είναι ιδιαίτερα σημαντική για τους ασθενείς, τόσο για τον μετέπειτα κλινικό τους χειρισμό όσο και για τη νομική διεκδίκηση αποζημίωσης (23, 32) (**Πίνακας 1**). Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις αποτελούν χρήσιμα εργαλεία διάγνωσης αλλά θα πρέπει να επιλέγεται ο σωστός συνδυασμός αντισωμάτων, ως θετικών ή αρνητικών δεικτών και τα αποτελέσματα να εκτιμώνται συνολικά (32) (**Πίνακας 2**). Η ποσοτική μέτρηση πρωτεϊνών σε δείγματα πλάσματος, ορού και υπεζωκοτικών συλλογών αποτελεί συμπληρωματικό διαγνωστικό εργαλείο ωστόσο είναι ελάχιστοι οι δείκτες με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για το κακόηθες μεσοθηλίωμα (όπως η μεσοθηλίνη, η οστεοποντίνη και το υαλουρονικό) (8) και πλέον η σύγχρονη έρευνα αξιοποιεί τις μικροσυστοιχίες DNA ώστε να ταυτοποιηθεί το μοριακό προφίλ του όγκου και να επιτευχθεί η γενετική διάκριση του από άλλες κακοήθειες (23). Η σωστή σταδιοποίηση του κακοήθους μεσοθηλιώματος είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό συγκριτικών μελετών, για την επιλογή των κατάλληλων θεραπευτικών χειρισμών καθώς και για την εκτίμηση της πρόγνωσης (33). Υπάρχουν τουλάχιστον πέντε συστήματα σταδιοποίησης της νόσου (33) με κυρίαρχα τα Butchart, Brigham και TNM. Το τελευταίο λαμβάνει υπόψη τρεις μεταβλητές: τον όγκο, τους λεμφαδένες και τις μεταστάσεις. Ωστόσο η σταδιοποίηση δεν προβλέπει πάντα επιτυχώς την επιβίωση και είναι εφικτή μόνο μετά το χειρουργείο.



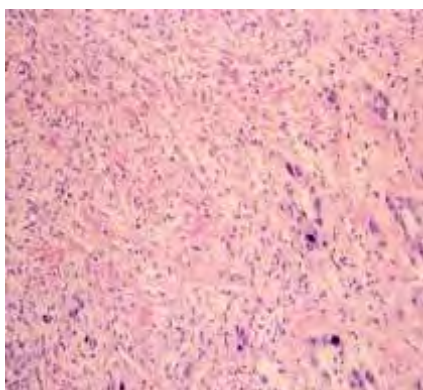
Εικόνα 7. Μικροφωτογραφία του επιθηλιοειδούς τύπου μεσοθηλιώματος με επικρατούσα τη φουσαλοειδή-σωληνοειδή δομή.

Πηγή: *Environ Health Prev Med* 2008;13(2):60-64



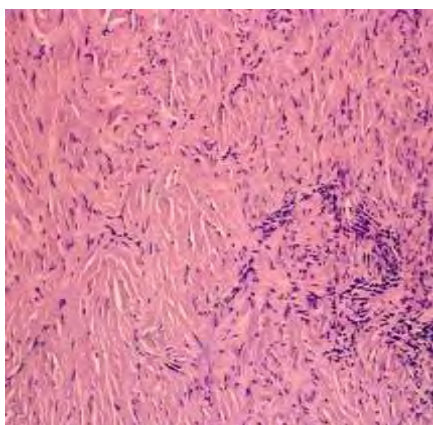
Εικόνα 8. Μικροφωτογραφία του σαρκωματώδους μεσοθηλιώματος.

Πηγή: Environ Health Prev Med 2008;13(2):60-64



Εικόνα 9. Μικροφωτογραφία του διφασικού τύπου μεσοθηλιώματος.

Πηγή: Environ Health Prev Med 2008;13(2):60-64



Εικόνα 10. Μικροφωτογραφία του δεσμοπλαστικού μεσοθηλιώματος με κυρίαρχα χαρακτηριστικά την κοκκίδωση ή ινώδη πλευρίπιδα.

Πηγή: Environ Health Prev Med 2008;13(2):60-64

1.4. Η ποιότητα ζωής των πασχόντων από κακόηθες μεσοθελίωμα.

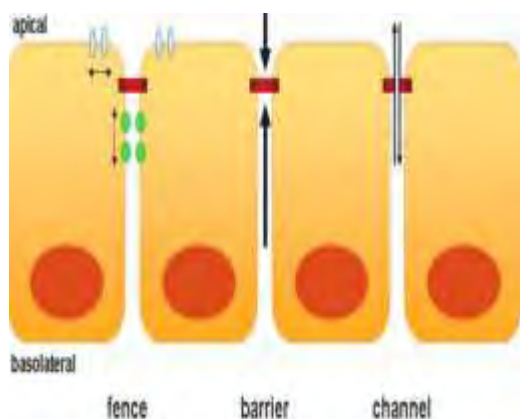
Η επίπτωση του κακοήθους μεσοθελιώματος στην υγεία των ασθενών είναι πολυδιάστατη καθώς πέρα από τα σοβαρά σωματικά συμπτώματα (πόνος, κόπωση, βήχας, απώλεια όρεξης, εφίδρωση, διαταραχές του ύπνου), το νόσημα συνοδεύεται από μειωμένη συναισθηματική λειτουργία (αγωνία, κατάθλιψη, φόβος, απομόνωση) καθώς και από αλλαγές στους κοινωνικούς ρόλους και τις διαπροσωπικές σχέσεις. Σε πρόσφατη έρευνα (34) εκτιμήθηκαν με τη βοήθεια ερωτηματολογίων, η ποιότητα ζωής και τα χαρακτηριστικά της προσωπικότητας των ασθενών αλλά και των πρώτου βαθμού συγγενείας φροντιστών τους. Τόσο οι ασθενείς όσο και οι συγγενείς ανέφεραν φτωχότερη σωματική υγεία από το δείγμα ελέγχου. Ωστόσο οι πάσχοντες είχαν καλύτερη αίσθηση της φυσικής τους εξασθένησης και ανέφεραν συχνά προβλήματα μνήμης και δυσκολίες συγκέντρωσης ενώ είχαν και μεγαλύτερη πεποίθηση ότι οι στόχοι δεν μπορούν να επιτευχθούν ή τα προβλήματα να επιλυθούν. Οι συγγενείς επίσης εμφάνισαν την ίδια πεποίθηση, ανέφεραν συν-νοσηρότητα από ψυχολογικά αίτια, αναποφασιστικότητα, αναποτελεσματικότητα και αίσθηση φόβου για το ενδεχόμενο πιθανής νόσησης λόγω της έμμεσης έκθεσης τους στον αμίαντο. Οι ερευνητές υπογράμμισαν ότι συναισθήματα όπως η θλίψη, η αγωνία, και ο θυμός ενδεχόμενα δεν σχετίζονται απευθείας και αποκλειστικά με τη νόσο αλλά και με το γεγονός ότι στη πλειονότητα τους οι πάσχοντες εκτέθηκαν στο καρκινογόνο πριν την εφαρμογή μέτρων ασφάλειας στο περιβάλλον εργασίας ως εκ τούτου μέρος του θυμού τους κατευθύνεται προς τους εργοδότες. Επιπλέον, στο άρθρο επισημαίνεται η επίδραση που έχει η μακροχρόνια διεκδίκηση οικονομικής αποζημίωσης μέσω ένδικων μέσων στα επίπεδα άγχους των ασθενών και των μελών της οικογένειάς τους. Εν κατακλείδι, οι πάροχοι υγειονομικής περίθαλψης θα πρέπει να αξιολογούν συνεχώς τη συνεχιζόμενη συναισθηματική προσαρμογή των πασχόντων και συγγενών κατά τη πορεία της νόσου, και να παρέχουν διαρκή υποστήριξη για τη μείωση της συναισθηματική 'δυσφορίας' (34).

Πίνακας 1. Διαφορική διάγνωση του Μεσοθηλιώματος.	
Ανατύπωση από: Environ Health Prev Med 2008;13(2):60-64	
Επιθηλιοειδές	
Υπεζωκότας	Αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα
	Μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα με συμμετοχή του υπεζωκότα
	Αντιδραστική Μεσοθηλιακή Υπερπλασία
Περιτόναιο	Ορώδες-Θηλώδες αδενοκαρκίνωμα των ωθηκών
	Ορώδες καρκίνωμα του περιτοναίου
Σαρκωματώδες	
Υπεζωκότας	Σάρκωμα (θωρακικό τοίχωμα, υπεζωκότας, πνεύμονας)
	Σαρκωματοειδές καρκίνωμα του πνεύμονα
Περιτόναιο	Σάρκωμα (κοιλιακό τοίχωμα, έντερο, περιτόναιο)
Δεσμοπλαστικό	
Υπεζωκότας	Ινώδης πλευρίτιδα
Διφασικό	
Υπεζωκότας	Καρκινοσάρκωμα ή Βλάστωμα του πνεύμονα
	Διφασικό, αρθρικό σάρκωμα του υπεζωκότα
Περιτόναιο	Καρκινοσάρκωμα ωθηκών, μήτρας

Πίνακας 2. Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται στην ανοσοϊστοχημική χρώση για τη διαφορική διάγνωση του μεσοθηλιώματος.		
Ανατύπωση από: Environ Health Prev Med 2008;13(2):60-64		
Τύπος Μεσοθηλιώματος	Θετικοί δείκτες	Αρνητικοί δείκτες
Επιθηλιοειδές	Καλρετινίνη	Επιφανειοδραστική αποπρωτεΐνη
	Θρομβομοδουλίνη	Ναψίνη Α
	Μεσοθηλίνη	Καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο
	Πρωτεΐνη του όγκου Wilms (WT ₁)	Μεταγραφικός παράγοντας του θυρεοειδούς (TTF ₋₁)
	Μονοκλωνικό αντίσωμα D ₂₋₄₀	Μονοκλωνικό αντίσωμα Ber EP4
		Μονοκλωνικό αντίσωμα MOC ₃₁
	Υποδοχέας Οιστρογόνου	
Σαρκωματώδες	Μίγμα μονοκλωνικών αντισωμάτων κυτοκερατίνης AE ₁ /AE ₃	Μυογλοβίνη, Μονοκλωνικό αντίσωμα Myo D ₁
	Μονοκλωνικό αντίσωμα κυτοκερατίνης CAM _{5.2}	Δεσμίνη, αντίσωμα h-cal
		S-100p, KP-1

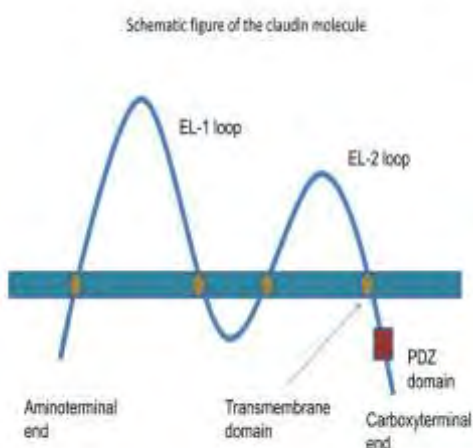
2. Σύσταση και λειτουργία των στενοσυνδέσμων

Οι στενοσύνδεσμοι ή στεγανοί σύνδεσμοι ανήκουν στις μεμβρανικές διαφοροποιήσεις απόφραξης του πλευρικού τμήματος της πλασματικής μεμβράνης. Παρατηρούνται κυρίως σε κύτταρα σπονδυλωτών και είναι άφθονοι στα επιθηλιακά κύτταρα του πεπτικού συστήματος. Αποτελούν φραγμούς που αποτρέπουν την είσοδο ουσιών στον διακυτταρικό χώρο ενώ ταυτόχρονα παρεμποδίζουν την ανάμιξη δομικών μεμβρανικών συστατικών στο κορυφαίο (apical) και το βασικό πλευρικό τμήμα του κυττάρου (basolateral), συμβάλλοντας στη διατήρηση της κυτταρικής πολικότητας (**Εικόνα 11**). Παράλληλα, συνεισφέρουν στη μηχανική στερεότητα των ιστών. Οι στενοσύνδεσμοι συγκροτούνται από προϋπάρχοντα πρωτεϊνικά σύμπλοκα μέσω μίας διαδικασίας που ελέγχεται από τη συγκέντρωση του εξωκυτταρικού ασβεστίου (Ca^{2+}) και μηχανισμούς κυτταρικής προσκόλλησης (35). Τα κύρια συστατικά αυτών των συμπλόκων είναι οι πρωτεΐνες ZO-1, ZO-2, ZO-3, τα συνδεσμικά μόρια προσκόλλησης (JAMs), η ζινγκουλίνη (cingulin), οι κλαουδίνες (claudins) και οι οκλουδίνες (occludins). Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες έχουν συσχετισθεί με διαδικασίες σηματοδότησης και 'αγκύρωσης' του δεσμοσώματος στα μικροϊνίδια ακτίνης του κυτταρικού σκελετού σε αντίθεση με τις κλαουδίνες που κυρίως ελέγχουν την διαπερατότητα των διαλυμένων ουσιών διαμέσου του παρακυτταρικού χώρου των επιθηλιακών στιβάδων με έναν μηχανισμό διαλογής βασισμένο στο μέγεθος και το φορτίο των ιόντων (36). Οι κλαουδίνες ανακαλύφθηκαν το 1998 και σήμερα, είναι γνωστή η ύπαρξη και έκφραση 27 γονιδίων κλαουδινών στα κύτταρα των θηλαστικών εκ των οποίων το 13^ο απουσιάζει στον άνθρωπο (37-38). Το μόριο των κλαουδινών χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τεσσάρων διαμεμβρανικών περιοχών, δύο εξωκυτταρικών βρόχων και ενός μικρού ενδοκυτταρικού (**Εικόνα 12**). Ο μεγαλύτερος εξωκυτταρικός βρόχος (EL-1) ρυθμίζει τη διαπερατότητα των διαλυμένων ουσιών και την επιλογή ιόντων ενώ ο δεύτερος (EL-2) επιτρέπει την επαφή με τα μόρια κλαουδινών των γειτονικών κυττάρων. Το ενδοκυτταρικό καρβοξυτελικό τμήμα των κλαουδινών συνδέεται μέσω της περιοχής PDZ στις υπόλοιπες πρωτεΐνες του στενοσυνδέσμου. Στην **Εικόνα 13** παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις των κλαουδινών με τα υπόλοιπα δομικά συστατικά του στενοσυνδέσμου καθώς και με τα μικροϊνίδια του κυτταρικού σκελετού.



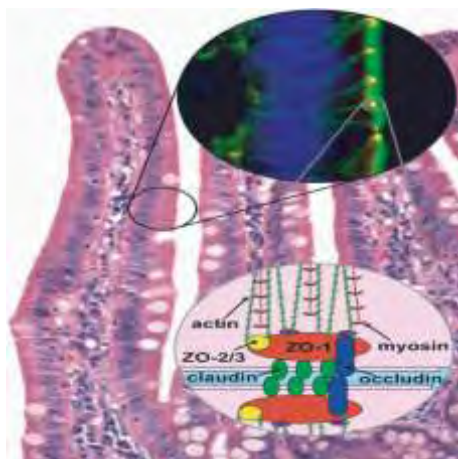
Εικόνα 11. Οι κύριες λειτουργίες του στενοσυνδέσμου. Αποτελεί φραγμό και δεν επιτρέπει την είσοδο ουσιών στο διακυτταρικό χώρο (barrier). Επιπλέον, παρεμποδίζει την ανάμιξη δομικών μεμβρανικών πρωτεϊνών ανάμεσα στο κορυφαίο και το βασικό-πλευρικό τμήμα του κυττάρου (fence) ενώ παράλληλα ελέγχει την διαπερατότητα των διαλυμένων ουσιών στο επιθήλιο (channel).

Πηγή: Perit Dial Int 2008;28(6):577-584



Εικόνα 12. Δομή του μορίου των κλαουδινών. Διακρίνονται οι εξωκυτταρικοί βρόχοι EL-1, EL-2 καθώς και ο μικρός ενδοκυτταρικός βρόχος. Οι κλαουδίνες, συνδέονται στη 'σκαλωσιά' του στενοσυνδέσμου μέσω της περιοχής PDZ του καρβοξυτελικού τους άκρου.

Πηγή: Respir Res 2011;12:70



Εικόνα 13. Η αλληλεπίδραση των κλαουδινών με τα υπόλοιπα δομικά συστατικά του στενοσυνδέσμου καθώς και με τα μικροϊνίδια ακτίνης-μυοσίνης του κυτταρικού σκελετου. Στην ένθετη εικόνα απεικονίζεται η περιορισμένη θέση του στενοσυνδέσμου επί των μικροϊνιδίων ακτίνης με την τεχνική του ανοσοφθορισμού.

Πηγή: Lab Invest 2004;84:282-291

Οι κλαουδίνες 2, 7, 10, 15, 16 αυξάνουν την διαπερατότητα των ιόντων μέσω του σχηματισμού πόρων στους στενοσυνδέσμους σε αντίθεση με τις κλαουδίνες 4, 5, 8, 11, 14, 18 που επιτελούν τη λειτουργία της στεγανοποίησης (36, 38). Διαφορετικοί ιστοί έχουν διαφορετικές απαιτήσεις παρακυτταρικής μεταφοράς ιόντων, ως εκ τούτου θεωρείται ότι οι διαφορετικοί συνδυασμοί των κλαουδινών σε ένα δεδομένο κύτταρο, καθορίζουν την στεγανότητα και επιλεκτικότητα των στενοσυνδέσμων (39). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η έκφραση των γονιδίων των κλαουδινών μεταβάλλεται σε πολλές νεοπλασματικές νόσους παρατήρηση που επιβεβαιώνει το φαινόμενο της αποσυναρμολόγησης των στενοσυνδέσμων κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης (40-41). Η απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των κλαουδινών στον καρκίνο παρέχει σημαντικές ενδείξεις για πιθανή συμμετοχή τους στις κυτταρικές λειτουργίες του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Ταυτόχρονα υποδεικνύει τη χρησιμότητα τους ως βιοδεικτών για τη πρόληψη, την ανίχνευση, τη διαφορική διάγνωση, τη πρόγνωση αλλά και την απόκριση στη θεραπεία των νεοπλασμάτων (39-41).

3. Εφαρμογές της γενωμικής και βιοπληροφορικής στην κλινική ογκολογία και τη δημόσια υγεία.

Η εφαρμογή των τεχνολογιών 'ωμικής' (γενωμική, πρωτεωμική, επιγενωμική, μεταβολωμική) κατά τη τελευταία δεκαετία άλλαξε σημαντικά το τοπίο της βιοϊατρικής έρευνας θέτοντας τα θεμέλια για την ανάπτυξη της βιολογίας συστημάτων και την ολιστική προσέγγιση των οργανισμών (42). Ταυτόχρονα, οι νέες τεχνικές ανέδειξαν τη σημασία των πλειοτροπικών επιδράσεων και των περιβαλλοντικών παραγόντων στην αιτιολογία των νοσημάτων. Σήμερα έχει καθιερωθεί η γνώση ότι τα γονίδια δεν δρουν αυτόνομα καθώς ανταποκρίνονται σε εσωτερικά και εξωτερικά σήματα. Στην πραγματικότητα, τα κύρια αίτια νοσηρότητας και θνησιμότητας προκύπτουν ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των γονιδίων με το περιβάλλον (7). Η αφομοίωση και ενσωμάτωση της γενωμικής στον κλάδο της δημόσιας υγείας πιστεύεται ότι θα αποτελέσει μελλοντικά τη μεγαλύτερη πρόκληση για τα Εθνικά Συστήματα Υγείας καθώς οι αναδυόμενες πληροφορίες θα μπορούν να αξιοποιηθούν για τη χάραξη νέων στρατηγικών πρόληψης των ασθενειών με απώτερο στόχο τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας (43). Επιπλέον, η αναγνώριση βιοδεικτών κινδύνου εμφάνισης των ασθενειών θα έχει παγκόσμιες επιπτώσεις στην προστασία της ασφάλειας των εργαζομένων. Το 2004, το Εθνικό γραφείο της Γονιδιωμικής για τη Δημόσια Υγεία (National Office of Public Health Genomics) και το Εθνικό Ινστιτούτο Επαγγελματικής Ασφάλειας και Κινδύνων (National Institute of Occupational Safety and Hazards) του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης ασθενειών των Ηνωμένων Πολιτειών αντιμετώπισε αυτό το

αναδυόμενο ζήτημα δημόσιας υγείας με την ανάπτυξη τριών ερευνητικών προτεραιοτήτων στον τομέα της επαγγελματικής γενετικής. Το 1994 οι Smith και συνεργάτες παρατήρησαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ασβέστωσης σε ξυλουργούς με ομόζυγη απαλειφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την τρανσφεράση της S γλουταθειόνης (GSTM-1) ένα ένζυμο απαραίτητο για την απάντηση στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται στον πνευμονικό ιστό από την έκθεση στον αμianto. Το 50% των Καυκάσιων παρουσιάζει αυτή την απαλειφή. Πρόσφατα στοιχεία έχουν δείξει ότι άτομα με πολυμορφισμούς του GSTM-1 έχουν αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη κακοήθους μεσοθηλιώματος. Αυτό το παράδειγμα προβάλλει τη σημασία της γονιδιωματικής στην εκτίμηση του ατομικού κινδύνου εκδήλωσης νόσου κατά την έκθεση σε επαγγελματικά καρκινογόνα (7). Ταυτόχρονα, η ποσοτικοποίηση του επιπέδου έκφρασης χιλιάδων γονιδίων μέσω των μικροσυστοιχιών επέκτεινε την γνώση του μηχανισμού της καρκινογένεσης, ανέδειξε το μοριακό προφίλ των όγκων και υπέδειξε πιθανούς διαγνωστικούς, θεραπευτικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες. Η συνέργεια της υπολογιστικής βιολογίας και βίο-πληροφορικής με την παραπάνω τεχνολογία κατέστησε δυνατή την ορθή διαχείριση και οργάνωση του μεγάλου όγκου δεδομένων καθώς και την σωστή ερμηνεία των πειραματικών αποτελεσμάτων. Όπως προκύπτει από τον αριθμό των σχετικών δημοσιεύσεων τη τελευταία δεκαετία, η μελέτη του κακοήθους μεσοθηλιώματος μέσω της ανάλυσης μεταγράφων έχει εντατικοποιηθεί. Η αναγνώριση προγνωστικών παραγόντων στο μοριακό επίπεδο πιστεύεται ότι θα κατευθύνει τους ασθενείς στις κατάλληλες προληπτικές και/ή θεραπευτικές επιλογές ενώ παράλληλα θα αυξήσει την ακρίβεια εκτίμησης της θεραπευτικής απόκρισης και θα δώσει την δυνατότητα ανεύρεσης νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων (25).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός

Η παρούσα μελέτη επιδιώκει τη διασύνδεση της περιβαλλοντικής υγιεινής με τη γενωμική και τη δημόσια υγεία. Σκοπός της είναι: 1. Η σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης των συστατικών των στεγανών συνδέσμων μεταξύ υγιών και ασθενών με κακόηθες μεσοθηλίωμα 2. Η σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης των ίδιων συστατικών μεταξύ των διαφορετικών ιστολογικών προτύπων ανάπτυξης του όγκου 3. Η επίδραση της έκθεσης σε ίνες αμιάντου στην έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν το πρωτεϊνικό σύμπλοκο των στεγανών συνδέσμων.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των συστατικών των στεγανών συνδέσμων σε υγιή άτομα και ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα.

Για την ανάκτηση των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτρονική βάση Oncomine (<http://www.oncomine.org>) που αποτελεί πλατφόρμα συλλογής πειραμάτων μικροσυστοιχιών συμπληρωματικού DNA και ολιγονουκλεοτιδίων στον τομέα της ογκολογίας. Προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι τα δεδομένα είναι επαρκή και παρήχθησαν με την ίδια μεθοδολογία αναλύθηκε η γονιδιακή έκφραση των συστατικών των στεγανών συνδέσμων σε δείγματα υγιών (N=9) και ασθενών (N=40) της ίδιας μελέτης (μελέτη 1) (44). Τα δεδομένα ανακτήθηκαν τον Μάρτιο του 2013 μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό και κανονικοποίηση σύμφωνα με προηγούμενη περιγραφή (45). Ως διαφορεικά εκφρασμένα χαρακτηρίστηκαν τα γονίδια με στατιστικά σημαντική διαφορά της σχετικής αναλογίας έκφρασης (fold change) μεταξύ της ομάδας των ασθενών με κακόηθες μεσοθηλίωμα και των υγιών ($p < 0.05$).

2.2. Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των συστατικών των στεγανών συνδέσμων στους τρεις ιστολογικούς τύπους του κακοήθους μεσοθηλιώματος. Μελέτη της επίδρασης που ασκεί η έκθεση σε ίνες αμιάντου στην έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν το πρωτεϊνικό σύμπλοκο των στενοσυνδέσμων.

Στην διαδικτυακή πλατφόρμα Oncomine (<http://www.oncomine.org>) αναζητήθηκε μελέτη με επαρκή αριθμό δεδομένων για κάθε ένα από τα τρία ιστολογικά πρότυπα ανάπτυξης του κακοήθους όγκου. Από την ίδια μελέτη (μελέτη 2) (46) ανακτήθηκαν πειραματικά δεδομένα γονιδιακής έκφρασης των συστατικών των στεγανών συνδέσμων σε ασθενείς, εκτεθειμένους και μη, σε αμιάντο καθώς και σε ασθενείς με απώλεια ή μη του γενετικού τόπου CDKN2A της χρωμοσωμικής περιοχής 9p21. Όλα τα πειραματικά δεδομένα ανακτήθηκαν κανονικοποιημένα τον Μάρτιο του 2013. Ως διαφορεικά εκφρασμένα χαρακτηρίστηκαν γονίδια με στατιστικά σημαντική υπέρ-έκφραση ή υπό-έκφραση μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων ($p < 0.05$).

2.3. Αναζήτηση γονιδίων που αλληλεπιδρούν με τα συστατικά των στεγανών συνδέσμων και διερεύνηση της έκφρασης τους σε υγιείς και ασθενείς.

Η διερεύνηση του δικτύου γονιδίων των συστατικών των στεγανών συνδέσμων έγινε μέσω των ακόλουθων βάσεων βιοπληροφορικής: Bio-grid (<http://thebiogrid.org>), ConsensusPathDB (<http://cpdb.molgen.mpg.de/>) και String 9.05 (<http://string-db.org/>). Η ανάλυση έγινε για γονίδια με σημαντική διαφορά έκφρασης μεταξύ των υγιών και των ασθενών με κακόηθες μεσοθηλίωμα. Οι πλατφόρμες που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν 'αποθήκες' γνωστών αλλά και προβλεπόμενων γενετικών και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων καθώς και σηματοδοτικών οδών. Μετά την ολοκλήρωση της αναζήτησης τα ανακτημένα γονίδια υποβλήθηκαν περαιτέρω σε ανάλυση για την ιεράρχηση και τη λειτουργία τους μέσω των ηλεκτρονικών βάσεων GeneMania (<http://www.genemania.org>) και Gene Cards (<http://www.genecards.org>). Το GeneMania είναι εργαλείο που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία υποθέσεων αναφορικά με τη λειτουργία των γονιδίων και την ιεράρχηση τους σε λειτουργικές δοκιμασίες. Το Gene Cards αποτελεί ολοκληρωμένη βάση δεδομένων των ανθρώπινων γονιδίων που παρέχει σημαντικές πληροφορίες γονιδιωματικής. Γονίδια του δικτύου των συστατικών των στενοσυνδέσμων για τα οποία υπήρχαν επαρκή δεδομένα στην βάση Oncomine (<http://www.oncomine.org>) αναλύθηκαν στη συνέχεια ως προς το προφίλ έκφρασης τους τόσο στους υγιείς όσο και στους πάσχοντες από κακόηθες μεσοθηλίωμα της

μελέτης 1. Επιπλέον έγινε έλεγχος του βαθμού συσχέτισης των μοτίβων έκφρασης όλων των διαφορεικά εκφρασμένων γονιδίων και στις δύο μελέτες. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν τον Απρίλιο του 2013.

2.4. Στατιστική ανάλυση.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της έκδοσης 19 του στατιστικού προγράμματος SPSS (IBM SPSS Statistics). Το στατιστικό τεστ Kolmogorov-Smirnov Z χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο κανονικότητας της κατανομής των πειραματικών παρατηρήσεων. Οι συγκρίσεις των μέσων τιμών έκφρασης των γονιδίων μεταξύ υγιών και πασχόντων από κακόηθες μεσοθηλίωμα έγιναν με τη χρήση του t-test για δύο ανεξάρτητα δείγματα και του Mann-Whitney U test για παραμετρικά και μη παραμετρικά δεδομένα αντίστοιχα. Στην υπό-ομάδα των πασχόντων καθώς ο αριθμός των παρατηρήσεων ήταν μεγαλύτερος από 30 χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Pearson για τον έλεγχο της σχέσης όλων των διαφορεικά εκφρασμένων γονιδίων. Επιπλέον, εφαρμόστηκε η εξίσωση παλινδρόμησης κατά Deming ώστε να εκφραστεί με μαθηματικά ακριβή τρόπο η παραπάνω σχέση. Η συγκεκριμένη μέθοδος υποθέτει ότι και οι δύο μεταβλητές (X, Y) συνδέονται με τυχαία σφάλματα μέτρησης. Στην μελέτη 2, οι μέσες τιμές γονιδιακής έκφρασης στους τρεις ιστολογικούς τύπους μεσοθηλιώματος συγκρίθηκαν με την ανάλυση διασποράς με ένα παράγοντα One-way ANOVA και διόρθωση Bonferroni για δεδομένα με κανονική κατανομή ενώ στη περίπτωση μη παραμετρικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το τεστ Kruskal-Wallis. Οι συγκρίσεις των μέσων τιμών γονιδιακής έκφρασης μεταξύ δύο ανεξάρτητων υπό-ομάδων (έκθεση ή μη σε αμίαντο, άντρες/γυναίκες, απώλεια ή μη του γενετικού τόπου CDKN2A) έγιναν όπως και στη περίπτωση της μελέτης 1 με τη χρήση των t-test και Mann-Whitney U test για παραμετρικά και μη παραμετρικά δεδομένα αντίστοιχα.

3. Αποτελέσματα

3.1. Διαφορική γονιδιακή έκφραση των κλαουδινών στους πάσχοντες από κακώθες μεσοθηλίωμα σε σχέση με τους υγιείς.

Τα κύρια χαρακτηριστικά της μελέτης 1 που ανευρέθηκε στην πλατφόρμα Oncomine για τη σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης των συστατικών των στεγανών συνδέσμων μεταξύ υγιών και πασχόντων από κακώθες μεσοθηλίωμα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**. Διαπιστώθηκε σημαντική υπέρ-έκφραση της κλαουδίνης 15 στα δείγματα των ασθενών συγκριτικά με αυτά των υγιών ($p < 0.0001$) (**Διάγραμμα 1**). Αντιθέτως, οι κλαουδίνες -4, -5, -8, -9, -10 και -18 βρέθηκαν σημαντικά υπό-εκφρασμένες στους πάσχοντες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.006$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.023$, $p < 0.0001$, και $p = 0.005$ αντίστοιχα). Δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στην έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις κλαουδίνες -1, -3, -6, -7, -11, -14, -16, και -17.

3.2. Διαφορική γονιδιακή έκφραση της κλαουδίνης 15 και της πρωτεΐνης 3 του στενοσυνδέσμου στους τρεις ιστολογικούς τύπους του κακοήθους μεσοθηλιώματος.

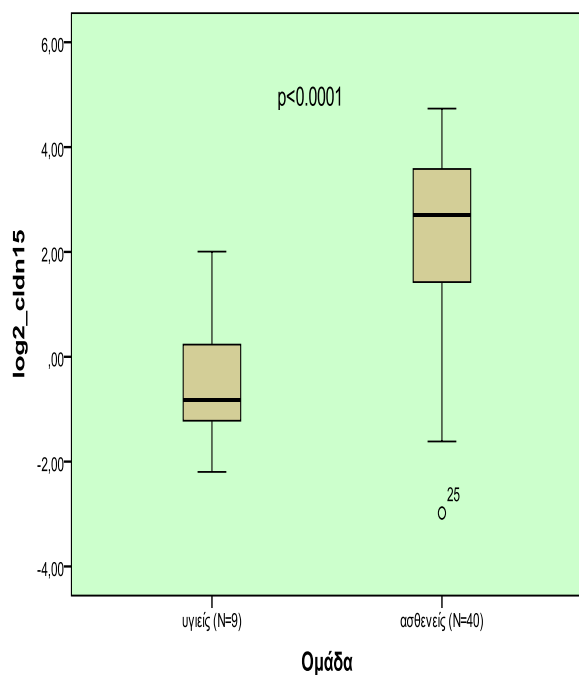
Τα κύρια χαρακτηριστικά της μελέτης 2 που ανευρέθηκε στην πλατφόρμα Oncomine για τη σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης των συστατικών των στεγανών συνδέσμων μεταξύ των τριών ιστολογικών προτύπων ανάπτυξης του κακοήθους μεσοθηλιώματος παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**. Βρέθηκε σημαντική υπέρ-έκφραση της κλαουδίνης 15 στον επιθηλιοειδή τύπο συγκριτικά με τον διφασικό ($p = 0.001$) και τον σαρκωματώδη ($p < 0.0001$) (**Διάγραμμα 2**). Επιπλέον διαπιστώθηκε θετική ρύθμιση της πρωτεΐνης 3 του στενοσυνδέσμου (TJP3) στον επιθηλιοειδή τύπο σε σχέση με τον σαρκωματώδη ($p = 0.038$). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν την κλαουδίνη, τις πρωτεΐνες -1, -2 του συμπλόκου των στενοσυνδέσμων και τις κλαουδίνες -1, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -14, -16 και -17.

Πίνακας 3. Τα χαρακτηριστικά της μελέτης που ανευρέθηκε στην ηλεκτρονική βάση Oncoline για την ανάκτηση πειραματικών δεδομένων γονιδιακής έκφρασης των συστατικών των στεγανών συνδέσμων σε υγιείς και πάσχοντες από κακήθες μεσοθηλίωμα (μελέτη 1).

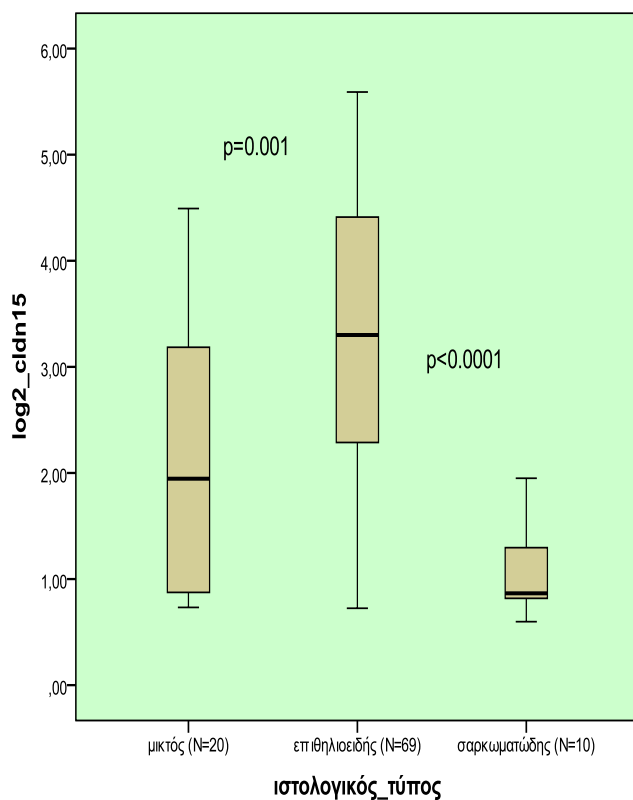
Μελέτη	Ομάδα ασθενών με MPM Ιστολογικός τύπος	Ομάδα ασθενών με MPM Σταδιοποίηση κατά Brigham	Ομάδα ελέγχου Προέλευση ιστού
Gordon et al Am J Pathol 2005	N=23 Επιθηλιοειδής	N=1 στάδιο1	N=4 Πνεύμονας
		N=11 στάδιο 2	N=5 Υπεζωκότας
	N=16 Μικτός	N=27 στάδιο 3	
	N=1 NA	N=1 NA	

Πίνακας 4. Τα χαρακτηριστικά της μελέτης που ανευρέθηκε στην ηλεκτρονική βάση Oncoline για την ανάκτηση πειραματικών δεδομένων γονιδιακής έκφρασης των συστατικών των στεγανών συνδέσμων στα τρία ιστολογικά πρότυπα ανάπτυξης του κακοήθους μεσοθηλιώματος (μελέτη 2).

Μελέτη	Ιστολογικός τύπος	Έκθεση σε αμίαντο	Απώλεια του γενετικού τύπου CDKN2A	Φύλο
Lopez-Rios et al Cancer Res 2006	N=69 Επιθηλιοειδής	N=58+	N=59+	N=75 άντρες
	N=10 Σαρκωματώδης	N=29-	N=21-	N=24 γυναίκες
	N=20 Μικτός	N=12 NA	N=19 NA	



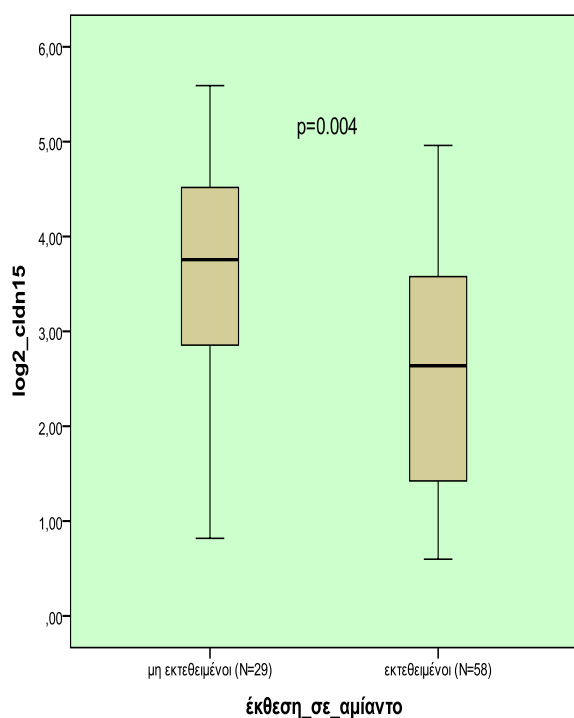
Διάγραμμα 1. Η κλαουδίνη 15 υπέρ-εκφράζεται στους πάσχοντες από κακήθες μεσοθηλίωμα σε σχέση με τους υγιείς. Τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης προήλθαν από τη μελέτη των Gordon et al (Am J Pathol 2005) και ανακτήθηκαν από τη βάση Oncomine μετά από λογαρίθμηση στη βάση του 2 και κανονικοποίηση σύμφωνα με προηγούμενη περιγραφή (Rhodes et al., 2004)



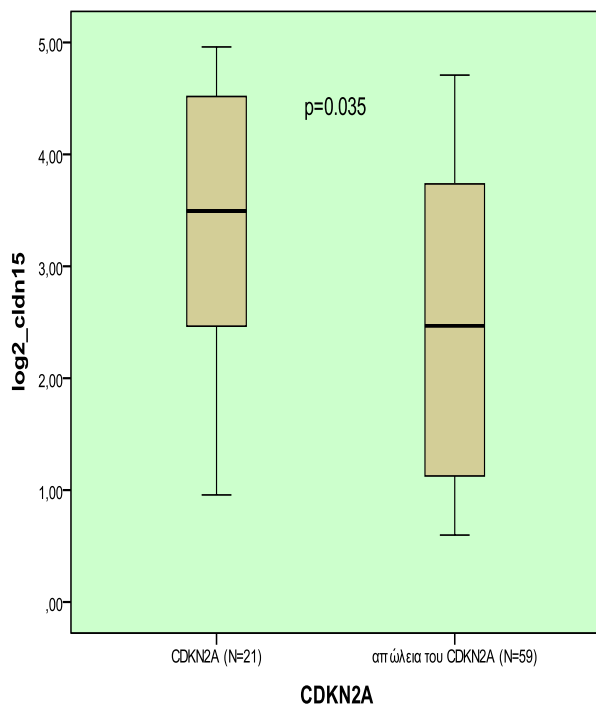
Διάγραμμα 2. Η κλαουδίνη 15 υπέρ-εκφράζεται στον επιθηλιοειδή τύπο μεσοθηλιώματος σε σχέση με τον μικτό και τον σαρκωματώδη τύπο. Τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης προήλθαν από τη μελέτη των Lopez-Rios et al (Cancer Res 2006) και ανακτήθηκαν από τη βάση Oncomine μετά από λογαρίθμηση στη βάση του 2 και κανονικοποίηση σύμφωνα με προηγούμενη περιγραφή (Rhodes et al., 2004).

3.3. Σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης των συστατικών των στεγανών συνδέσμων στους ασθενείς με κακήθες μεσοθηλίωμα σε σχέση με την έκθεση σε αμίαντο, το φύλο και την απώλεια του γενετικού τόπου CDKN2A.

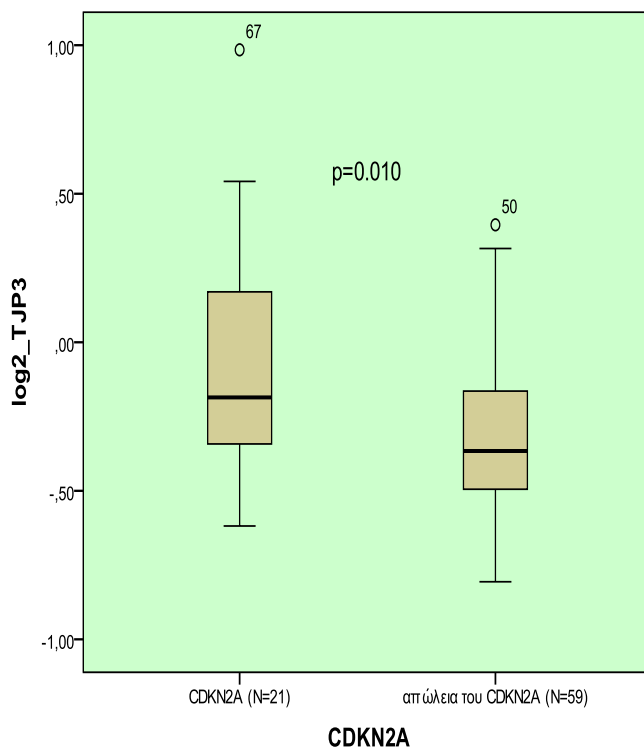
Διαπιστώθηκε υπό-έκφραση της κλαουδίνης 15 στους ασθενείς με κακήθες μεσοθηλίωμα που είχαν εκτεθεί σε αμίαντο σε σχέση με τους μη εκτεθειμένους ($p=0.004$) (**Διάγραμμα 3**). Παρομοίως, στην ίδια ομάδα ασθενών παρατηρήθηκε τάση για αρνητική ρύθμιση της TJP3 ($p=0.057$). Επιπλέον βρέθηκε ότι τα δύο προαναφερόμενα γονίδια είναι αρνητικά ρυθμιζόμενα στους πάσχοντες με απώλεια του γενετικού τόπου CDKN2A ($p=0.035$ για την *cldn-15* και $p=0.010$ για το TJP3) (**Διαγράμματα 4-5**). Αναφορικά με το φύλο διαπιστώθηκε υπέρ-έκφραση των γονιδίων *cldn-6*, *cldn-14* και TJP3 στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άντρες ($p=0.021$, $p=0.031$ και $p=0.021$ αντίστοιχα).



Διάγραμμα 3. Η κλαουδίνη 15 υπό-εκφράζεται στους πάσχοντες από κακήθες μεσοθηλίωμα που έχουν εκτεθεί σε αμίαντο σε σχέση με τους μη εκτεθειμένους. Τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης προήλθαν από τη μελέτη των Lopez-Rios et al (Cancer Res 2006) και ανακτήθηκαν από τη βάση Oncomine μετά από λογαρίθμηση στη βάση του 2 και κανονικοποίηση σύμφωνα με προηγούμενη περιγραφή (Rhodes et al., 2004).



Διάγραμμα 4. Η κλαουδίνη 15 ρυθμίζεται αρνητικά στους πάσχοντες από κακήθες μεσοθηλίωμα με απώλεια του γενετικού τόπου CDKN2A. Τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης προήλθαν από τη μελέτη των Lopez-Rios et al (Cancer Res 2006) και ανακτήθηκαν από τη βάση Oncomine μετά από λογαρίθμηση στη βάση του 2 και κανονικοποίηση σύμφωνα με προηγούμενη περιγραφή (Rhodes et al., 2004).



Διάγραμμα 5. Η πρωτεΐνη 3 των στενοσυνδέσμων ρυθμίζεται αρνητικά στους πάσχοντες από κακήθες μεσοθηλίωμα με απώλεια του γενετικού τόπου CDKN2A. Τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης προήλθαν από τη μελέτη των Lopez-Rios et al (Cancer Res 2006) και ανακτήθηκαν από τη βάση Oncomine μετά από λογαρίθμηση στη βάση του 2 και κανονικοποίηση σύμφωνα με προηγούμενη περιγραφή (Rhodes et al., 2004).

3.4. Ανεύρεση των γονιδίων που αλληλεπιδρούν με τα συστατικά των στεγανών συνδέσμων και πρόβλεψη της λειτουργίας τους.

Μέσω της ανάλυσης στις πλατφόρμες Bio-grid, ConsensusPathDB, και String 9.05 βρέθηκε ότι συνολικά 32 γονίδια συνθέτουν το δίκτυο αλληλεπίδρασης με τις κλαουδίνες του στενοσυνδέσμου. Ο συμβολισμός και η περιγραφή αυτών των γονιδίων όπως εμφανίζονται στην βάση δεδομένων GeneCards παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5**. Για 20 από τα 32 γονίδια (S100B, ERHA2, GEM, HGD, SHBG, VKORC1, VWF, VEGFA, NKX2-1, MAPK9, INADL, CDH5, CDC34 /UBC3, OVGP1, OCLN, TJP1, TJP2, TJP3, EGF, MPDZ) υπήρχαν επαρκή δεδομένα ανάλυσης τόσο στους υγιείς όσο και στους πάσχοντες από κακήθες μεσοθηλίωμα. Τα γονίδια αυτά εισήχθησαν ως λίστα στο λογισμικό πρόγραμμα της βάσης GeneMania προκειμένου να προβλεφθεί η βιολογική τους λειτουργία. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**.

3.5. Διαφορική έκφραση των γονιδίων που αλληλεπιδρούν με τις κλαουδίνες στους πάσχοντες από κακήθες μεσοθηλίωμα σε σχέση με τους υγιείς.

Από τα 20 γονίδια που αναλύθηκαν, τα ERHA2, UBC3, VEGFA, MAPK9 και INADL διαπιστώθηκε ότι υπέρ-εκφράζονται στους πάσχοντες σε σχέση με τους υγιείς ($p=0.031$, $p=0.035$, $p=0.023$, $p=0.005$, $p=0.009$ αντίστοιχα). Αντίθετα τα γονίδια S100B, GEM, HGD, SHBG, VWF, NKX2-1, CDH5 βρέθηκε ότι είναι αρνητικά ρυθμιζόμενα στην υπό-ομάδα των ασθενών ($p<0.0001$, $p=0.030$, $p=0.005$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p=0.011$, $p<0.0001$ αντίστοιχα). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση των VKORC1, EGF, OVGP1, OCLN, TJP1-3, και MPDZ ανάμεσα στις δύο υπό-ομάδες. Η σύνοψη των αποτελεσμάτων σύγκρισης της γονιδιακής έκφρασης όλων των υπό-μελέτη γονιδίων μεταξύ ασθενών και υγιών παρουσιάζεται στον **Πίνακα 7**.

3.6. Συσχέτιση του προφίλ έκφρασης των κλαουδινών και των αλληλεπιδρώντων με αυτές γονιδίων στους πάσχοντες από κακήθες μεσοθηλίωμα. Ανάλυση σε σχέση με τη σταδιοποίηση κατά Brigham, την έκθεση σε αμίαντο και τον ιστολογικό τύπο.

Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές θετικές αλλά και αρνητικές συσχετίσεις στα μοτίβα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων εντός της υπό-ομάδας των ασθενών της μελέτης 1 (**Πίνακας 8**) (**Διαγράμματα 6-9**). Επιπλέον παρατηρήθηκε σημαντική υπέρ-έκφραση της κλαουδίνης 16 σε πάσχοντες από μεσοθηλίωμα σταδίου 2 έναντι αυτών με νόσο σταδίου 3

($p=0.008$). Στη μελέτη 2 επίσης διαπιστώθηκαν σημαντικές συσχετίσεις στα μοτίβα έκφρασης των τριών γονιδίων (INADL, MPDZ, GEM) που αλληλεπιδρούν με την κλαουδίνη 15 (Πίνακας 9), (Διάγραμμα 10). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση των προαναφερθέντων γονιδίων σε σχέση με την έκθεση σε αμίαντο. Ωστόσο το γονίδιο INADL βρέθηκε σημαντικά υπέρ-εκφρασμένο στον επιθηλιοειδή τύπο του κακοήθους μεσοθηλιώματος συγκριτικά με τον σαρκωματώδη ($p=0.022$).

Πίνακας 5. Ο συμβολισμός και η περιγραφή των γονιδίων που συνθέτουν το δίκτυο αλληλεπίδρασης με τις κλαουδίνες των στενοσυνδέσμων όπως αναφέρονται στην ηλεκτρονική βάση GeneCards.	
Συμβολισμός γονιδίου	Περιγραφή γονιδίου
VKORC1	vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1
S100B	S100 calcium binding protein B
EPHA2	EPH receptor A2
GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle
HGD	homogentisate 1,2-dioxygenase
SHBG	sex hormone-binding globulin
CDC34 (UBC3)	cell division cycle 34
OVGP1	oviductal glycoprotein 1, 120kDa
OCLN	Occludin
TJP1	tight junction protein 1
TJP2	tight junction protein 2
TJP3	tight junction protein 3
VWF	von Willebrand factor
VEGFA	vascular endothelial growth factor A
NKX2-1	NK2 homeobox 1
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9
INADL	InaD-like (Drosophila)
CDH5	cadherin 5, type 2 (vascular endothelium)
EGF	epidermal growth factor
MPDZ	multiple PDZ domain protein
WNK4	WNK lysine deficient protein kinase 4
TAT	tyrosine aminotransferase
HDAC8	histone deacetylase 8
LNX1	ligand of numb-protein X 1, E3 ubiquitin protein ligase
RHOXF2	Rhox homeobox family, member 2
CLDN2	claudin 2
CLDN12	claudin 12
CLDN19	claudin 19
CLDN20	claudin 20
ESAM	endothelial cell adhesion molecule
EPCAM	epithelial cell adhesion molecule
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)

Πίνακας 6. Η πρόβλεψη της βιολογικής λειτουργίας των γονιδίων που αλληλεπιδρούν με τις κλαυδίνες των στεγανών συνδέσμων σύμφωνα με το λογισμικό GeneMania (FDR: False Discovery Rate)

Λειτουργία	FDR
cell junction	1.06E-10
cell-cell junction organization	3.77E-9
cell-cell junction	4.29E-9
cell junction assembly	5.45E-8
cell-cell junction assembly	6.68E-8
cell junction organization	7.1E-8
apicolateral plasma membrane	8.98E-6
apical junction complex	3.51E-4
tight junction	4.61E-3
occluding junction	4.61E-3
cadherin binding	9.55E-3
morphogenesis of a branching epithelium	1.2E-2
branching morphogenesis of a tube	1.43E-2
cellular component disassembly involved in apoptosis	1.59E-2
morphogenesis of a branching structure	2.08E-2
gland development	3.07E-2
regulation of cell morphogenesis	3.47E-2
regulation of epithelial to mesenchymal transition	4.17E-2
adherens junction organization	5.5E-2
perinuclear region of cytoplasm	5.5E-2
regulation of cell morphogenesis involved in differentiation	5.5E-2
apical junction assembly	5.5E-2
epithelial tube morphogenesis	5.5E-2
cell adhesion molecule binding	6.15E-2
tube morphogenesis	8.59E-2
vesicle lumen	8.77E-2
cell leading edge	8.77E-2
morphogenesis of an epithelium	8.77E-2
cytoplasmic membrane-bounded vesicle lumen	8.77E-2
secretory granule lumen	8.77E-2
platelet alpha granule lumen	8.77E-2

Πίνακας 7. Σύγκριση της έκφρασης όλων των υπό-μελέτη γονιδίων στους πάσχοντες από κακήθες μεσοθηλίωμα σε σχέση με τους υγιείς. Τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης προήλθαν από τη μελέτη των Gordon et al (Am J Pathol 2005) και ανακτήθηκαν από τη βάση Oncomine μετά από λογαρίθμηση στη βάση του 2 και κανονικοποίηση σύμφωνα με προηγούμενη περιγραφή (Rhodes et al., 2004)

Ταυτότητα γονιδίου	Τιμή p
Θετικά ρυθμιζόμενα γονίδια	
CLDN-15	<0.0001
EPHA2	0.031
VEGFA	0.023
MAPK9	0.005
INADL	0.009
CDC34	0.035
Αρνητικά ρυθμιζόμενα γονίδια	
CLDN-4	0.006
CLDN-5	<0.0001
CLDN-8	<0.0001
CLDN-9	0.023
CLDN-10	<0.0001
CLDN-18	0.005
S100B	< 0.0001
GEM	0.030
HGD	0.005
SHBG	<0.0001
VWF	<0.0001
NKX2-1	0.011
CDH5	<0.0001

Πίνακας 8. Οι σχέσεις που συνδέουν τα μοτίβα έκφρασης των γονιδίων που αλληλεπιδρούν με τα συστατικά των στεγανών συνδέσμων στους πάσχοντες από κακήθες μεσοθηλίωμα. Τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης προήλθαν από τη μελέτη των Gordon et al (Am J Pathol 2005) και ανακτήθηκαν από τη βάση Oncomine μετά από λογαρίθμηση στη βάση του 2 και κανονικοποίηση σύμφωνα με προηγούμενη περιγραφή (Rhodes et al., 2004)

Ταυτότητα γονιδίων	Συντελεστής συσχέτισης Pearson (r)	Εξίσωση παλινδρόμησης κατά Deming	Τιμή p
CLDN1			
MPDZ	0.385	MPDZ= 0.3175 CLDN1+ 0.6925	0.014
TJP3	-0.344	TJP3=-0.1876CLDN1-3.498	0.030
CLDN4			
INADL	-0.324	INADL=-1.514CLDN4-3.975	0.041
CLDN5			
CLDN6	-0.454	CLDN6=-0.2117CLDN5-0.2137	0.003
CLDN8	-0.329	CLDN8=-1.297CLDN5-5.078	0.038
MAPK9	-0.361	MAPK9=-0.4066CLDN5-0.3073	0.022
CLDN6			
MAPK9	0.344	MAPK9=3.544CLDN6-0.2261	0.030
CLDN7			
CLDN9	0.352	CLDN9=0.3680CLDN7+0.1174	0.026
VKORC1	-0.318	VKORC1=-0.3091CLDN7+1.289	0.045
CLDN8			
TJP1	0.421	TJP1=0.2101CLDN8+2.864	0.007
CLDN9			
HGD	0.312	HGD=0.3725CLDN9-2.001	0.05

VKORC1	-0.345	VKORC1=-0.8716CLDN9+1.376	0.029
EPHA2	-0.409	EPHA2=-0.9131CLDN9+0.7998	0.009
CLDN10			
CLDN16	0.346	CLDN16= 3.428 CLDN10-4.197	0.029
CLDN17	0.322	CLDN17= 9.668 CLDN10-3.985	0.042
CLDN18	0.358	CLDN18= 2.498 CLDN10-3.415	0.023
TJP2	-0.398	TJP2=-4.568CLDN10+3.146	0.011
VKORC1	-0.554	VKORC1=-3.823CLDN10+3.207	<0.0001
EPHA2	-0.360	EPHA2=-5.730CLDN10+3.393	0.022
MAPK9	-0.378	MAPK9=-4.512CLDN10+2.260	0.016
CLDN11			
CLDN9	0.322	CLDN9= 0.6965 CLDN11+0.1697	0.043
CLDN14			
OCLN	0.338	OCLN = 0.4660 CLDN14-0.01388	0.033
TJP3	0.330	TJP3 = 0.3246 CLDN14- 2.830	0.037
CLDN15			
TJP2	0.425	TJP2=0.2235CLDN15+0.8533	0.006
UBC3	0.358	UBC3=0.1183CLDN15-0.1464	0.023
INADL	0.588	INADL=-0.5675CLDN15-1.398	<0.0001
HGD	-0.326	HGD=-0.1314CLDN15-1.848	0.040
CLDN16			
CLDN4	0.482	CLDN4=2.948CLDN16+5.868	0.002
S100B	0.348	S100B=2.552CLDN16+4.426	0.028
SHBG	0.314	SHBG=1.028CLDN16-0.2494	0.049

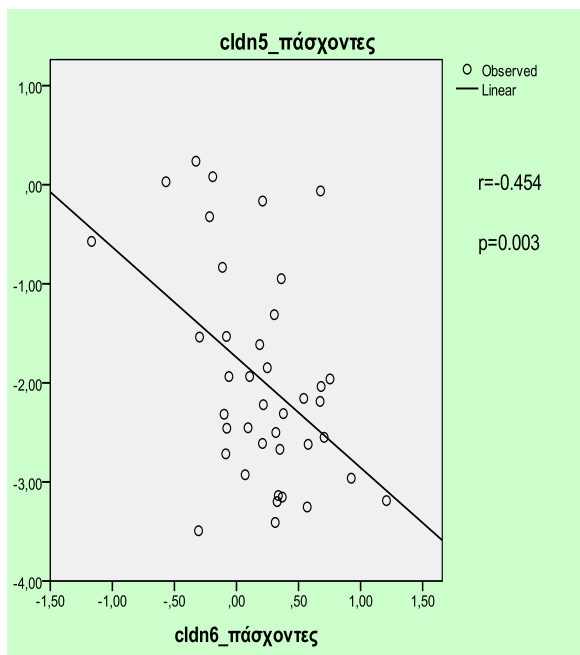
VKORC1	-0.344	VKORC1=-2.492CLDN16-5.406	0.030
CDH5	-0.352	CDH5=-4.365CLDN16-13.01	0.026
CLDN17			
CLDN9	0.352	CLDN9=0.4586CLDN17-0.2917	0.026
OCLN	0.388	OCLN=0.4226CLDN17-0.7584	0.013
TJP1	-0.352	TJP1=-0.1715CLDN17+2.299	0.026
TJP2	-0.328	TJP2=-0.3266CLDN17+1.293	0.039
CLDN18			
CLDN8	0.328	CLDN8=5.788CLDN18+11.58	0.039
NKX2-1	0.349	NKX2-1=2.404CLDN18+3.497	0.027
TJP2	-0.343	TJP2=-2.843CLDN18-5.573	0.030
VKORC1	-0.513	VKORC1=-2.458CLDN18-4.281	0.001
EPHA2	-0.356	EPHA2=-3.319CLDN18-6.939	0.024
MAPK9	-0.390	MAPK9=-2.382CLDN18-5.313	0.013
OCLN			
MPDZ	0.313	MPDZ=1.440OCLN+1.752	0.049
S100B	-0.392	S100B=-1.103OCLN-3.791	0.012
TJP1			
TJP2	0.405	TJP2=2.642TJP1-4.808	0.010
VKORC1	0.470	VKORC1=2.737TJP1-4.678	0.002
EPHA2	0.373	EPHA2=3.353TJP1-6.675	0.018
MAPK9	0.460	MAPK9=2.242TJP1-4.738	0.003
INADL	0.327	INADL=6.532TJP1-15.36	0.040
HGD	-0.462	HGD=-1.610TJP1+1.612	0.003
SHBG	-0.321	SHBG=-1.754TJP1+0.9080	0.044

NKX2-1	-0.321	$NKX2-1 = -2.715TJP1 + 3.974$	0.044
TJP2			
VKORC1	0.431	$VKORC1 = 1.227TJP2 + 0.0437$	0.005
EPHA2	0.519	$EPHA2 = 1.209TJP2 - 0.4920$	0.001
INADL	0.436	$INADL = 2.608TJP2 - 3.658$	0.005
HGD	-0.349	$HGD = -0.5535TJP2 - 1.393$	0.027
SHBG	-0.336	$SHBG = -0.4929TJP2 - 2.515$	0.034
EGF	-0.335	$EGF = -1.776TJP2 + 0.4448$	0.034
S100B			
HGD	0.404	$HGD = 0.4772S100B - 0.7788$	0.010
SHBG	0.403	$SHBG = 0.4415S100B - 1.921$	0.010
VKORC1			
EPHA2	0.533	$EPHA2 = 1.019VKORC1 - 0.5933$	<0.0001
MAPK9	0.662	$MAPK9 = 0.8220VKORC1 - 0.9123$	<0.0001
HGD	-0.497	$HGD = -0.5544VKORC1 - 1.196$	0.001
SHBG	-0.367	$SHBG = -0.4282VKORC1 - 2.452$	0.020
EPHA2			
MAPK9	0.347	$MAPK9 = 0.6732EPHA2 - 0.2808$	0.028
INADL	0.449	$INADL = 2.146EPHA2 - 2.585$	0.004
HGD	-0.432	$HGD = -0.5027EPHA2 - 1.566$	0.005
SHBG	-0.345	$SHBG = -0.4010EPHA2 - 2.723$	0.029
NKX2-1	-0.405	$NKX2-1 = -0.6566EPHA2 - 1.607$	0.010
GEM			
MPDZ	0.396	$MPDZ = 0.5950GEM - 0.7580$	0.011
VWF	0.606	$VWF = 0.9033GEM - 0.3056$	<0.0001

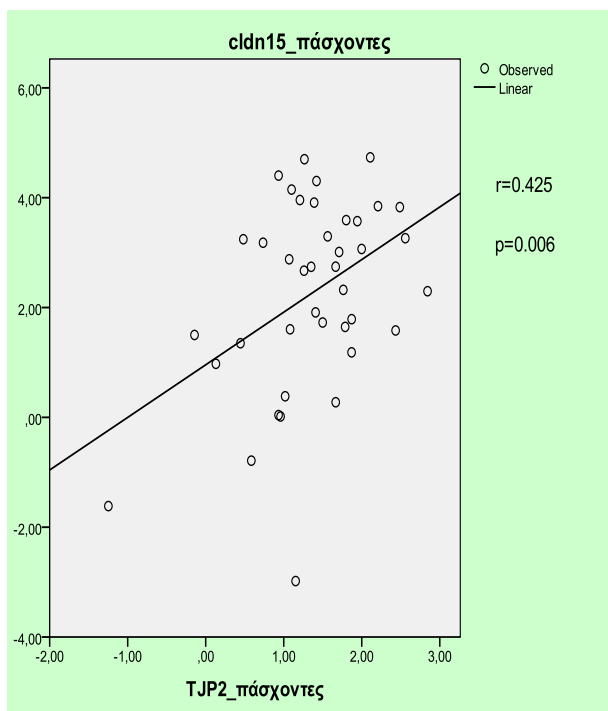
CDH5	0.680	CDH5=1.023GEM-2.778	0.0001
UBC3	-0.326	UBC3=-0.1841GEM+0.5219	0.040
VEGFA	-0.501	VEGFA=-0.3865GEM+2.374	0.001
HGD			
SHBG	0.489	SHBG=0.9257HGD-1.200	0.001
MAPK9	-0.414	MAPK9=-1.514HGD-2.753	0.008
INADL	-0.326	INADL=-4.747HGD-10.30	0.040
MPDZ			
CDH5	0.323	CDH5=1.943MPDZ-1.596	0.042
MAPK9	0.348	MAPK9=0.5430MPDZ+0.2010	0.028
VWF	0.428	VWF=1.418MPDZ+0.8993	0.006
VEGFA	-0.378	VEGFA=-0.4645MPDZ+1.782	0.016
UBC3	-0.337	UBC3=-0.2648MPDZ+0.2632	0.033
SHBG	-0.392	SHBG=-0.3735MPDZ-2.984	0.012
VWF			
CDH5	0.676	CDH5=1.120VWF-2.412	<0.0001
OVGP1			
MAPK9	-0.488	MAPK9=-0.6898OVGP1+0.3641	0.001
SHBG			
MAPK9	-0.439	MAPK9=-1.603SHBG-4.611	0.005
UBC3			
VWF	-0.493	VWF=-3.442UBC3+2.078	0.001

Πίνακας 9. Οι σχέσεις που συνδέουν τα μοτίβα έκφρασης των γονιδίων που αλληλεπιδρούν με την κλαουδίνη 15 στα ιστολογικά δείγματα κακοήθους μεσοθηλιώματος της μελέτης των Lopez-Rios et al (Cancer Res 2006). Τα δεδομένα ανακτήθηκαν από τη βάση Oncomine μετά από λογαρίθμηση στη βάση του 2 και κανονικοποίηση σύμφωνα με προηγούμενη περιγραφή (Rhodes et al., 2004)

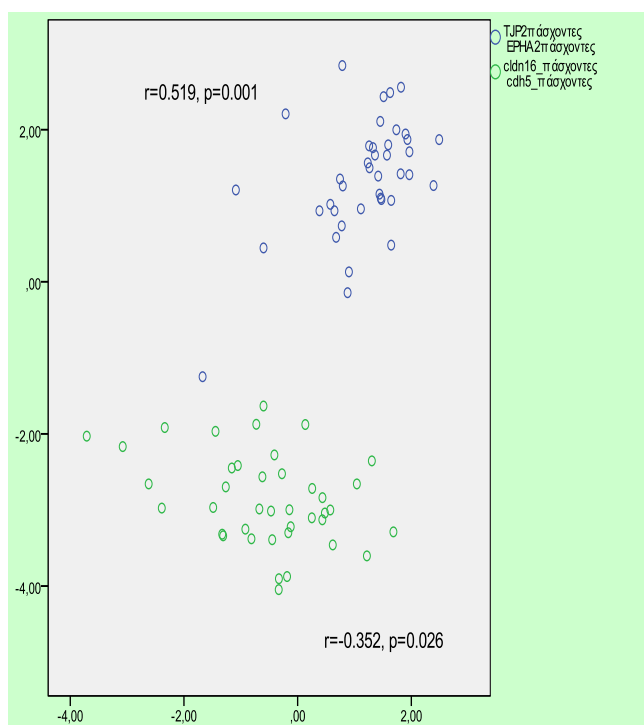
Ταυτότητα γονιδίων	Συντελεστής συσχέτισης Pearson (r)	Εξίσωση παλινδρόμησης κατά Deming	Τιμή p
CLDN15			
INADL	0.347	INADL=0.2341CLDN15-3.035	<0.0001
MPDZ	-0.305	MPDZ=-0.1599CLDN15+1.293	0.002
GEM	-0.205	GEM=-0.3192CLDN15+2.096	0.042
GEM			
MPDZ	0.213	MPDZ=0.1794GEM+0.6309	0.035



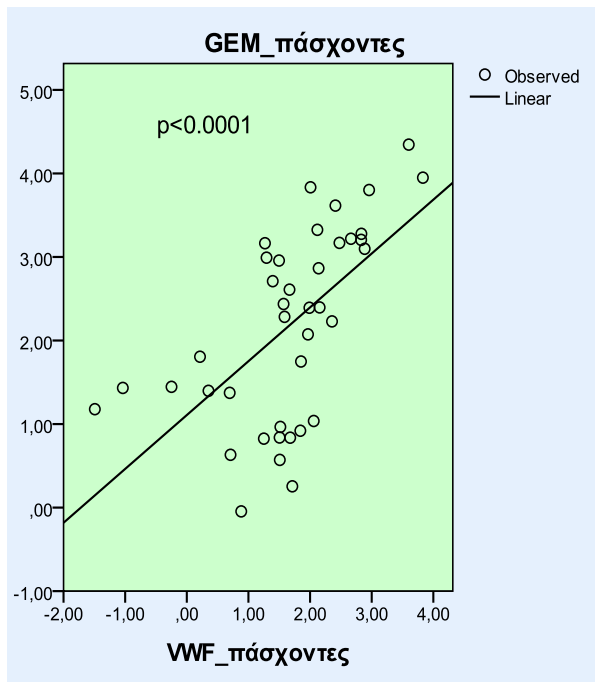
Διάγραμμα 6. Η αρνητική συσχέτιση στα μοτίβα έκφρασης των κλαουδινών 5 και 6 στους πάσχοντες από κακόηθες μεσοθηλίωμα. Τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης προήλθαν από τη μελέτη των Gordon et al (Am J Pathol 2005) και ανακτήθηκαν από τη βάση Oncomine μετά από λογαρίθμηση στη βάση του 2 και κανονικοποίηση σύμφωνα με προηγούμενη περιγραφή (Rhodes et al., 2004).



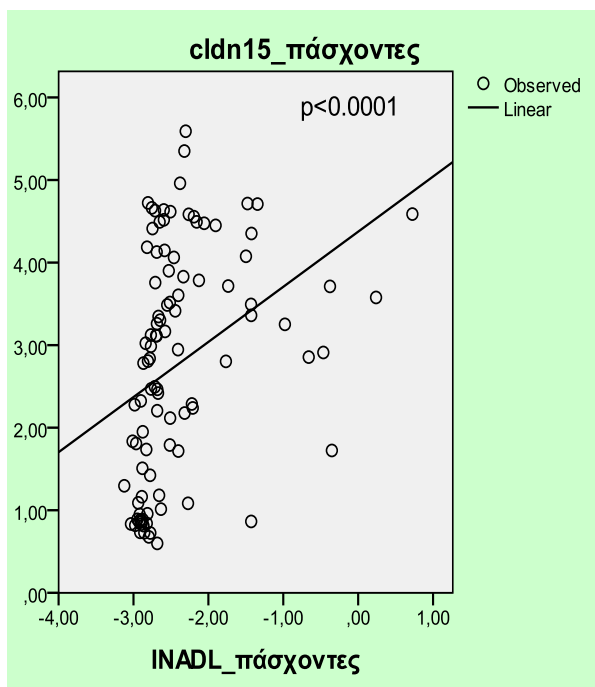
Διάγραμμα 7. Η θετική συσχέτιση στα προφίλ έκφρασης της κλαουδίνης 15 και της πρωτεΐνης 2 του στενοσυνδέσμου στους πάσχοντες από κακήθες μεσοθηλίωμα. Τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης προήλθαν από τη μελέτη των Gordon et al (Am J Pathol 2005) και ανακτήθηκαν από τη βάση Oncomine μετά από λογαρίθμηση στη βάση του 2 και κανονικοποίηση σύμφωνα με προηγούμενη περιγραφή (Rhodes et al., 2004).



Διάγραμμα 8. Η συσχέτιση στα μοτίβα έκφρασης των γονιδίων TJP2-EPHA2 και CLDN16-CDH5 στους πάσχοντες από κακήθες μεσοθηλίωμα. Τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης προήλθαν από τη μελέτη των Gordon et al (Am J Pathol 2005) και ανακτήθηκαν από τη βάση Oncomine μετά από λογαρίθμηση στη βάση του 2 και κανονικοποίηση σύμφωνα με προηγούμενη περιγραφή (Rhodes et al., 2004).



Διάγραμμα 9. Η θετική συσχέτιση στα μοτίβα έκφρασης των γονιδίων GEM-VWF στους πάσχοντες από κακήθες μεσοθηλίωμα. Τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης προήλθαν από τη μελέτη των Gordon et al (Am J Pathol 2005) και ανακτήθηκαν από τη βάση Oncomine μετά από λογαρίθμηση στη βάση του 2 και κανονικοποίηση σύμφωνα με προηγούμενη περιγραφή (Rhodes et al., 2004).



Διάγραμμα 10. Η θετική συσχέτιση στα προφίλ έκφρασης των γονιδίων cldn15-INADL στα ιστολογικά δείγματα κακοήθους μεσοθηλιώματος της μελέτης των Lopez-Rios et al (Cancer Res 2006). Τα δεδομένα ανακτήθηκαν από τη βάση Oncomine μετά από λογαρίθμηση στη βάση του 2 και κανονικοποίηση σύμφωνα με προηγούμενη περιγραφή (Rhodes et al., 2004).

4. Συζήτηση

Στη παρούσα μελέτη, με την εφαρμογή υπολογιστικών εργαλείων βιοπληροφορικής, διερευνήθηκε ο ρόλος των δομικών συστατικών των στεγανών συνδέσμων ως γονιδιακών βιοδεικτών στο κακόηθες μεσοθηλίωμα του πνεύμονα ενώ παράλληλα αναζητήθηκαν νέα γονίδια που αλληλεπιδρούν με τα δομικά συστατικά του στενοσυνδέσμου συν-καθορίζοντας τη γενετική υπογραφή της νόσου. Ταυτόχρονα αξιολογήθηκε η επίδραση της έκθεσης σε αμίαντο, του φύλου, της απώλειας του γενετικού τόπου CDKN2A, του ιστολογικού τύπου αλλά και σταδίου του όγκου στην έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν το πρωτεϊνικό σύμπλοκο των στενοσυνδέσμων. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές τόσο για θετική όσο και για αρνητική ρύθμιση των παραπάνω γονιδίων, κυρίως των κλαουδινών (38-40) σε διάφορους όγκους ωστόσο η ακριβής συμβολή τους στην παθοβιολογία του κακοήθους μεσοθηλιώματος παραμένει υπό διερεύνηση.

Στην παρούσα εργασία βρέθηκε υπέρ-έκφραση της κλαουδίνης 15 στα δείγματα πασχόντων σε σχέση με αυτά των υγιών ενώ παράλληλα, μεταξύ των ασθενών διαπιστώθηκε θετική ρύθμιση του γονιδίου στον επιθηλιοειδή τύπο συγκριτικά με τον μικτό και σαρκωματώδη, εύρημα στο οποίο καταλήγουν ανεξάρτητα και οι δύο μελέτες που ανακτήθηκαν από τη βάση Oncomine (44, 46). Επιπλέον διαπιστώθηκε θετική ρύθμιση της πρωτεΐνης 3 του στενοσυνδέσμου (TJP3) στον επιθηλιοειδή τύπο σε σχέση με τον σαρκωματώδη. Ένα ακόμη σημαντικό εύρημα είναι ότι τόσο η κλαουδίνη 15 όσο και η πρωτεΐνη 3 του στενοσυνδέσμου ρυθμίζονται αρνητικά στους ασθενείς που έχουν εκτεθεί σε αμίαντο σε σχέση με τους μη εκτεθειμένους ενώ υπό-έκφραση των ίδιων γονιδίων παρατηρείται και στους ασθενείς με ομόζυγη έλλειψη του γενετικού τόπου CDKN2A συγκριτικά με τους ετεροζυγώτες. Η έκθεση σε αμίαντο αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη κακοήθους μεσοθηλιώματος και αναφέρεται σε ποσοστό περίπου 80% των πασχόντων. Ερευνητικά, η ποσοτική μέτρηση αυτής της έκθεσης έχει συσχετιστεί με περισσότερους από 100 διακριτούς CpG τόπους ενώ σχεδόν στο σύνολο των περιστατικών (94%) η αυξημένη μεθυλίωση συνάδει με αυξημένη έκθεση (47). Οι επαγόμενες από τον αμίαντο επιγενετικές αλλαγές, όπως η υπέρ-μεθυλίωση μπορούν να επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων, καθοριστικές για την καρκινογένεση. Η βαρύτητα της έκθεσης σε ίνες αμιάντου έχει συσχετισθεί θετικά με τον βαθμό μεθυλίωσης του CDKN2A (48). Το ομόζυγο έλλειμμα του γενετικού τόπου CDKN2A αποτελεί την συνηθέστερα παρατηρούμενη γενετική μεταβολή στο κακόηθες μεσοθηλίωμα

και συνεπάγεται την αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p16^{INK4a} και p14^{ARF}. Η ταυτόχρονη απώλεια αυτών των γονιδίων βρέθηκε ότι επιταχύνει την επαγόμενη από τον αμίαντο διαδικασία της καρκινογένεσης in vivo (49). Η παρατηρούμενη στη παρούσα μελέτη αρνητική ρύθμιση των γονιδίων cldn-15 και TJP3 στους ασθενείς με ομόζυγο έλλειμμα του CDKN2A και θετικό ιστορικό έκθεσης σε αμίαντο υποδηλώνει επιγενετικές μεταβολές και τονίζει την σημασία μελέτης του επιγονιδιώματος ως βιοδείκτη για την εκτίμηση του κινδύνου νοσηρότητας.

Σε αντίθεση με την παρατηρούμενη θετική ρύθμιση της κλαουδίνης 15, οι κλαουδίνες -4, -5, -8, -9, -10 και -18 βρέθηκαν σημαντικά υπό-εκφρασμένες στην ομάδα των ασθενών συγκριτικά με αυτήν των υγιών. Στην βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για υπέρ-έκφραση της κλαουδίνης 15 στο διάχυτο κακόηθες μεσοθηλίωμα του περιτοναίου συγκριτικά με το ορώδες καρκίνωμα των ωοθηκών (4, 9). Οι Soini και συνεργάτες (50) μελέτησαν με ανοσοϊστοχημεία την έκφραση των κλαουδινών στο κακόηθες μεσοθηλίωμα και το μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα με συμμετοχή του υπεζωκότα και παρατήρησαν ότι το πρώτο χαρακτηρίζεται από ασθενέστερη έκφραση των κλαουδινών -1,-3,-4,-5,-7 προτείνοντας τον πιθανό ρόλο των συγκεκριμένων πρωτεϊνών ως διαφορικών διαγνωστικών δεικτών. Αρνητική γονιδιακή ρύθμιση των κλαουδινών -3, -4, και -6 στα κακοήθη μεσοθηλίωματα παρατηρήθηκε και κατά την σύγκριση τους με τα καρκινώματα των ωοθηκών (4, 9). Οι Ohta και συνεργάτες (51), προσπαθώντας να εκτιμήσουν την συμβολή της κλαουδίνης 4 στη διαφοροδιάγνωση των μεσοθηλιωμάτων από τα καρκινώματα διαπίστωσαν ότι κανένα από τα δείγματα των KM δεν εξέφραζε την συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Τέλος, οι Chaouche-Mazouni και συνεργάτες (52) μελετώντας τις κυτταρικές σειρές κακοήθους μεσοθηλιώματος M14K και M38K παρατήρησαν υπέρ-έκφραση της κλαουδίνης 15 και απουσία έκφρασης των κλαουδινών -3, -4. Γενικά θεωρείται ότι η υπό-έκφραση των κλαουδινών στους κακοήθεις όγκους αντανακλά την παρατηρούμενη κατά την καρκινογένεση αποσυναρμολόγηση των στεγανών συνδέσμων ενώ η υπέρ-έκφραση τους σχετίζεται με την κινητικότητα και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (40). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, υποδεικνύουν ένα συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης των κλαουδινών στο κακόηθες μεσοθηλίωμα και θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω, τόσο σε μοριακό επίπεδο-με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-όσο και σε επίπεδο ανοσοϊστοχημείας ώστε να επιβεβαιωθεί η χρησιμότητα τους ως εργαλείων στην έγκαιρη διάγνωση και αποτελεσματικότερη θεραπεία της νόσου.

Η περαιτέρω εφαρμογή υπολογιστικών εργαλείων οδήγησε στην ανεύρεση 32 γονιδίων που αλληλεπιδρούν με τα συστατικά των στεγανών συνδέσμων και σχετίζονται κυρίως με τη

συναρμολόγηση του στενοσυνδέσμου και τη κυτταρική μορφογένεση. Από τα 20 γονίδια που τελικά αναλύθηκαν, τα EPHA2, UBC3, VEGFA, MAPK9, και INADL βρέθηκαν σημαντικά υπέρ-εκφρασμένα στα δείγματα των πασχόντων από κακήθες μεσοθηλίωμα σε σχέση με αυτά των υγιών.

Αν και ο υποδοχέας EPHA2 υπέρ-εκφράζεται στους συμπαγείς όγκους η ακριβής συμβολή του στην καρκινογένεση είναι περίπλοκη και φαίνεται ότι εξαρτάται τόσο από τον κυτταρικό τύπο όσο και από το μικροπεριβάλλον του όγκου. Ωστόσο είναι γνωστό ότι το EPHA2 αποτελεί άμεσο μεταγραφικό στόχο του σηματοδοτικού μονοπατιού Ras-MAPK (53). Στον καρκίνο του πνεύμονα η θετική ρύθμιση του EPHA2 συσχετίζεται με μικρότερη επιβίωση ενώ αποτελεί και προγνωστικό δείκτη της εγκεφαλικής μετάστασης (54). Οι κυτταρικές σειρές KM εκφράζουν υψηλά επίπεδα του υποδοχέα ενώ τα μη νεοπλασματικά μεσοθηλιακά κύτταρα δεν τον εκφράζουν. Επιπλέον η αποσιώπηση του EPHA2 υποδοχέα μέσω των siRNA-Epha2 επιβράδυνε την ανάπτυξη του κακοήθους όγκου και προκάλεσε την απόπτωση των νεοπλασματικών κυττάρων. Εξαιτίας αυτών των ευρημάτων ο υποδοχέας EPHA2 έχει ήδη προταθεί τόσο ως βιοδείκτης για τη διάκριση του κακοήθους υπεζωκοτικού ιστού από τον καλοήγη όσο και ως πιθανός φαρμακευτικός στόχος (55).

Το ένζυμο CDC34 (UBC3) ρυθμίζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου ενεργοποιώντας την εξαρτώμενη από την ουβικουΐνη πρωτεϊνική αποδόμηση και έχει βρεθεί ότι υπέρ-εκφράζεται τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης σε κύτταρα πολλαπλού μυελώματος σε σχέση με τα υγιή (56). Οι Tanaka και συνεργάτες επίσης παρατήρησαν ενισχυμένη έκφραση του UBC3 mRNA στο ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και πρότειναν ότι η θετική ρύθμιση του γονιδίου μπορεί να συμβάλλει στην εξέλιξη της νόσου μέσω της αποδόμησης του p27^{kip1} (57).

Η πρωτεΐνη σηματοδότησης VEGFA επάγει την αγγειογένεση, την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων και την κυτταρική μετανάστευση ενώ παράλληλα αναστέλλει τη απόπτωση (σύνοψη στη βάση δεδομένων Gene Cards). Ένας από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων επάγεται η VEGFA καθοδηγούμενη αγγειακή διαπερατότητα είναι ο σχηματισμός διακυτταρικών πόρων και το παροδικό άνοιγμα των διακυτταρικών συνδέσμων που προϋποθέτει την αποσυναρμολόγηση των στενοσυνδέσμων καθώς και των συνδέσμων προσκόλλησης (58). Έχει βρεθεί ότι πάσχοντες από κακήθες μεσοθηλίωμα έχουν υψηλότερα επίπεδα της VEGFA πρωτεΐνης στον ορό συγκριτικά με τους υγιείς ενώ και η επιβίωση τους συσχετίζεται αντίστροφα με τα επίπεδα της πρωτεΐνης στον ορό (19).

Η πρωτεΐνη MAPK9 ανήκει στην οικογένεια των κινασών MAP οι οποίες συμμετέχουν σε πολλές διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση, η μετανάστευση, ο μετασχηματισμός και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Ταυτόχρονα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη επαγόμενη από το οσμωτικό στρες αποσυναρμολόγηση των στεγανών συνδέσμων (σύνοψη στη βάση δεδομένων Gene Cards). Σε μελέτη των Coe και συνεργατών (59) βρέθηκε υπέρ-έκφραση της MAPK9 σε κυτταρικές σειρές μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Αντίθετα, πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι αυξημένα επίπεδα του MAPK9 mRNA σχετίζονται με παρατεταμένη επιβίωση ελεύθερης νόσου αλλά και μεγαλύτερη συνολικά επιβίωση στον καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων του λάρυγγα (60). Το μονοπάτι σηματοδότησης MAPK, κατατάσσεται ανάμεσα στα 14 πιο απορρυθμισμένα μονοπάτια του κακοήθους μεσοθηλιώματος του υπεζωκότα σύμφωνα με πρόσφατη ανασκόπηση (3). Το εύρημα αυτό πιθανά ερμηνεύεται από το γεγονός ότι τα κακοήθη κύτταρα του όγκου αλληλεπιδρούν τόσο με το δίκτυο αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών όσο και με το έξω-κυτταρικό μικροπεριβάλλον που τους μεταδίδει ενδοκυτταρικά σήματα (3).

Το γονίδιο INADL κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη με πολλές PDZ περιοχές που μπορεί να ρυθμίζουν την κυτταρική πολικότητα και την ακεραιότητα των στεγανών συνδέσμων (σύνοψη στη βάση δεδομένων Gene Cards). Οι PDZ περιοχές των κλαουδινών συνδέονται με αυτές άλλων πρωτεϊνών και πιστεύεται ότι οι πρωτεϊνικές αυτές αλληλεπιδράσεις παρέχουν συνδέσεις με την ακτίνη του κυτταρικού σκελετού ενώ ταυτόχρονα εξυπηρετούν την πρόσληψη μορίων που διαμεσολαβούν στη μετάδοση σημάτων προς και από τους στεγανούς συνδέσμους (61).

Σε αντίθεση με την θετική ρύθμιση των EPHA2, UBC3, VEGFA, MAPK9 και INADL που συμβάλλει στη διαδικασία της καρκινογένεσης όπως αποδεικνύεται και από τη βιβλιογραφία, τα γονίδια S100B, GEM, HGD, SHBG, VWF, NKX2-1 και CDH5 υπό-εκφράζονται στους πάσχοντες από κακοήθες μεσοθηλίωμα σε σχέση με τους υγιείς.

Η πρωτεΐνη S100B αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες εντός των κυττάρων για να ρυθμίσει ενζυμικές δραστηριότητες, την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση αλλά και την ομοίωση του ασβεστίου (62). Επιπλέον, εμπλέκεται λειτουργικά στη ρύθμιση της κυτταρικής μορφολογίας καθώς αλληλεπιδρά με τα συστατικά του κυτταρικού σκελετού. Η S100B αποτελεί χρήσιμο δείκτη σταδιοποίησης του κακοήθους μελανώματος ενώ χρησιμοποιείται και για την εκτίμηση του θεραπευτικού αποτελέσματος αλλά και την πρόβλεψη υποτροπής (63). Οι Pang και συνεργάτες βρήκαν αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης S100B σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και εγκεφαλική

μετάσταση σε σχέση με αυτούς χωρίς μεταστατική νόσο (62). Βιβλιογραφικά επισημαίνεται ότι τα επίπεδα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών όγκων ενώ μεταβάλλονται και ανάλογα με το στάδιο της νόσου (63). Ο ρόλος της στην παθολογία του κακοήθους μεσοθηλιώματος χρήζει περαιτέρω έρευνας.

Η GEM ανήκει στις GTP δεσμευτικές πρωτεΐνες, σχετίζεται με την άτρακτο και θεωρείται απαραίτητη για την εξέλιξη της μιτωτικής διαίρεσης ενώ λειτουργικά η απώλεια της οδηγεί σε μη ευθυγραμμισμένα χρωμοσώματα (64). Η διαπιστούμενη στη παρούσα εργασία αρνητική ρύθμιση της GEM στους πάσχοντες από κακόηθες μεσοθηλίωμα σε σχέση με τους υγιείς παρουσιάζει ενδιαφέρον και πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω καθώς παθογενετικά, ένας από τους βασικούς μηχανισμούς επαγωγής του ΚΜ από τον αμίαντο είναι η παρεμβολή στη μίτωση.

Το ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο HGD συμμετέχει στον καταβολισμό των αμινοξέων τυροσίνη και φαινυλαλανίνη. Οι μεταλλάξεις του HGD ευθύνονται για την υπολειπόμενη αυτοσωμική μεταβολική νόσο αλκαπτονουρία (σύνοψη στη βάση δεδομένων Gene Cards). Η παρατηρούμενη υπό-έκφραση του στους πάσχοντες από κακόηθες μεσοθηλίωμα είναι ενδιαφέρουσα καθώς είναι γνωστό ότι ατομικές διαφορές σε γονίδια που συμμετέχουν σε μεταβολικά μονοπάτια μπορούν να μεταβάλλουν την απόκριση σε περιβαλλοντικά καρκινογόνα (7). Ως εκ τούτου η πιθανή συμμετοχή του HGD στη παθοβιολογία του κακοήθους μεσοθηλιώματος πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Η SHBG είναι κύριος ρυθμιστής των επιπέδων ελεύθερων ανδρογόνων στο πλάσμα ενώ μεσολαβεί και στη σηματοδότηση των φυλετικών ορμονών από και προς την κυτταρική μεμβράνη μέσω της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης. Οι μελέτες που αφορούν τον ρόλο της SHBG στον καρκίνο του προστάτη παρήγαγαν αντικρουόμενα αποτελέσματα (65). Η παρατηρούμενη στη παρούσα μελέτη αρνητική ρύθμιση του SHBG γονιδίου στους πάσχοντες από ΚΜ σε συνδυασμό με την υπέρ-έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις κλαουδίνες -6, -14 καθώς και την πρωτεΐνη-3 του στενοσυνδέσμου στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άντρες επιβεβαιώνει ότι οι φυλετικοί παράγοντες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεση και πρόγνωση της νόσου. Σε προηγούμενη μελέτη (66) αναφέρεται ότι απουσία άλλων αρνητικών προγνωστικών παραγόντων οι γυναίκες με επιθηλιοειδή τύπο κακοήθους μεσοθηλιώματος έχουν σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των αντρών. Οι συγγραφείς απέδωσαν το εύρημα τους στην πιθανή έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνου από το συγκεκριμένο ιστολογικό πρότυπο ανάπτυξης του όγκου με αποτέλεσμα τη καταστολή της ανάπτυξης του. Αν και η δημοσίευση δεν περιελάμβανε δεδομένα αναφορικά

με το status εμμηνόπαυσης των γυναικών οι ερευνητές υπογράμμισαν τον ρόλο των ορμονών του φύλου στο πλεονέκτημα επιβίωσης.

Το γονίδιο NKX2-1, σε πρόσφατη ανασκόπηση αναφέρεται ότι έχει διπλό ρόλο, αφενός προ-νεοπλασματικό καθώς αναφέρεται η συσχέτιση του με την καρκινογένεση στους πνεύμονες αφετέρου αντικαρκινικό καθώς εμποδίζει την μετάσταση των πρωτογενών όγκων (67). Έχει βρεθεί ότι το συγκεκριμένο γονίδιο ενεργοποιεί απευθείας τις πρωτεΐνες οκλουδίνη και κλαουδίνη-1 των στενοσυνδέσμων στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα ενώ και η κλαουδίνη 18 αποτελεί άμεσο μεταγραφικό του στόχο (67). Στη παρούσα μελέτη βρέθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση στα μοτίβα έκφρασης των γονιδίων NKX2-1-κλαουδίνη 18 γεγονός που επιβεβαιώνει το παραπάνω εύρημα. Πειραματικά, η απενεργοποίηση του NKX2-1 προκάλεσε αντίσταση των πνευμονικών καρκινικών κυττάρων σε έναν τύπο προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που επάγεται κατά την αποκόλληση των κυττάρων από την εξωκυττάρια μήτρα ενώ η έκφραση της οκλουδίνης αποκατέστησε την κυτταρική ευαισθησία στην απόπτωση (ο συγκεκριμένος τύπος απόπτωσης αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως *anoikis*). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν τη πιθανή συμμετοχή των συστατικών των στεγανών συνδέσμων στην ικανότητα του NKX2-1 να καταστέλλει την εξέλιξη του καρκίνου του πνεύμονα (67). Ωστόσο, ο ρόλος του στη βιολογική οδό του KM χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Το γονίδιο VWF κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη απαραίτητη για την προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων κατά την αιμόσταση (68). Σε μελέτη των Starke και συνεργατών (69) βρέθηκε ότι η απώλεια του ενδοθηλιακού VWF συνεπάγεται αυξημένη αγγειογένεση *in vitro*. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε νέο-αγγειογένεση και αυξημένη αγγείωση στα ποντίκια με έλλειψη του VWF. Σε πρόσφατη ανασκόπηση (3) ο VWF εμφανίζεται ανάμεσα στα γονίδια που υπό-εκφράζονται συστηματικά στο κακόηθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα σε ανεξάρτητες έρευνες.

Η καδερίνη CDH5 αποτελεί το κύριο συστατικό των συνδέσμων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της ακεραιότητας και διαπερατότητας των αγγείων. Δομικά αλλά και λειτουργικά αλληλεπιδρά με την κλαουδίνη 5. Σε μοριακό επίπεδο διαπιστώθηκε ότι αυξάνει απευθείας το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την κλαουδίνη-5 απομακρύνοντας από τον προαγωγέα του δυνητικά κατασταλτικούς παράγοντες μεταγραφής όπως η β-κατενίνη. Αντίθετα, η απώλεια της λειτουργικής CDH5 συνεπάγεται την απώλεια έκφρασης της κλαουδίνης-5. Ελέγχοντας άμεσα την έκφραση της τελευταίας, η καδερίνη CDH5 ελέγχει παράλληλα την οργάνωση αλλά και πλαστικότητα των στεγανών συνδέσμων στα ενδοθηλιακά κύτταρα (70). Στη

παρούσα μελέτη δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση στα μοτίβα έκφρασης των δύο αυτών γονιδίων στους πάσχοντες από κακοήθες μεσοθηλίωμα, παρατηρήθηκε όμως αρνητική συσχέτιση στα προφίλ έκφρασης της καδερίνης 5 και της κλαουδίνης 16 ένα εύρημα που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Η αρνητική ρύθμιση της CDH5 συνεπάγεται αναδιοργάνωση των στενοσυνδέσμων και αύξηση της ενδοθηλιακής αλλά και διακυτταρικής διαπερατότητας, διεργασίες που αυξάνουν τη ροή των διαλυμένων ουσιών και ευνοούν την κινητικότητα των μετασχηματισμένων κυττάρων (70).

Ένα ακόμη σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης είναι ότι μεταξύ των ασθενών τα μοτίβα έκφρασης των συστατικών των στεγανών συνδέσμων συσχετίζονται σημαντικά με αυτά του υπολοίπου δικτύου που δομήθηκε μέσω της ανάλυσης στις πλατφόρμες Bio-grid, ConsensusPathDB, και String 9.05. Η παρατήρηση αυτή αντανακλά την δυναμική αλληλεπίδραση των γονιδίων κατά την ανάπτυξη και εξέλιξη του κακοήθους μεσοθηλιώματος και υπογραμμίζει την απαίτηση για βαθύτερη κατανόηση των γενετικών μηχανισμών που συμβάλλουν στη νόσο.

Συνολικά, τα αποτελέσματα της μελέτης παρέχουν ενδείξεις για τη πιθανή χρησιμότητα των συστατικών των στεγανών συνδέσμων ως βιοδεικτών κινδύνου, διάγνωσης και πρόγνωσης του κακοήθους μεσοθηλιώματος ενώ παράλληλα αναδεικνύουν νέα γονίδια που αξίζει να μελετηθούν περαιτέρω για τον ρόλο τους στην εκδήλωση και εξέλιξη της νόσου. Επιπρόσθετα, προβάλλουν την επιγενετική επίδραση του αμιάντου στα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων.

Στη σύγχρονη βιβλιογραφία επισημαίνεται η αναγκαιότητα ανεύρεσης βιοδεικτών που θα μπορούσαν να υποβοηθήσουν τη διάγνωση του κακοήθους μεσοθηλιώματος και/ή να προβλέψουν την επιβίωση αλλά και να μετρήσουν την απόκριση στη θεραπεία. Ο βιοδείκτης, είναι ένα 'χαρακτηριστικό' που μπορεί αντικειμενικά να μετρηθεί και να εκτιμηθεί ως δείκτης μίας παθογενετικής διαδικασίας. Μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ασθένεια ή βιοδείκτη κινδύνου σχετιζόμενου με την ασθένεια (όχι απαραίτητα αιτιολογικά συνδεόμενου), ή μπορεί να αποτελεί μέτρο της ίδιας της ασθένειας. Ο ιδανικός βιοδείκτης θα αυξάνεται παθολογικά στη παρουσία ασθένειας (αποδίδοντας υψηλή ευαισθησία), και δεν θα αυξάνεται επί απουσίας αυτής (υψηλή ειδικότητα). Επιπλέον, θα σχετίζεται με τη βαρύτητα και έκταση της νόσου και θα μεταβάλλεται κατά την κλινική της εξέλιξη αντικατοπτρίζοντας την απόκριση στη θεραπεία και παρέχοντας πληροφορίες αναφορικά με την πρόγνωση. Περαιτέρω επιθυμητά χαρακτηριστικά είναι η βιολογική σταθερότητα, η επαναληψιμότητα και αξιοπιστία ενώ ιδανικά η επιλεγόμενη τεχνική δοκιμή θα πρέπει να είναι φτηνή και εύκολη στην εφαρμογή. Μέχρι σήμερα, η πλειονότητα των ερευνών έχει επικεντρωθεί στη γονιδιακή

οικογένεια της μεσοθελίνης (6). Ωστόσο, σε πρόσφατη μετά-ανάλυση διαπιστώθηκε ότι με μόλις 32% ευαισθησία επί ειδικότητας 95%, η μεσοθελίνη του ορού δεν είναι κατάλληλη ως διαγνωστικός δείκτης του κακοήθους μεσοθελιώματος (71). Γενικά, η διάγνωση του μεσοθελιώματος παρουσιάζει προκλήσεις καθώς η φαινοτυπική διαφοροποίηση των κακοήθων μεσοθελιακών κυττάρων από τα καλοήθη είναι συχνά δύσκολη. Επιπλέον, κανένας ανοσοϊστοχημικός δείκτης δεν μπορεί αξιόπιστα να διαγνώσει τη νόσο. Συχνά απαιτείται θωρακοσκοπική βιοψία αλλά ακόμη και τότε παρατηρούνται πολλά ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Καθώς τα ιστολογικά πρότυπα ανάπτυξης των κακοήθων μεσοθελιωμάτων διαφέρουν σημαντικά ως προς τα επίπεδα γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης η ανεύρεση και ενσωμάτωση στον διαγνωστικό αλγόριθμο ενός μόνο βιοδείκτη θεωρείται δύσκολη (6, 8). Αντίθετα, θεωρείται πιο πιθανή η ανεύρεση ενός βιοδείκτη παρακολούθησης της θεραπευτικής απάντησης και πρόγνωσης της ασθένειας. Μέχρι στιγμής οι περισσότερες μελέτες διερεύνησης προγνωστικών δεικτών μοιράζονται εγγενείς περιορισμούς όπως το μικρό μέγεθος δείγματος, τα συστηματικά λάθη επιλογής και η απουσία εξωτερικής πιστοποίησης. Για παράδειγμα, πολλές μελέτες χρησιμοποίησαν δείγματα προερχόμενα από ριζικές χειρουργικές εκτομές ενώ μόνο ένα μικρό δείγμα των πασχόντων από ΚΜ κρίνεται κατάλληλο για τέτοιους χειρισμούς. Επιπρόσθετα, τα μικρά δειγματοληπτικά μεγέθη δεν επιτρέπουν την επαρκή ανάλυση των αναλογικά λιγότερο συχνών τύπων του ΚΜ όπως το διφασικό και το σαρκωματώδες γεγονός που παράγει συστηματικά λάθη επιλογής. Ως εκ τούτου απαιτούνται περισσότερες, εξωτερικά επικυρωμένες μελέτες, με μεγαλύτερα και πιο αντιπροσωπευτικά δείγματα πληθυσμού ασθενών (6). Σε πρόσφατη δημοσίευση (72) προτάθηκε ότι τα επίπεδα της φιμπριουλίνης-3 (που κωδικοποιείται από το γονίδιο EFEMP1) στο πλάσμα μπορούν να συνδράμουν στη διάγνωση και πρόγνωση του κακοήθους μεσοθελιώματος του υπεζωκότα. Η ευαισθησία και ειδικότητα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στο να διακρίνει τους πάσχοντες από τους εκτεθειμένους στον αμίαντο υγιείς αλλά και από τους ασθενείς με υπεζωκοτική συλλογή μη οφειλόμενη σε μεσοθελίωμα ήταν μεγαλύτερη από αυτήν άλλων δεικτών τα δε επίπεδα της δεν επηρεάστηκαν από τη διάρκεια έκθεσης στον αμίαντο. Επιπρόσθετα, τα υψηλά επίπεδα της φιμπριουλίνης-3 στις υπεζωκοτικές συλλογές βρέθηκε ότι έχουν υψηλή θετική προγνωστική αξία και αντανακλούν την πρόγνωση. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της μελέτης, σύμφωνα με τους συγγραφείς, δεν μπορούν να υποστηρίξουν το ρόλο της πρωτεΐνης αυτής ως δείκτη έγκαιρης ανίχνευσης της νόσου καθώς δεν διενεργήθηκαν προοπτικά συλλογές δειγμάτων πλάσματος. Η οστεοποντίνη, που επίσης συνδέθηκε με το μεσοθελίωμα μέσω της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών (5), φάνηκε αρχικά ότι αποτελεί υποσχόμενο διαγνωστικό δείκτη της νόσου. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες επικύρωσης δεν απέδωσαν την αναμενόμενη

διαγνωστική ακρίβεια σε κανένα από τα επιλεγόμενα είδη δείγματος (ορό, πλάσμα ή υπεζωκοτικές συλλογές) με αποτέλεσμα ο ρόλος της πρωτεΐνης αυτής ως διαγνωστικού βιοδείκτη να είναι πια περιορισμένος. Τα υψηλά επίπεδα οστεοποντίνης στις υπεζωκοτικές συλλογές φαίνεται ότι είναι προβλεπτικά μικρότερης επιβίωσης. Περιορίζουν τα οφέλη της χημειοθεραπείας αλλά και την απόκριση στην χειρουργική εκτομή του όγκου. Ωστόσο, και στον τομέα της πρόγνωσης, τα ερευνητικά δεδομένα είναι αντικρουόμενα (8). Πρόσφατα, εκτιμήθηκε ο κλινικός ρόλος της θειορεδοξίνης 1, σε δείγματα ορού πασχόντων από κακόηθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα και του περιτοναίου. Το ένζυμο, που σχετίζεται με την κυτταρική άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες, μπόρεσε να διακρίνει τους ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα από τους πάσχοντες από καρκίνο του πνεύμονα και πιθανά έχει προγνωστική αξία. Επιπλέον φάνηκε ότι μπορεί να διαχωρίσει τους πάσχοντες από κακόηθες μεσοθηλίωμα του περιτοναίου από τους εκτεθειμένους στον αμίαντο υγιείς. Ωστόσο, οι μελέτες απαιτούν επικύρωση με πιο αντιπροσωπευτικές ομάδες ελέγχου (8). Τελευταία, με τη βοήθεια της πρωτεωμικής, αναγνωρίστηκαν δύο νέοι πιθανοί βιοδείκτες του κακοήθους μεσοθηλιώματος, η γαλεκτίνη-1 και η άλδο-κέτο ρεδοουκτάση 1B10. Η πρώτη, περιγράφηκε ως ισχυρός αρνητικός προβλεπτικός δείκτης του κακοήθους μεσοθηλιώματος συγκριτικά με τα μεταστατικά αδενοκαρκινώματα ενώ η δεύτερη αναφέρεται ως πιθανός προγνωστικός δείκτης της νόσου. Υψηλά επίπεδα του ενζύμου άλδο-κέτο ρεδοουκτάση 1B10 σχετίζονται με αντίσταση στη χημειοθεραπεία γεγονός που πιθανά εξηγεί την μικρότερη επιβίωση των ασθενών. Ανασταλτές του ενζύμου όπως το Tolrestat, έχουν αναπτυχθεί για την θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη και θα μπορούσαν να δοκιμαστούν σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία πασχόντων από κακόηθες μεσοθηλίωμα με υψηλά επίπεδα ενζύμου (8). Παράλληλα, μέσω της ανάλυσης του μεταγραφικού προφίλ των γονιδίων βρέθηκε ότι η υπέρ-έκφραση της συνδεκάνης-1 επηρεάζει την ρύθμιση γονιδίων που συμμετέχουν στην κυτταρική διαφοροποίηση, προσκόλληση και μετανάστευση. Η αποσιώπηση ή η θετική ρύθμιση της συνδεκάνης-1 επέδρασε σημαντικά σε πολλά κυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης, κυρίως στα δίκτυα ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου (8). Το επόμενο στάδιο στην έρευνα για το κακόηθες μεσοθηλίωμα θα περιλαμβάνει την εκτίμηση ενός συνδυασμού βιοδεικτών που θα αυξήσει την ακρίβεια διάγνωσης του νοσήματος (6, 8). Επιπλέον θα πρέπει να καθοριστεί ο τρόπος με τον οποίο οι νέοι βιοδείκτες θα ενσωματωθούν στους κλινικούς διαγνωστικούς και/ή θεραπευτικούς αλγόριθμους. Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η υπό-ομάδα των ασθενών που έχουν εκτεθεί σε αμίαντο και ανέπτυξαν χρόνια φλεγμονή του υπεζωκότα αλλά όχι μεσοθηλίωμα. Η υπό-ομάδα αυτή έχει αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης του κακοήθους όγκου και μπορεί να αποτελέσει το 'κλειδί' για την αναγνώριση πρώιμων, υπό-κλινικών δεικτών της ασθένειας (8). Τέλος, η πρόοδος στο ερευνητικό πεδίο

του κακοήθους μεσοθηλιώματος θα πρέπει να ενσωματωθεί στο πεδίο της δημόσιας υγείας καθώς η βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στη νόσο θα επιτρέψει στα Εθνικά Συστήματα Υγείας να τροποποιήσουν τις στρατηγικές πρόληψης. Στη μεταγονιδιωματική εποχή, οι νέες πληροφορίες θα μπορούν να αξιοποιηθούν στον μαζικό προσυμπτωματικό έλεγχο των ομάδων υψηλού κινδύνου, την έγκαιρη διάγνωση, θεραπευτική παρακολούθηση και πρόγνωση της ασθένειας.

5. Συμπεράσματα

Τα κακοήθη μεσοθηλιώματα είναι εξαιρετικά επιθετικά νεοπλασμάτα που αναπτύσσονται σε κοιλότητες επενδυμένες με μεσοθηλιακά κύτταρα. Λόγω της αιτιολογικής τους συσχέτισης με την έκθεση σε ίνες αμιάντου αλλά και των επιδημιολογικών προβλέψεων για αύξηση της επίπτωσης τους έχουν προκαλέσει την έντονη ανησυχία των επιστημόνων της δημόσιας υγείας και περιβαλλοντικής υγιεινής. Τα τελευταία ιδιαίτερα χρόνια, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην αναζήτηση μοριακών δεικτών που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην έγκαιρη διάγνωση των κακοήθων αυτών όγκων κυρίως σε πληθυσμιακές ομάδες υψηλού κινδύνου εξαιτίας της επαγγελματικής ή περιβαλλοντικής έκθεσης στις ορυκτές ενώσεις αμιάντου και σε άλλα περιβαλλοντικά καρκινογόνα. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι ενδεικτικά ενός ξεχωριστού μοτίβου έκφρασης των συστατικών του στεγανού συνδέσμου στο κακόηθες μεσοθηλίωμα καθιστώντας τα τελευταία ελκυστικούς γονιδιακούς δείκτες για την έγκαιρη διάγνωση και πρόγνωση της νόσου. Ταυτόχρονα υποδεικνύουν ότι η κλαουδίνη 15 και η πρωτεΐνη-3 του συμπλόκου απορρυθμίζονται σημαντικά στους ασθενείς που έχουν εκτεθεί σε αμιάντο και παρουσιάζουν ομόζυγη έλλειψη του γενετικού τόπου CDKN2A σε σχέση με τους μη εκτεθειμένους και τους ετεροζυγώτες αντίστοιχα. Το εύρημα αυτό προβάλλει τις επιπτώσεις των περιβαλλοντικών παραγόντων πίεσης στην λειτουργία και έκφραση των γονιδίων και τονίζει την αναγκαιότητα επέκτασης της έρευνας στο πεδίο της περιβαλλοντικής γονιδιωματικής και επιγενετικής. Τέλος, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποκαλύπτουν νέα γονίδια που συμμετέχουν στη δόμηση του δικτύου των στεγανών συνδέσμων. Η έκφραση αυτών των γονιδίων στο μεσοθηλίωμα μεταβάλλεται σε άμεση συνάρτηση με την έκφραση των κλαουδινών και των υπολοίπων συστατικών του στενοσυνδέσμου. Ως εκ τούτου αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω ο ακριβής τους ρόλος στην παθοβιολογία του μεσοθηλιώματος για να εκτιμηθεί η χρησιμότητα τους ως βιοδεικτών.

Βιβλιογραφία

1. J. R. Testa, M. Cheung, J. Pei, J. E. Below, Y. Tan, E. Sementino, N. J. Cox, A. U. Dogan, H. I. Pass, S. Trusa, M. Hesdorffer, M. Nasu, A. Powers, Z. Rivera, S. Comertpay, M. Tanji, G. Gaudino, H. Yang, M. Carbone. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet* 2011;43:1022-1025
2. MC. F. Jaurand, A. Renier, J. Daubriac. Mesothelioma: Do asbestos and carbon nanotubes pose the same health risk? *Part Fiber Toxicol* 2009;6:16
3. O. Melaiu, A. Cristaudo, E. Melissari, M. Di Russo, A. Bonotti, R. Bruno, R. Foddis, F. Gemignani, S. Pellegrini, S. Landi. A review of transcriptome studies combined with data mining reveals novel potential markers of malignant pleural mesothelioma. *Mutat Res* 2012;750:132-140
4. B. Davidson, Z. Zhang, L. Kleinberg, M. Li, V. A. Flørenes, T. L. Wang, Ie-M. Shih. Gene expression signatures differentiate ovarian/peritoneal serous carcinoma from diffuse malignant peritoneal mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2006;12:5944-5950
5. H. I. Pass, Z. Liu, A. Wali, R. Bueno, S. Land, D. Lott, F. Siddiq, F. Lonardo, M. Carbone, S. Draghici. Gene expression profiles predict survival and progression of pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2004;10(3):849-859
6. F. J. Brims, Y. C. G. Lee, J. Creaney. The continual search for ideal biomarkers for mesothelioma: the hurdles. *J Thorac Dis* 2013;5(3):364-366
7. R. G. Ramos, K. Olden. Gene-Environment Interactions in the Development of Complex Disease Phenotypes. *Int J Environ Res Public Health* 2008;5(1):4-11
8. F. Mundt. Malignant Pleural Mesothelioma: Novel Biomarkers and related pathways. Διαθέσιμο:
https://publications.ki.se/xmlui/bitstream/handle/10616/41389/Thesis_Filip_Mundt.pdf?sequence=1
9. B. Davidson. The diagnostic and molecular characteristics of malignant mesothelioma and ovarian/peritoneal serous carcinoma. *Cytopathology* 2011;22:5-21

10. E. K. Park, K. Takahashi, T. Hoshuyama, T. J. Cheng, V. Delgermaa, G. V. Le, T. Sorahan. Global magnitude of reported and unreported mesothelioma. *Environ Health Perspect* 2011;119:514-518
11. E. Gogou, Th. Kerenidi, V. Chamos, E. Zintzaras, K. I. Gourgoulianis. Mesothelioma mortality in Greece from 1983 to 2003. *Int J Clin Pract* 2009;63:944-948
12. C. Bianchi, T. Bianchi. Malignant Mesothelioma: Global Incidence and Relationship with Asbestos. *Ind Health* 2007;45:379-387
13. V. Delgermaa, K. Takahashi, E. K. Park, G. V. Le, T. Hara, T. Sorahan. Global mesothelioma deaths reported to the World Health Organization between 1994 and 2008. Διαθέσιμο:
<http://www.who.int/bulletin/volumes/89/10/11-086678/en/>
14. J. C. Wagner, C. A. Sleggs, P. Marchand. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the northwestern Cape Province. *Br J Ind Med* 1960;17:260-271
15. G. W. Gibbs, G. Berry. Mesothelioma and asbestos. *Regul Toxicol Pharmacol* 2008;52:223-231
16. M. S. Kanarek. Mesothelioma from Chrysotile Asbestos: Update. *Ann Epidemiol* 2011;21:688-697
17. G. Liu, P. Cheresch, D. W. Kamp. Molecular Basis of Asbestos-Induced Lung Disease. *Annu Rev Pathol* 2013;8:161-187
18. A. Νικολάου. Η επικινδυνότητα του αμιάντου: Ιστορικό-Νομοθεσία-Διερεύνηση σε εργασιακό περιβάλλον. Διαθέσιμο:
<http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/2528/1/NIKOLAOU%20MASTER.pdf>
19. P. A. Rascoe, D. Jupiter, X. Cao, J. E. Littlejohn, W. R. Smythe. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Expert Rev Mol Med* 2012;14:12
20. L. Kazan-Allen. Asbestos and Mesothelioma: Worldwide trends. *Lung Cancer* 2005;49:3-8

21. M. Carbone, B. H. Ly, R. F. Dodson, I. Pagano, P. T. Morris, U. A. Dogan, A. F. Gazdar, H. I. Pass, H. Yang. Malignant Mesothelioma: Facts, Myths and Hypotheses. *J Cell Physiol* 2012;227:44-58
22. K. Anastasiadou, E. Gidarakos. Toxicity evaluation for the broad area of the asbestos mine of northern Greece. *J Hazard Mater* 2007;139:9-18
23. B. W. Robinson, A. W. Musk, R. A. Lake. Malignant mesothelioma. *Lancet* 2005;366:397-408
24. J. F. Lechner, J. Tesfaigzi, B. I. Gerwin. Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes in Mesothelioma-A Synopsis. *Environ Health Perspect* 1997;105:1061-1067
25. M.E. Ramos-Nino, J. R. Testa, D. A. Altomare, H. I. Pass, M. Carbone, M. Bocchetta, B. T. Mossman. Cellular and Molecular Parameters of Mesothelioma. *J Cell Biochem* 2006;98:723-734
26. J. E. Below, N. J. Cox, N. K. Fukagawa, A. Hirvonen, J. R. Testa. Factors that impact susceptibility to fiber-induced health effects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2011;14:246-266
27. M. Carbone, H. I. Pass, L. Miele, M. Bocchetta. New developments about the association of SV40 with human mesothelioma. *Oncogene* 2003;22:5173-5180
28. D. Ugolini, M. Neri, M. Ceppi, A. Cesario, I. Dianzani, R. Filiberti, F. Gemignani, S. Landi, C. Magnani, L. Mutti, R. Puntoni, S. Bonassi. Genetic susceptibility to malignant mesothelioma and exposure to asbestos: The influence of the familiar factor. *Mutat Res* 2008;658:162-171
29. B. Jasani, A. Gibbs. Mesothelioma not Associated with Asbestos Exposure. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136:262-267
30. R. Pilarski, C. M. Cebulla, J. B. Massengill, K. Rai, T. Rich, L. Strong, B. McGillivray, M. J. Asrat, F. H. Davidorf, M. H. Abdel-Rahman. Expanding the clinical phenotype of hereditary BAP1 cancer predisposition syndrome, reporting three new cases. *Genes Chromosomes Cancer* 2014;53:177-182
31. J. T. Peterson, D. Greenberg, P. A. Buffler. Non-Asbestos-Related Malignant Mesothelioma. *Cancer* 1984;54:951-960

- 32.** K. Inai. Pathology of mesothelioma. *Environ Health Prev Med* 2008;13:60-64
- 33.** P. V. Schil. Malignant Pleural Mesothelioma: Staging systems. *Lung cancer* 2005;49:45-48
- 34.** A. Granieri, S. Tamburello, A. Tamburello, S. Casale, C. Cont, F. Guglielmucci, M. Innamorati. Quality of life and personality traits in patients with malignant pleural mesothelioma and their first-degree caregivers. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2013;9:1193-202
- 35.** Γ. Ν. Θωμόπουλος. Ο Υπό Κυπταρικός Κόσμος: Οργανίδια και ασθένειες. University Studio Press. Θεσσαλονίκη 1995.
- 36.** C. Will, M. Fromm, D. Muller. Claudin Tight Junction Proteins: Novel aspects in paracellular transport. *Perit Dial Int* 2008;28:577-584
- 37.** M. Furuse, K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto, S. Tsukita. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occluding. *J Cell Biol* 1998;141:1539-1550
- 38.** Y. Soini. Claudins in lung diseases. *Respir Res* 2011;12:70
- 39.** B. L. Valle, P. J. Morin. Claudins in Cancer Biology. *Curr Top Membr* 2010;65:293-333
- 40.** M. Lal-Nag, P. J. Morin. Protein Family review. The Claudins. *Genome Biology* 2009;10:235
- 41.** F. Facchetti, S. Lonardi, F. Gentili, L. Bercich, M. Falchetti, R. Tardanico, C. Baronchelli, L. Lucini, A. Santin, B. Murer. Claudin 4 identifies a wide spectrum of epithelial neoplasms and represents a very useful marker for carcinoma versus mesothelioma diagnosis in pleural and peritoneal biopsies and effusions. *Virchows Arch* 2007;451:669-680
- 42.** R. R. Pathak, V. Dave. Integrating Omics Technologies to study Pulmonary Physiology and Pathology at the Systems Level. *Cell Physiol Biochem* 2014;33:1239-1260
- 43.** A. Brand, H. Brand, T. Schulte in den Baumen. The impact of genetics and genomics on public health. *Eur J Hum Genet* 2008;16(1):5-13
- 44.** G. J. Gordon, G. N. Rockwell, R. V. Jensen, J. G. Rheinwald, J. N. Glickman, J. P. Aronson, B. J. Pottorf, M. D. Nitz, W. G. Richards, D. J. Sugarbaker et al. Identification of novel candidate oncogenes and tumor suppressors in malignant pleural mesothelioma using large-scale transcriptional profiling. *Am J Pathol* 2005;166:1827-1840

45. D. R. Rhodes, J. Yu, K. Shanker, N. Deshpande, R. Varambally, D. Ghosh, T. Barrette, A. Pandey, A. M. Chinnaiyan. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* 2004; 6: 1-6
46. F. López-Ríos, S. Chuai, R. Flores, S. Shimizu, T. Ohno, K. Wakahara, P. B. Illei, S. Hussain, L. Krug, M. F. Zakowski. Global gene expression profiling of pleural mesotheliomas: overexpression of aurora kinases and P16/CDKN2A deletion as prognostic factors and critical evaluation of microarray-based prognostic prediction. *Cancer Res* 2006;66:2970-2979
47. B. C. Christensen, C. J. Marsit. Epigenomics in environmental health. *Front Genet* 2011;2:84
48. B. Ficociello, C. Minoia, E. Sturchio. A key role of microRNAs as early biomarkers in mesothelioma. *J Environ Occup Sci* 2013;2(2):89-102
49. Y. Sekido. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis* 2013;34(7):1413-1419
50. Y. Soini, V. Kinnula, K. Kahlos, P. Pääkkö. Claudins in differential diagnosis between mesothelioma and metastatic adenocarcinoma of the pleura. *J Clin Pathol* 2006;59:250-254
51. Y. Ohta, Y. Sasaki, M. Saito, M. Kushima, M. Takimoto, A. Shiokawa, H. Ota. Claudin-4 as a Marker for Distinguishing Malignant Mesothelioma From Lung Carcinoma and Serous Adenocarcinoma. *Int J Surg Pathol* 2013;
52. S. Chaouche-Mazouni, M. C. Copin, P. Lassalle, N. Lebaili, A. Cortot, A. Scherpereel. M14K and M38K malignant pleural mesothelioma cell lines preserve the same claudin-based phenotype in vivo. *In Vivo* 2013;27:227-232
53. W. Wykosky, W. Debinski. The EphA2 Receptor and EphrinA1 Ligand in Solid Tumors: Function and Therapeutic Targeting. *Mol Cancer Res* 2008;6: 1795-1806
54. M.S. Kinch, M. B. Moore, D. H. Jr Harpole. Predictive value of the EphA2 Receptor Tyrosine Kinase in lung cancer recurrence and survival. *Clin Cancer Res* 2003;9:613-618
55. N. Nasreen, N. Khodayari, K. A. Mohammed. Advances in malignant pleural mesothelioma therapy: targeting EphA2 a novel approach. *Am J Cancer Res* 2012;2(2):222-234
56. D. Chauhan, G. Li, T. Hideshima, K. Podar, R. Shringarpure, C. Mitsiades, N. Munshi, P.

- R. Yew, K. C. Anderson. Blockade of ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 enhances anti-myeloma activity of Bortezomib/Proteasome inhibitor PS-341. *Oncogene* 2004;23:3597-3602
- 57.** K. Tanaka, N. Kondoh, M. Shuda, O. Matsubara, N. Imazeki, A. Ryo, T. Wakatsuki, A. Hada, N. Goseki, T. Igari et al. Enhanced expression of mRNAs of antiseecretory factor-1, gp96, DAD1 and CDC34 in human hepatocellular carcinomas. *Biochim Biophys Acta* 2001;1536:1-12
- 58.** L. Claesson-Welsh, M. Welsh. VEGFA and Tumor Angiogenesis. *J Intern Med* 2013;273:114-127
- 59.** B. P. Coe, W. W. Lockwood, L. Girard, R. Chari, C. Macaulay, S. Lam, A. F. Gazdar, J. D. Minna, W. L. Lam. Differential disruption of cell cycle pathways in small cell and non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2006;94:1927-1935
- 60.** G. Mountzios, I. Kostopoulos, V. Kotoula, I. Sfakianaki, E. Fountzilas, K. Markou, I. Karasmanis, S. Leva, N. Angouridakis, K. Vlachtsis et al. Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) expression and survival in operable squamous-cell laryngeal cancer. *Plos One* 2013;8(1): e54048
- 61.** Y. C. Chao, S. H. Pan, S. C. Yang, S. L. Yu, T. F. Che, C. W. Lin, M. S. Tsai, G. C. Chang, C. H. Wu, Y. Y. Wu et al. Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:123-133
- 62.** X. Pang, J. Min, L. Liu, Y. Liu, N. Ma, H. Zhang. S100B protein as a possible participant in the brain metastasis of NSCLC. *Med Oncol* 2012;29: 2626-2632
- 63.** R. Harpio, R. Einarsson. S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clin Biochem* 2004;37:512-518
- 64.** G. Andrieu, M. Quaranta, C. Leprince, A. Hatzoglou. The GTPase Gem and its partner Kif9 are required for chromosome alignment, spindle length control, and mitotic progression. *FASEB J* 2012;26:5025-5034
- 65.** N. Mononen, J. Schleutker. Polymorphisms in Genes Involved in Androgen Pathways as Risk Factors for Prostate Cancer. *J Urol* 2009;181:1541-1549

- 66.** A. S. Wolf, W. G. Richards, T. R. Tilleman, L. Chirieac, S. Hurwitz, R. Bueno, D. J. Sugarbaker. Characteristics of malignant pleural mesothelioma in women. *Ann Thorac Surg* 2010;90:949-956
- 67.** D. Mu. The complexity of Thyroid Transcription Factor 1 with both Pro- and Anti-Oncogenic Activities. *J Biol Chem* 2013;288(35):24992-25000
- 68.** G. P. Luo, B. Ni, X. Yang, Y. Z. Wu. von Willebrand Factor: More than a regulator of Hemostasis and Thrombosis. *Acta Haematol* 2012;128:158-169
- 69.** R. D. Starke, F. Ferraro, K. E. Paschalaki, N. H. Dryden, T. A. McKinnon, R. E. Sutton, E. M. Payne, D. O. Haskard, A. D. Hughes, D. F. Cutler et al. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood* 2011; 117:1071-1080
- 70.** J. Gavard. Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS Lett* 2009;583(1):1-6
- 71.** K. Hollevoet, J. B. Reitsma, J. Creaney, B. D. Grigoriu, B. W. Robinson, A. Scherpereel, A. Cristando, H. I. Pass, K. Nackaerts, J. A. Rodriguez Portal et al. Serum mesothelin for diagnosing malignant pleural mesothelioma: an individual patient data meta-analysis. *J Clin Oncol* 2012;30:1541-1549
- 72.** H. I. Pass, S. M. Levin, M. R. Harbut, J. Melamed, L. Chiriboga, J. Donington, M. Huflejt, M. Carbone, D. Chia, L. Goodglick et al. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for Pleural Mesothelioma. *N Engl J Med* 2012;367(15):1417-1427