

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA**

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA PREVENZIONE

XX CICLO (2005-2007)

COMPOSTI VOLATILI NELL'ARIA ESPIRATA E  
DIAGNOSI PRECOCE DI TUMORE AL POLMONE

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Antonio Mutti

Tutor:

Chiar.mo Prof. Antonio Mutti

Dottoranda:

DIANA POLI

## **ABSTRACT**

Non-invasive diagnostic strategies aimed at identifying biomarkers of lung cancer are of great interest for early cancer detection. They could be helpful in picking out lung cancer in suspected cases, but also and especially to exclude its occurrence in cases of those pulmonary nodules more and more frequently detected by CT scans. In fact, purely morphological criteria seem to be insufficient to confidently distinguish lung cancer at early stages from benign nodules, and false positives seem to occur frequently. Among non-invasive tests, analysis of exhaled air seems to be very promising thanks to its sensitivity and specificity.

The aim of this study was to set up a new method for identifying and quantifying volatile organic compounds (VOCs) in exhaled air of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), by comparing the levels with those obtained from asymptomatic smokers and non-smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease (cross sectional study). The VOC collection and analyses were repeated after the NSCLC patients undergone lung surgery (longitudinal study). Further experiments were performed to better understand the origin of the VOCs and their meaning related to the development of lung cancer.

**Key words:** *lung cancer, early diagnosis, exhaled air, biomarkers*

## **RIASSUNTO**

Nell'ambito della diagnosi precoce di tumore al polmone, una tematica di grande interesse è rappresentata dalla ricerca di nuove strategie diagnostiche non invasive per l'identificazione di nuovi indicatori.

Tali tecniche potrebbero contribuire alla conferma della malattia nei casi sospetti e all'esclusione dei soggetti con noduli polmonari benigni, frequentemente individuati dalle moderne tecniche di *imaging*. Criteri puramente morfologici non sembrano sufficienti per distinguere con attendibilità univoca il tumore al polmone ad uno stadio precoce dai noduli benigni, aumentando così l'incidenza di falsi positivi.

Tra i test diagnostici non invasivi, l'analisi dell'aria espirata rappresenta una metodica promettente, grazie ai buoni valori di sensibilità e specificità dimostrati.

Lo scopo del presente studio è stato quello di identificare e quantificare i composti organici volatili (VOCs) nell'aria esalata di pazienti con tumore non a piccole cellule (NSCLC) e confrontarne i livelli con quelli ottenuti in soggetti asintomatici fumatori e non, e in pazienti con broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO).

L'analisi dell'aria espirata è stata ripetuta a distanza di tempo dall'intervento chirurgico per valutare l'effetto dell'intervento stesso sul profilo dei VOCs.

Ulteriori esperimenti sono stati fatti per meglio comprendere l'origine dei VOCs ed il loro significato in relazione allo sviluppo della neoplasia.

**Parole chiave:** *tumore al polmone, diagnosi precoce, aria esalata, indicatori*

# INDICE

1	INTRODUZIONE .....	3
1.1	La neoplasia polmonare .....	3
1.1.1	Epidemiologia del carcinoma polmonare .....	4
1.1.2	Fattori di Rischio .....	5
1.1.3	Patogenesi .....	10
1.1.4	Classificazione .....	11
1.1.5	Procedure Diagnostiche .....	11
1.1.6	Stadiazione e Prognosi.....	15
1.1.7	Cenni di terapia .....	17
1.2	DIAGNOSI PRECOCE DEL CARCINOMA POLMONARE .....	18
1.2.1	Test di screening e tecniche di Imaging.....	18
1.2.2	Problematiche relative allo screening.....	21
1.2.3	Nuove prospettive: analisi dell'aria espirata.....	22
1.2.4	Problematiche nell'analisi dell'aria espirata.....	28
2	SCOPO DELLA TESI .....	30
3	PARTE A) DETERMINAZIONE DI COMPOSTI ORGANICI VOLATILI IN TUMORI POLMONARI NON A PICCOLE CELLULE: STUDIO TRASVERSALE E STUDIO LONGITUDINALE .....	32
3.1	Materiali e metodi .....	33
3.1.1	Disegno dello studio .....	33
3.1.2	Soggetti .....	33
3.1.3	Raccolta dell'aria espirata.....	34
3.1.4	Estrazione ed analisi dei VOCs .....	34
3.1.5	Analisi statistica.....	35
3.2	Studio trasversale .....	36
3.2.1	Risultati.....	36
3.2.2	Discussione .....	38
3.2.3	Conclusioni .....	42
3.3	Conferma dei risultati sui soggetti NSCLC .....	43
3.4	Studio Longitudinale.....	44

3.4.1	Risultati .....	44
3.4.2	Discussione .....	45
3.4.3	Conclusioni .....	46
4	PARTE B) SIGNIFICATO DELLE CONCENTRAZIONI DEI VOCS MISURATI NELL'ARIA ESPIRATA .....	47
4.1	Materiali e metodi .....	49
4.1.1	Disegno dello studio-Soggetti .....	49
4.1.2	Analisi del tessuto polmonare .....	49
4.1.3	Raccolta ed analisi dell'aria espirata .....	50
4.1.4	Analisi Statistica .....	50
4.2	Risultati .....	51
4.2.1	Determinazioni tessutali di idrocarburi aromatici .....	51
4.2.2	Effetto acuto del fumo di sigaretta .....	51
4.3	Discussione .....	52
4.4	Conclusioni .....	56
5	PARTE C) DETERMINAZIONE DI ALDEIDI NELL'ARIA ESPIRATA COME INDICATORI DI NEOPLASIA POLMONARE NON A PICCOLE CELLULE .....	57
5.1	Materiali e metodi .....	58
5.1.1	Disegno dello studio-Soggetti .....	58
5.1.2	Raccolta dell'aria espirata .....	58
5.1.3	Estrazione ed analisi delle aldeidi .....	58
5.1.4	Analisi statistica .....	60
5.2	Risultati .....	60
5.3	Discussione .....	61
5.4	CoNclusioni .....	63
6	CONCLUSIONE DEL LAVORO DI TESI .....	64
7	BIBLIOGRAFIA .....	66
8	APPENDICE .....	76
	Atti di Congressi pubblicati su riviste internazionali .....	79
9	FIGURE .....	82
10	TABELLE .....	83

# **1 INTRODUZIONE**

## **1.1 LA NEOPLASIA POLMONARE**

Le malattie dell'apparato respiratorio rappresentano attualmente la terza causa di morte in Italia, dopo le malattie cardiovascolari ed i tumori. La loro distribuzione è cambiata significativamente nell'ultimo secolo per la netta riduzione della mortalità per tubercolosi e polmonite, a fronte di un aumento delle patologie cronic-degenerative, quali la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) e l'asma bronchiale. L'interesse per il ruolo delle infiammazioni delle vie aeree nello sviluppo e nella progressione di diverse malattie polmonari, in particolare dell'asma bronchiale e della BPCO, si è accentuata negli ultimi anni, soprattutto per il fatto che queste situazioni patologiche rappresentano spesso una situazione precedente o concomitante allo sviluppo di neoplasie polmonari.

Il polmone può infatti essere sede di un gran numero di formazioni neoplastiche, sia benigne che maligne, come ad esempio il carcinoma broncogeno, così definito poiché ha origine dall'epitelio respiratorio, comprendente cioè bronchi, bronchioli e alveoli.

La prognosi del tumore al polmone è tuttora limitata a causa della mancanza di validi approcci per una diagnosi precoce. Proprio la mancanza della possibilità di una diagnosi precoce fa sì che la diagnosi della malattia sia spesso concomitante alla rilevazione di metastasi già presenti al momento della diagnosi, che la risposta alla terapia chemioterapica sia spesso limitata e che si possano verificare recidive della neoplasia polmonare a distanza dall'intervento chirurgico.

Questa problematica complessa che riveste un ruolo di rilievo nell'ambito della salute pubblica, evidenzia la necessità di implementare la ricerca di nuovi metodi di indagine non invasivi integrabili con quelli attualmente a disposizione, per una diagnosi precoce di neoplasia polmonare.

### **1.1.1 *Epidemiologia del carcinoma polmonare***

Il carcinoma polmonare rappresenta dal 1985 la tipologia di tumore più comune al mondo (Parkin *et al.*, 1993) e si stima che solo nel 2002 abbia rappresentato il 12,4% di tutti i nuovi casi di tumore (Parkin *et al.*, 2005).

Il carcinoma polmonare a causa dell'alta incidenza e di una prognosi soventemente infausta, è inoltre la principale causa di morte per cancro in Italia e nel mondo occidentale (Figura 1) e la seconda causa di morte dopo le malattie cardiovascolari (Jemal *et al.*, 2006).

In generale, dal 1985 si è verificato un incremento globale dei casi di tumore al polmone di circa il 51%. Negli uomini l'incidenza di tale patologia sembra legato maggiormente alla crescita e all'invecchiamento della popolazione mentre nelle donne per lo più al diffondersi dell'abitudine al fumo. Infatti il rapporto maschi/femmine appare in riduzione, dal valore di 7:1 del 1964 all'attuale di 2:1 (Gallone and Cantaluppi, 2005).

I dati epidemiologici evidenziano chiaramente come l'esposizione al fumo di tabacco sia la causa preponderante nello sviluppo della patologia (IARC, 2004) e si è stimato che solo nel 2000 circa l'85% dei tumori polmonari nell'uomo ed il 47% nella donna fossero da ricollegare all'abitudine tabagica. In linea con queste considerazioni, si è registrata una tendenza alla diminuzione dei casi di carcinoma broncogeno nei paesi del Nord Europa e negli USA, dove da tempo sono in atto campagne antifumo (Jemal *et al.*, 2001; Bray *et al.*, 2004; Jemal *et al.*, 2004; Tyczynski *et al.*, 2004).

I dati riportati in letteratura evidenziano che l'incidenza della neoplasia, espressa come numero assoluto di nuovi casi all'anno, sia maggiore nei paesi più industrializzati, in particolare Nord-America ed Europa, rispetto a quanto registrato nei paesi in via di sviluppo come Africa e Sud-America (Parkin *et al.*, 2005).

Il picco di manifestazione del carcinoma broncogeno si registra tra la quinta e la sesta decade di vita, mentre oltre un terzo dei nuovi casi è diagnosticato in soggetti d'età superiore ai 70 anni. Questo tumore presenta una sopravvivenza globale che varia dal 10% al 15% a 5 anni dalla diagnosi. Tale percentuale è rimasta sostanzialmente invariata nel corso degli ultimi 20 anni poiché nella maggior parte dei casi esso viene diagnosticato ad uno stadio avanzato non operabile (Ihde and Minna, 1991).

Infatti, al momento della diagnosi, solo il 15% dei pazienti si presenta con malattia localizzata, il 25% dei casi ha un coinvolgimento dei linfonodi regionali e il 55% una

diffusione metastatica a distanza (Minna, 2002). Tuttavia, se il tumore viene diagnosticato allo stadio iniziale, la resezione chirurgica radicale della neoplasia può consentire fino all'80% di sopravvivenza a 5 anni (Fleehinger *et al.*, 1992). È significativo notare come, nella quasi totalità dei pazienti sopravvissuti a lungo termine per lo più grazie ad una diagnosi allo stadio iniziale della malattia, la neoplasia viene riscontrata casualmente in fase ancora asintomatica, (Marcus *et al.*, 2006) (Figura 2).

Da questi dati si può dedurre l'importanza di una diagnosi precoce per un trattamento chirurgico radicale tempestivo che possa portare ad una risoluzione positiva della malattia.

Purtroppo nonostante abbiano già avuto luogo numerosi studi sulla possibilità di utilizzare diverse tecniche, quali l'analisi citologica e genetica dell'escreato (McWilliams *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007), la radiografia del torace (Humphrey *et al.*, 2004), la TAC-spirale a basse dosi (Picozzi *et al.*, 2005; McWilliams *et al.*, 2006), la PET (Bunyaviroch and Coleman, 2006), per la diagnosi del tumore al polmone, non ci sono stati finora risultati confortanti che abbiano portato alla messa a punto di un programma di *screening* della popolazione a rischio (Patz, 2006).

Si rende quindi necessaria la ricerca di metodi sensibili per la diagnosi precoce in soggetti ad alto rischio, quali i forti fumatori e/o esposti all'azione di cancerogeni ambientali.

### **1.1.2 Fattori di Rischio**

Il carcinoma broncogeno è una condizione a patogenesi multifattoriale ed insorgenza multifasica (Kobitz, 2000) e quindi, numerosi sono quindi i fattori di rischio che possono contribuire allo sviluppo della malattia.

FUMO - Poiché l'85% delle persone a cui è diagnosticato un tumore del polmone è costituito da fumatori o ex fumatori, il fumo è il principale fattore incriminato nello sviluppo del carcinoma (Testa *et al.*, 1999). Da tempo è stata evidenziata una relazione diretta tra l'intensità dell'esposizione al fumo, determinata dal numero di sigarette giornaliere e dal numero di anni dell'abitudine tabagica, ed il rischio di tumore polmonare (IARC, 1986). Infatti, in base all'entità dell'esposizione, i fumatori presentano un rischio di sviluppare il carcinoma polmonare di 8-20 volte maggiore rispetto ai non fumatori.

Studi epidemiologici hanno dimostrato come il rischio di carcinoma polmonare abbia una relazione temporale sia con la dose (numero di sigarette fumate) sia con il tempo che intercorre dall'interruzione dell'abitudine al fumo. Inoltre per gli ex-fumatori vi è una progressiva riduzione del rischio nel corso dei 15-20 anni successivi anche se occorre ricordare che il rischio per un ex fumatore rimane sempre significativamente più alto di quello di un soggetto che non ha mai fumato (Peto *et al.*, 2000).

Secondo un recente studio (Lubin and Caporaso, 2006), a parità di esposizione quantificabile in pacchi/anno, al di sotto delle 20 sigarette/die il rischio risente maggiormente dell'intensità che non della durata dell'esposizione. In pratica coloro che fumano un numero elevato di sigarette al giorno in un arco di tempo inferiore hanno un rischio più elevato di quelli che ne fumano un minor numero ma per un tempo maggiore. Per consumi al di sopra delle 20 sigarette/die si osserva invece un *trend* opposto.

Il fumo di sigaretta contiene alcune centinaia di sostanze chimiche molte delle quali cancerogene, secondo quanto riportato dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) (Hoffmann *et al.*, 2001). Tra i più forti cancerogeni per il polmone, nonostante le basse concentrazioni dell'ordine di 5-200 ng per sigaretta, vi sono gli idrocarburi policiclici aromatici, meglio noti come IPA e le nitrosammine derivanti dalla nicotina. I più abbondanti cancerogeni sono invece le aldeidi e altri composti come benzene e butadiene che sono contenuti in quantità che vanno dai 10 ai 100 µg per sigaretta (Hecht, 2002).

Anche alcuni elementi metallici (es. nichel, cadmio, cromo), noti cancerogeni, sono presenti nel fumo di sigaretta in modeste quantità, (nanogrammi), sebbene una volta inalati col fumo di sigaretta tendono a depositarsi e a rimanere per lunghi periodi a livello polmonare (Shriver *et al.*, 2000).

La partecipazione dei composti contenuti nel fumo ai processi di cancerogenesi polmonare è confermata dalla loro relazione con la presenza di addotti al DNA di cellule polmonari di soggetti fumatori. È interessante notare che negli ex fumatori la perdita degli addotti al DNA segue di mesi o anni l'interruzione del fumo (Johnson and Kelley, 1993).

Inoltre, l'esposizione al fumo di sigaretta, modificando l'equilibrio tra le diverse attività enzimatiche presenti nel tessuto polmonare, promuove la trasformazione delle sostanze xenobiotiche a composti pro-cancerogeni, inibendo contemporaneamente gli enzimi biosintetici di fase II, come nel caso delle glutatione transferasi (Wingo *et al.*, 1999).

Anche l'esposizione passiva a fumo di tabacco rappresenta un fattore di rischio per l'insorgenza del carcinoma polmonare. Per esposizione passiva si intende l'inalazione involontaria di una miscela composta da ciò che viene liberato dalla combustione spontanea della sigaretta e dal fumo espirato. In presenza di tale esposizione il rischio per lo sviluppo di neoplasia polmonare sembra aumentare del 15-20% (Boffetta *et al.*, 1998). Proprio per questo motivo, recentemente, il fumo passivo è stato classificato dalla IARC come sostanza cancerogena di Gruppo I per l'essere umano.

Sembra infatti che nel fumo *sidestream* (quello aspirato involontariamente dal non fumatore) siano presenti concentrazioni significativamente più elevate rispetto al fumo *mainstream* (quello aspirato direttamente dal fumatore) di svariati composti tossici e cancerogeni (es. nitrosammine volatili, cataboliti della nicotina, ammine aromatiche) che si accumulano e si diffondono rapidamente negli ambienti chiusi.

Studi caso-controllo e studi prospettici condotti su individui dichiaratisi non fumatori esposti giornalmente e per lunghi periodi al giorno al fumo passivo (es. convivenza con coniuge fumatore), hanno dimostrato un aumento del rischio relativo riassuntivo di 1.27 nei caso-controllo e di 1.44 nei prospettici. Mediante precisi modelli matematici, si è arrivati a stimare il rischio di morte per cancro al polmone nei fumatori passivi nell'ordine di 1/1000 (Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori, 1999), decisamente superiore ai rischi ambientali ritenuti accettabili nei paesi sviluppati.

Un recente studio europeo multicentrico che ha coinvolto 10 paesi della Comunità Europea ha stimato la proporzione di tumori polmonari attribuibile all'esposizione a fumo passivo e all'inquinamento atmosferico in soggetti non fumatori ed in ex-fumatori da oltre 10 anni. Secondo questo studio i casi di carcinoma polmonare attribuibili all'esposizione a fumo passivo sarebbero compresi tra 16 e il 24%, mentre l'inquinamento ambientale sarebbe responsabile del 5-7% dei tumori polmonari tra soggetti non fumatori o ex-fumatori (Vineis *et al.*, 2007).

D'altra parte è importante ricordare che, sebbene il fumo rappresenti la principale causa di tumore polmonare, meno del 20% dei fumatori sviluppa nel corso della vita un tumore polmonare (IARC, 1986) e il 10-15% di tutti i tumori polmonari insorgono in soggetti non fumatori.

**ESPOSIZIONE PROFESSIONALE** – Nello studio del processo di cancerogenesi polmonare, non deve essere sottovalutato il ruolo svolto dall'esposizione professionale ad agenti cancerogeni. È stato stimato che una percentuale di carcinomi broncogeni

variabile, a seconda delle casistiche dall'1 al 40%, sia attribuibile all'esposizione occupazionale i cui agenti eziologici possono essere sia chimici (organici ed inorganici) che fisici, come le radiazioni ionizzanti (Ezzati *et al.*, 2002). L'effetto delle sostanze chimiche è dovuto al fatto che molte permangono a lungo nei polmoni, in quanto stabili e di difficile eliminazione. Inoltre la maggior parte di queste sostanze chimiche potenzialmente nocive inquina non solo i luoghi di lavoro, ma anche l'ambiente generale, benché i livelli di esposizione siano in questo caso generalmente più bassi.

D'altra parte il contributo dell'esposizione lavorativa (frazione eziologica) è meno rilevante sotto il profilo epidemiologico, di quello del fumo di tabacco, con cui però si possono manifestare effetti additivi o sinergici (Bardin-Mikolajczak *et al.*, 2007).

Tra gli agenti chimici cancerogeni, si ricordano alcuni idrocarburi aromatici policiclici, il bis-clorometilene (il più potente cancerogeno chimico, che causa soprattutto microcitomi), il cloruro di vinile, il cromo, il nichel, il cadmio, l'arsenico ed il berillio.

**ESPOSIZIONE AMBIENTALE** - Poiché il carcinoma del polmone risulta essere da 1,5 a 2 volte più diffuso nelle zone urbane rispetto a quelle rurali, le alterazioni quali-quantitative del pulviscolo atmosferico rivestono un ruolo importante, sebbene ancora scarsamente indagato, nella patogenesi del tumore (Alberg and Samet, 2003). Fattori causali dell'inquinamento atmosferico sono individuabili nelle attività peculiari degli insediamenti urbani a cui sono riconducibili molte delle sostanze aerodisperse di riconosciuto potere cancerogeno. In uno studio condotto su alcune città statunitensi è stato infatti riportato un aumentato rischio di mortalità per cancro al polmone di 1.4 volte superiore tra la città con la più alta e la più bassa concentrazione di polveri sottili (Dockery *et al.*, 1993).

D'altra parte, considerando che la maggior parte della vita quotidiana si svolge in ambienti chiusi, grande attenzione deve essere rivolta a quei contaminanti atmosferici che possono facilmente accumularsi o prodursi negli ambienti chiusi (Gao *et al.*, 1987; Mumford *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1990).

**DIETA** – E' noto come anche le abitudini alimentari in certi casi possano rivestire un effetto protettivo nel rischio di sviluppo della malattia, soprattutto se la dieta risulta ricca di elementi antiossidanti, come retinolo, carotenoidi, betacarotene e vitamina C, in grado di contrastare i danni ossidativi al DNA a carico dei radicali liberi. Diversi studi hanno infatti mostrato come i soggetti con un alto apporto alimentare di vegetali e frutta

hanno un minor rischio d'insorgenza di carcinoma polmonare rispetto a quelli con basso introito di tali alimenti (Feskanich *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2004). D'altra parte risulta difficile scindere i fattori protettivi di una corretta alimentazione da fattori di rischio quali il fumo di sigaretta anche perché spesso, una forte abitudine tabagica, è associata ad una condotta alimentare non salutare (Hebert and Kabat, 1990; Morabia and Wynder, 1990). In questo caso si può parlare di effetti sinergici e/o additivi con conseguente rischio di un'amplificazione e/o più veloce evoluzione di una patologica.

FATTORI GENETICI - È ormai noto che l'insorgenza di una patologia è fortemente influenzata oltre che da fattori ambientali anche da fattori genetici, che interagendo tra di loro sono responsabili della cosiddetta "susceptibilità individuale". Ciò si osserva anche per il tumore polmonare. Infatti pur essendo il fumo la principale causa d'insorgenza di tale neoplasia, meno del 20% dei fumatori sviluppano cancro al polmone entro i 70 anni di età. Esisterebbero quindi soggetti assai più sensibili di altri all'azione cancerogena del fumo sui bronchi.

Variazioni geneticamente determinate nel metabolismo degli xenobiotici sono alla base di corrispettive modificazioni della dose interna di cancerogeni attivi.

Individui con un'alta attività per gli enzimi di fase I e bassa attività per quelli di fase II presumibilmente sono portati a produrre una quantità maggiore di intermedi reattivi e quindi sarebbero più soggetti a subire danni al DNA (Kobitz, 2000; Osada and Takahashi, 2002; Fong *et al.*, 2003; Sanchez-Cespedes, 2003; Andriani *et al.*, 2004; Panani and Roussos, 2006). Il polimorfismo di geni codificanti per enzimi implicati nel metabolismo di xenobiotici è risultato associato in diversi studi alla susceptibilità al tumore polmonare (Gresner *et al.*, 2007).

I meccanismi di riparazione del danno genetico rivestono un'importanza fondamentale nel mantenimento dell'integrità del genoma. La variabilità genetica di tali sistemi determina differenze nelle capacità di rimuovere le lesioni del DNA, causate sia da fattori esogeni ambientali che endogeni.

Diversi studi hanno osservato un incremento del rischio d'insorgenza del carcinoma polmonare in soggetti con una minor capacità di riparazione del DNA (Wei *et al.*, 2000; Spitz *et al.*, 2003). Altri fattori di rischio non ben caratterizzati quali l'ereditarietà, il gruppo etnico di appartenenza ed il sesso (con un rischio diminuito per le donne), sembrano influenzare l'insorgenza del carcinoma polmonare. Inoltre gli studi epidemiologici hanno evidenziato come uno stretto grado di parentela sia legato ad un

aumentato rischio nello sviluppo della neoplasia rispetto alla popolazione generale (Nitadori *et al.*, 2006). D'altra parte il forte effetto di confondimento rappresentato da altre variabili, quali in primo luogo l'abitudine al fumo, rendono i dati relativi ai fattori genetici, all'appartenenza etnica o al sesso di più difficile interpretazione (Haiman *et al.*, 2006; Nitadori *et al.*, 2006).

### 1.1.3 *Patogenesi*

La storia naturale del carcinoma polmonare ricalca quella della maggior parte delle patologie neoplastiche ed è riconducibile a quattro fasi, e cioè:

1. trasformazione maligna della cellula bersaglio
2. crescita delle cellule trasformate
3. invasione locale
4. produzione di metastasi a distanza.

La cellula tipo della popolazione neoplastica ha delle caratteristiche che ne descrivono la malignità biologica. Generalmente l'aggressività della neoplasia è inversamente proporzionale al grado di differenziamento, ossia di somiglianza fenotipica e genotipica alla popolazione cellulare di riferimento, degli elementi che la compongono. Le cellule anaplastiche mostrano un notevole grado di pleiomorfismo, perdita della normale polarità, nucleo ipercromico a causa dell'addensamento della cromatina ed un numero di mitosi elevato che spesso sovverte l'architettura strutturale del tessuto in cui prolifera.

L'88% delle neoplasie polmonari primitive è riconducibile a quattro tipi istologici (Ihde and Minna, 1991; Flehinger *et al.*, 1992; Kobitz, 2000):

- **carcinoma epidermoide (25-40%):** insorge generalmente nei bronchi di grosso calibro, in cui l'epitelio cilindrico ciliato viene sostituito da epitelio pavimentoso a tendenza cheratoplastica, con tre gradi di differenziazione in funzione della cheratinizzazione; strettamente associato al fumo di sigaretta, si riscontra più frequentemente nel sesso maschile;
- **adenocarcinoma (25-40%):** in genere periferico, in cui l'epitelio bronchiale è sostituito da elementi di tipo ghiandolare cilindrico tubulare, acinare, papillare o anaplastico, frequente la produzione di mucina; di crescita più lenta, forma masse più piccole, ma tende a metastatizzare diffusamente con più precocità; ha forte componente genetica, è l'istotipo più comune sotto i 40 anni, tra i non fumatori e le donne;

- **microcitoma (20-25%):** altamente maligno, localizzato principalmente in sede centrale o ilare, si presenta con cellule caratteristiche di piccole dimensioni rotondeggianti o ovalari e scarso citoplasma, aggregate in nidi privi di particolare struttura ghiandolare o squamosa, spesso con granuli neurosecretori a nucleo denso (cellule di Kulchitsky-simili), capaci di secernere ormoni polipeptidici e *markers* neuroendocrini;
- **carcinoma anaplastico (10-15%):** lesione centrale e periferica, formato da elementi ampi, con citoplasma abbondante, nucleoli prominenti e nucleo vescicoloso, probabilmente si può ricondurre a carcinomi squamocellulari e adenocarcinomi talmente indifferenziati da non esser più identificabili; ha la prognosi peggiore, altamente invasivo, metastatizza rapidamente a distanza.

#### **1.1.4 Classificazione**

La classificazione Istologica dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, 1982), con le modifiche proposte dalla International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC, 1988), e la nuova classificazione dell'WHO (1999), prevede la suddivisione in Carcinoma a piccole cellule, Adenocarcinoma, Carcinoma anaplastico a larghe cellule ed altri tumori rari o inclassificabili (Sobin, 1981). In Tabella 1 vengono descritte in modo dettagliato le classificazioni WHO del 1982 e del 1999 e la IASLC del 1988.

Da un punto di vista terapeutico risulta agevole la distinzione in due grandi gruppi, i carcinomi a piccole cellule (SCLC), trattati prevalentemente con radio e chemioterapia, e i carcinomi non a piccole cellule (NSCLC), di interesse prevalentemente chirurgico.

#### **1.1.5 Procedure Diagnostiche**

A causa della presenza di pochi sintomi, peraltro non specifici in grado di suggerirne l'esistenza, la diagnosi delle neoplasie broncopolmonari è spesso tardiva con la malattia già ad uno stadio avanzato.

In caso di sospetta neoplasia polmonare, la storia clinica e l'esame fisico del paziente sono i punti di partenza, che consentono di mirare gli accertamenti successivi.

Oggi giorno, la diagnosi della neoplasia polmonare si può avvalere di metodiche sia invasive che non invasive (Maddaus and Ginsbers, 1995) Un approccio di tipo sequenziale prevede:

- l'esecuzione di una radiografia (Rx) del torace e confronto con eventuali radiogrammi precedentemente effettuati;
- gli esami ematochimici compresi i markers tumorali;
- la tomografia assiale computerizzata (TC) di torace-addome-encefalo con mezzo di contrasto;
- la risonanza magnetica nucleare (RMN);
- la fibrobroncoscopia;
- la scintigrafia ossea totale corporea; tomografia ad emissione di positroni (PET);
- la valutazione della funzionalità respiratoria, cardiovascolare e metabolica;
- mediastinoscopia, mediastinotomia anteriore, videotoracosopia.

RX - In generale, la radiografia del torace fornire la prima indicazione della presenza di una neoplasia polmonare, anche se l'aspetto radiologico può essere quanto mai vario e di difficile interpretazione (Picozzi *et al.*, 2005). Poiché con le attuali tecniche radiografiche possono essere identificate le lesioni tumorali con un volume minimo di 1 cm<sup>3</sup>, al momento del sospetto radiologico molti tumori sono già disseminati. D'altra parte, se l'esame radiologico non è in grado di rivelare la presenza del tumore, può però evidenziare alterazioni legate ad esso come un versamento pleurico, un coinvolgimento linfonodale o un addensamento infiammatorio.

TAC - Qualora la radiografia metta in luce anomalie si procede con l'esecuzione di una TAC, che è in grado di fornire informazioni utili per chiarire la natura di un nodulo polmonare (Dales *et al.*, 1990; Armstrong, 1994). Inoltre, la TAC non solo permette di far diagnosi in caso di RX torace negativo, ma è anche in grado di definire meglio l'estensione del tumore, il coinvolgimento linfonodale e la presenza di metastasi parenchimali polmonari, condizionando così anche il successivo approccio terapeutico.

RMN – In alcuni casi la risonanza magnetica nucleare (RMN) si è dimostrata migliore della TAC nello studio dell'invasione della parete toracica e del diaframma poiché è in grado di fornire un eccellente contrasto tra tessuto tumorale ed i tessuti molli propri della parete toracica.

PET - La tomografia ad emissione di positroni (PET) è una metodica relativamente nuova che si differenzia dalla TAC e dalla RMN perché è in grado di studiare le

funzioni ed il metabolismo dei tessuti sani e di quelli malati, evidenziando le loro alterazioni quando la malattia si trova ad uno stadio iniziale (Coleman, 1999). Quest'esame riesce a distinguere le cellule che si dividono rapidamente (come le cellule tumorali), da quelle a basso indice di proliferazione (le cellule normali) (Gauger *et al.*, 2007).

Se queste metodiche sono state in grado di evidenziare una lesione compatibile con la diagnosi di carcinoma, è necessario ottenere l'identificazione istologica della neoformazione polmonare (Mountain, 1997; Shaham, 2000).

In ordine di crescente invasività, gli esami impiegati sono:

- **ESAME CITOLOGICO DELL'ESPETTORATO** (Raab *et al.*, 1997; Petty, 2000).  
E' l'esame più semplice e meno costoso, consistente nell'analisi citologica delle cellule dell'escreato del paziente. Il risultato dell'esame dipende dalla localizzazione e dalle dimensioni del tumore. Le percentuali di successo più alte si raggiungono nelle lesioni di grandi dimensioni a localizzazione centrale. Con riferimento all'istotipo, la specificità dell'esame citologico dell'escreato è massima per il *carcinoma spinocellulare* (90%), che ha il più alto tasso di desquamazione di cellule neoplastiche nell'espettorato. Nell'*adenocarcinoma* prevale la localizzazione periferica nel polmone e la propagazione neoplastica nella sottomucosa: per tali motivi il tasso di desquamazione è molto basso e l'eventuale positività dell'escreato è spesso indicativa di un tumore inoperabile di grandi dimensioni. Al contrario, il riscontro nell'escreato di cellule di carcinoma spinocellulare può verificarsi in presenza di una radiografia del torace normale.
- **BRONCOSCOPIA** – E' un esame standard nella valutazione di un paziente affetto da neoplasia polmonare e costituisce l'approccio diagnostico fondamentale per la valutazione dei pazienti con un sospetto carcinoma broncogeno, essendo in grado di evidenziare eventuali lesioni neoplastiche a carico della mucosa (Lam *et al.*, 2000). Grazie alla visualizzazione del tratto prossimale dell'albero bronchiale fino al secondo e a volte al terzo bronco subsegmentale, è possibile reperire informazioni generali sulla localizzazione della neoplasia, la sua estensione in rapporto al bronco sano, la distanza dalla carena, l'eventuale compressione estrinseca sulle strutture aeree prossimali, il coinvolgimento di sottomucosa e tessuto peribronchiale. La broncoscopia permette anche di ottenere materiale biologico di provenienza diretta dalle vie aeree, adatto ad una valutazione cito-istologica: infatti la sua esecuzione dà

la possibilità di aspirare le secrezioni bronchiali (broncoaspirato), di eseguire ripetuti spazzolamenti dei bronchi che presentano alterazioni della mucosa (brushing) e di effettuare il lavaggio bronco-alveolare (BAL). Nei casi di lesioni che crescono all'interno del bronco, è possibile eseguire biopsie di piccole porzioni di mucosa, il che di solito permette di giungere ad una diagnosi istologica.

- **AGOBIOPSIA TRANSTORACICA SOTTO GUIDA TAC** - Consiste in una biopsia intraparenchimale effettuata con un ago sottile introdotto attraverso la parete toracica sotto guida TAC. È indicata nella diagnosi di neoplasie polmonari periferiche, non raggiungibili per via endoscopica. Complessivamente, la sensibilità della biopsia transtoracica raggiunge percentuali superiori al 90% anche per le lesioni molto piccole ed è da considerarsi la procedura di scelta per la diagnosi dei noduli polmonari periferici;
- **TORACOSCOPIA** – E' una metodica invasiva che permette di arrivare alla superficie polmonare con l'utilizzo di un toracoscopio inserito attraverso una piccola incisione della parete toracica (Mentzer *et al.*, 1997). La toracosopia video assistita (VAT) è una tecnica più recente che prevede una seconda incisione per introdurre una videocamera. Attraverso la pleura mediastinica, la VAT consente di eseguire delle biopsie sulle stazioni linfonodali ilari e mediastiniche.
- **MEDIASTINOSCOPIA** – Viene eseguita nel caso in cui la TAC abbia messo in luce linfonodi mediastinici di oltre un centimetro di diametro. Questa tecnica, permette di effettuare prelievi biotipici dei linfonodi vicini alla trachea. In tempi recenti si è assistito all'incremento dell'utilizzo della toracosopia videoassistita, minimamente invasiva, a scopo diagnostico, poiché rende possibile con precisione l'identificazione dei linfonodi coinvolti, l'estensione del tumore, il coinvolgimento e lo stato delle pleure e un'estemporanea biopsia per esame istologico. La VAT e la mediastinoscopia sono interventi chirurgici condotti in anestesia generale, che solitamente precedono l'atto chirurgico vero e proprio;

Per il rilievo di metastasi a distanza si fa uso delle moderne tecniche di *imaging*, TAC, RMN, a seconda dell'organo che si intende analizzare.

Costituiscono esami complementari di stadiazione l'ecografia o la TAC dell'addome. Di routine non sono eseguite la TAC cerebrale (Ferrigno and Buccheri, 1994) e la scintigrafia ossea *total body*, salvo che la sintomatologia non deponga per la presenza di lesioni secondarie a livello del sistema nervoso e dell'apparato scheletrico.

I marcatori tumorali sierici dovrebbero rappresentare, in teoria, un utile ausilio clinico, sia in fase diagnostica sia nel monitoraggio della terapia., ma allo stato attuale nessuno dei marcatori proposti presenta valori di sensibilità e di specificità sufficienti (Margolis *et al.*, 1994).

### **1.1.6 Stadiazione e Prognosi**

Per definire l'estensione della neoplasia e deciderne in base ad essa l'adeguato trattamento si utilizza il sistema internazionale TNM (*Tumor Nodes Metastasis*), elaborato dall'*Union Internationale Contre Cancer* (UICC) e dall'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC). E' possibile distinguere una stadiazione clinica (cTNM) raggiunta in seguito ad anamnesi, esame obiettivo ed indagini strumentali, e una stadiazione patologica (pTNM) stabilita in base al riscontro anatomo-patologico sul pezzo operatorio e all'interessamento linfonodale. Le diverse modalità di stadiazione, clinica e patologica, possono differenziarsi tra loro: la prima, sebbene avvalorata da indagini invasive, è solamente presuntiva. La seconda riferisce il reale stato della neoplasia all'osservazione diretta.

Nell'ambito di questo sistema si valutano tre parametri:

- T, corrisponde al tumore primitivo, e si ha:
  - Tx, tumore dimostrato dalla presenza di cellule maligne nel secreto broncopolmonare, ma non visualizzabile radiograficamente o tramite broncoscopia;
  - T0, nessuna evidenza di tumore primitivo;
  - Tis, carcinoma in situ;
  - T1, tumore di dimensioni inferiori ai 3 cm, senza coinvolgimento del parenchima circostante, della pleura viscerale o del bronco lobare;
  - T2, tumore di dimensioni superiori ai 3 cm, o interessamento della pleura viscerale o presenza di atelettasia o polmonite da ostruzione, ad una distanza di almeno 2 cm dalla carena;
  - T3, tumore di qualsiasi dimensione con invasione del mediastino, del pericardio, della pleura parietale, del diaframma, della parete toracica, del nervo frenico, della catena del simpatico o localizzato in un bronco principale a meno di 2 cm dalla carena o atelettasia di un intero polmone;

T4, tumore di qualsiasi dimensione che invade il cuore, i grossi vasi, la trachea, l'esofago, i corpi vertebrali, la carena o rilevamento di cellule neoplastiche nel versamento pleurico o presenza di altri noduli nello stesso lobo;

- N, valuta l'estensione ai linfonodi, e si ha:
  - N0, non evidenziabili metastasi ai linfonodi regionali;
  - N1, coinvolgimento dei linfonodi peribronchiali o ilari omolaterali;
  - N2, interessamento dei linfonodi mediastinici omolaterali e sottocarenali;
  - N3, invasione dei linfonodi mediastinici o ilari controlaterali o dei linfonodi scalenici o sovraclaveari omolaterali o controlaterali;
- M, ossia le metastasi a distanza:
  - M0, non evidenziabili metastasi a distanza;
  - M1, presenza di metastasi a distanza.

La stadiazione patologica riveste un'importanza fondamentale nel determinare la prognosi correlata allo stadio di appartenenza, la definizione istologica, l'interessamento delle stazioni linfonodali soprattutto mediastiniche ed il conseguente programma terapeutico.

La combinazione dei fattori permette una suddivisione in stadi (Mountain, 1997), riassunti in Tabella 2 e presentati in Figura 3.

Lo stadio condiziona sia le scelte terapeutiche che la prognosi. Conoscere l'esatta diffusione della malattia permette di pianificare l'approccio più corretto per il paziente. Anche da un punto di vista prognostico è utile differenziare la stadiazione clinica da quella chirurgica. Dati raccolti nei maggiori centri in tutto il mondo hanno evidenziato nei pazienti con stadiazione clinica 1A e 1B dopo resezione chirurgica completa una sopravvivenza a cinque anni rispettivamente 67% e 57%.

La sopravvivenza a 5 anni nel caso di tumore al polmone con stadiazioni cliniche 2A è del 34% se cTNM mentre sale a 55% se pTNM.

Risultati sovrapponibili in ambito prognostico si hanno per tumori T2N1M0 e T3N0M0 (stadiazione clinica, 24% e 22%, stadiazione chirurgica, 39% e 38%), tanto da riunirli nello stadio 2B. All'interno dello stadio 3A, la sopravvivenza a 5 anni dei pazienti con cT3N1M0 è leggermente inferiore, 9%, rispetto a quella dei soggetti con cT1 2 3N2M0, 13%, poiché si considera la percentuale cumulativa e il 72% dei casi si presenta con cT2N2M0. La prognosi migliora sensibilmente nei casi candidati a trattamento

chirurgico radicale, infatti dopo resezione totale con pT3N1M0 si arriva al 25%, con pT1 2 3N2M0 al 23%.

Assolutamente infausta, soprattutto perché di solito il trattamento chirurgico può avere solo scopo palliativo e non curativo, è la prognosi in stadio 3B e 4: nel dettaglio si ha, sempre a 5 anni dalla diagnosi, 7% con T4N0 1 2M0, 3% con T1 2 3 4N3M0, 1% con T1 2 3 4 N0 1 2M1.

Da quanto esposto e da un anche rapido sguardo alla figura 4 si evince come l'unico trattamento risolutivo della malattia sia rappresentato dalla chirurgia resettiva radicale che, unitamente ad una diagnosi precoce, risultano discriminanti nella probabilità di sopravvivenza del paziente.

### **1.1.7 Cenni di terapia**

Nella terapia del NSCLC, il ruolo della chirurgia è fondamentale, in quanto l'asportazione completa della neoplasia è l'unica metodica che offra al paziente una reale possibilità di cura (American Society of Clinical Oncology, 1997). Tuttavia, l'approccio terapeutico è strettamente condizionato dallo stadio della malattia al momento della diagnosi. Sono candidabili all'intervento chirurgico radicale gli stadi I e II, pur con diversa prognosi di sopravvivenza, variabile dal 60 all'80 % in stadio I fino al 20-30 % in stadio II (Buccheri, 1996; Landreneau *et al.*, 1997; Laroche *et al.*, 1998). I tumori in stadio III non sono potenzialmente operabili ed il trattamento di scelta è rappresentato dalla combinazione radio-chemioterapica, con percentuali di sopravvivenza a cinque anni intorno al 15 %. Nello stadio non operabile l'unico trattamento possibile è la chemioterapia, con sopravvivenza a cinque anni compresa tra l'1 ed il 4 % (Buccheri *et al.*, 1990; Buccheri, 1994).

## 1.2 DIAGNOSI PRECOCE DEL CARCINOMA POLMONARE

Nel trattamento delle neoplasie polmonari risulta fondamentale il ruolo di una diagnosi precoce, che permetta di individuare pazienti con tumore ad uno stadio chirurgicamente aggredibile. Infatti è noto come il carcinoma del polmone rimanga asintomatico a lungo e che si manifesti clinicamente solo in uno stadio avanzato quando ormai la risposta al trattamento è scarsa. È necessario quindi trovare un indicatore o più probabilmente una batteria di indicatori precoci che consentano di distinguere la neoplasia polmonare da condizioni cliniche che spesso ne precedono la comparsa, ovvero la condizione di fumatore asintomatico o la presenza di BPCO.

La diagnosi di tumore polmonare nelle fasi iniziali rimane difficile sia perché mancano sintomi specifici sia perché non sembrano esserci efficaci sistemi di *screening* di massa come quelli attuati con successo in altre patologie (es. il carcinoma della mammella) (Lam and Shibuya, 1999; McCarthy and Jelsing, 2000; Patz *et al.*, 2000).

In generale, i tests di *screening* devono soddisfare alcuni requisiti come la semplicità, la non invasività, devono essere accurati e con un basso rapporto costo/beneficio. Ma soprattutto, un programma di *screening* risulta efficace se l'intervento è capace di migliorare la storia naturale di una malattia.

La maggior parte degli studi in tal senso ha focalizzato l'attenzione soprattutto sulle tecniche di *Imaging*, cioè radiografia (Rx), tomografia assiale computerizzata (TAC) e tomografia ad emissione di positroni (PET).

### 1.2.1 Test di screening e tecniche di Imaging

Per studiare l'efficacia dello *screening* nel cancro del polmone utilizzando per lo più la radiografia (Rx) al torace, agli inizi degli anni '70, furono sponsorizzati dal National Cancer Institute americano tre importanti progetti di ricerca. Si trattava dei "Lung Projects", affidati alla Mayo Clinic di Rochester, al John Hopkins Hospital di Baltimora e al Memorial Sloan Kettering Cancer Center di New York.

Tali studi, che videro la partecipazione di oltre 30.000 persone, miravano a verificare il possibile incremento di corrette diagnosi precoci ottenibile ripetendo periodicamente una radiografia standard del torace, associata o meno alla ricerca di cellule neoplastiche nell'espettorato (Fontana *et al.*, 1991; Marcus *et al.*, 2000; Strauss, 2002). I risultati

furono resi noti per la prima volta a Toronto nel 1985, in occasione del IV Congresso Mondiale sul Tumore Polmonare, e segnarono un aumento di neoplasie identificate in stadio iniziale negli individui sottoposti a programmi di *screening*. Tuttavia non vennero registrate variazioni significative della mortalità, ma solo un apparente aumento di sopravvivenza nei soggetti la cui neoplasia venne diagnosticata precocemente, frutto dell'anticipo diagnostico, senza peraltro sicure modificazioni della storia naturale della malattia. Questi risultati si spiegavano anche con la scarsa sensibilità e specificità diagnostica delle tecniche usate (45-50% per il radiogramma toracico, 25-30% per l'esame citologico dell'escreato, 60-67% per la combinazione di entrambi).

L'esame citologico dell'escreato è un test di *screening* ancor meno efficace, soprattutto a causa della bassa sensibilità in confronto alla radiografia. Inoltre, la sua valenza diagnostica è legata alla sede anatomica della neoplasia, essendo positivo solo per forme centrali endobronchiali.

Per questi motivi, allo stato attuale è dubbia l'utilità di uno *screening* di routine per il carcinoma del polmone mediante radiografia o esame citologico dell'escreato, neppure per i soggetti ad alto rischio (Manser *et al.*, 2004).

Risultati più incoraggianti sono emersi da studi che propongono l'uso della TAC spirale a basso dosaggio per una diagnosi precoce del cancro del polmone (Smith, 1999; Henschke and Yankelevitz, 2000; Patz and Goodman, 2001). La TAC spirale del torace è un tecnica radiologica che permette di analizzare tutto il volume del polmone con grande accuratezza, senza mezzo di contrasto, con livelli di esposizione del paziente alle radiazioni ionizzanti inferiori al 70% della dose raccomandata e con tempi di esecuzione decisamente rapidi: la scansione dura 12-18 secondi. Inoltre, la TAC spirale presenta il grande vantaggio di rivelare la presenza di tumore allo stadio iniziale con una frequenza sette volte maggiore rispetto alla radiografia del torace.

In uno studio longitudinale da poco terminato, una popolazione composta da fumatori ed ex-fumatori è stata sottoposta a *screening* mediante TAC spirale annuale e trattamento dei noduli riscontrati, per valutare se tale protocollo di *screening* fosse in grado di aumentare la frequenza di diagnosi di cancro polmonare e la sua resecabilità nonché di ridurre il rischio di diagnosi in stadio avanzato o la morte per cancro polmonare. I risultati sono stati recentemente pubblicati (Bach *et al.*, 2007) e gli autori hanno concluso che lo *screening* con TAC spirale a basso dosaggio è in grado di aumentare la frequenza delle diagnosi ed il trattamento chirurgico del carcinoma

polmonare pur non riducendo in maniera significativa il rischio di cancro polmonare in stadio avanzato né la mortalità per tale patologia.

Diversi studi (Pastorino *et al.*, 2003) hanno dimostrato la necessità di controlli ripetuti e ravvicinati affinché la TAC a basse dosi sia efficace nell'identificare ogni lesione sospetta e monitorarla evitando trattamenti invasivi inutili. Questo comporta chiaramente un incremento di dispendio di risorse; tutto ciò a conferma del fatto che, nonostante il costo di un esame TAC a basse dosi sia paragonabile a quella di una mammografia, il bilancio costi/benefici risulti inadatto per l'utilizzo dell'esame su larga scala.

Nei programmi di *screening* con TAC spirale è sorto inoltre un problema di interpretazione dei dati, perché, oltre a tumori maligni, vengono evidenziati anche tumori benigni, granulomi, cicatrici dovute a pregressi processi infiammatori. Questo comporta un elevato numero di falsi positivi e quindi si rendono necessarie indagini ancora più avanzate, tra cui la tomografia ad emissione di positroni, per migliorare ulteriormente la diagnosi ed evitare così procedure invasive ed interventi non necessari. Tali approfondimenti diagnostici incidono però negativamente sia sul costo del programma di *screening*, sia sulla *compliance* dei soggetti, che devono sottoporsi a più indagini.

Nell'ottica della ricerca di efficaci metodiche di *screening* della popolazione, fra le possibili tecniche di *imaging* è stata valutata anche la PET.

Diversi studi effettuati hanno rilevato una diminuzione dei costi nella gestione del paziente qualora nel normale iter con TAC, agoaspirato e biopsia in toracosopia venisse inserita una FDG-PET, grazie alla buona sensibilità e specificità. Sembra però più promettente l'impiego di FDG-PET/TC; poiché la sovrapposizione delle diverse metodiche permetterebbe la visualizzazione di un quadro anatomo-metabolico, con un incremento di sensibilità e specificità rispetto alle singole tecniche, soprattutto per quanto riguarda l'identificazione di metastasi linfonodali e della stadiazione. D'altra parte anche in questo caso vi è la problematica dei possibili artefatti TC, insieme al fatto che, essendo questa combinazione di metodiche di recente acquisizione nella diagnostica per immagini, essa è ancora in fase di valutazione e applicazione pratica. Non esistono infatti studi correlati alla sopravvivenza dei pazienti (Freudenberg *et al.*, 2007).

Al momento, il dibattito sulla messa a punto di un programma di *screening* per il carcinoma polmonare è quanto mai acceso. Appare evidente come siano necessari

ulteriori conoscenze sulla biologia della neoplasia tanto che, al momento, l'unica terapia efficace sembra essere quella chirurgica, che per esplicarsi in tutta la sua potenzialità auspica che la malattia venga rilevata in fase precoce.

### **1.2.2 Problematiche relative allo screening**

Poiché la fase di sviluppo del tumore al polmone presenta una latenza di anni, tale periodo finestra potrebbe essere sfruttato per l'applicazione di tecniche di *screening*. D'altra parte sono ancora molti i dubbi legati alla loro utilità.

Infatti, precedenti studi basati sull'analisi citologica dello sputo indotto e sui raggi X, non hanno evidenziato benefici in termini di riduzione della mortalità (Manser *et al.*, 2004). Inoltre lo sviluppo tecnologico ha portato alla messa a punto di sistemi di analisi sempre più sensibili in grado di evidenziare anomalie in fase precoce, ma al contempo non necessariamente legate allo sviluppo della patologia stessa.

Il sensibile aumento dei casi diagnosticati risulta perciò strettamente legato ad un aumento dei falsi negativi con un conseguente impatto psicologico sui pazienti coinvolti e sulle loro famiglie. A questo si unisce un aumento economico della spesa a carico del Sistema Sanitario dovuto alla necessità di un approfondimento della diagnosi iniziale.

Un chiaro esempio è rappresentato dalla diversa diagnosi per pazienti con sospetto tumore al polmone che mostrano noduli polmonari non calcifici alla CT. Ad oggi, la diagnosi differenziale è principalmente basata sull'utilizzo di tecniche addizionali di *imaging*, in modo particolare la PET, tecniche molto costose, che richiedono una lunga tempistica di attesa e mostrano limitazioni in termini di sensibilità e specificità (Kelly *et al.*, 2004).

Questo problema appare sempre più frequente come conseguenza del facile accesso a nuove e più sensibili tecniche di *imaging*, che stanno sostituendo la RX, tecnica standard meno sensibile.

Ciò significa che una considerevole frazione dei soggetti sani va incontro ad un intervento chirurgico non necessario in seguito a criteri puramente morfologici che sembrano essere insufficienti per distinguere con una sufficiente confidenza il tumore al polmone ad uno stadio precoce dai noduli benigni. Per esempio, nello studio Clinico Mayo sui risultati delle procedure di *screening*, i pazienti che mostravano noduli benigni all'operazione chirurgica erano circa un terzo di quelli maligni allo stadio I (Patz, 2006).

L'utilizzo di tecniche complementari di diagnosi non invasive, rapide ed affidabili, potrebbe quindi essere utile non solo nella fase di *screening*, ma soprattutto nella fase di esclusione dei noduli falsi positivi, con costi più accettabili per il Servizio Sanitario. Questo approccio potrebbe aiutare ad escludere il tumore al polmone in soggetti ad alto rischio come i forti fumatori o soggetti professionalmente, e permetterebbe di effettuare una diagnosi precoce nel caso di recidive nei pazienti dopo resezione chirurgica. La Figura 4 mostra una simulazione effettuata sulla base dei numeri attesi presso l'Università di Parma di diagnosi di NSCLC. Considerando 500 casi/anno di soggetti che mostrano noduli solitari non calcifici alla CT, l'uso della PET effettuata su tutti i pazienti porterebbe all'esclusione di patologia NSCLC in 428 soggetti con una conseguente spesa a carico del Servizio Sanitario dell'ordine di 500.000 euro.

Lo schema mostra come, introducendo un semplice test non invasivo di conferma come l'analisi del DNA circolante, si ridurrebbe ad 88 il numero dei pazienti a cui applicare la PET, con una conseguente riduzione dell'82% dei costi e l'esclusione di 474 soggetti con una probabilità di errore dell'1,3% (6 falsi negativi). Un simile schema è ottenibile anche considerando altre tecniche innovative e non invasive come l'analisi dei VOCs nell'aria espirata, l'analisi del condensato dell'aria espirata, il DNA circolante, la frammentazione del DNA, l'utilizzo del naso elettronico ecc.. Tali sistemi, oltre alla loro bassa invasività, mostrano buoni valori di sensibilità e specificità per la diagnosi al tumore al polmone (Tabella 3) (Pastorino *et al.*, 2003; Phillips *et al.*, 2003a; Sozzi *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2005; Poli *et al.*, 2005). Particolarmente interessante è l'analisi dell'aria espirata per la sua totale non invasività, nonché per la buona capacità di individuare i falsi positivi.

Quindi l'utilizzo di una batteria di test non invasivi in seguito alla CT potrebbe fornire risultati ottimali in termini di sensibilità e specificità, abbattendo così i costi dell'applicazione della PET, che verrebbe applicata solamente ai soggetti positivi ai precedenti test.

### **1.2.3 Nuove prospettive: analisi dell'aria espirata**

Un nuovo approccio nella problematica delle diverse patologie polmonari, nonché dei processi metabolici che avvengono all'interno dell'organismo, è rappresentato dallo studio dell'aria espirata (Kharitonov and Barnes, 2001).

Questo interesse è rappresentato dai molteplici aspetti positivi inerenti alla raccolta dell'aria espirata che si inseriscono nell'ottica della ricerca di nuove procedure non invasive nella di valutazione dello stato di salute della popolazione. Infatti, l'analisi dell'aria espirata risulta particolarmente vantaggiosa perché:

- non è invasiva (può essere quindi ripetuta più volte),
- è semplice e veloce da eseguire (anche a domicilio),
- può essere utilizzata in pazienti con un grado severo di malattia,
- è adatta anche al monitoraggio di malattie nei bambini,
- la sua raccolta non determina irritazione o flogosi delle vie aeree.

L'aria espirata può essere considerata come un aerosol di vapore saturo di umidità, costituito quindi da una **frazione gassosa** ed una **frazione liquida** in equilibrio fra di loro. Alla luce di questa sua duplice natura, l'aria espirata rappresenta un'ottima e veloce via di eliminazione sia per i gas permanenti (es. NO, CO, CO<sub>2</sub> ecc.) o per le sostanze ad alta volatilità (es. i composti organici volatili -VOCs), eliminate nella porzione gassosa dell'espriato, sia per quelle idrosolubili o più in generale a bassa volatilità, che vengono veicolate all'esterno grazie alla fase liquida (Kharitonov and Barnes, 2001).

Negli ultimi anni, grazie a dispositivi di condensazione, è stato possibile raccogliere la frazione liquida dell'aria espirata ed ottenere così una nuova matrice: il condensato dell'aria espirata (CAE). Il crescente interesse legato alla ricerca di indicatori nel CAE nasce dall'eventuale possibilità di ricavare, in modo totalmente non invasivo, utili informazioni che possano aiutare nell'interpretazione e nella comprensione dei meccanismi fisiopatologici che si verificano nel fluido di rivestimento bronco-alveolare. Nel CAE sono già state individuate numerose sostanze di interesse di origine endogena (Horvath *et al.*, 2005) fra cui:

- *Perossido di Idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*: si forma in seguito all'attivazione di cellule infiammatorie (leucociti polimorfonucleati e macrofagi alveolari);
- *Eicosanoidi*: sono potenti mediatori dell'infiammazione derivanti dall'acido arachidonico. Sono per lo più prostanoidi (prostaglandine e tromboxani), isoprostani e leucotrieni;
- *Aldeidi*: es. malondialdeide, aldeidi lineari ed idrossilate. Sono dei possibili indicatori di stress ossidativo in quanto prodotti di perossidazione lipidica;

- *Nitrati, Nitriti, S-Nitrosotioili e Nitrotirosine*: sono metaboliti dell'ossido di azoto (NO), molecola implicata nella patogenesi di molte pneumopatie.

Inoltre nel CAE è stato possibile determinare elementi metallici derivanti ad esempio da esposizione occupazionale attuale o pregressa (Goldoni *et al.*, 2004), (Cagliari *et al.*, 2006).

D'altra parte, limitandosi allo studio del CAE vengono perse tutte quelle informazioni relative alle sostanze gassose o altamente volatili che rimangono nella porzione gassosa dell'espriato stesso: l'aria esalata. Quindi dall'analisi incrociata dell'esalato e del CAE si possono ottenere utili informazioni sull'ambiente polmonare come indicatori di stress ossidativo, per le sostanze endogene, e/o di esposizione ambientale od occupazionale, per le sostanze esogene.

Inoltre proprio lo studio delle sostanze di chiara natura endogena, potrebbe fornire un prezioso aiuto nella fase di diagnosi di malattie polmonari come ad esempio asma, bronchite cronica, fibrosi cistica, nonché nella valutazione del grado di severità della malattia stessa o della risposta ad uno specifico trattamento farmacologico.

Se il CAE rappresenta una matrice ancora poco studiata, l'analisi delle sostanze presenti nella frazione gassosa dell'aria espirata è da tempo utilizzata in medicina: sono già state individuate più di 200 sostanze (Conkle *et al.*, 1975; Krotoszynski *et al.*, 1977; Barkley *et al.*, 1980), anche se per solo alcune è nota l'origine metabolica, come illustrato in Tabella 4.

I prodotti presenti in un normale espriato possono essere divisi in 5 gruppi:

1. *Prodotti di degradazione lipidica*: numerose disfunzioni metaboliche possono portare ad una variazione sia nel profilo che nella concentrazione delle sostanze prodotte. Ad esempio un aumento superiore a 50 nmol/l di acetone è stato associato al diabete (Rooth and Ostenson, 1966).
2. *Composti aromatici*: sono stati individuati nell'aria espriata benzene ed alchil benzene derivati, anche se non è ancora conosciuta la loro provenienza (origine endogena o inquinamento atmosferico?).
3. *Tioli*: sono presenti metantiolo, etantiolo, dimetilsolfuro a basse concentrazioni, alcani-tioli e alchilsolfuri a più alte concentrazioni. Un aumento nella concentrazione di specifici tio-composti ha mostrato una certa importanza nella valutazione clinica di cirrosi (Kaji *et al.*, 1978; Hisamura, 1979) e nei disturbi dell'ovulazione (Kostelc, 1981).

4. *Ammoniaca ed ammine*: un aumento della concentrazione di ammoniaca è indice di una disfunzione epatica (Routh, 1976), mentre si è registrato un aumento di di- e trimetilammina in soggetti uremici (Simenhoff *et al.*, 1977).

5. *Gas permanenti*: es. NO e CO.

Il monossido di azoto (NO) ed il monossido di carbonio (CO) sono le sostanze più studiate nell'ambito della valutazione clinica di patologie polmonari. La concentrazione di NO nell'esalato è aumentata nei soggetti asmatici; la sua determinazione può consentire l'individuazione del paziente asmatico e la valutazione dell'andamento della patologia e della risposta alla terapia (Kharitonov and Barnes, 2001).

La misura del CO è stata soprattutto utilizzata per valutare l'abitudine tabagica; questo è possibile grazie all'utilizzo di strumenti portatili e a basso costo che ne permettono la rapida quantificazione nel gas esalato. Tuttavia la principale fonte endogena di CO è costituita dalla degradazione dell'emoglobina da parte dell'enzima emeossigenasi (Kharitonov and Barnes, 2001). Poiché questo enzima è considerato un valido indicatore di stress ossidativo, la determinazione dei livelli di CO nell'esalato è utile per determinare l'attività dell'enzima stesso.

Così, come la misura di NO e di CO si è dimostrata un utile strumento nella valutazione di determinate patologie polmonari, interessanti informazioni potrebbero derivare dalla valutazione quali-quantitativa di selezionati VOCs. Lavorando in quest'ottica, si deve ricercare un quadro caratteristico (*fingerprint*) delle sostanze selezionate in modo tale da poter ottenere utili informazioni nella valutazione dello stato di salute del polmone stesso.

Infatti, l'origine di diversi VOCs endogeni sembrerebbe direttamente legata alle condizioni di stress ossidativo normalmente presenti anche nei sani, ma che tendono ad aumentare con l'invecchiamento, oppure in presenza di xenobiotici tossici o dei loro metaboliti, ma soprattutto in caso di patologie più o meno gravi.

Lo stress ossidativo è causato dalla presenza di radicali liberi, specie estremamente reattive, in grado di innescare una serie di reazioni a catena che portano alla perossidazione lipidica delle membrane cellulari (con conseguente necrosi cellulare da lesioni alla membrana plasmatica) o ad addotti con macromolecole biologiche (in particolare DNA e proteine) (Kneepkens *et al.*, 1992; Kneepkens *et al.*, 1994). I radicali liberi, per lo più specie reattive dell'ossigeno (ROS), sono quindi importanti mediatori di danno cellulare, fenomeno alla base di diversi processi patologici. Diversi sono i prodotti di perossidazione lipidica a carico delle membrane cellulari quali ad esempio

isoprostani, aldeidi, acidi grassi, idrocarburi alifatici o, più in generale, composti organici volatili (Figura 5).

Per questo motivo la determinazione dei VOCs di natura endogena nell'aria esalata come possibili prodotti di stress ossidativo a carico delle membrane cellulari, potrebbe fornire delle importanti indicazioni sullo stato di salute del polmone stesso. D'altra parte, gli altri prodotti dell'irrancimento ossidativo o più in generale derivanti da processi di infiammazione polmonare, proprio per la loro bassa volatilità o più in generale per le loro caratteristiche chimico-fisiche (es. isoprostani, leucotrieni, prodotti di idrossilazione del DNA ecc) possono essere individuati nel CAE .

In particolare, nella perossidazione lipidica, i ROS attaccano i costituenti delle membrane cellulari, come gli acidi grassi polinsaturi (PUFAs), generando reazioni a catena che portano alla formazione di lipidi perossidi, successivamente convertiti in alcani, dieni coniugati e composti carbonilici (aldeidi) (Miekisch *et al.*, 2004).

Poiché la presenza di queste classi di composti è in parte riconducibile agli acidi grassi che costituiscono i fosfolipidi di membrana, la loro misura può fornire un utile parametro per valutare l'entità del danno radicalico.

I PUFAs, a causa della presenza di doppi legami, sono molto suscettibili all'attacco dei radicali liberi ed ognuno di essi, in relazione alla propria struttura chimica, porta alla formazione di un determinato alcano:

- ac. grassi  $\omega$ -3: etano
- ac. grassi  $\omega$ -4: propano
- ac. grassi  $\omega$ -6: pentano
- ac. grassi  $\omega$ -7: esano

Poiché gli acidi grassi  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 sono i più abbondanti nelle membrane cellulari, l'etano ed il pentano sono prodotti in maggiore quantità e da tempo descritti in letteratura come prodotti di stress ossidativi a carico dei lipidi di membrana (Esterbauer *et al.*, 1991).

Un aumento di tali composti è perciò indice monitorabile di danno ossidativo, anche se bisogna tener conto che il pentano viene metabolizzato via epatica tramite l'attività del citocromo p450, che può variare tra i pazienti e nei diversi periodi di vita dello stesso paziente.

Sono documentati in letteratura livelli aumentati di pentano ed etano nell'esalato di soggetti con patologie polmonari infiammatorie, acute o croniche, quali asma, BPCO, ARDS, sindrome delle apnee ostruttive notturne, e altre malattie che comportino uno

stato di flogosi, come rigetto di trapianto di organo allogenico, sepsi, infarto miocardico, ischemia intestinale, sindrome coronaria (Cao and Duan, 2006).

Con un ritmo circadiano, zenit cioè alle 6 del mattino e nadir alle 6 di sera, nonché età dipendente, minimo nei bambini, è possibile rilevare nell'esalato la presenza di isoprene, idrocarburo insaturo derivato del processo di sintesi del colesterolo dal mevalonato, anch'esso indice di danno ossidativo. Uno squilibrio nella riparazione delle membrane cellulari, quale si riscontra durante infarto miocardico o ARDS, ne determina infatti un decremento nelle concentrazioni.

Tutto ciò dimostra ampiamente l'interesse della comunità scientifica verso l'analisi dell'aria esalata per il monitoraggio delle sostanze legate a condizioni di stress ossidativo.

La composizione dell'aria esalata fu messa in relazione col tumore polmonare già alla fine degli anni '80 quando alcuni studiosi (Gordon *et al.*, 1985; O'Neill *et al.*, 1988) identificarono nel respiro di soggetti con tumore polmonare, diversi idrocarburi alifatici e derivati del benzene. I VOCs identificati erano strutturalmente simili nei soggetti sani e malati, ma variavano in termini di concentrazione.

Successivamente Phillips e coll. (Phillips *et al.*, 1999a), studiando la composizione dell'esalato in soggetti affetti da tumore polmonare e in soggetti sani, selezionarono 22 VOCs, in maggioranza idrocarburi alifatici e benzene-derivati, in grado di discriminare fra soggetti con e senza tumore al polmone. Alcuni anni dopo lo stesso gruppo di studio modificò e ridusse da 22 a 9, il numero dei VOCs di interesse (Phillips *et al.*, 2003a). L'aumento riscontrato negli idrocarburi alifatici è probabilmente collegato ad una maggiore attività dei radicali liberi dell'ossigeno nelle cellule tumorali (Cuomo *et al.*, 2000; Sozzi, 2001; Chen *et al.*, 2007; Shivapurkar *et al.*, 2007). Quest'ultima osservazione suscitò un grande interesse nella comunità scientifica tanto che in un editoriale venne sottolineata la potenziale utilità dell'analisi dell'aria esalata nello screening del tumore al polmone, pur evidenziandone i possibili fattori di confondimento sia clinici che legati alla variabilità analitica (Ost *et al.*, 2003)

Tra i numerosi fattori di confondimento da tener presente nell'interpretazione dei risultati, vi sono l'età, poiché l'invecchiamento è caratterizzato da un aumento della produzione di radicali liberi e quindi da una maggior perossidazione lipidica (Phillips *et al.*, 2000; Lechner *et al.*, 2006) e la variabilità inter-individuale e intra-individuale (Phillips *et al.*, 1999b), legata a diverse caratteristiche come il sesso, le abitudini alimentari, il tessuto adiposo, ma anche ad interferenze microbiologiche (Cuomo *et al.*,

2000). Anche il fumo può incidere sulla concentrazione dei VOCs nell'aria esalata, provocando ad esempio un aumento di etano e di pentano, derivanti sia dai costituenti del fumo stesso che dal danno ossidativo causato. Tuttavia, aumenti cronici di etano e di pentano nell'aria espirata di fumatori o ex fumatori sono indici più specifici di stress ossidativo rispetto ad aumenti transitori, maggiormente legati all'esposizione al fumo di sigaretta (Aghdassi and Allard, 2000).

In generale si può però affermare che i risultati molto promettenti riportati in letteratura, invitano ad un approfondimento nella ricerca di un gruppo selezionato di VOCs che possa essere utilizzato nella diagnosi precoce di neoplasia polmonare. Per affrontare questo studio è di fondamentale importanza la messa a punto di un'opportuna metodica per la raccolta ed il campionamento dell'aria espirata che tenga conto delle problematiche legate alla natura stessa della matrice nonché alle sostanze di interesse in essa presenti.

#### ***1.2.4 Problematiche nell'analisi dell'aria espirata***

L'analisi dell'aria esalata presenta una serie di problemi legati soprattutto alla standardizzazione delle operazioni di raccolta. Infatti solo un'accurata standardizzazione della procedura aumenta la riproducibilità delle analisi sullo stesso individuo e consente così di evidenziare solo le variazioni inter-individuali legate allo stato di salute del paziente stesso e non a variabili voluttuarie o a stili di vita, quali l'abitudine al fumo o l'alimentazione.

Un altro rilevante problema è rappresentato dalle bassissime concentrazioni degli analiti di interesse, che sono in genere comprese tra le nanomoli ( $10^{-9}$  M) e le picomoli ( $10^{-12}$  M) per litro di aria. Sono quindi necessarie appropriate tecniche di arricchimento come la crioconcentrazione, la concentrazione su materiale adsorbente (carbone attivo o setacci molecolari) o tramite particolari reazioni chimiche (Phillips, 1997; Cheng and Lee, 1999). I risultati più convincenti riportati in letteratura sono stati ottenuti da Phillips e coll. (Phillips, 1997) grazie ad una complessa apparecchiatura portatile controllata da microprocessori ed appositamente disegnata per raccogliere, a flusso costante, solo l'aria alveolare e concentrare gli analiti su una trappola di materiale adsorbente. Questo sistema, pur garantendo ottimi risultati, richiede tempi molto lunghi sia di campionamento che di analisi, oltre ad una strumentazione estremamente complessa. Peraltro, l'analisi quantitativa risulta limitata dalla impossibilità di utilizzare

tecniche idonee (come l'uso di standard interni) per verificare l'efficienza dell'adsorbimento e della successiva estrazione.

Nel presente lavoro di tesi è stata utilizzato un sistema alternativo di campionamento e arricchimento dei VOCs: la microestrazione in fase solida o SPME (*Solid Phase MicroExtraction*), una tecnica che permette di estrarre uno o più analiti dal campione concentrandoli su una fibra di materiale adsorbente.

L'aria espirata viene raccolta in un sistema di materiale inerte all'interno del quale viene successivamente inserita la fibra SPME. La capacità di concentrazione ottenuta con questo metodo risulta minore rispetto a quella ottenuta da una espirazione forzata su materiale adsorbente, poichè è limitata dalla libertà di migrazione degli analiti verso la fibra all'interno del sistema contenente l'espirato. Tuttavia, utilizzando la tecnica SPME si possono identificare molte delle sostanze riportate in letteratura, anche in concentrazioni dell'ordine delle picomoli/L ( $10^{-12}$  M). La tecnica consente l'uso di standard interni, rappresentati da sostanze simili a quelle in esame o, meglio ancora, dalle stesse sostanze rese riconoscibili mediante spettrometria di massa attraverso l'impiego di isotopi dei costituenti, come ad esempio del deuterio in sostituzione dell'idrogeno. Pur comportando costi più elevati, l'uso di sostanze marcate isotopicamente permette l'analisi quantitativa anche a livelli di ultratraccia.

## 2 SCOPO DELLA TESI

La problematica della diagnosi precoce del tumore al polmone richiede la ricerca di nuovi metodi non invasivi efficaci e di costi contenuti, da utilizzare in modo sinergico ad altre metodiche tradizionali, in un'ottica di *screening* della popolazione generale.

L'analisi dell'aria esalata, sembra rappresentare una possibile risposta grazie soprattutto alla sua particolare non invasività che ne rende possibile l'applicazione anche in condizioni cliniche e psicologiche difficili.

In letteratura sono riportati interessanti risultati sull'analisi dell'espirsto e le neoplasie polmonari. Tuttavia, la maggior parte degli studi considera gruppi di pazienti eterogenei, senza considerare il peso di importanti fattori di confondimento quali la condizione di fumatore o di BPCO, che spesso precede lo stadio di sviluppo del tumore al polmone (Bach *et al.*, 2004; Papi *et al.*, 2004).

Nella maggior parte dei casi viene utilizzata una strumentazione complessa che richiede lunghe tempistiche nella raccolta del campione stesso ed in generale viene riportata un'analisi di tipo qualitativo e/o semi-quantitativo, senza dare una precisa valutazione delle reali concentrazioni delle sostanze misurate, nè tantomeno fornire indicazioni più chiare sulla loro origine ed il loro significato.

In questo lavoro di ricerca verrà presentato una nuova metodica semplice ed economica per la raccolta e l'analisi dell'aria alveolare espirata in modo da poter identificare e quantificare composti volatili di interesse.

Quindi lo scopo della tesi è stato quello di:

parte A) applicare tale metodica per la determinazione delle concentrazione di VOCs selezionati (idrocarburi alifatici ed aromatici) nell'aria esalata dei soggetti con neoplasia polmonare NSCLC in uno studio trasversale ed in uno longitudinale.

- i) *Studio trasversale.* Sono stati confrontati i livelli dei VOCs misurati nell'aria esalata di pazienti NSCLC in uno stadio operabile con soggetti BPCO, e con controlli asintomatici fumatori e non fumatori. Quindi è stato valutato l'effetto della progressione della patologia considerando i pazienti NSCLC ad uno stadio non operabile.
- ii) *Studio longitudinale.* Nei pazienti NSCLC è stata valutata la variazione del profilo quantitativo dei VOCs prima e dopo l'intervento chirurgico.

parte B) chiarire il significato dei più alti livelli dei VOCs, sia endogeni che esogeni, misurati nell'aria espirata di soggetti affetti da neoplasia tramite:

- i) l'analisi di campioni di tessuto polmonare peri-tumorale e tumorale di alcuni pazienti NSCLC precedentemente studiati
- ii) la valutazione dell'effetto acuto del fumo di sigaretta sulle concentrazioni dei VOCs

parte C) mettere a punto un metodo per la determinazione delle aldeidi volatili nell'aria espirata come indicatori endogeni di stress ossidativo. Investigare quindi il loro ruolo come indicatori nelle neoplasie polmonari NSCLC.

### **3 PARTE A) DETERMINAZIONE DI COMPOSTI ORGANICI VOLATILI IN TUMORI POLMONARI NON A PICCOLE CELLULE: STUDIO TRASVERSALE E STUDIO LONGITUDINALE**

La maggior parte degli studi riportati in letteratura considera pazienti eterogenei con tumore al polmone sia allo stadio primario che secondario. Inoltre tali studi non confrontano tali pazienti con gruppi di fumatori sani e BPCO, non considerando quindi come sia l'abitudine al fumo che la situazione di BPCO possano precedere lo stadio di sviluppo del tumore al polmone.

Nella maggior parte degli articoli riportati in letteratura vi è solo un'analisi di tipo qualitativo senza una precisa valutazione delle reali concentrazioni dei VOCs misurati. Ciò permetterebbe invece un più preciso confronto fra i livelli nei diversi gruppi fornendo al contempo un utile strumento nell'interpretazione dei dati.

Un'altra problematica importante per chiarire il ruolo delle sostanze presenti nell'aria espirata è rappresentata dalla valutazione dell'intervento chirurgico sui livelli dei VOCs misurati. L'importanza di tale approccio è legata anche al fatto che in letteratura non sono finora stati descritti studi analoghi, anche per la difficile reperibilità dei pazienti a tempi definiti dall'intervento chirurgico.

Lo scopo del presente studio è stato quello di sviluppare una nuova, semplice ed economica procedura di raccolta e di analisi dell'aria alveolare espirata in modo da identificare e quantificare i VOCs. La scelta di un gruppo selezionato di VOCs è stata fatta in base alle indicazioni fornite dalla letteratura.

Il metodo è stato quindi applicato in uno *Studio trasversale* ed in uno *Studio longitudinale*.

(i) *Studio trasversale*. In questo studio l'analisi dell'aria espirata è stata effettuata reclutando pazienti NSCLC, BPCO e controlli asintomatici fumatori e non fumatori. Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare il significato delle concentrazioni dei VOCs selezionati nei soggetti con neoplasia. Nello studio è stato considerato anche il peso di fattori di confondimento quali l'abitudine tabagica o la condizione di BPCO che spesso precede o coesiste con lo sviluppo della patologia. Infine, i pazienti NSCLC allo stadio operabile precedentemente investigati sono stati confrontati con pazienti NSCLC ad uno stadio non operabile per valutare l'effetto

dell'aggravarsi della patologia sul profilo quantitativo delle sostanze. Essendo questo studio attualmente in corso, i dati descritti rappresentano dei risultati preliminari, ma di chiara utilità nell'interpretazione dei dati.

- (ii) *Studio longitudinale.* L'analisi dell'aria espirata è stata ripetuta sui pazienti NSCLC a diversi intervalli di tempo dopo l'intervento chirurgico. In questo modo si è voluto valutare l'effetto dell'intervento stesso sui livelli dei VOCs nell'aria esalata, in relazione alla rimozione del tessuto neoplastico. Per meglio comprendere l'effetto dell'operazione sui livelli dei VOCs esalati, tali risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti nell'aria esalata di pazienti NSCLC allo stadio non operabile.

## **3.1 MATERIALI E METODI**

### **3.1.1 *Disegno dello studio***

Nello studio trasversale sono stati valutati pazienti NSCLC ad uno stadio chirurgicamente operabile (stadio IA o IB), BPCO e controlli asintomatici fumatori e non fumatori. Nello studio longitudinale, i livelli dei VOCs nei pazienti NSCLC sono stati misurati prima ( $T_0$ ) e a diversi intervalli di tempo ( $T_1$  e  $T_2$ ) dopo l'intervento chirurgico.  $T_1$  rappresenta il monitoraggio effettuato dopo un mese dall'intervento chirurgico, mentre  $T_2$  il monitoraggio dopo 3 anni dall'intervento stesso.

Infine, per valutare l'effetto del peggioramento della malattia rispetto alle variazioni indotte nei livelli dei VOCs dopo intervento chirurgico, sono stati valutati pazienti con neoplasia NSCLC ad uno stadio chirurgicamente non operabile.

### **3.1.2 *Soggetti***

Sono stati reclutati 36 pazienti presso il Dipartimento di Chirurgia Toracica dell'Università di Parma tra il gennaio 2003 e giugno 2004. Nessuno dei pazienti è stato sottoposto a chemioterapia prima dell'intervento chirurgico. Nello studio sono stati inclusi anche 23 soggetti BPCO, 35 fumatori asintomatici e 49 controlli non fumatori. I fumatori non hanno fumato per almeno un'ora prima della raccolta dell'espriato. Le caratteristiche dei soggetti dello studio sono illustrate in Tabella 5. Ogni volontario ha firmato il consenso informato. Ventisei dei pazienti NSCLC hanno accettato di ripetere lo studio ad un mese ( $T_1$ ) e 10 dopo circa tre anni ( $T_2$ ) dall'intervento chirurgico.

Da febbraio 2007 è in corso un secondo reclutamento di pazienti NSCLC allo stadio IA ed IB con caratteristiche omogenee a quelle dei pazienti precedentemente coinvolti nello studio. Allo stato attuale sono stati reclutati 27 pazienti.

Infine, è attualmente in corso uno studio su pazienti con tumore in stadio avanzato non operabile, reclutati presso l'Unità Operativa di Oncologia Medica di Parma. I dati presentati nel lavoro si riferiscono ai 14 pazienti finora reclutati.

### **3.1.3 Raccolta dell'aria espirata**

Esperimenti preliminari sono stati fatti per aumentare la riproducibilità della procedura di campionamento dell'aria esalata, utilizzando un nuovo sistema di raccolta dell'aria espirata a volume fisso (Bio-VOC sampler, Markes International Ltd, Rhondda Cynon Taff, UK) (Figura 6). In breve, l'aria da un unico atto respiratorio è stata raccolta in uno speciale contenitore in Teflon® fornito di una valvola ad una sola via sia in entrata che in uscita. Tale sistema ha permesso la raccolta dell'aria alveolare ed in particolare degli ultimi 150 ml della porzione dell'espirato. I livelli dei VOCs nell'espirato sono stati confrontati con quelli dell'aria ambientale raccolta 12 volte durante lo studio negli stessi locali dove sono stati fatti stazionare per almeno 2 ore sia i pazienti NSCLC e BPCO che i controlli (fumatori e non).

### **3.1.4 Estrazione ed analisi dei VOCs**

Dopo la raccolta dell'espirato in ogni contenitore è stato aggiunto 1 µL di n-eptano-d<sub>16</sub> e stirene-d<sub>8</sub> in soluzione metanolica ( $1.5 \times 10^{-5}$  M) utilizzato come standard interno (S.I.) rispettivamente per gli alcani ed i benzene-derivati. I VOCs presenti nell'espirato e lo S.I. aggiunto sono stati estratti introducendo direttamente nel Bio-VOC per 30 min a temperatura ambiente una fibra SPME 75 µm Carboxen/PDMS fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Gli analiti sono stati quindi desorbiti termicamente a 280°C nell'iniettore del GC e quindi analizzati in GC/MS.

L'analisi GC/MS è stata effettuata su un gascromatografo Hewlett-Packard HP 6890 accoppiato con uno spettrometro di massa a HP 5973 (Palo Alto, CA, USA). Per la separazione cromatografia è stata utilizzata una colonna Equity<sup>TM</sup>-1(30 m, 0.25 mm i.d., 1.0 µm film, Supelco). L'acquisizione è stata effettuata in scansione nell'intervallo di massa 40-350 *m/z*. Fra i principali composti presenti nell'aria alveolare sono stati

selezionati 13 VOCs (7 alifatici e 6 aromatici). Ogni sostanza è stata identificata grazie al corrispettivo spettro di massa e confermata confrontandone il tempo di ritenzione con quello degli standard puri. Per l'analisi quantitativa per ogni sostanza è stato scelto un frammento caratteristico non interferito dai composti di coeluizione.

In un primo momento sono stati studiati i fattori che coinvolgono il processo di estrazione SPME come l'adsorbimento, il desorbimento e quindi è stata ottimizzata la temperatura di campionamento (dati non riportati). Dopo 30 min di estrazione a temperatura ambiente (circa 22°C) per tutti i VOCs si raggiunge l'equilibrio di estrazione, dopo di che la fibra viene immediatamente desorbita termicamente nell'iniettore del GC a 280°C per evitare la perdita degli analiti. E' infatti dimostrato che il tempo che intercorre durante il trasferimento al GC può essere un'importante sorgente di variazione a causa dell'evaporazione degli analiti dalla fibra (Arthur and Pawliszyn, 1990). Dopo esposizione della fibra a 280°C per 5 min non si notano effetti memoria. Il metodo è stato validato sia in modalità di acquisizione *full scan* che *sim*, studiando l'intervallo di linearità, il LODs e la precisione. L'acquisizione in *full scan* consta nell'acquisizione di tutti i possibili frammenti carichi costituenti le molecole, mentre la modalità *sim* permette l'acquisizione dei soli frammenti caratteristici delle sostanze di interesse, permettendo così di raggiungere una sensibilità maggiore. La linearità è stata stabilita per oltre 4 ordini di grandezza ( $10^{12}$ - $10^{-8}$  M,  $r^2 > 0.98$ ) ed il LOD, calcolato come rapporto S/N=3, è dell'ordine di  $10^{-12}$  M per ogni sostanza. La precisione analitica, calcolata come RSD% sugli standard è compresa fra 3.1 e 13.7% sia per le determinazioni intra-day che inter-days.

Gli standard gassosi sono stati preparati direttamente nel contenitore Bio-VOC aggiungendo 1 µL di soluzione metanolica standard dei VOCs scelti, 1 µL di S.I. ( $1.5 \times 10^{-5}$  M) e 6 µL di acqua deionizzata per saturare di umidità l'aria, e quindi stabilizzati per 1 ora a temperatura ambiente. Gli standard gassosi così preparati sono stabili per circa 60 ore.

### **3.1.5 Analisi statistica**

#### *Studio Trasversale.*

Nello studio trasversale, i livelli di benzene e toluene mostrano una distribuzione log normale (test di normalità Kolmogorov-Smirnov) e perciò sono stati applicati dei test statistici parametrici (ANOVA ad una via seguita dal test Games Howell Post Hoc). Per

gli altri VOCs che non hanno distribuzione normale nemmeno dopo trasformazione logaritmica, sono stati usati test non parametrici (Kruskal-Wallis test seguito dal Dunns Post Hoc test). Per classificare i casi è stata usata una classificazione logistica multinomiale.

### *Studio Longitudinale*

Nello studio longitudinale, a causa della bassa numerosità dei gruppi in esame, è stato applicato il test non parametrici Mann-Whitney per confronti singoli. Una più corretta analisi dei dati avrebbe previsto l'applicazione di test parametrici su confronti multipli (es. Kruskal-Wallis test seguito dal Dunns Post Hoc test) considerando contemporaneamente tutti i gruppi in esame. D'altra parte con tale approccio statistico, la bassa casistica attualmente a disposizione non permetterebbe di evidenziare le eventuali differenze statistiche fra i diversi gruppi.

## **3.2 STUDIO TRASVERSALE**

### **3.2.1 Risultati**

Nelle Tabelle 4 e 5 sono riassunti i livelli dei VOCs nei diversi gruppi con le relative differenze significative. Le concentrazioni di 10 sostanze rispetto alle 13 considerate, sono significativamente più alte nei soggetti NSCLC rispetto ai controlli, mentre 9 sono significativamente più alte sia nei BPCO che nei fumatori rispetto ai controlli. In particolare solo l'isoprene, l'eptano e lo stirene hanno evidenziato livelli simili nei controlli e nei soggetti NSCLC, mentre le stesse concentrazioni sono state rilevate nei controlli e nei BPCO per l'isoprene, il benzene, il toluene ed il pentametilptano. Infine isoprene, ottano, stirene e decano presentano livelli simili nei controlli sia fumatori che non. D'altra parte si vede come diverse sostanze siano in grado di distinguere fra soggetti NSCLC, BPCO e fumatori nei confronti a due a due. In particolare i livelli del metilpentano e dell'isoprene sono significativamente più alti, mentre l'etilbenzene e lo stirene sono significativamente più bassi nei soggetti NSCLC rispetto ai BPCO. Inoltre il benzene, l'eptano ed il toluene sono significativamente più bassi nei NSCLC rispetto ai fumatori. Infine l'isoprene, il metilpentano, il benzene ed il toluene sono più bassi, mentre lo stirene è più alto nei BPCO rispetto ai fumatori.

Nella Tabella 6 sono stati riassunti i valori delle concentrazioni, in termini di mediane, dei VOCs nell'aria espirata dei diversi gruppi, mentre in Tabella 7 i valori di  $p$  per ogni singola sostanza, calcoli confrontando i gruppi a due a due.

In nella Tabella 8 è il rapporto tra le mediane misurate nell'esalato e nell'ambiente.

I valori di  $p$  sono stati calcolati rispetto alle concentrazioni misurate nei controlli e nell'aria ambientale usando il test di Mann-Whitney. Solo l'isoprene e l'eptano evidenziano concentrazioni significativamente più alte nei controlli rispetto all'aria ambientale. Chiaramente, i soggetti NSCLC, BPCO e fumatori, sulla base dei risultati ottenuti nelle Tabelle 5 e 6, presentano valori più elevati.

Per valutare il potere discriminante dei VOCs selezionati fra i gruppi presi in esame, è stata effettuata una regressione logistica multinomiale. La Figura 7 mostra la corretta classificazione calcolata per ogni gruppo, con un  $r^2$  pari a 0.70. In generale l'82.5% dei soggetti viene classificato correttamente con un massimo dell'87.8% per i controlli ed un minimo del 72.2% per i NSCLC.

Infine, l'analisi a componenti principali effettuata sulle variabili ne ha permesso il raggruppamento in 3 diversi fattori in base alla loro varianza nei soggetti valutati, come mostrato in Tabella 9.

Per valutare l'effetto del progredire della malattia con l'andamento delle concentrazioni dei VOCs selezionati nell'aria espirata, è attualmente in corso uno studio di valutazione di pazienti NSCLC ad uno stadio non operabile. Allo stato attuale sono stati reclutati 14 pazienti con caratteristiche simili a quelle dei pazienti NSCLC allo Stadio IA e IB. In particolare l'età media è uguale a 65.3 anni, 10 soggetti sono di sesso maschile ed il rapporto fumatore/ex-fumatore/non fumatore è di 2/9/3. Nessun paziente è stato sottoposto a trattamento chemioterapico nel periodo precedente al nostro studio.

Le concentrazioni dei VOCs analizzati sono riportate in Tabella 10 insieme a quelle misurate nei controlli e nei pazienti NSCLC allo Stadio IA e IB. Le caselle della tabella evidenziano una gradazione di colore tanto più intensa tanto più è elevata la concentrazione misurata. Si osserva un generale aumento delle concentrazioni con il progredire della malattia, più marcato per quelle di origine esogena.

In Figura 8 vengono riportate le distribuzioni dei livelli misurati dei singoli VOC che evidenziavano differenze significative fra i pazienti allo Stadio non operabile rispetto ai pazienti T0 e/o ai controlli. In questa fase nelle figure non è stato riportato il confronto fra i pazienti T0 e T2 poiché questa problematica verrà affrontata in modo più dettagliato nella sezione dedicata allo studio longitudinale.

La distribuzione delle concentrazioni evidenzia come il benzene, il toluene e l'etilbenzene risultino aumentati con il progredire della malattia e statisticamente diversi dalle concentrazioni misurate sia nei controlli che nei pazienti T0. L'ottano, la cui concentrazione diminuisce allo stadio non operabile, risulta significativamente diverso solo dai pazienti T0. Tutte le altre sostanze, ad eccezione dello stirene che non evidenzia alcuna differenza, risultano aumentate e significativamente diverse dai controlli ma non dai pazienti T0. Risulta comunque di fondamentale importanza un aumento della casistica soprattutto per quelle sostanze come il 2-metilpentano, l'eptano, il pentametileptano e l'esano che mostrano un generale incremento rispetto ai soggetti T0 pur senza raggiungere la significatività.

### **3.2.2 *Discussione***

La ricerca e lo sviluppo di nuove strategie diagnostiche non invasive per individuare indicatori specifici per una diagnosi precoce del tumore al polmone è attualmente di grande interesse. I risultati attualmente riportati in letteratura evidenziano come questo obiettivo sarà probabilmente raggiunto attraverso l'uso di un gruppo di indicatori piuttosto che di un singolo composto (Andriani *et al.*, 2004).

Infatti, il principale risultato di questo studio è che nessuno dei VOC selezionati è in grado da solo di distinguere fra i pazienti NSCLC e gli altri gruppi. Perciò non è possibile identificare un singolo VOC come specifico *biomarker* di neoplasia polmonare, mentre l'uso del pattern dei VOCs selezionati e considerati nella loro totalità presenta un forte potere discriminante (>70%).

Una novità del presente studio è la selezione di un gruppo di pazienti che, avendo un tumore polmonare operabile NSCLC, possono beneficiare in modo particolare di una diagnosi precoce. L'analisi dell'aria esalata è di particolare interesse in quanto è un metodo non invasivo per la ricerca di *biomarkers* di tumore allo stadio precoce. D'altra parte, in generale, l'analisi dell'aria espirata presenta diversi fattori metodologici che possono inficiare la bontà dei risultati: (i) la presenza nel sistema di raccolta dello spazio anatomico morto che può essere contaminato dall'aria ambientale e dalle vie aeree superiori, (ii) la povera riproducibilità perché non è possibile inserire nel sistema di analisi uno standard interno essendo non conosciuto il volume di espirato raccolto.

Per superare queste limitazioni, è stata sviluppata una nuova procedura di raccolta dell'aria esalata, usando uno specifico sistema (Fig.5) che intrappola gli ultimi 150 ml

dell'aria espirata in un tubo di Teflon®. Il metodo usato è abbastanza semplice e presenta diversi vantaggi: i) permette il campionamento di un volume fisso di aria alveolare, ii) presenta una resistenza fissa, permettendo un confortevole e costante flusso respiratorio, iii) non presenta effetti memoria e permette l'aggiunta dello standard interno al campione aumentando così la riproducibilità dei dati, iv) è un sistema ben tollerato e quindi utilizzabile anche con fini di screening e anche in condizioni cliniche e fisiologiche difficili come quelle osservate nei soggetti NSCLC. Inoltre questo sistema non richiede particolari strumentazioni di supporto agli strumenti normalmente disponibili (Cope *et al.*, 2004).

Dal profilo cromatografico dell'aria esalata, sono stati selezionati 13 composti sulla base della loro rivelabilità e dell'importanza biologica. Dieci di queste sono le stesse riportate nel *pattern* dei 22 composti descritti da Phillips e coll. (Phillips *et al.*, 1999a) come discriminanti del tumore polmonare, con l'aggiunta di un noto indicatore di stress ossidativo (pentano) e della sua forma metilata (2-metilpentano). E' stato quindi considerato anche il toluene come sostanza strettamente relazionata al fumo di sigaretta. Il numero dei VOCs identificati era minore rispetto a quelli riportati da Phillips e coll. (Phillips *et al.*, 1999a) probabilmente a causa del diverso sistema di raccolta dell'aria esalata. Infatti nel loro metodo l'aria esalata proveniente da più atti respiratori viene concentrata su una trappola di materiale adsorbente (Phillips, 1997). Nel nostro metodo viene invece raccolta l'aria proveniente da un unico atto respiratorio ed in seguito i VOCs presenti vengono estratti con la tecnica SPME. Nonostante la più bassa sensibilità, questo sistema presenta il vantaggio di essere semplice, veloce, di non richiedere una fase di preparazione del campione e di non necessitare di ulteriori strumentazione di supporto al normale GC (Lord and Pawliszyn, 2000).

Sebbene l'esatto meccanismo del rilascio dei VOCs nell'aria esalata debba ancora essere dimostrato, affascinanti ipotesi possono essere ricavate dall'analisi delle componenti principali sulle variabili. Questa analisi ha permesso la fattorializzazione dei composti in 3 gruppi (Tabella 9).

L'isoprene, il pentano ed il 2-metilpentano sono stati raggruppati insieme (gruppo 1), confermando l'ipotesi di una loro origine prettamente endogena, nonostante il pentano e la sua forma metilata siano presenti negli scarichi autoveicolari (Tsai *et al.*, 2003) e l'isoprene sia un componente del fumo di sigaretta (Darrall *et al.*, 1998). Infatti l'isoprene deriva nell'uomo dall'acetil-CoA ed è la molecola base nella biosintesi del colesterolo (Stone *et al.*, 1993), mentre il pentano è considerato come un prodotto della

perossidazione lipidica ed un indicatore di stress ossidativo (Pitkanen *et al.*, 1989). Il 2-metilpentano è stato raggruppato con l'isoprene ed il pentano e questo è in linea con quanto riportato in un precedente articolo che considera gli alcani metilati come prodotti secondari dello stress ossidativo nell'uomo (Phillips *et al.*, 2003b) anche se è ancora in discussione l'esatta origine degli alcani metilati (Mitsui and Kondo, 2003).

Tra le sostanze del gruppo 1, i livelli del 2-metilpentano nei pazienti NSCLC erano chiaramente più alti rispetto a quelli osservati nei controlli e nei COPD, sottolineando quindi la potenziale utilità di questo indicatore nelle procedure di *screening* (possibilmente associato con altri indicatori rilevanti).

I livelli di pentano erano più alti nell'aria esalata dei soggetti con condizioni cliniche associate allo stress ossidativo come i pazienti NSCLC e BPCO e nei fumatori asintomatici rispetto ai controlli. Questi dati sono in linea con precedenti osservazioni riportate in letteratura (Mitsui *et al.*, 2000).

Nonostante i buoni risultati, i livelli di pentano esalato non sono in grado di distinguere tra NSCLC e BPCO o fumatori asintomatici. Essendo i livelli di pentano nei controlli non significativamente diversi da quelli misurati nell'aria ambientale (Tabella 8), i livelli più alti possono essere messi in relazione sia con la condizione patologica che con l'abitudine al fumo. Per quanto riguarda l'isoprene, la sua origine endogena viene confermata dal fatto che i livelli di isoprene misurati nell'aria espirata sono significativamente più alti di quelli ambientali e sono consistenti con quelli riportati in letteratura (Jones *et al.*, 1995; Mitsui *et al.*, 2000).

I soggetti NSCLC ed i fumatori mostrano livelli di isoprene più alti di quelli osservati nei BPCO. Le differenze osservate tra i gruppi sono difficili da interpretare, ma probabilmente possono essere messe in parte in relazione al moderato contributo da parte dell'isoprene presente nel fumo di sigaretta, e in parte all'enfisema polmonare che spesso si verifica nei pazienti COPD. Sebbene in letteratura non vi siano degli studi che confrontino i livelli di isoprene nei soggetti NSCLC e BPCO, basse concentrazioni di isoprene sono state osservate nell'aria esalata di pazienti affetti da "Acute Respiratory Distress Syndrome" (ARDS) rispetto a pazienti senza tale sindrome (Miekisch *et al.*, 2001).

Le sostanze che appartengono al gruppo 2 (Tabella 9) possono essere classificate prevalentemente come composti esogeni relazionati all'abitudine al fumo. Gli Xileni totali sono stati esclusi dall'analisi a componenti principali per l'alta correlazione ( $r$

>0.95) con l'etilbenzene. Infatti, le sostanze del gruppo 2 presentano dei livelli di concentrazione chiaramente più alte nei fumatori rispetto ai controlli. Tra queste sostanze i livelli di etilbenzene possono essere di particolare interesse, grazie alla capacità di distinguere tra soggetti NSCLC e BPCO ed i controlli.

Le sostanze appartenenti al gruppo 3 sono eterogenee poiché sia di origine endogena che esogena e quindi le differenze osservate fra i gruppi sono di difficile interpretazione.

Riassumendo, nessuno dei VOC selezionati si è dimostrato specifico per distinguere in modo univoco la situazione di neoplasia polmonare da tutti gli altri gruppi considerati. D'altra parte, la combinazione delle concentrazioni di tutti i VOC può essere utile per classificare correttamente i soggetti (Figura 7): la regressione logistica multinomiale permette la classificazione corretta nel proprio gruppo di appartenenza di più dell'82% dei soggetti selezionati.

Da questi risultati, considerando i pazienti NSCLC rispetto a tutti gli altri soggetti analizzati, la sensibilità e la specificità del metodo sono rispettivamente pari al 72.2% ed al 93.6% il che indica la buona capacità di escludere i falsi positivi ed i falsi negativi.

Tali valori di sensibilità e specificità sono confrontabili con quelli riportati in letteratura per l'analisi dell'aria espirata da altri autori (Phillips *et al.*, 2003a), nonché con quelli ottenuti con altre tecniche come ad esempio la PET (Pastorino *et al.*, 2003), la determinazione del DNA circolante (Sozzi *et al.*, 2003) ed il naso elettronico (Machado *et al.*, 2005).

Per meglio interpretare i risultati ottenuti dall'analisi dell'aria espirata dei pazienti NSCLC allo stadio operabile, si è voluto valutare l'effetto del progredire della malattia con l'andamento delle concentrazioni dei VOCs. Tale studio, attualmente in corso, ha evidenziato come con il progredire della malattia molte delle sostanze, per lo più quelle di origine esogena, mostrino un generale aumento (risultati preliminari – Tabella 10).

Un'eccezione è rappresentata dai livelli di pentano ed isoprene che, pur essendo di chiara origine endogena, mostrano una generale diminuzione, seppur non significativa nei soggetti NSCLC allo stadio non operabile. L'interpretazione di questo risultato è particolarmente difficile per l'isoprene mentre per il pentano si può ipotizzare che il suo calo sia concorde ad un aumento dei processi di metilazione che avvengono con l'aumentare delle condizioni di stress ossidativo. Si può infatti notare anche un aumento

delle altre sostanze non metilate come il 2-metilpentano, il pentametileptano ed il trimetilbenzene.

Un andamento meno chiaro viene mantenuto per il terzo gruppo di sostanze per le quali era già stata evidenziata l'origine dubbia e la più difficile interpretazione dei risultati.

Nello studio è stato considerato in un secondo momento anche l'esano, sostanza di particolare importanza poichè la sua origine può essere legata alle condizioni di stress ossidativo a carico dei lipidi di membrana. L'analisi dell'esano è risultata in prima battuta particolarmente difficile e solo migliorando le *performance* di acquisizione dello spettrometro di massa (passando da un'acquisizione in *scan* ad una in *sim*) è stato possibile includere l'esano nel gruppo dei VOCs selezionati.

Risulta comunque di fondamentale importanza un aumento della casistica soprattutto per quelle sostanze come il 2-metilpentano, l'eptano, il pentametileptano e l'esano che mostrano un generale incremento rispetto ai soggetti T0 pur senza raggiungere la significatività.

### **3.2.3 Conclusioni**

In conclusione, sebbene la misura di nessun VOC preso singolarmente è specifica per il tumore al polmone, la combinazione di tutti e 13 i VOCs selezionati permette una buona classificazione dei soggetti nei corrispettivi gruppi. L'analisi statistica ha inoltre permesso di raggruppare le sostanze monitorate in base alla possibile origine, fornendo così un'importante chiave di lettura per l'interpretazione dei dati e confermando al contempo la validità del *pattern* di sostanze selezionate.

I risultati ottenuti dall'analisi dell'aria espirata nei pazienti NSCLC allo stadio non operabile, hanno evidenziato come il profilo dei VOCs cambi con il progredire della neoplasia, indicando un legame con lo sviluppo della neoplasia stessa.

Alla luce dei risultati ottenuti, in combinazione con approcci diagnostici convenzionali, questa analisi potrebbe fornire delle utili indicazioni nella diagnosi precoce contribuendo alla diminuzione del numero dei falsi positivi e quindi dei pazienti a cui applicare metodiche di indagine più costose e/o più invasive per la conferma della diagnosi.

### 3.3 CONFERMA DEI RISULTATI SUI SOGGETTI NSCLC

Come sopra riportato, un aumento della casistica dei soggetti NSCLC risulta di fondamentale importanza per confermare i risultati precedentemente ottenuti. Questa necessità diventa tanto più rilevante se si considera la grande variabilità evidenziata fra i soggetti di uno stesso gruppo nelle concentrazioni dei VOCs nell'aria espirata.

Per questo motivo è in corso un ulteriore reclutamento di soggetti NSCLC allo stadio IA ed IB con caratteristiche omogenee a quelle dei pazienti precedentemente coinvolti nello studio. Allo stato attuale sono stati reclutati 28 pazienti con un'età, espressa come mediana, pari a 70,5 anni, di cui 24 di sesso maschile. Per quanto riguarda l'abitudine al fumo 6 sono risultati fumatori, 19 ex-fumatori e 3 non fumatori.

In Figura 9 sono riportate le distribuzioni delle concentrazioni e le relative mediane dei VOCs selezionati misurati nell'aria esalata dei pazienti coinvolti nel primo studio e di quelli relativi al secondo reclutamento. I livelli dei VOCs nei due gruppi sono stati quindi confrontati con il test non parametrico di Mann-Whitney per campioni indipendenti.

L'analisi statistica mostra chiaramente l'assenza di differenze significative fra le concentrazioni dei VOCs selezionati nei gruppi presi in esame, fatta eccezione per il pentametilptano e per il decano ( $p < 0.01$ ), confermando così la loro origine non chiara (origine endogena? Esogena?) nell'aria espirata.

Alla luce della loro difficile determinazione analitica e di una così ampia variabilità nei risultati, si consiglia di non includere il decano fra il *pattern* delle sostanze selezionate nell'aria esalata e di valutare solo in un secondo momento dopo un congruo aumento della casistica, il peso delle informazioni ottenute dall'analisi del pentametilptano. I risultati ottenuti per il pentano e gli xileni totali mostrano una differenza fra le concentrazioni vicina al limite della significatività ( $p = 0.054$  e  $p = 0.53$ , rispettivamente). Anche in questo caso l'aumento del numero dei pazienti investigati potrebbe meglio definire i valori delle concentrazioni di tali sostanze per i soggetti in esame.

## 3.4 STUDIO LONGITUDINALE.

### 3.4.1 *Risultati*

Al fine di valutare l'effetto dell'intervento chirurgico, l'analisi dell'aria espirata è stata ripetuta nei pazienti NSCLC a due diversi intervalli di tempo dall'intervento chirurgico: dopo un mese ( $T_1$ ) e dopo 3 anni ( $T_2$ ). Dopo un mese dall'intervento chirurgico, "follow up" a breve termine, solo le concentrazioni dell'isoprene evidenziavano una diminuzione statisticamente significativa (Tabella 11). Risultati più chiari sono stati ottenuti nello studio di "follow up" a lungo termine, dopo cioè 3 anni dall'intervento chirurgico. Si conferma l'andamento dell'isoprene per il quale viene evidenziata un'ulteriore diminuzione, in termini di concentrazione, statisticamente significativa rispetto sia al tempo  $T_0$  che  $T_1$ . Anche per altre sostanze dopo 3 anni dall'intervento chirurgico ( $T_2$ ), si evidenziano interessanti variazioni nelle concentrazioni misurate (Figura 10). Fra le sostanze che presentano un calo significativo oltre all'isoprene vi è il benzene, mentre per il 2-metilpentano e l'eptano si vede un solo una tendente diminuzione che non raggiunge però la significatività. In particolare, le concentrazioni di benzene al tempo  $T_2$  risultano statisticamente diminuite sia rispetto al tempo  $T_0$  che  $T_1$ . Tuttavia, solo le concentrazioni di benzene e di eptano al tempo  $T_2$  subiscono un calo tale da non risultare più significativamente diverse rispetto ai controlli, come mostrato in Figura 8.

Altre sostanze come il pentano, il toluene, l'etilbenzene e l'esano evidenziano un aumento significativo al tempo  $T_2$  rispetto ai livelli evidenziati prima dell'intervento chirurgico. In particolare le concentrazioni al tempo  $T_2$  di pentano, toluene ed etilbenzene risultano significativamente aumentate sia rispetto al tempo  $T_0$  che  $T_1$ .

Alla luce dell'andamento altalenante dei VOCs al tempo  $T_2$  dall'intervento chirurgico, risulta interessante confrontare i risultati con quelli ottenuti nei soggetti NSCLC al stadio non operabile. In Figura 8 è riportata la distribuzione delle concentrazioni dei VOCs sia nel gruppo dei pazienti allo tempo  $T_2$  che al stadio non operabile. In particolare per isoprene, 2-metilpentano e benzene vi è un aumento significativo nelle concentrazioni misurate nei soggetti allo stadio non operabile rispetto ai livelli misurati al tempo  $T_2$  e per il solo benzene anche rispetto al tempo  $T_0$ .

D'altra parte altre sostanze che al tempo T2 mostravano un generale aumento in termini di concentrazione rispetto al tempo T0, risultano generalmente diminuite nei pazienti allo stadio non operabile. I risultati più evidenti si hanno con il pentano e l'etilbenzene che risultano diminuiti in modo significativo rispetto al tempo T2 e T0 rispettivamente. In generale per 9 dei 13 VOCs studiati, le concentrazioni allo Stadio non operabile ed al tempo T2 dall'intervento chirurgico risultano significativamente diverse.

### **3.4.2 *Discussione***

I valori di specificità e sensibilità dell'analisi dell'aria espirata hanno evidenziato la validità del pattern dei VOCs selezionati come possibili indicatori di neoplasia polmonare.

In questo modo si è voluto valutare l'effetto dell'intervento stesso, con la conseguente rimozione del tessuto neoplastico sui livelli dei VOCs nell'aria esalata (studio longitudinale). I risultati hanno evidenziato delle differenze statisticamente significative solamente a 3 anni dall'intervento chirurgico (*follow up* a lungo termine) fatta eccezione per l'isoprene la cui diminuzione in termini di concentrazione era risultata significativa già dopo un mese dall'intervento chirurgico.

Per meglio comprendere l'effetto dell'operazione sui livelli dei VOCs esalati, tali risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti nei pazienti con neoplasia non operabile NSCLC allo stadio non operabile, per valutare l'andamento delle sostanze monitorate con il progredire della patologia. Tale condizione rappresenta infatti l'evoluzione della neoplasia NSCLC in quei soggetti dove, proprio la diagnosi tardiva, non ha permesso la resezione chirurgica polmonare.

In generale i risultati hanno evidenziato come alcune delle sostanze, le cui concentrazioni diminuivano al tempo T2, risultavano aumentate con il progredire della malattia, come ad esempio l'isoprene ed il benzene. D'altra parte, alcune delle sostanze che al tempo T2 mostravano un generale aumento in termini di concentrazione rispetto al tempo T0, risultavano generalmente diminuite allo stadio non operabile.

Anche in questo caso un aumento della casistica risulta necessario per una migliore interpretazione dei dati.

### **3.4.3 Conclusioni**

Lo studio del profilo dei composti organici volatili (VOCs) nell'aria esalata di soggetti con tumore polmonare reclutati prima e dopo 3 anni dalla resezione chirurgica della neoplasia, ha mostrato un cambiamento in termini di concentrazione. Con il progredire della neoplasia (stadio non operabile) si è osservata una generale variazione dei VOCs che sembra complementare rispetto a quella osservata dopo l'asportazione della neoplasia.

Ulteriori studi sono tuttora in corso per aumentare sia la casistica dell'indagine post-operatoria, in particolare quella a lungo termine, che quella relativa ai soggetti con tumore polmonare ad uno stadio clinico avanzato, per meglio comprendere l'influenza della progressione della patologia sulla composizione dell'aria esalata.

Tuttavia, va considerato come uno studio longitudinale a lungo termine appaia più difficoltoso a causa dei grandi cambiamenti/differenze nella storia personale e clinica dei pazienti.

## **4 PARTE B) SIGNIFICATO DELLE CONCENTRAZIONI DEI VOCS MISURATI NELL'ARIA ESPIRATA**

L'analisi della frazione volatile dell'aria espirata ha permesso l'identificazione di sostanze di interesse legate allo sviluppo della neoplasia polmonare in accordo con quanto riportato in letteratura da diversi autori (Phillips *et al.*, 1999a), (Phillips *et al.*, 2003a).

Dal profilo cromatografico dell'aria esalata, sono stati selezionati 13 composti sulla base della loro rivelabilità e dell'importanza biologica.

Sebbene l'esatto meccanismo del rilascio dei VOCs nell'espirato debba ancora essere dimostrato, l'analisi delle componenti principali sulle variabili ha permesso la fattorializzazione dei composti in 3 gruppi. Nel primo gruppo sono state statisticamente raggruppate le sostanze di natura principalmente endogena, nel secondo composti prevalentemente esogeni relazionati all'abitudine al fumo ed nel terzo sostanze eterogenee di diversa origine e quindi di più difficile interpretazione.

Prima di ricercare nuovi indicatori di stress ossidativo legati allo sviluppo della neoplasia polmonare, si è cercato di meglio interpretare l'aumento delle concentrazioni dei VOCs nei soggetti NSCLC e di chiarire il ruolo dell'effetto del fumo sia sulle sostanze esogene che su quelle di origine endogena, soprattutto considerando il ruolo peculiare dell'abitudine tabagica nello sviluppo della neoplasia polmonare.

Il monitoraggio dei VOCs nell'aria esalata ha evidenziato come nei pazienti con neoplasia polmonare vi sia un generale aumento sia di sostanze endogene che esogene (es. i BTEX).

L'andamento dei livelli delle sostanze endogene potrebbe essere spiegato dalle condizioni di stress ossidativo che accompagnano lo sviluppo della malattia, mentre di più difficile interpretazione è l'aumento dei livelli di alcune sostanze esogene, come ad esempio gli idrocarburi aromatici.

Particolarmente interessante si è rivelato non solo il benzene, per le note proprietà neoplastiche, ma anche l'etilbenzene le cui concentrazioni hanno permesso di distinguere tra soggetti NSCLC e BPCO ed i controlli. La presenza dei BTEX nell'aria espirata può essere attribuita a condizioni di inquinamento ambientale e/o occupazionale (attuale o pregressa), ma anche all'abitudine al fumo, essendo questi

stessi importanti componenti del fumo di sigaretta. Va infatti considerato che nella maggior parte dei casi, i pazienti NSCLC e BPCO sono ex-fumatori.

Alla luce di queste considerazioni, lo scopo della seconda parte dello studio è stato quello di chiarire il significato dei più alti livelli dei BTEX e dei composti endogeni individuati nell'aria espirata di soggetti NSCLC rispetto ai controlli tramite:

(i) la determinazione dei livelli di BTEX in campioni di tessuto polmonare peritumorale e tumorale di alcuni dei soggetti NSCLC precedentemente studiati,

(ii) la valutazione dell'effetto acuto del fumo di sigaretta sulla presenza di sostanze endogene ed esogene nell'aria espirata.

## **4.1 MATERIALI E METODI**

### **4.1.1 Disegno dello studio-Soggetti**

#### *i) Determinazioni tessutali di BTEX e stirene*

In 27 pazienti NSCLC allo stadio IA e/o IB reclutati presso il Dipartimento di Chirurgia Toracica dell'Università di Parma tra il gennaio 2003 e giugno 2004 ed il gennaio e il novembre del 2007 è stato prelevato durante l'operazione una piccola porzione di tessuto tumorale e peri-tumorale. Nessuno dei pazienti è stato sottoposto a chemioterapia prima dell'intervento chirurgico.

Ogni volontario ha firmato il consenso informato.

#### *ii) Effetto acuto del fumo di sigaretta sul profilo quantitativo dei VOCs selezionati*

Cinque soggetti sani (età  $34.0 \pm 12.1$ ), fumatori occasionali (meno di una sigaretta/die), sono stati reclutati presso il Laboratorio di Tossicologia Industriale del Dipartimento di Clinica Medica Nefrologia e Scienze della Prevenzione per valutare l'effetto acuto del fumo di sigaretta sui livelli dei VOCs. L'aria espirata è stata raccolta prima e, ad intervalli regolari, dopo il consumo di una sigaretta (0, 15, 30, 60 min).

Ogni volontario ha firmato il consenso informato.

### **4.1.2 Analisi del tessuto polmonare**

I campioni di tessuto tumorale e peri-tumorale sono stati prelevati durante l'intervento chirurgico da pazienti con neoplasia NSCLC allo stadio IA e IB.

Porzioni di circa 50-100 mg di tessuto sono state inserite in un sistema a tenuta con una quantità proporzionale di soluzione tampone, sale (0.5 g) per migliorare l'efficienza estrattiva e standard interno (Styrene- $d_8$ , 2  $\mu$ l a  $5 \cdot 10^{-5}$  M).

Ogni campione è stato quindi estratto esponendo una fibra 75 $\mu$ m-Carboxen/PDMS per 20 min a 70°C. La fibra è stata quindi desorbita a 280°C per 5 min nell'iniettore del gas cromatografo (GC) e l'analisi è stata effettuata in Spettrometria di massa (SM) in

modalità di acquisizione *sim*. Le analisi sono state effettuate utilizzando un GC HP 6890 accoppiato con uno SM 5973 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA).

La separazione degli analiti è stata ottenuta utilizzando una colonna capillare Equity™-1 (30 m, 0.25 µm di diametro interno, spessore del film liquido di 0.10 µm; Supelco) utilizzando H<sub>2</sub> come fase mobile al flusso di 1 ml/min.

#### **4.1.3 Raccolta ed analisi dell'aria espirata**

La raccolta e l'analisi dell'aria espirata, nei soggetti invitati al consumo di sigaretta, sono state eseguite secondo la metodica descritta nella prima parte del lavoro.

#### **4.1.4 Analisi Statistica**

La significatività delle differenze tra tessuto tumorale e peri-tumorale è stata verificata mediante il test di Wilcoxon, considerando la distribuzione non normale. La significatività delle differenze tra i livelli di VOCS PRE e a diversi intervalli di tempo dal consumo di una singola sigaretta è stata verificata mediante l'ANOVA per misure ripetute seguita dal test *post-hoc* di Tukey.

## 4.2 RISULTATI

### 4.2.1 *Determinazioni tessutali di idrocarburi aromatici*

Nelle porzioni di tessuto tumorale e peri-tumorale sono state determinate le concentrazioni di idrocarburi aromatici quali BTEX (benzene, toluene, etilbenzene e xileni totali), stirene e trimetilbenzene. I risultati sono riportati in Figura 11.

Si vede chiaramente come le concentrazioni di tutti gli idrocarburi aromatici eccetto quelle degli xileni totali ( $p=0.13$ ) siano significativamente più alte nel tessuto tumorale rispetto a quello peritumorale.

La maggiore differenza di concentrazione si verifica per il benzene ( $p<0.0001$ ) seguito dal toluene ( $p=0.012$ ).

I dati dimostrano quindi la tendenza di un accumulo di tali idrocarburi aromatici, componenti caratteristici del fumo di sigaretta, nel tessuto tumorale.

Questi dati sono in linea con le più elevate concentrazioni di idrocarburi aromatici rilevate nell'aria espirata dei pazienti NSCLC allo stadio IA e IB ed allo stadio non operabile (Figura 8).

Si vede infatti con il progredire della malattia (stadio non operabile) un aumento di benzene, toluene ed etilbenzene rispetto ai soggetti NSCLC ad uno stadio operabile, mentre aumenti generali, seppur non significativi, si vedono per gli xileni ed il trimetilbenzene.

### 4.2.2 *Effetto acuto del fumo di sigaretta*

Per quantificare il contributo del fumo di sigaretta sul *pattern* dei VOCs selezionati, è stata raccolta l'aria espirata in modo seriale prima (PRE) e dopo (a diversi intervalli di tempo: POST, 15 min, 30 min e 60 min) il consumo di una sigaretta.

Tutti VOCs selezionati hanno evidenziato un aumento statisticamente significativo nell'aria espirata PRE e POST per poi ritornare a livelli basali nell'arco di tempo considerato (dati non presentati). Risultati di più chiara interpretazione sono stati ottenuti dal monitoraggio delle sostanze precedentemente classificate come endogene

(isoprene, 2-metilpentano e pentano) e dagli idrocarburi aromatici, in particolare i BTEX.

L'andamento delle concentrazioni a diversi tempi e le relative significatività sono riportate rispettivamente in Figura 12 e in Tabella 12.

Il pentano, il 2-metilpentano e l'isoprene mostrano un andamento simile con un incremento nell'aria espirata POST per poi ritornare ai valori basali entro 15 min. Infatti le concentrazioni misurate nell'aria espirata PRE e dopo 15 min non sono significativamente diverse, mentre lo sono i valori POST, indicando quindi una *clearance* veloce per tali sostanze. L'isoprene presenta un andamento leggermente discostante poiché, pur essendo di origine endogena, è anche presente nel fumo di sigaretta.

Un andamento diverso si ottiene per i BTEX e per il trimetilbenzene, idrocarburi aromatici presenti nel fumo di sigaretta. In figura si vede come tali sostanze presentino una *clearance* più lenta, aspetto più marcato per il benzene ed il toluene. Questi ultimi infatti ritornano a valori simili a quelli PRE dopo circa 60 min, mentre nell'intervallo di tempo precedente le concentrazioni PRE sono sempre significativamente più basse.

Un andamento meno chiaro si vede per l'etilbenzene, gli xileni ed il trimetilbenzene a causa della grande variabilità dei dati e di un incremento nell'aria POST non così spiccato come per il benzene.

### **4.3 DISCUSSIONE**

I risultati dello studio trasversale sulla misura dell'aria espirata in soggetti con patologia polmonare sia NSCLC che BPCO hanno evidenziato non solo un aumento dei livelli degli idrocarburi alifatici derivanti da condizioni di stress ossidativo come ad es. il pentano o il metilpentano, ma anche di altre sostanze legate all'abitudine tabagica come ad esempio i BTEX, composti rappresentativi degli idrocarburi aromatici. Nella casistica considerata, i livelli dei BTEX erano infatti più elevati non solo nei fumatori sani, ma anche nei soggetti NSCLC e BPCO. In particolare, come riportato in Tabella 7, le concentrazioni di tutti i BTEX erano significativamente più alte nei soggetti NSCLC e nei fumatori rispetto ai controlli, ed inoltre il benzene ed il toluene erano

statisticamente diversi anche fra NSCLC e fumatori. Di particolare interesse poi si era rivelato l'etilbenzene le cui concentrazioni erano in grado di distinguere i pazienti NSCLC dai BPCO. Per dare un razionale a questi valori si è proceduto quindi alla determinazione dei BTEX nei tessuti polmonari di alcuni dei pazienti NSCLC valutati.

La determinazione degli altri VOCs monitorati nell'aria esalata non è plausibile a causa dell'elevata volatilità di queste sostanze. I risultati confermano, come ipotizzato, un accumulo di BTEX, di trimetilbenzene e di stirene nel tessuto tumorale rispetto a quello peri-tumorale. Questi risultati sembrerebbero confermare un accumulo degli idrocarburi aromatici nel tessuto tumorale fornendo una possibile chiave di lettura nell'interpretazione delle più elevate concentrazioni dei BTEX nei soggetti con NSCLC rispetto ai controlli.

L'ipotesi di un maggiore accumulo dei BTEX nel tessuto tumorale insieme ad un aumento generale degli altri VOCs è stata poi confermata dai risultati preliminari di uno studio attualmente in corso su pazienti con tumore polmonare ad uno stadio avanzato come riportato nella parte A (Studio Trasversale, Tabella 6) del presente lavoro di ricerca.

Una possibile spiegazione di questo accumulo a livello polmonare può essere data dall'abitudine al fumo di sigaretta poiché, nella quasi totalità dei casi di neoplasia polmonare o di condizione BPCO, viene documentata un'abitudine tabagica attuale e/o pregressa.

E' noto infatti come il fumo di sigaretta sia un sistema bifasico costituito da un porzione gassosa e da una solida (particolato) nelle quali sono dispersi composti organici ed inorganici di nota tossicità (Hoshino *et al.*, 2001).

Il particolato, depositandosi nei polmoni, può dare origini a patologie polmonari (ad es. fibrosi) più o meno gravi e nel contempo creare fenomeni di adsorbimento verso sostanze presenti nel fumo di sigaretta ad alte concentrazioni (es. i BTEX o gli IPA).

Esempi più gravi di esposizione a particolato sono rappresentati da malattie professionali come l'antracosi causata da inalazione prolungata di polvere di carbone. Tale patologia è detta comunemente anche malattia del polmone nero, poiché l'aspetto radiologico del polmone nei casi più gravi è simile a quanto riportato in Figura 13 dove si evidenziano anomalie del parenchima (piccole o grandi opacità), anomalie pleuriche o anomalie aggiuntive (ispessimenti o calcificazioni).

Nonostante il fenomeno del “polmone nero” sia associato ad un’esposizione lavorativa, in letteratura sono stati riportati lavori che evidenziano fenomeni di antracosi legati all’esposizione a fumo di sigaretta o derivante dalla combustione della legna. In particolare nel 1999, Boespflug et al (Boespflug *et al.*, 1999) riportarono il caso di due bambini affetti da antracosi come conseguenza di esposizione passiva a fumo di sigaretta.

E’ ipotizzabile quindi che questo particolato a matrice carbaniosa presente nel fumo di sigaretta, possa depositarsi negli alveoli polmonari favorendo l’adsorbimento degli idrocarburi aromatici presenti ad alte concentrazioni nel fumo. Questa ipotesi è plausibile considerando non solo le note le proprietà adsorbenti del carbone attivo, ma anche documentati fenomeni di adsorbimento di idrocarburi aromatici a carico di strutture sintetiche come ad es. i nanotubi a base di carbonio. Questi composti sono nuovi prodotti artificiali di forma sferica o fibrosa con dimensioni confrontabili con quelle del particolato inalabile (Shih and Li, 2007).

Tutto ciò supporta l’ipotesi che l’esposizione prolungata a fumo di sigaretta e quindi la conseguente deposizione polmonare del particolato presente, possano contribuire al verificarsi di fenomeni di adsorbimento a carico di idrocarburi aromatici, come i BTEX. Le zone tessutali maggiormente danneggiate sarebbero o quelle derivanti da deposizione maggiore e/oppure, proprio per la loro struttura danneggiata, più inclini ad una deposizione polmonare. Questo giustificerebbe non solo la presenza di più alti livelli di idrocarburi aromatici nel tessuto tumorale ma anche il loro l’aumento nell’aria espirata di pazienti con neoplasia rispetto ai soggetti sani.

Valutando l’effetto acuto del fumo sull’aria espirata, raccogliendola prima e dopo il consumo di una sigaretta, queste ipotesi hanno trovato una conferma. I risultati hanno infatti evidenziato aumenti immediati nell’aria espirata delle concentrazioni sia delle sostanze endogene che dei BTEX, seppur con una *clearance* diversa.

I BTEX ed il trimetilbenzene, idrocarburi aromatici presenti nel fumo di sigaretta (Pankow *et al.*, 2004), aumentano nell’aria espirata POST, non perché indotti da condizioni di stress ossidativo ma in quanto costituenti del fumo stesso. In particolare, per il benzene ed il toluene, la cinetica di eliminazione è più lenta poiché i valori basali (PRE) vengono raggiunti dopo circa 60 min dal consumo della sigaretta. Questo effetto è in pieno accordo con quanto riportato in letteratura per il benzene (Jo and Pack, 2000)

ed indica una tendenza degli idrocarburi aromatici ad accumularsi a livello del tessuto polmonare, come confermato anche dai dati precedentemente riportati.

Tale studio ha inoltre confermato per il pentano, il 2-metilpentano e l'isoprene la loro origine endogene direttamente legata alle condizioni di stress ossidativo.

L'aumento delle sostanze endogene è dovuto alla presenza dei radicali liberi presenti nel fumo di sigaretta in grande quantità ed in grado di iniziare o comunque promuovere il danno ossidativo. È stato infatti stimato che nella fase gas di in una singola aspirata di fumo di sigaretta siano contenuti circa  $10^{-7}$  radicali liberi insieme a complessi chinonici/semichinonici che possono produrre specie reattive dell'ossigeno (ROS), come lo ione superossido in grado di attaccare l'epitelio polmonare (Church and Pryor, 1985). Nel presente studio tramite l'analisi dell'aria espirata raccolta prima e dopo il consumo di una sigaretta, è stato dimostrato come la misura del pentano, del 2-metilpentano, del pentametilpentano e dell'isoprene possa fornire delle indicazioni indirette sulla perossidazione lipidica promossa dal fumo di sigaretta, in accordo con quanto riportato in letteratura (Euler *et al.*, 1996).

Anche altri idrocarburi alifatici del *pattern* dei VOCs selezionati subiscono un incremento significativo nell'aria esalata POST rispetto alle condizioni basali. Tuttavia, come descritto nel precedente lavoro, avendo un'origine mista cioè sia endogena che esogena, forniscono delle indicazioni meno chiare.

Invece, proprio l'assenza di pentano e di metilpentano nel fumo di sigaretta e le basse concentrazioni ambientali, rappresentano un'ulteriore conferma della loro origine endogena.

A causa dell'estrema reattività dei radicali liberi, non è però sorprendente che l'aumento della perossidazione lipidica sia temporaneo, come dimostrato dal raggiungimento in circa 15 min dei livelli basali di pentano, 2-metilpentano ed isoprene.

La misura nell'aria espirata degli alcani, la cui origine è legata a condizioni di stress ossidativo risulta perciò un buon metodo non invasivo proprio per valutare lo stress ossidativo a livello polmonare indotto dal consumo di sigaretta. Infatti i livelli di pentano, prodotto dalla perossidazione lipidica a carico degli n-6 acidi grassi polinsaturi, e dal 2-metilpentano, che rappresenta il corrispondente prodotto di metilazione, confermano il loro ruolo come indicatori endogeni di stress ossidativo. Le informazioni fornite dall'isoprene sono invece meno chiare poiché esso rappresenta un

importante composto endogeno nel metabolismo del colesterolo, ma anche uno dei principali idrocarburi alifatici presenti nel fumo di sigaretta (Euler *et al.*, 1996), (Barrefors and Petersson, 1993), (Brunnemann *et al.*, 1990).

## 4.4 CONCLUSIONI

I risultati presentati in questa sezione hanno permesso di chiarire meglio il significato ed il ruolo dei VOCs monitorati nell'aria espirata. In particolare l'analisi di tessuto polmonare ha evidenziato un accumulo di BTEX e di altri idrocarburi aromatici nel tessuto tumorale, giustificandone i più alti livelli nei pazienti con neoplasia polmonare.

L'effetto acuto del fumo di sigaretta sul tessuto polmonare di soggetti sani ha poi indicato un aumento non solo delle concentrazioni dei BTEX presenti nel fumo stesso, ma anche delle sostanze endogene derivanti da condizioni di stress ossidativo a carico dei radicali liberi presenti nel fumo. Tale esperimento ha dimostrato, seppur solo dopo esposizione acuta, la diversa *clearance* di tali sostanze, evidenziando una più lenta cinetica di eliminazione degli idrocarburi aromatici rispetto ai composti di origine endogena. Anche questa informazione sembra supportare l'ipotesi di un loro accumulo a livello del tessuto polmonare, tanto più favorito dalla presenza del particolato nel fumo di sigaretta.

Questi dati sono in accordo con quanto riportato nello studio A del lavoro di ricerca.

## **5 PARTE C) DETERMINAZIONE DI ALDEIDI NELL'ARIA ESPIRATA COME INDICATORI DI NEOPLASIA POLMONARE NON A PICCOLE CELLULE**

La parte A del presente studio ha evidenziato il ruolo di un gruppo selezionato di VOCs come indicatori di neoplasia polmonare, mentre la parte B ne ha chiarito il significato, sia per i composti endogeni che esogeni.

Dai risultati è evidente come nessuna sostanza presa singolarmente sia in grado di discriminare la condizione di neoplasia polmonare da un soggetto sano, soprattutto considerando le pesanti condizioni di confondimento esistenti.

Nonostante la buona sensibilità e specificità dell'analisi dell'aria espirata, è di fondamentale importanza la ricerca di altri composti rappresentativi dello stato di salute del polmone, al fine di poter migliorare la bontà di classificazione di un soggetto.

I risultati hanno evidenziato come importanti informazioni vengano fornite dai livelli delle sostanze endogene, alcune delle quali derivanti da condizioni di stress ossidativo a carico dei lipidi di membrana.

Le aldeidi, rappresentando i prodotti finali di perossidazione lipidica (Halliwell and Chirico, 1993), (Moore and Roberts, 1998), (Meagher and FitzGerald, 2000), potrebbero fornire importanti informazioni come indicatori di danno tessutale.

Infatti, nel processo di stress ossidativo a carico dei lipidi di membrana, le aldeidi  $\alpha,\beta$ -insature, come il trans-2-esenale, il trans-2-eptenale ed il trans-2-nonenale derivano dalla perossidazione degli acidi grassi poliinsaturi  $\omega$ -3 (acido oleico) e  $\omega$ -6 (es. acido arachidonico e acido linoleico), mentre le aldeidi lineari rappresentano invece i prodotti finali di degradazione radicalica come mostrato in Figura 5 (Esterbauer *et al.*, 1991).

In molti lavori viene infatti descritta un associazione tra il tumore al polmone (Deng *et al.*, 2004) e le aldeidi misurate in diverse matrici come il sangue, il condensato dell'aria esalata (EBC), lo sputo indotto ecc., con patologie polmonari come la BPCO (Mutti and Corradi, 2006), (Montuschi, 2005), (Corradi *et al.*, 2004), (Corradi *et al.*, 2003b), l'asma (Corradi *et al.*, 2003a).

La determinazione delle aldeidi lineari nell'EBC presenta però una serie di problemi legati alla loro volatilità nonché alla loro intrinseca instabilità nelle matrici acquose.

Le aldeidi lineari, soprattutto quelle a catena corta, presentano infatti una volatilità non trascurabile e quindi tendono a ripartirsi tra la fase gassosa, recuperata nell'aria espirata,

e quella liquida, recuperata nell'EBC. Inoltre, in soluzione acquosa, essendo il pH leggermente acido, sono favorite le reazioni di condensazione alcolica e di addizione nucleofila che possono determinare una degradazione delle aldeidi stesse a prodotti secondari.

In questa parte del lavoro di tesi viene messo a punto un metodo per la determinazione delle aldeidi volatili lineari e insature nell'aria espirata e quindi investigato il loro ruolo come indicatori nelle neoplasie polmonari NSCLC.

## **5.1 MATERIALI E METODI**

### ***5.1.1 Disegno dello studio-Soggetti***

Da febbraio 2007 è in corso un secondo reclutamento di pazienti NSCLC allo stadio IA ed IB e di controlli asintomatici non fumatori. I gruppi presentano caratteristiche omogenee a quelle dei soggetti precedentemente coinvolti nella determinazione dei VOCs nell'aria espirata (vedi Studio A del presente lavoro di ricerca).

Allo stato attuale sono stati reclutati 21 controlli e 21 pazienti valutati prima (T0) e dopo dell'intervento chirurgico (T1).

Nel caso dei pazienti NSCLC, l'età media è uguale a 66.5 anni, 15 soggetti sono di sesso maschile ed il rapporto fumatore/ex-fumatore/non fumatore è di 5/12/4 mentre nei controlli l'età media è uguale a 45.6 anni e 11 soggetti sono di sesso maschile.

Dei pazienti NSCLC, 13 hanno accettato di ripetere l'analisi 4 mesi dopo l'intervento chirurgico (T1) in accordo con la normale tempistica di controllo post-operatoria. Nessuno dei pazienti è stato sottoposto a chemioterapia prima dell'intervento chirurgico.

Ogni volontario ha firmato il consenso informato.

### ***5.1.2 Raccolta dell'aria espirata***

L'aria espirata è stata raccolta secondo la metodica descritta nella parte A del lavoro di tesi.

### ***5.1.3 Estrazione ed analisi delle aldeidi***

Dopo la raccolta dell'espriato in ogni contenitore è stato aggiunto 1  $\mu$ L di soluzione standard di 2-metilpentanale come standard interno (S.I.). Le aldeidi sono state estratte tramite derivatizzazione utilizzando una fibra SPME 65  $\mu$ m PDMS/DVB (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Come derivatizzante è stato utilizzato il pentafluorobenzil idrossilammina (PFBHA) in grado di trasformare le aldeidi nelle corrispondenti basi di Schiff, trasformandole così in composti volatili più stabili e con un ottimo fattore di risposta di risposta GC/MS.

La reazione di derivatizzazione porta alla formazione di due prodotti per ogni aldeide, uno *cis* ed uno *trans* come illustrato in Figura 14. Per questo motivo ogni aldeide originerà, laddove lo permettono le capacità separative della colonna, due picchi cromatografici.

In una prima fase la fibra è stata caricata per 10 min circa con l'agente derivatizzante tramite esposizione della fibra stessa ai vapori dello spazio di testa e quindi esposta per 1 ora nel Bio-VOC®, secondo la modalità precedentemente descritta.

Gli analiti sono stati quindi desorbiti termicamente a 280°C nell'iniettore del GC e analizzati in GC/MS.

L'analisi GC/MS è stata effettuata secondo la procedura precedentemente descritta enllo Studio A del lavoro di tesi.. L'acquisizione è stata effettuata monitorando lo ione 181, in quanto unico ione derivante dalla frammentazione dei prodotti di derivatizzazione ottenuti.

Ogni sostanza è stata identificata grazie al corrispettivo tempo di ritenzione individuato utilizzando gli standard puri.

In un primo momento sono stati studiati i fattori che coinvolgono il processo di estrazione SPME come l'adsorbimento, il desorbimento e quindi è stata ottimizzata la temperatura di campionamento (dati non riportati). Dopo 60 min di estrazione a temperatura ambiente (22°C) per tutti le aldeidi viene raggiunto l'equilibrio di estrazione. L'analisi non presenta effetti memoria.

Il metodo è stato validato studiando l'intervallo di linearità, il LODs e la precisione.

La linearità è stata studiata nell'intervallo 5-555 pM con  $r^2 > 0.98$ ) ed il LOD, calcolato come rapporto S/N=3, è dell'ordine di 0.5 pM per le diverse aldeidi. La precisione analitica, calcolata come RSD% sullo standard interno è compresa fra 5 e 16% sia per le determinazioni intra-day che inter-days.

Gli standard gassosi sono stati preparati direttamente nel contenitore Bio-VOC aggiungendo 1  $\mu$ L di soluzione standard delle aldeidi in cloroformio, 1  $\mu$ L dello S.I. e 6

$\mu\text{L}$  di acqua deionizzata per saturare di umidità l'aria. Gli standard gassosi così preparati sono stabili per circa 40 ore.

#### **5.1.4 *Analisi statistica***

Nella quasi totalità dei casi, le aldeidi misurate presentano una distribuzione normale. Tuttavia nel caso di confronti studiati nello studio trasversale (Controlli vs NSCLC T0) e longitudinale (NSCLC prima T0 e dopo l'intervento chirurgico T1) sono stati effettuati test non parametrici a causa della limitata casistica al momento a disposizione. In particolare, le differenze fra i controlli ed i pazienti NSCLC sono state valutate con il test di Mann–Whitney, mentre per i risultati ottenuti nell'aria espirata prima PRE e POST intervento chirurgico è stato utilizzato il test di Wilcoxon per misure ripetute. La bontà di classificazione dei pazienti NSCLC e dei controlli è stata calcolata con due metodi: la regressione logistica e l'analisi del discriminante con cross-validazione. Per tutte le analisi statistiche, laddove non è indicato diversamente, è stato considerato un livello di significatività di  $p < 0.05$ .

## **5.2 RISULTATI**

In Figura 15 è descritta la distribuzione delle concentrazioni delle aldeidi nell'aria espirata dei controlli e dei pazienti NSCLC e le corrispondenti differenze significative. Si vede chiaramente come le concentrazioni di tutte le aldeidi, sia quelle lineari che le  $\alpha,\beta$ -insature siano statisticamente più elevate nei pazienti con tumore al polmone rispetto ai controlli. In Tabella 13 sono riportate le concentrazioni in termini di mediana, 25° e 75° percentile.

Lo studio di collinearità fra le diverse variabili ha evidenziato in entrambi i gruppi una correlazione con un  $r > 0.8$  del pentanale con il butanale e l'esanale, dell'ottanale con il pentanale ed il nonanale ed infine la correlazione del nonenale con il suo omologo insaturo (dati non mostrati).

Per valutare il potere discriminante delle aldeidi selezionate fra i gruppi presi in esame, è stata effettuata sia la regressione logistica che l'analisi del discriminante ottenendo risultati perfettamente sovrapponibili ed una classificazione generale superiore al 95% (dati non mostrati).

L'analisi statistica ha altresì evidenziato come il propanale ed il butanale siano le aldeidi che rivestono un peso maggiore nella corretta classificazione dei soggetti tanto che, un'esclusione nell'analisi di tutte le altre aldeidi, porta ad una classificazione generale uguale o superiore al 90% calcolata sia con la regressione logistica che con l'analisi del discriminante (Figura 16A e 16B).

In un secondo momento i pazienti NSCLC sono stati valutati circa 4 mesi dopo l'intervento chirurgico. I risultati delle concentrazioni delle aldeidi studiate e le relative significatività fra i pazienti PRE e POST sono riportati nella Tabella 12.

Solo il propanale, il pentanale e l'esanale risultano significativamente diverse nei malati al tempo T0 rispetto che al tempo T1. Al tempo T1 si vede un generale incremento in termini di concentrazione per le aldeidi da 3 a 6 atomi di carbonio, mentre per quelle da 7 a 9 atomi di carbonio e le aldeidi insature si ha una generale diminuzione delle concentrazioni, seppur non statisticamente significativa. In questo caso un aumento della casistica risulta necessario per una più chiara interpretazione dei dati.

I valori di questo secondo gruppo di aldeidi sono stati quindi confrontati con i controlli usando il test di Mann-Whitney per valutare se, in caso di calo delle concentrazioni, i livelli si assestassero a valori simili a quelli dei controlli.

I risultati evidenziano una differenza significativa nei pazienti al tempo T1 ed i controlli solo per l'eptanale ed il trans-2-nonenale.

### **5.3 DISCUSSIONE**

La grande sensibilità del metodo di estrazione SPME seguito dall'analisi in GC/MS ha permesso la determinazione delle aldeidi nell'aria espirata in concentrazioni dell'ordine delle pmoli per litro. La derivatizzazione delle sostanze sulla fibra ne ha garantito la stabilità, a fronte della loro elevata reattività, permettendo così un'elevata riproducibilità dell'analisi. Inoltre la trasformazione delle corrispondenti immine ne ha aumentato la volatilità nonché i fattori di risposta GC/MS, permettendone l'identificazione nell'espriato.

Il confronto fra controlli asintomatici e pazienti NSCLC ha evidenziato come le concentrazioni di tutte le aldeidi fossero significativamente più alte nei malati.

Nell'analisi statistica dei risultati è stato utilizzato il test non parametrico di Mann-Whitney per la scarsa numerosità dei gruppi in esame (n=21).

Questi risultati sono in accordo con l'ipotesi di una loro origine a carico dei processi di perossidazione lipidica. Infatti, se le aldeidi lineari sature possono essere presenti anche negli ambienti di lavoro e di vita, quelle insature sono invece attribuibili in modo univoco ad una produzione endogena.

E' necessario tuttavia completare lo studio valutando anche altre variabili che possono rappresentare dei fattori di confondimento ed in modo particolare l'abitudine al fumo di sigaretta.

Risultati interessanti sono stati ottenuti anche nello studio longitudinale considerando cioè il profilo delle aldeidi prima (T0) e 4 mesi dopo (T1) l'intervento chirurgico. Analogamente ai VOCs precedentemente studiati, anche alcune aldeidi subiscono un incremento in alcuni casi significativo (dall'aldeide C3 alla C6) rispetto alla situazione PRE (T0). Altre invece presentano una generale riduzione nei livelli che, pur non raggiungendo la significatività, in alcuni casi riporta i livelli delle concentrazioni statisticamente uguali a quelli dei controlli.

In questo studio i pazienti sono stati rivisti dopo 4 mesi dall'intervento chirurgico in relazione ai risultati ottenuti nello studio sui VOCs. Tale studio aveva infatti evidenziato l'assenza di variazioni significative (fatta eccezione per l'isoprene) a breve termine, cioè dopo 1 mese dall'intervento chirurgico, rispetto alla situazione pre-operatoria. Dati interessanti erano invece stati ottenuti dopo 3 anni dall'intervento stesso, mentre tempistiche intermedie non erano state incluse nello studio. Al di là degli interessanti risultati ottenuti a lungo termine, bisogna considerare la difficoltà nel reclutare i pazienti dopo un così lungo periodo dall'intervento chirurgico proprio per la storia clinica e personale dei pazienti stessi. Per questo motivo in questo studio è stato considerato un ulteriore reclutamento dei pazienti ad un intervallo di tempo intermedio.

Per valutare le differenze PRE e POST-operatorie, è stato utilizzato il test non parametrico per misure ripetute di Wilcoxon.

Prima dello studio di classificazione dei soggetti è stata verificata la multicollinearità fra le diverse aldeidi in entrambi i gruppi. In particolare, una correlazione di r superiore a 0.8 (vedi risultati) ci ha permesso di ridurre le variabili considerate nei modelli (da 10 a 7) escludendo il pentanale, l'ottanale ed il trans-2-nonenale. E' interessante notare come alcune aldeidi lineari di dimensioni simili correlino fra di loro (ad es. C5 vs C4 e C6

opp C8 vs C9) così come il nonanale verso il suo corrispondente insaturo, evidenziando la possibile via comune di produzione endogena.

Sia nel caso della regressione logistica che nell'analisi del discriminante, il propanale ed il butanale rappresentavano le variabili a maggior peso di classificazione, mentre modesti erano i contributi forniti dalle altre aldeidi.

Considerando quindi solo le aldeidi a maggior significato (C3 e C4) la classificazione generale risulta superiore al 90%. La bontà di classificazione è stata calcolata con due metodi: la regressione logistica e l'analisi del discriminante con cross-validazione, ottenendo dei risultati perfettamente consistenti fra di loro (Figura 15A e 15B). Una classificazione generale superiore al 92% è stata ottenuta includendo nell'analisi tutte le variabili escluso quelle che avevano mostrato collinearità. A fronte del modesto numero di soggetti considerati (controlli non fumatori-NSCLC), il propanale ed il butanale mostravano un preponderante potere classificatorio, evidenziando contemporaneamente l'alta sensibilità e specificità del metodo (2 aldeidi necessarie rispetto ai 13 VOCs del precente studio).

Va però ricordato, che in questo caso non sono stati considerati altri gruppi come i fumatori o i pazienti di BPCO, che rappresentano importanti fattori di confondimento, ma soprattutto come un aumento della casistica sia necessario per confermare i risultati ottenuti.

D'altra parte, questo studio suggerisce un uso combinato delle analisi dei VOCs e delle aldeidi con lo scopo di individuare un *pattern* di composti più limitato (ad es.  $n < 10$ ) ma con maggiore potere discriminante per la neoplasia polmonare.

## 5.4 CONCLUSIONI

La grande sensibilità del metodo di analisi sviluppato ha permesso la determinazione delle aldeidi in un singolo atto respiratorio, nonostante le basse concentrazioni.

I risultati del lavoro hanno evidenziato il possibile ruolo delle aldeidi nell'espriato come indicatori di stress ossidativo, mostrando inoltre un ottimo potere discriminante nel confronto controllo/malati.

Per confermare i dati è però necessario un aumento della casistica nonché la valutazione di altri fattori di confondimento quali l'abitudine tabagica e/o l'effetto di altre patologie polmonari (as es. BPCO).

## 6 CONCLUSIONE DEL LAVORO DI TESI

Il presente lavoro di ricerca ha evidenziato le potenzialità dell'analisi dell'aria espirata nella problematica della diagnosi del tumore al polmone.

La particolare non invasività del metodo di raccolta del campione relativo ad un singolo atto respiratorio, ne permette l'applicabilità anche in condizioni cliniche e psicologiche particolarmente difficili.

I risultati delle determinazioni dei livelli dei VOCs selezionati (idrocarburi alifatici ed aromatici) presenti nell'aria esalata ha evidenziato come nessuna sostanza possa candidarsi come indicatore univoco di effetto e che solo la compenetrazione di tutte le informazioni ottenute permette di raggiungere una classificazione globale superiore all'80%.

La potenzialità di tale studio è evidenziata anche dai buoni valori di sensibilità e specificità, confrontabili con quelli descritti per altre tecniche, come ad es. la PET.

La validità del gruppo di sostanze selezionate è stata confermata dai risultati complementari ottenuti sia valutando i soggetti a distanza dall'intervento chirurgico, che considerando l'effetto della progressione della malattia.

L'analisi dei tessuti polmonari di alcuni pazienti NSCLC e lo studio dell'effetto acuto del fumo di sigaretta sul profilo dei VOCs, ha contribuito nel fornire utili indicazioni sul significato e sull'origine di alcune delle sostanze considerate. In particolare è stato confermato il risultato ottenuto dall'analisi fattoriale e cioè l'origine endogena a carico dei processi di stress ossidativo di alcuni idrocarburi alifatici, e quella esogena legata all'abitudine al fumo degli idrocarburi aromatici. Questi esperimenti hanno infatti dimostrato come gli idrocarburi aromatici, presenti in grandi quantità nel fumo di sigaretta, tendano ad accumularsi a livello del tessuto tumorale, dando così un razionale alle più alte concentrazioni misurate nei pazienti affetti da neoplasia polmonare.

Infine, nella logica della ricerca di ulteriori indicatori di danno polmonare, la determinazione delle aldeidi nell'aria espirata ha confermato l'importanza delle informazioni fornite dai composti derivanti dalla perossidazione lipidica a carico dei PUFAs delle membrane cellulari.

Infatti le concentrazioni delle aldeidi lineari e di quelle insature si sono confermate significativamente più alti nei pazienti NSCLC rispetto ai controlli.

I risultati incoraggianti ottenuti, suggeriscono la selezione di un numero più limitato e mirato di sostanze, con lo scopo di migliorare i i valori di sensibilità e di specificità del metodo.

Il presente lavoro di ricerca ha dimostrato come i composti volatili nell'aria espirata possano ricoprire un ruolo importante nella moderna diagnostica, costituendo un test veloce e non invasivo in grado di implementare le informazioni ottenute con le più avanzate tecniche di *imaging*.

Questo affascinante obiettivo richiede necessariamente un ampliamento della casistica, ma soprattutto la necessità di studiarne la trasferibilità sui grandi numeri, per poter testare la reale potenzialità dell'aria espirata nella diagnosi precoce del tumore al polmone.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- Aghdassi, E., and Allard, J. P. (2000). Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions. *Free Radic Biol Med* **28**, 880-886.
- Alberg, A. J., and Samet, J. M. (2003). Epidemiology of lung cancer. *Chest* **123**, 21S-49S.
- American Society of Clinical Oncology (1997). Clinical practice guidelines for the treatment of unresectable non-small-cell lung cancer. Adopted on May 16, 1997 by the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* **15**, 2996-3018.
- Andriani, F., Conte, D., Mastrangelo, T., Leon, M., Ratcliffe, C., Roz, L., Pelosi, G., Goldstraw, P., Sozzi, G., and Pastorino, U. (2004). Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers. *Int J Cancer* **108**, 91-96.
- Armstrong, P. (1994). Preoperative computed tomographic scanning for staging lung cancer. *Thorax* **49**, 941-943.
- Arthur, C. L., and Pawliszyn, J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry* **62**, 2145-2148.
- Bach, P. B., Elkin, E. B., Pastorino, U., Kattan, M. W., Mushlin, A. I., Begg, C. B., and Parkin, D. M. (2004). Benchmarking lung cancer mortality rates in current and former smokers. *Chest* **126**, 1742-1749.
- Bach, P. B., Jett, J. R., Pastorino, U., Tockman, M. S., Swensen, S. J., and Begg, C. B. (2007). Computed tomography screening and lung cancer outcomes. *JAMA* **297**, 953-961.
- Bardin-Mikolajczak, A., Lissowska, J., Zaridze, D., Szeszenia-Dabrowska, N., Rudnai, P., Fabianova, E., Mates, D., Navratilova, M., Bencko, V., Janout, V., Fevotte, J., Fletcher, T., t Mannetje, A., Brennan, P., and Boffetta, P. (2007). Occupation and risk of lung cancer in Central and Eastern Europe: the IARC multi-center case-control study. *Cancer Causes Control* **18**, 645-654.
- Barkley, J., Bunch, J., Bursey, J. T., Castillo, N., Cooper, S. D., Davis, J. M., Erickson, M. D., Harris, B. S., 3rd, Kirkpatrick, M., Michael, L. C., Parks, S. P., Pellizzari, E. D., Ray, M., Smith, D., Tomer, K. B., Wagner, R., and Zweidinger, R. A. (1980). Gas chromatography mass spectrometry computer analysis of volatile halogenated hydrocarbons in man and his environment--A multimedia environmental study. *Biomed Mass Spectrom* **7**, 139-147.
- Barrefors, G., and Petersson, G. (1993). Assessment of ambient volatile hydrocarbons from tobacco smoke and from vehicle emissions. *J Chromatogr* **643**, 71-76.
- Boespflug, M. D., Bourliere-Najean, B., Panuel, M., Petit, P., Doucet, V., Gentet, J. C., Dubus, J. C., and Devred, P. (1999). Pulmonary anthracosis in children. *Eur Radiol* **9**, 485-486.
- Boffetta, P., Agudo, A., Ahrens, W., Benhamou, E., Benhamou, S., Darby, S. C., Ferro, G., Fortes, C., Gonzalez, C. A., Jockel, K. H., Krauss, M., Kreienbrock, L., Kreuzer, M., Mendes, A., Merletti, F., Nyberg, F., Pershagen, G., Pohlabein, H., Riboli, E., Schmid, G., Simonato, L., Tredaniel, J., Whitley, E., Wichmann, H. E., Winck, C., Zambon, P., and Saracci, R. (1998). Multicenter case-control study of exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer in Europe. *J Natl Cancer Inst* **90**, 1440-1450.

- Bray, F., Tyczynski, J. E., and Parkin, D. M. (2004). Going up or coming down? The changing phases of the lung cancer epidemic from 1967 to 1999 in the 15 European Union countries. *Eur J Cancer* **40**, 96-125.
- Brunnemann, K. D., Kagan, M. R., Cox, J. E., and Hoffmann, D. (1990). Analysis of 1,3-butadiene and other selected gas-phase components in cigarette mainstream and sidestream smoke by gas chromatography-mass selective detection. *Carcinogenesis* **11**, 1863-1868.
- Buccheri, G. (1994). Chemotherapy and survival in non-small cell lung cancer. Three years later. *Chest* **106**, 990-992.
- Buccheri, G. (1996). Is there a standard treatment for locally advanced non-small cell lung cancer? *Chest* **109**, 864-866.
- Buccheri, G. F., Ferrigno, D., Rosso, A., and Vola, F. (1990). Further evidence in favour of chemotherapy for inoperable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **6**, 87-98.
- Bunyaviroch, T., and Coleman, R. E. (2006). PET evaluation of lung cancer. *J Nucl Med* **47**, 451-469.
- Caglieri, A., Goldoni, M., Acampa, O., Andreoli, R., Vettori, M. V., Corradi, M., Apostoli, P., and Mutti, A. (2006). The effect of inhaled chromium on different exhaled breath condensate biomarkers among chrome-plating workers. *Environ Health Perspect* **114**, 542-546.
- Cao, W., and Duan, Y. (2006). Breath analysis: potential for clinical diagnosis and exposure assessment. *Clin Chem* **52**, 800-811.
- Chen, B. H., Hong, C. J., Pandey, M. R., and Smith, K. R. (1990). Indoor air pollution in developing countries. *World Health Stat Q* **43**, 127-138.
- Chen, H. Y., Yu, S. L., Chen, C. H., Chang, G. C., Chen, C. Y., Yuan, A., Cheng, C. L., Wang, C. H., Terng, H. J., Kao, S. F., Chan, W. K., Li, H. N., Liu, C. C., Singh, S., Chen, W. J., Chen, J. J., and Yang, P. C. (2007). A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **356**, 11-20.
- Cheng, W. H., and Lee, W. J. (1999). Technology development in breath microanalysis for clinical diagnosis. *J Lab Clin Med* **133**, 218-228.
- Church, D. F., and Pryor, W. A. (1985). Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* **64**, 111-126.
- Coleman, R. E. (1999). PET in lung cancer. *J Nucl Med* **40**, 814-820.
- Conkle, J. P., Camp, B. J., and Welch, B. E. (1975). Trace composition of human respiratory gas. *Arch Environ Health* **30**, 290-295.
- Cope, K. A., Watson, M. T., Foster, W. M., Sehnert, S. S., and Risby, T. H. (2004). Effects of ventilation on the collection of exhaled breath in humans. *J Appl Physiol* **96**, 1371-1379.
- Corradi, M., Folesani, G., Andreoli, R., Manini, P., Bodini, A., Piacentini, G., Carraro, S., Zanconato, S., and Baraldi, E. (2003a). Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 395-399.
- Corradi, M., Pignatti, P., Manini, P., Andreoli, R., Goldoni, M., Poppa, M., Moscato, G., Balbi, B., and Mutti, A. (2004). Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation. *Eur Respir J* **24**, 1011-1017.
- Corradi, M., Rubinstein, I., Andreoli, R., Manini, P., Caglieri, A., Poli, D., Alinovi, R., and Mutti, A. (2003b). Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 1380-1386.

- Cuomo, A., Franciosi, V., Gabrielli, M., and Carbognani, P. (2000). Polmone. In *Patologia toracica di interesse chirurgico* (M. Medica, Ed.), pp. 8-26.
- Dales, R. E., Stark, R. M., and Raman, S. (1990). Computed tomography to stage lung cancer. Approaching a controversy using meta-analysis. *Am Rev Respir Dis* **141**, 1096-1101.
- Darrall, K. G., Figgins, J. A., Brown, R. D., and Phillips, G. F. (1998). Determination of benzene and associated volatile compounds in mainstream cigarette smoke. *Analyt* **123**, 1095-1101.
- Deng, C., Zhang, X., and Li, N. (2004). Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **808**, 269-277.
- Dockery, D. W., Pope, C. A., 3rd, Xu, X., Spengler, J. D., Ware, J. H., Fay, M. E., Ferris, B. G., Jr., and Speizer, F. E. (1993). An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* **329**, 1753-1759.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* **11**, 81-128.
- Euler, D. E., Dave, S. J., and Guo, H. (1996). Effect of cigarette smoking on pentane excretion in alveolar breath. *Clin Chem* **42**, 303-308.
- Ezzati, M., Lopez, A. D., Rodgers, A., Vander Hoorn, S., and Murray, C. J. (2002). Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet* **360**, 1347-1360.
- Ferrigno, D., and Buccheri, G. (1994). Cranial computed tomography as a part of the initial staging procedures for patients with non-small-cell lung cancer. *Chest* **106**, 1025-1029.
- Feskanich, D., Ziegler, R. G., Michaud, D. S., Giovannucci, E. L., Speizer, F. E., Willett, W. C., and Colditz, G. A. (2000). Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1812-1823.
- Flehinger, B. J., Kimmel, M., and Melamed, M. R. (1992). The effect of surgical treatment on survival from early lung cancer. Implications for screening. *Chest* **101**, 1013-1018.
- Fong, K. M., Sekido, Y., Gazdar, A. F., and Minna, J. D. (2003). Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* **58**, 892-900.
- Fontana, R. S., Sanderson, D. R., Woolner, L. B., Taylor, W. F., Miller, W. E., Muhm, J. R., Bernatz, P. E., Payne, W. S., Pairolero, P. C., and Bergstralh, E. J. (1991). Screening for lung cancer. A critique of the Mayo Lung Project. *Cancer* **67**, 1155-1164.
- Freudenberg, L. S., Rosenbaum, S. J., Beyer, T., Bockisch, A., and Antoch, G. (2007). PET versus PET/CT dual-modality imaging in evaluation of lung cancer. *Radiol Clin North Am* **45**, 639-644, v.
- Gallone, L., and Cantaluppi, G. (2005). Polmoni e pleure. In *Chirurgia* (C. E. Ambrosiana, Ed.).
- Gao, Y. T., Blot, W. J., Zheng, W., Ershow, A. G., Hsu, C. W., Levin, L. I., Zhang, R., and Fraumeni, J. F., Jr. (1987). Lung cancer among Chinese women. *Int J Cancer* **40**, 604-609.
- Gauger, J., Patz, E. F., Jr., Coleman, R. E., and Herndon, J. E., 2nd (2007). Clinical stage I non-small cell lung cancer including FDG-PET Imaging: sites and time to recurrence. *J Thorac Oncol* **2**, 499-505.

- Goldoni, M., Catalani, S., De Palma, G., Manini, P., Acampa, O., Corradi, M., Bergonzi, R., Apostoli, P., and Mutti, A. (2004). Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten. *Environ Health Perspect* **112**, 1293-1298.
- Gordon, S. M., Szidon, J. P., Krotoszynski, B. K., Gibbons, R. D., and O'Neill, H. J. (1985). Volatile organic compounds in exhaled air from patients with lung cancer. *Clin Chem* **31**, 1278-1282.
- Gresner, P., Gromadzinska, J., and Wasowicz, W. (2007). Polymorphism of selected enzymes involved in detoxification and biotransformation in relation to lung cancer. *Lung Cancer* **57**, 1-25.
- Haiman, C. A., Stram, D. O., Wilkens, L. R., Pike, M. C., Kolonel, L. N., Henderson, B. E., and Le Marchand, L. (2006). Ethnic and racial differences in the smoking-related risk of lung cancer. *N Engl J Med* **354**, 333-342.
- Halliwell, B., and Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* **57**, 715S-724S; discussion 724S-725S.
- Hebert, J. R., and Kabat, G. C. (1990). Differences in dietary intake associated with smoking status. *Eur J Clin Nutr* **44**, 185-193.
- Hecht, S. S. (2002). Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol* **3**, 461-469.
- Henschke, C. I., and Yankelevitz, D. F. (2000). CT screening for lung cancer. *Radiol Clin North Am* **38**, 487-495, viii.
- Hisamura, M. (1979). [Quantitative analysis of methyl mercaptan and dimethyl sulfide in human expired alveolar gas and its clinical application: study in normal subjects and patients with liver diseases (author's transl)]. *Nippon Naika Gakkai Zasshi* **68**, 1284-1292.
- Hoffmann, D., Hoffmann, I., and El-Bayoumy, K. (2001). The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol* **14**, 767-790.
- Horvath, I., Hunt, J., Barnes, P. J., Alving, K., Antczak, A., Baraldi, E., Becher, G., van Beurden, W. J., Corradi, M., Dekhuijzen, R., Dweik, R. A., Dwyer, T., Effros, R., Erzurum, S., Gaston, B., Gessner, C., Greening, A., Ho, L. P., Hohlfeld, J., Jobsis, Q., Laskowski, D., Loukides, S., Marlin, D., Montuschi, P., Olin, A. C., Redington, A. E., Reinhold, P., van Rensen, E. L., Rubinstein, I., Silkoff, P., Toren, K., Vass, G., Vogelberg, C., and Wirtz, H. (2005). Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* **26**, 523-548.
- Hoshino, Y., Mio, T., Nagai, S., Miki, H., Ito, I., and Izumi, T. (2001). Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L509-516.
- Humphrey, L. L., Teutsch, S., and Johnson, M. (2004). Lung cancer screening with sputum cytologic examination, chest radiography, and computed tomography: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* **140**, 740-753.
- IARC (1986). Cumulative Index to IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* **39**, 379-403.
- IARC (2004). Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **83**, 1-1438.
- Ihde, D. C., and Minna, J. D. (1991). Non-small cell lung cancer. Part I: Biology, diagnosis, and staging. *Curr Probl Cancer* **15**, 61-104.

- Jemal, A., Chu, K. C., and Tarone, R. E. (2001). Recent trends in lung cancer mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst* **93**, 277-283.
- Jemal, A., Clegg, L. X., Ward, E., Ries, L. A., Wu, X., Jamison, P. M., Wingo, P. A., Howe, H. L., Anderson, R. N., and Edwards, B. K. (2004). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer* **101**, 3-27.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., and Thun, M. J. (2006). Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* **56**, 106-130.
- Jo, W. K., and Pack, K. W. (2000). Utilization of breath analysis for exposure estimates of benzene associated with active smoking. *Environ Res* **83**, 180-187.
- Johnson, B. E., and Kelley, M. J. (1993). Overview of genetic and molecular events in the pathogenesis of lung cancer. *Chest* **103**, 1S-3S.
- Jones, A. W., Lagesson, V., and Tagesson, C. (1995). Determination of isoprene in human breath by thermal desorption gas chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* **672**, 1-6.
- Kaji, H., Hisamura, M., Saito, N., and Murao, M. (1978). Evaluation of volatile sulfur compounds in the expired alveolar gas in patients with liver cirrhosis. *Clin Chim Acta* **85**, 279-284.
- Kelly, R. F., Tran, T., Holmstrom, A., Murar, J., and Segurolo, R. J., Jr. (2004). Accuracy and cost-effectiveness of [18F]-2-fluoro-deoxy-D-glucose-positron emission tomography scan in potentially resectable non-small cell lung cancer. *Chest* **125**, 1413-1423.
- Kharitonov, S. A., and Barnes, P. J. (2001). Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 1693-1722.
- Kneepkens, C. M., Ferreira, C., Lepage, G., and Roy, C. C. (1992). The hydrocarbon breath test in the study of lipid peroxidation: principles and practice. *Clin Invest Med* **15**, 163-186.
- Kneepkens, C. M., Lepage, G., and Roy, C. C. (1994). The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* **17**, 127-160.
- Kobitz, L. (2000). Il polmone. In *Le basi patologiche delle malattie* (Piccin, Ed.), pp. 869-877.
- Kostelc, J. G. (1981). Saliva signals ovulation. *Clinical Chemistry* **7**, 1-10.
- Krotoszynski, B., Gabriel, G., and O'Neil, H. (1977). Characterization of human expired air: a promising investigative and diagnostic technique. *J Chromatogr Sci* **15**, 239-244.
- Lam, S., MacAulay, C., leRiche, J. C., and Palcic, B. (2000). Detection and localization of early lung cancer by fluorescence bronchoscopy. *Cancer* **89**, 2468-2473.
- Lam, S., and Shibuya, H. (1999). Early diagnosis of lung cancer. *Clin Chest Med* **20**, 53-61, x.
- Landreneau, R. J., Sugarbaker, D. J., Mack, M. J., Hazelrigg, S. R., Luketich, J. D., Fetterman, L., Liptay, M. J., Bartley, S., Boley, T. M., Keenan, R. J., Ferson, P. F., Weyant, R. J., and Naunheim, K. S. (1997). Wedge resection versus lobectomy for stage I (T1 N0 M0) non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* **113**, 691-698; discussion 698-700.
- Laroche, C., Wells, F., Coulden, R., Stewart, S., Goddard, M., Lowry, E., Price, A., and Gilligan, D. (1998). Improving surgical resection rate in lung cancer. *Thorax* **53**, 445-449.
- Lechner, M., Moser, B., Niederseer, D., Karlseder, A., Holzknecht, B., Fuchs, M., Colvin, S., Tilg, H., and Rieder, J. (2006). Gender and age specific differences in exhaled isoprene levels. *Respir Physiol Neurobiol* **154**, 478-483.

- Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori (1999). *Libro bianco sul fumo*.
- Li, R., Todd, N. W., Qiu, Q., Fan, T., Zhao, R. Y., Rodgers, W. H., Fang, H. B., Katz, R. L., Stass, S. A., and Jiang, F. (2007). Genetic deletions in sputum as diagnostic markers for early detection of stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 482-487.
- Lord, H., and Pawliszyn, J. (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *J Chromatogr A* **885**, 153-193.
- Lubin, J. H., and Caporaso, N. E. (2006). Cigarette smoking and lung cancer: modeling total exposure and intensity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**, 517-523.
- Machado, R. F., Laskowski, D., Deffenderfer, O., Burch, T., Zheng, S., Mazzone, P. J., Mekhail, T., Jennings, C., Stoller, J. K., Pyle, J., Duncan, J., Dweik, R. A., and Erzurum, S. C. (2005). Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 1286-1291.
- Maddaus, M., and Ginsbers, R. S. (1995). Diagnosis and staging. In *Thoracic surgery* (C. Livingstone, Ed.), pp. 671-690.
- Manser, R. L., Irving, L. B., Stone, C., Byrnes, G., Abramson, M., and Campbell, D. (2004). Screening for lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001991.
- Marcus, P. M., Bergstrahl, E. J., Fagerstrom, R. M., Williams, D. E., Fontana, R., Taylor, W. F., and Prorok, P. C. (2000). Lung cancer mortality in the Mayo Lung Project: impact of extended follow-up. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1308-1316.
- Marcus, P. M., Bergstrahl, E. J., Zweig, M. H., Harris, A., Offord, K. P., and Fontana, R. S. (2006). Extended lung cancer incidence follow-up in the Mayo Lung Project and overdiagnosis. *J Natl Cancer Inst* **98**, 748-756.
- Margolis, M. L., Hyzy, J. B., Schenken, L. L., and Schepart, B. S. (1994). Serum tumor markers in non-small cell lung cancer. A comparative analysis. *Cancer* **73**, 605-609.
- McCarthy, P. M., and Jelsing, N. C. (2000). An advocacy perspective on screening and early diagnosis of lung cancer. *Cancer* **89**, 2510-2514.
- McWilliams, A. M., Mayo, J. R., Ahn, M. I., MacDonald, S. L., and Lam, S. C. (2006). Lung cancer screening using multi-slice thin-section computed tomography and autofluorescence bronchoscopy. *J Thorac Oncol* **1**, 61-68.
- Meagher, E. A., and FitzGerald, G. A. (2000). Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med* **28**, 1745-1750.
- Mentzer, S. J., Swanson, S. J., DeCamp, M. M., Bueno, R., and Sugarbaker, D. J. (1997). Mediastinoscopy, thoracoscopy, and video-assisted thoracic surgery in the diagnosis and staging of lung cancer. *Chest* **112**, 239S-241S.
- Miekisch, W., Schubert, J. K., and Noeldge-Schomburg, G. F. (2004). Diagnostic potential of breath analysis--focus on volatile organic compounds. *Clin Chim Acta* **347**, 25-39.
- Miekisch, W., Schubert, J. K., Vagts, D. A., and Geiger, K. (2001). Analysis of volatile disease markers in blood. *Clin Chem* **47**, 1053-1060.
- Miller, A. B., Altenburg, H. P., Bueno-de-Mesquita, B., Boshuizen, H. C., Agudo, A., Berrino, F., Gram, I. T., Janson, L., Linseisen, J., Overvad, K., Rasmuson, T., Vineis, P., Lukanova, A., Allen, N., Amiano, P., Barricarte, A., Berglund, G., Boeing, H., Clavel-Chapelon, F., Day, N. E., Hallmans, G., Lund, E., Martinez, C., Navarro, C., Palli, D., Panico, S., Peeters, P. H., Quiros, J. R., Tjonneland, A., Tumino, R., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Slimani, N., and Riboli, E. (2004). Fruits and vegetables and lung cancer: Findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* **108**, 269-276.

- Minna, J. D. (2002). Neoplasie del polmone. In *Principi di medicina interna* (M. Hill, Ed.), pp. 662-673.
- Mitsui, T., and Kondo, T. (2003). Inadequacy of theoretical basis of breath methylated alkane contour for assessing oxidative stress. *Clin Chim Acta* **333**, 91; author reply 93-94.
- Mitsui, T., Naitoh, K., Tsuda, T., Hirabayashi, T., and Kondo, T. (2000). Is endogenous isoprene the only coeluting compound in the measurement of breath pentane? *Clin Chim Acta* **299**, 193-198.
- Montuschi, P. (2005). Exhaled breath condensate analysis in patients with COPD. *Clin Chim Acta* **356**, 22-34.
- Moore, K., and Roberts, L. J., 2nd (1998). Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res* **28**, 659-671.
- Morabia, A., and Wynder, E. L. (1990). Dietary habits of smokers, people who never smoked, and exsmokers. *Am J Clin Nutr* **52**, 933-937.
- Mountain, C. F. (1997). Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* **111**, 1710-1717.
- Mumford, J. L., He, X. Z., Chapman, R. S., Cao, S. R., Harris, D. B., Li, X. M., Xian, Y. L., Jiang, W. Z., Xu, C. W., Chuang, J. C., and et al. (1987). Lung cancer and indoor air pollution in Xuan Wei, China. *Science* **235**, 217-220.
- Mutti, A., and Corradi, M. (2006). Recent developments in human biomonitoring: non-invasive assessment of target tissue dose and effects of pneumotoxic metals. *Med Lav* **97**, 199-206.
- Nitadori, J., Inoue, M., Iwasaki, M., Otani, T., Sasazuki, S., Nagai, K., and Tsugane, S. (2006). Association between lung cancer incidence and family history of lung cancer: data from a large-scale population-based cohort study, the JPHC study. *Chest* **130**, 968-975.
- O'Neill, H. J., Gordon, S. M., O'Neill, M. H., Gibbons, R. D., and Szidon, J. P. (1988). A computerized classification technique for screening for the presence of breath biomarkers in lung cancer. *Clin Chem* **34**, 1613-1618.
- Osada, H., and Takahashi, T. (2002). Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* **21**, 7421-7434.
- Ost, D., Shah, R. D., Fein, D., and Fein, A. M. (2003). To screen or not to screen: a volatile issue in lung cancer. *Chest* **123**, 1788-1792.
- Panani, A. D., and Roussos, C. (2006). Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Lett* **239**, 1-9.
- Pankow, J. F., Luo, W., Tavakoli, A. D., Chen, C., and Isabelle, L. M. (2004). Delivery levels and behavior of 1,3-butadiene, acrylonitrile, benzene, and other toxic volatile organic compounds in mainstream tobacco smoke from two brands of commercial cigarettes. *Chem Res Toxicol* **17**, 805-813.
- Papi, A., Casoni, G., Caramori, G., Guzzinati, I., Boschetto, P., Ravenna, F., Calia, N., Petruzzelli, S., Corbetta, L., Cavallese, G., Forini, E., Saetta, M., Ciaccia, A., and Fabbri, L. M. (2004). COPD increases the risk of squamous histological subtype in smokers who develop non-small cell lung carcinoma. *Thorax* **59**, 679-681.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**, 74-108.
- Parkin, D. M., Pisani, P., and Ferlay, J. (1993). Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* **54**, 594-606.

- Pastorino, U., Bellomi, M., Landoni, C., De Fiori, E., Arnaldi, P., Picchio, M., Pelosi, G., Boyle, P., and Fazio, F. (2003). Early lung-cancer detection with spiral CT and positron emission tomography in heavy smokers: 2-year results. *Lancet* **362**, 593-597.
- Patz, E. F., Jr. (2006). Lung cancer screening, overdiagnosis bias, and reevaluation of the Mayo Lung Project. *J Natl Cancer Inst* **98**, 724-725.
- Patz, E. F., Jr., and Goodman, P. C. (2001). Low-dose spiral computed tomography screening for lung cancer: not ready for prime time. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 813-814.
- Patz, E. F., Jr., Goodman, P. C., and Bepler, G. (2000). Screening for lung cancer. *N Engl J Med* **343**, 1627-1633.
- Peto, R., Darby, S., Deo, H., Silcocks, P., Whitley, E., and Doll, R. (2000). Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ* **321**, 323-329.
- Petty, T. L. (2000). The early identification of lung carcinoma by sputum cytology. *Cancer* **89**, 2461-2464.
- Phillips, M. (1997). Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath. *Anal Biochem* **247**, 272-278.
- Phillips, M., Cataneo, R. N., Cummin, A. R., Gagliardi, A. J., Gleeson, K., Greenberg, J., Maxfield, R. A., and Rom, W. N. (2003a). Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. *Chest* **123**, 2115-2123.
- Phillips, M., Cataneo, R. N., Greenberg, J., Grodman, R., Gunawardena, R., and Naidu, A. (2003b). Effect of oxygen on breath markers of oxidative stress. *Eur Respir J* **21**, 48-51.
- Phillips, M., Cataneo, R. N., Greenberg, J., Gunawardena, R., Naidu, A., and Rahbari-Oskoui, F. (2000). Effect of age on the breath methylated alkane contour, a display of apparent new markers of oxidative stress. *J Lab Clin Med* **136**, 243-249.
- Phillips, M., Gleeson, K., Hughes, J. M., Greenberg, J., Cataneo, R. N., Baker, L., and McVay, W. P. (1999a). Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. *Lancet* **353**, 1930-1933.
- Phillips, M., Herrera, J., Krishnan, S., Zain, M., Greenberg, J., and Cataneo, R. N. (1999b). Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **729**, 75-88.
- Picozzi, G., Paci, E., Lopez Pegna, A., Bartolucci, M., Roselli, G., De Francisci, A., Gabrielli, S., Masi, A., Villari, N., and Mascalchi, M. (2005). Screening of lung cancer with low dose spiral CT: results of a three year pilot study and design of the randomised controlled trial "Italung-CT". *Radiol Med (Torino)* **109**, 17-26.
- Pitkanen, O. M., Hallman, M., and Andersson, S. M. (1989). Determination of ethane and pentane in free oxygen radical-induced lipid peroxidation. *Lipids* **24**, 157-159.
- Poli, D., Carbognani, P., Corradi, M., Goldoni, M., Acampa, O., Balbi, B., Bianchi, L., Rusca, M., and Mutti, A. (2005). Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study. *Respir Res* **6**, 71.
- Raab, S. S., Hornberger, J., and Raffin, T. (1997). The importance of sputum cytology in the diagnosis of lung cancer: a cost-effectiveness analysis. *Chest* **112**, 937-945.
- Rooth, G., and Ostenson, S. (1966). Acetone in alveolar air, and the control of diabetes. *Lancet* **2**, 1102-1105.

- Routh, J. L. (1976). Liver function. In *Fundamentals of Clinical Chemistry*.
- Sanchez-Cespedes, M. (2003). Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis. *Lung Cancer* **40**, 111-121.
- Shaham, D. (2000). Semi-invasive and invasive procedures for the diagnosis and staging of lung cancer. I. Percutaneous transthoracic needle biopsy. *Radiol Clin North Am* **38**, 525-534.
- Shih, Y. H., and Li, M. S. (2007). Adsorption of selected volatile organic vapors on multiwall carbon nanotubes. *J Hazard Mater*.
- Shivapurkar, N., Stastny, V., Suzuki, M., Wistuba, II, Li, L., Zheng, Y., Feng, Z., Hol, B., Prinsen, C., Thunnissen, F. B., and Gazdar, A. F. (2007). Application of a methylation gene panel by quantitative PCR for lung cancers. *Cancer Lett* **247**, 56-71.
- Shriver, S. P., Bourdeau, H. A., Gubish, C. T., Tirpak, D. L., Davis, A. L., Luketich, J. D., and Siegfried, J. M. (2000). Sex-specific expression of gastrin-releasing peptide receptor: relationship to smoking history and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **92**, 24-33.
- Simenhoff, M. L., Burke, J. F., Saukkonen, J. J., Ordinario, A. T., and Doty, R. (1977). Biochemical profile of uremic breath. *N Engl J Med* **297**, 132-135.
- Smith, I. E. (1999). Screening for lung cancer: time to think positive. *Lancet* **354**, 86-87.
- Sobin, L. H. (1981). The international histological classification of tumours. *Bull World Health Organ* **59**, 813-819.
- Sozzi, G. (2001). Molecular biology of lung cancer. *Eur J Cancer* **37 Suppl 7**, S63-73.
- Sozzi, G., Conte, D., Leon, M., Ciricione, R., Roz, L., Ratcliffe, C., Roz, E., Cirenei, N., Bellomi, M., Pelosi, G., Pierotti, M. A., and Pastorino, U. (2003). Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* **21**, 3902-3908.
- Spitz, M. R., Wei, Q., Dong, Q., Amos, C. I., and Wu, X. (2003). Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**, 689-698.
- Stone, B. G., Besse, T. J., Duane, W. C., Evans, C. D., and DeMaster, E. G. (1993). Effect of regulating cholesterol biosynthesis on breath isoprene excretion in men. *Lipids* **28**, 705-708.
- Strauss, G. M. (2002). The Mayo Lung Cohort: a regression analysis focusing on lung cancer incidence and mortality. *J Clin Oncol* **20**, 1973-1983.
- Testa, V., Facchini, U., and Bianchi, A. (1999). Abitudine al fumo di sigaretta e tumore del polmone. *Medico e paziente* **10**, 48-53.
- Tsai, J.-H., Chiang, H.-L., Hsu, Y.-C., Weng, H.-C., and Yang, C.-Y. (2003). The speciation of volatile organic compounds (VOCs) from motorcycle engine exhaust at different driving modes. *Atmospheric Environment* **37**, 2485-2496.
- Tyczynski, J. E., Bray, F., Aareleid, T., Dalmas, M., Kurtinaitis, J., Plesko, I., Pompe-Kirn, V., Stengrevics, A., and Parkin, D. M. (2004). Lung cancer mortality patterns in selected Central, Eastern and Southern European countries. *Int J Cancer* **109**, 598-610.
- Vineis, P., Hoek, G., Krzyzanowski, M., Vigna-Taglianti, F., Veglia, F., Airoidi, L., Overvad, K., Raaschou-Nielsen, O., Clavel-Chapelon, F., Linseisen, J., Boeing, H., Trichopoulou, A., Palli, D., Krogh, V., Tumino, R., Panico, S., Bueno-De-Mesquita, H. B., Peeters, P. H., Lund, E. E., Agudo, A., Martinez, C., Dorronsoro, M., Barricarte, A., Cirera, L., Quiros, J. R., Berglund, G., Manjer, J., Forsberg, B., Day, N. E., Key, T. J., Kaaks, R., Saracci, R., and Riboli, E. (2007). Lung cancers attributable to environmental tobacco smoke and air

- pollution in non-smokers in different European countries: a prospective study. *Environ Health* **6**, 7.
- Wei, Q., Cheng, L., Amos, C. I., Wang, L. E., Guo, Z., Hong, W. K., and Spitz, M. R. (2000). Repair of tobacco carcinogen-induced DNA adducts and lung cancer risk: a molecular epidemiologic study. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1764-1772.
- Wingo, P. A., Ries, L. A., Giovino, G. A., Miller, D. S., Rosenberg, H. M., Shopland, D. R., Thun, M. J., and Edwards, B. K. (1999). Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst* **91**, 675-690.

## 8 APPENDICE

Durante il periodo del dottorato di ricerca in Scienze della Prevenzione mi sono occupata principalmente sullo studio della frazione volatile dell'aria espirata con lo scopo di identificare e quantificare molecole di interesse quali importanti indicatori di stress ossidativo collegati alla neoplasia polmonare.

Tale attività di ricerca è iniziata nell'ambito del progetto della Ricerca Finalizzata 2003 "Strategie ed indicatori innovativi per la valutazione delle interazioni gene-ambiente nei tumori polmonari professionali". Gli incoraggianti dati preliminari qui presentati hanno permesso di contribuire all'assegnazione del Programma di Ricerca Regione-Università 2007-2009 "Early molecular diagnosis of lung cancer".

D'altra parte, durante gli anni del dottorato di ricerca, la mia attività mi ha portato ad affrontare la problematica di "Scienze della Prevenzione" in altre tematiche, grazie soprattutto alla strumentazione a mia disposizione (gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa).

In particolare, una cospicua parte del lavoro è stata svolta all'interno del progetto europeo "Toxic threats to the developing nervous system: in vivo and in vitro studies on the effects of mixture of neurotoxic substances potentially contaminating food" (acronimo: DEVNERTO 506143). Lo scopo del progetto è stato quello di mettere a punto modelli *in vitro* e *in vivo* per lo studio della neurotossicità di miscele di sostanze tossiche normalmente presenti in matrici ambientali. In particolare ho sviluppato ed applicato metodi per la determinazione di selezionati policlorobifenili (PCBs) in diverse matrici biologiche e in linee cellulari con lo scopo di valutare le cinetiche di eliminazione degli xenobiotici sia *in vivo* che *in vitro*. Ho infine contribuito allo studio dell'effetto di co-esposizione dei PCBs con Metilmercurio su sistemi cellulari dopaminergici.

Ho collaborando inoltre al progetto di ricerca finanziata dal MIUR: "A mechanistic research approach to in vitro methods for toxicology testing" prot. 2004051890-002 con lo scopo iniziale di caratterizzare la citotossicità dell'estratto di fumo di sigaretta (EFS) in relazione alla composizione della sua fase gassosa (VOCs). In particolare, ho studiato la citotossicità dell'estratto di fumo di sigaretta (EFS) e la relativa bio-disponibilità

delle diverse sostanze selezionate in linee cellulari rappresentative dell'epitelio polmonare umano.

Nell'ambito della problematica di esposizione occupazionale e ambientale, mi sono occupata della determinazione di sostanze clorurate in campioni biologici di soggetti esposti sia negli ambienti di vita che di lavoro. Tale approccio metodologico è stato poi applicato in una situazione di emergenza causata dalla contaminazione dell'acqua di rete in un sistema di dialisi.

riguardanti la speciazione del Cromo nell'aria esalata di lavoratori professionalmente esposti e la determinazione di idrocarburi aromatici quali BTEX in matrici biologiche di taxisti professionalmente esposti al traffico autoveicolare.

Infine la mia attività di ricerca è stata rivolta alla determinazione del protossido di azoto in diverse matrici biologiche autoptiche e in aria in un caso fatale di sostituzione della linea dell'ossigeno con quella dell'anestetico in un reparto di terapia intensiva. Il lavoro ha avuto come scopo la dimostrazione della reale asfissia dei pazienti a carico del protossido di azoto, dimostrando come tale gas in concentrazioni particolarmente elevate sia in grado di permanere nei tessuti anche diversi giorni dopo il decesso. risultati scientifici di ricerca sono stati pubblicati su riviste nazionali ed internazionali mentre altri sono in corso di stesura.

## Publicazioni Internazionali

(1° Gennaio 2005-31 Dicembre 2007)

1. A. Vitalone., A. Catalani, V. Chiodi, C. Cinque, V. Fattori, M. Goldoni, P. Matteucci, D. Poli, A. R. Zuena and L. G. Costa, *Neurobehavioral assessment of rats exposed to low doses of PCB126 and methyl mercury during development*, Environmental Toxicology and Pharmacology, In Press, Accepted Manuscript, Available online 26 September 2007
2. Goldoni Matteo, Cagliari A, Poli D, Vettori MV, Ceccatelli S, Mutti A. *Methylmercury at low doses modulates the toxicity of PCB153 on PC12 neuronal cell line in asynchronous combination experiments*. **Food and Chemical Toxicology** (2007). In press.
3. M.Goldoni, A.Cagliari, M.Corradi, D.Poli, M.Rusca, P.Carbognani, A.Mutti. “*Chromium in exhaled breath condensate and pulmonary tissue of non-small cell lung cancer patients*” Int. Arch. Occupat. Environ. Health, Aug. 28, (2007)
4. Teresa Coccini, Elisa Roda, Anna F. Castoldi, Matteo Goldoni, Diana Poli, Graziella Bernocchi and Luigi Manzo. “*Perinatal co-exposure to methylmercury and PCB153 or PCB126 in rats alters the cerebral cholinergic muscarinic receptors at weaning and puberty*”, Toxicology, 238 (2007) 34-48
5. P.Manini, G.De Palma, R.Andreoli, D.Poli, P.Mozzoni, G.Folesani, A.Mutti and P.Apostoli, “*Environmental and biological monitoring of benzene exposure in a cohort of Italian taxi drivers*”, Toxicology Letters, Toxicology Letters, Toxicol Lett. 2006 167(2):142-51.
6. Vettori M.V., Goldoni M., Cagliari A., Poli D, Ceccatelli S., Mutti A. “*Antagonistic effects of methyl-mercury and PCB153 on PC12 cells after a combined and simultaneous exposure*”. Food Chem Toxicol. 2006 Sep;44(9):1505-1512. Epub 2006 Apr 26.
7. Matteo Goldoni, Andrea Cagliari, Diana Poli, Maria Vittoria Vettori, Massimo Corradi, Pietro Apostoli, Antonio Mutti, “*Determination of hexavalent Chromium in exhaled breath condensate and in environmental air among chrome plating workers*”, Analytica Chimica Acta, 562 (2), March 2006: 229-235
8. D. Poli, L. Pavone, P. Tansinda, M. Goldoni, D. Tagliavini, S. david, A. Mutti, I. Franchini. *Organic contamination in dialysis water: trichloroethylene as a model compound*. Nephrol Dial Transplant. 2006 21(6):1618-25
9. Goldoni M, Cagliari A, Andreoli R, Poli D, Manini P, Vettori MV, Corradi M, Mutti A. *Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters*. BMC Pulmonary Medicine (2005) 5: 10.
10. Poli D, Carbognani Pi., Corradi M., Acampa O., Balbi B., Bianchi L., Rusca M., A Mutti. *Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study*. Respir Res. 2005 Jul 14;6(1):71

11. Poli D., Manini P., Andreoli R., Franchini I., Mutti A. *Determination of dichloromethane, trichloroethylene and perchloroethylene in urine samples by headspace solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry* .J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2005 Jun 5;820(1):95-102.

### **Atti di Congressi pubblicati su riviste internazionali (1° Gennaio 2005-31 Dicembre 2007)**

1. Poli D., Caglieri A, Goldoni M, Vettori MV, Coccini T, Castoldi AF, Ceccatelli S, Mutti A. PCB153 and methylmercury (MeHg) assessment of target tissues doses in rats after single and combined exposures: mothers versus pups comparisons. *Toxicology Letters*, 2006, 164 (Suppl. 1), S177-S178.
2. Goldoni M, Vettori MV, Caglieri A, Poli D., Folesani G, Ceccatelli S, Mutti A. Competitive and additive effects of methylmercury and PCB153 on PC12 cells viabilità, lipidic peroxidation products (TBARS) and dopamine levels. *Toxicology Letters*, 2006, 164 (Suppl. 1), S211.
3. E. Roda, T. Coccini, M.V. Vettori, D. Poli, A. Caglieri, L. Manzo and A.F. Castoldi Effects of in utero and lactational exposure to methylmercury and PCB153 on cerebral dopaminergic receptors in rats at weaning and puberty. *Toxicology Letters*, 2006, 164 (Suppl. 1), S77-78.
4. L Pavone, D. Poli, P Tansinda, M Goldoni, D Tagliavini, A Mutti, I Franchini, V Cambi, S David, "Trichloroethylene water contamination in hemodialysis centre" XLII Congress of the ERA-EDTA, June 4-7, 2005, Istanbul, Turkey Nephrology Dialysis Transplantation 2005 Jun; 20 (Suppl 5) : v 331

### **Comunicazioni a congressi**

#### **(1° Gennaio 2005-31 Dicembre 2007)**

1. "Biological monitoring of benzene exposure in Italian traffic policemen" G. De Palma, P.Manini, D.Poli, P.Apostoli, A.Mutti, *Atti del Seventh International Symposium on Biological Monitoring in Occupational & Environmental Health*, Beijing, China, 10-12 Sept, 2007
2. "Effects of gestational and lactational exposure to PCB 126 and methylmercury on circulating steroid hormone levels at weaning and puberty in rat" T.Coccini, A.Bongiorno, A.F.Castoldi, E.Roda, A.Viatalone, L.G.Costa, M.Goldoni, D.Poli, A.Mutti, L.Manzo, *Atti del 44<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology*, Amsterdam, The Netherlands, 07-10 October, 2007
3. "SPME-GC/MS method for rapid determination of PCBs in rat tissues: comparison with SPE and liquid/liquid extraction", D.Poli, M.Goldoni, A.Caglieri, R.Andreoli, A.F.Castoldi, T.Coccini, E.Roda, S.Ceccatelli and A.Mutti. *Atti del Congresso di Spettrometria di Massa 2007, Italian Annual Meeting on Mass Spectrometry*, Lucca , Italia, 2-5 Settembre 2007.

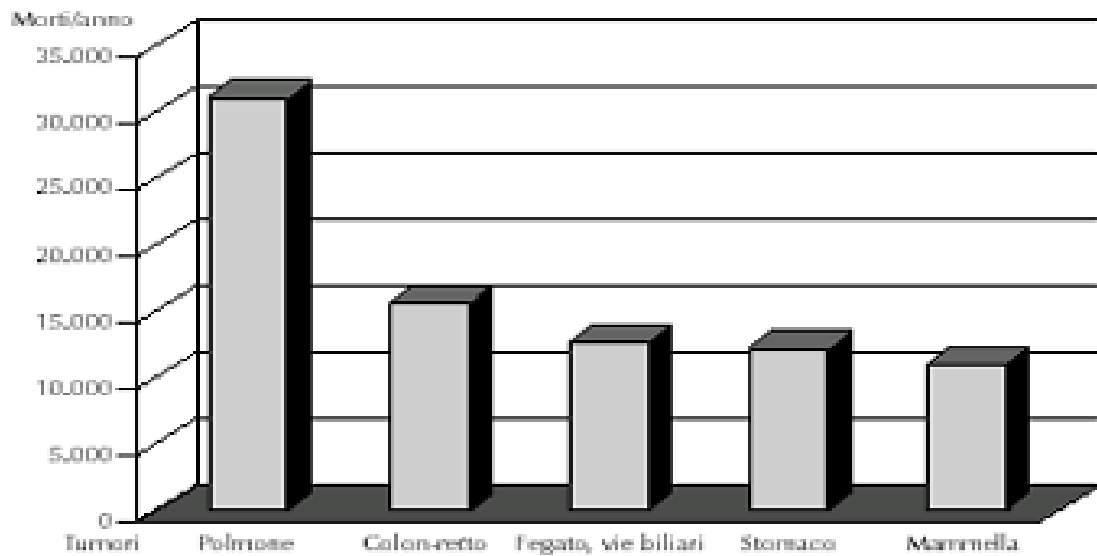
4. *"PCB126 and Methylmercury (MeHg) target dose in rat brain after single or combined mother exposure: pups vs mothers comparison"* D.Poli, A.Caglieri, M.Goldoni., M.V.Vettori, A.Vitalone, G.L.Costa, B.Piedrafita, V.Felipo, S.Ceccatelli, A.Mutti, Atti dell'International Conference on Food Contaminants and Neurodevelopment Disorders, Valencia, Spagna, 3-5 Dicembre 2006
5. *"Actual dose of Methylmercury and PCB153 in rat developing brain after mother single and combined exposure"* D.Poli, M.Goldoni., A.Caglieri, M.V.Vettori, A.F.Castoldi, T.Coccini, E.Roda, K.Sitarek, S.Gralewicz, B.Piedrafita, V.Felipo, S.Ceccatelli., A.Mutti, Atti dell'International Conference on Food Contaminants and Neurodevelopment Disorders, Valencia, Spagna, 3-5 Dicembre 2006
6. *"Purity of PCB126 and PCB153 assessed by solid phase extraction and GC/MS analysis"* D.Poli, M.Goldoni., A.Caglieri, M.V.Vettori, V.Felipo, S.Ceccatelli., A.Mutti, Atti dell'International Conference on Food Contaminants and Neurodevelopment Disorders, Valencia, Spagna, 3-5 Dicembre, 2006
7. *"Effects of Methylmercury and PCB153 on two neuronal cell lines after single and combined exposure"* A.Caglieri, M.Goldoni., M.V.Vettori, D.Poli, G.Folesani, S.Ceccatelli., A.Mutti, Atti dell'International Conference on Food Contaminants and Neurodevelopment Disorders, Valencia, Spagna, 3-5 Dicembre 2006
8. *"Effects on developmental exposure to Methylmercury and PCB153 on cerebral dopamine D1-like and D-2 like receptors in weaning and pubertal rats"* A.F.Castoldi, E.Roda, T.Coccini, M.Goldoni., D.Poli, M.V.Vettori, L.Manzo, Atti dell'International Conference on Food Contaminants and Neurodevelopment Disorders, Valencia, Spagna, 3-5 Dicembre 2006
9. *"Effects of developmental exposure to Methylmercury on cholinergic receptors at the weaning and puberty in rat"* E.Roda, T.Coccini, A.F.Castoldi, A.Bongiorno, D.Poli, M.Goldoni., L.Manzo, Atti dell'International Conference on Food Contaminants and Neurodevelopment Disorders, Valencia, Spagna, 3-5 Dicembre 2006
10. *"Biomarkers in exhaled breath condensate of chrome-planting workers"* Goldoni M., Caglieri A., Poli D., Acampa O., Andreoli R., Vettori M.V., Corradi M., Apostoli P., Mutti A.. Atti del 28<sup>th</sup> International Congress on Occupational Health (ICOH), Milano, Italia, Giugno 11-16, 2006
11. *"Environmental and biological monitoring of benzene exposure in taxi drivers"* Andreoli R., Manini P., De Palma G., Mozzoni P., Poli D., Folesani G., Scotti E., Catalani ., Mutti A., Apostoli P., Atti del 28<sup>th</sup> International Congress on Occupational Health (ICOH), Milano, Italia, Giugno 11-16, 2006
12. *"Sviluppo di un modello matematico per valutare gli effetti in vitro dell'esposizione combinata a Metil-mercurio e PCB153"* Vettori M.V., Goldoni M., Caglieri A, Poli D., Folesani G., Ceccatelli S., Mutti A., Atti del XIV Congresso Nazionale della Società Italiana di Tossicologia (SITOX), Roma, 6-9 Febbraio 2006
13. *"Utilizzo di un modello in vitro per lo studio della biodisponibilità di alcuni VOCs presenti nel fumo di sigaretta"* D. Poli; M.V. Vettori, M. Goldoni; A. Caglieri; S.Carnevali; I. Franchini, A. Mutti, ,

Atti del XIV Congresso Nazionale della Società Italiana di Tossicologia (SITOX), Roma, 6-9 Febbraio 2006

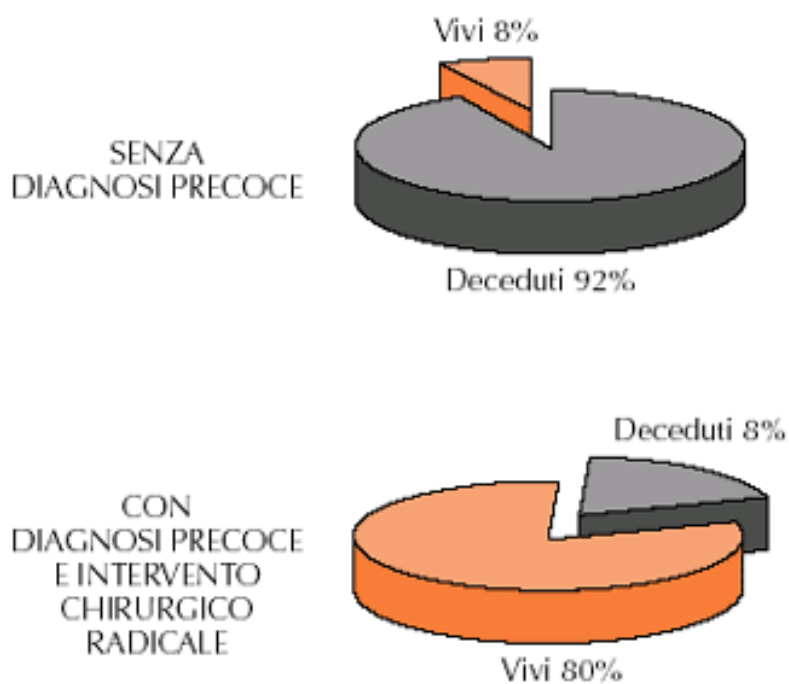
14. *“Monitoraggio biologico dell’esposizione a benzene”* R. Andreoli, P. Manini, G. De Palma, D. Poli, P. Mozzoni, G. Casillo, R. Bergonzi, S.Catalani, P. Apostoli, A. Mutti. Atti del 68° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale (SIMLII), Parma, 5-8 Ottobre 2005, pp. 86-87
15. *“I composti organici volatili nell’aria esalata come inquinanti ambientali e come indicatori di patologia (tumore) polmonare”* D. Poli, M. Goldoni, M. Corradi, P. Carbognani, B. Balbi, M. Rusca, S. Salvagni, V. Franciosi, A. Mutti. Atti del 68° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale (SIMLII), Parma, 5-8 Ottobre 2005, pp. 92-93
16. *“Speciazione del cromo nel condensato dell’aria espirata di cromatori a spessore: dati preliminari”* M. Goldoni, M. Corradi, P. Apostoli, A. Caglieri, D. Poli, S. Catalani, M.V. Vettori, A. Mutti Atti del 68° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale (SIMLII), Parma 5-8 Ottobre 2005, pp. 328-330
17. *“Bioavailability of selected VOCs as assessed by SPME/GC/MS in pulmonary cell cultures exposed to cigarette smoke”* Diana Poli; Maria Vittoria Vettori, Matteo Goldoni; Andrea Caglieri; Massimo Corradi, Stefano Carnevali; Antonio Mutti Atti del Congresso di Spettrometria di Massa 2005, An International Symposium on Mass Spectrometry, Roma 28 Giugno – 1° Luglio 2005

## **9 FIGURE**

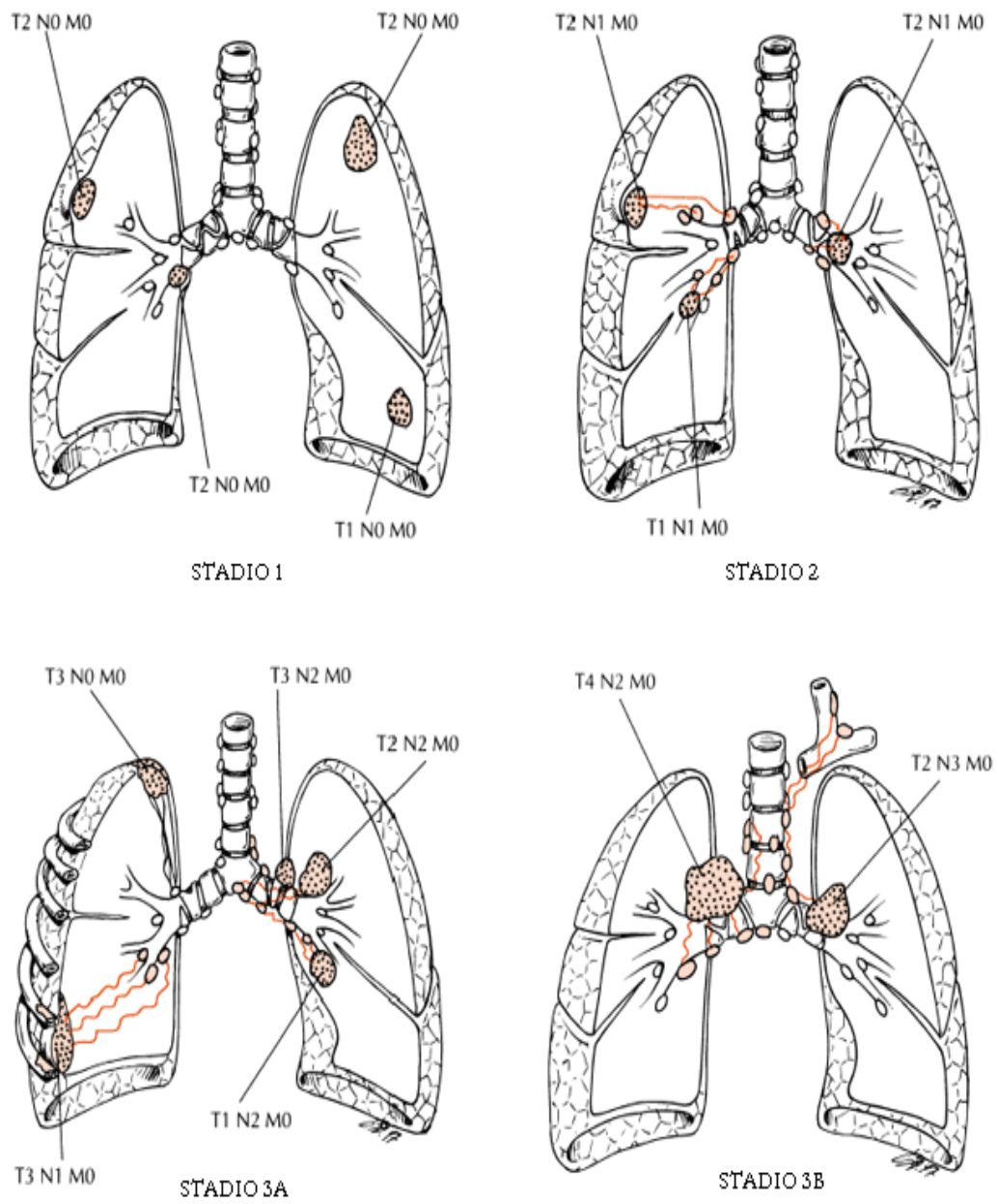
**Figura 1.** Numero di morti/anno per tumore in Italia (dati ISTAT, 2005).



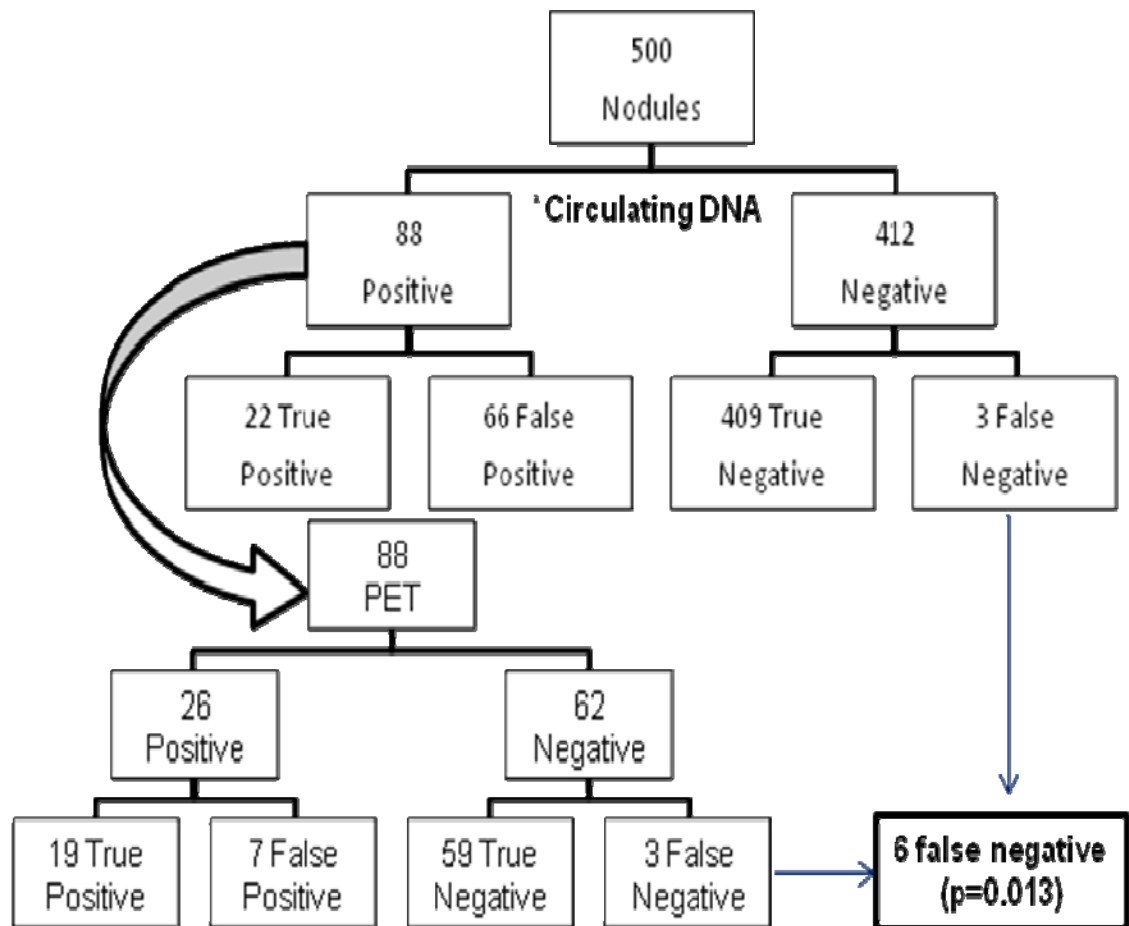
**Figura 2.** Carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC): sopravvivenza a 5 anni.



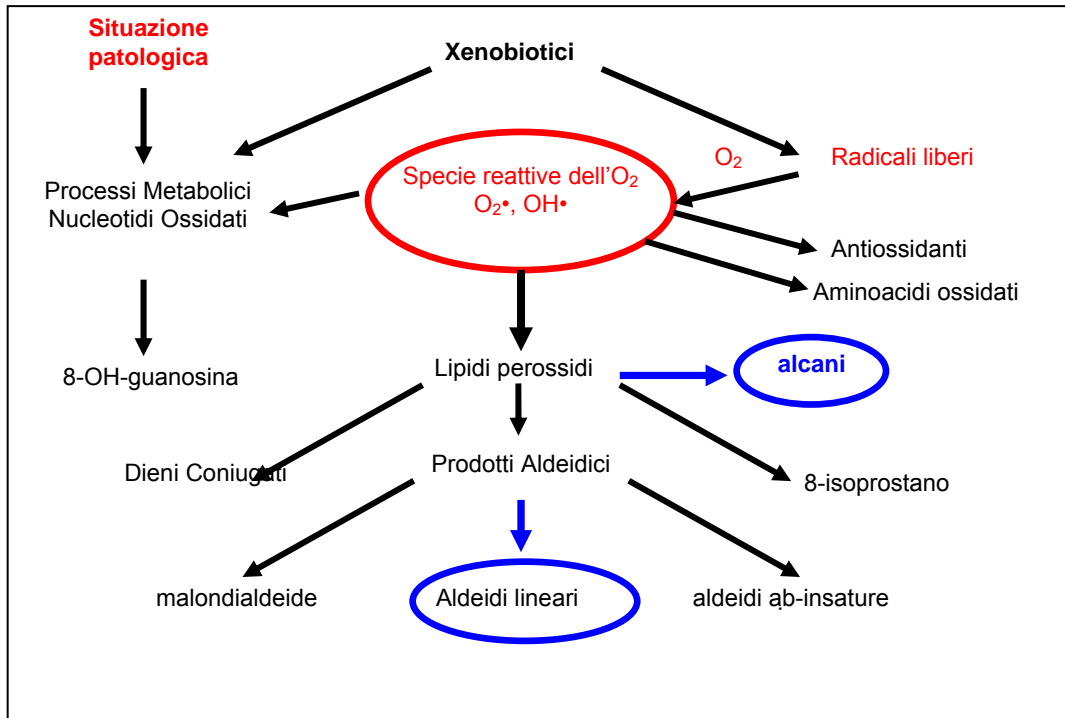
**Figura 3.** Stadi del carcinoma polmonare secondo Mountain.



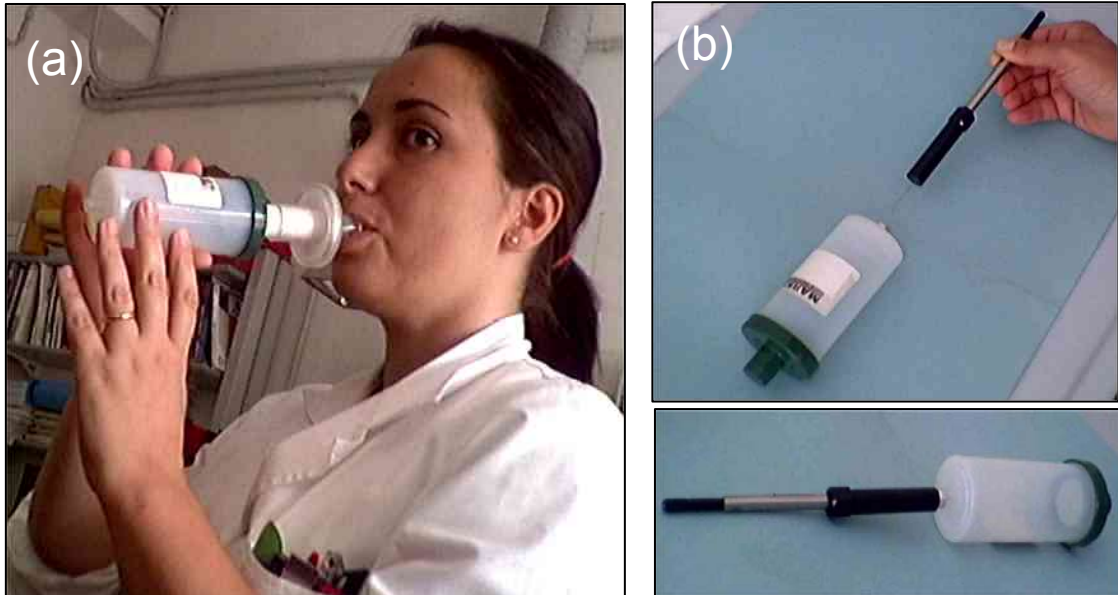
**Figura 4.** Simulazione effettuata considerando 500 casi/anno di soggetti che mostrano noduli solitari non calcificici alla CT a cui applicare il test del DNA circolante seguito dalla PET. Schemi simili possono essere ottenuti applicando prima della PET anche altre tecniche non invasive come ad esempio l'analisi dell'aria espirata.



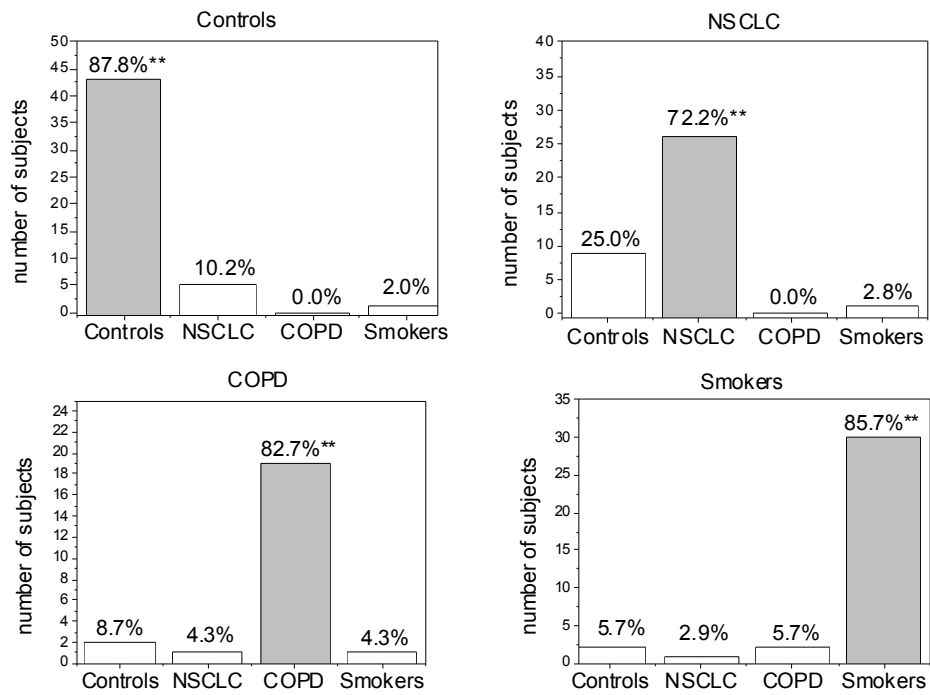
**Figura 5.** Pathway dello stress ossidativo a carico delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).



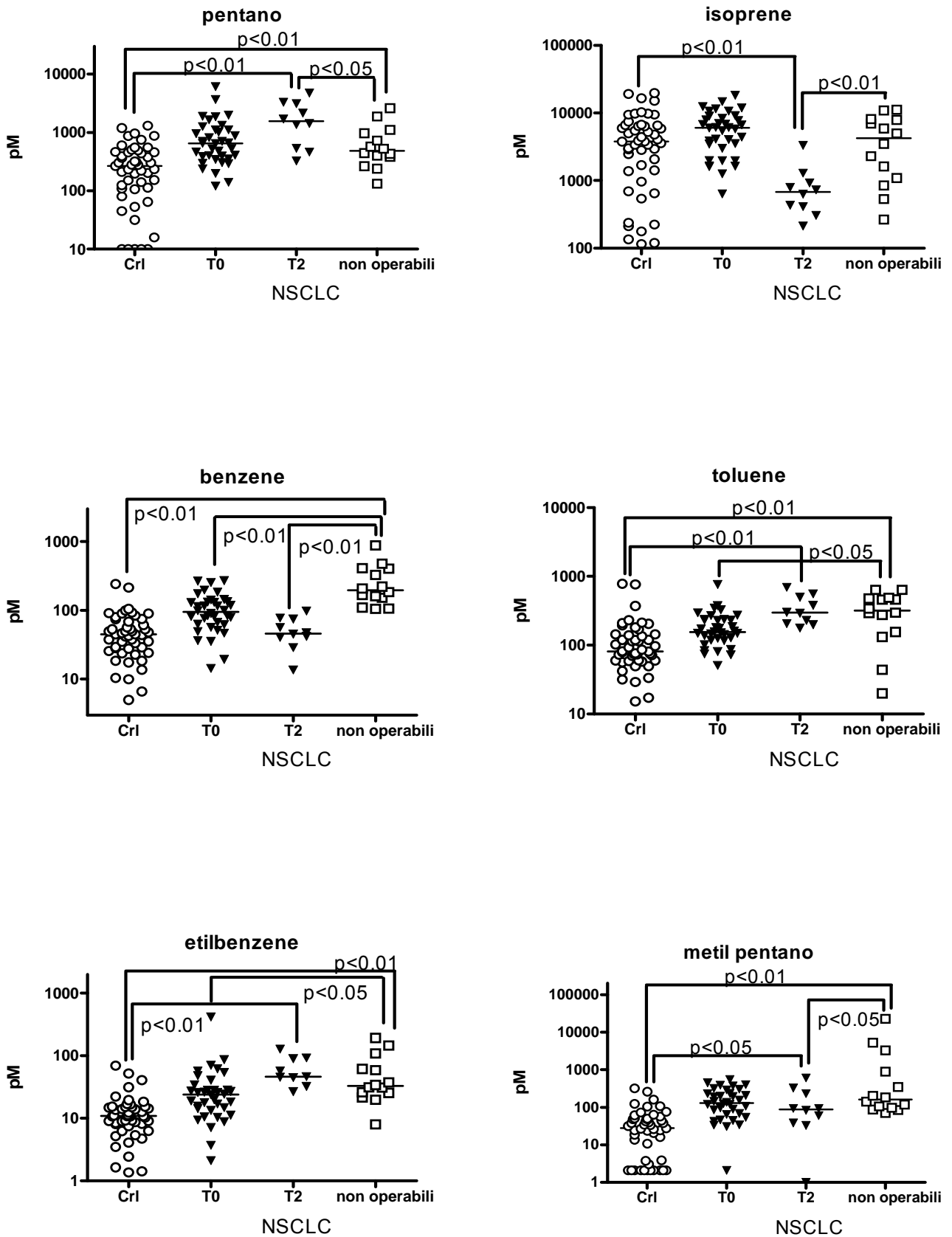
**Figura 6.** I soggetti eseguono un unico atto respiratorio in un tubo di Teflon® (Bio-VOC®) (a), dove rimangono raccolti gli ultimi 150 ml dell'aria espirata che rappresenta l'aria alveolare. I VOCs sono estratti inserendo direttamente nel contenitore (b) la fibra 75 µm Carboxen/PDMS SPME.

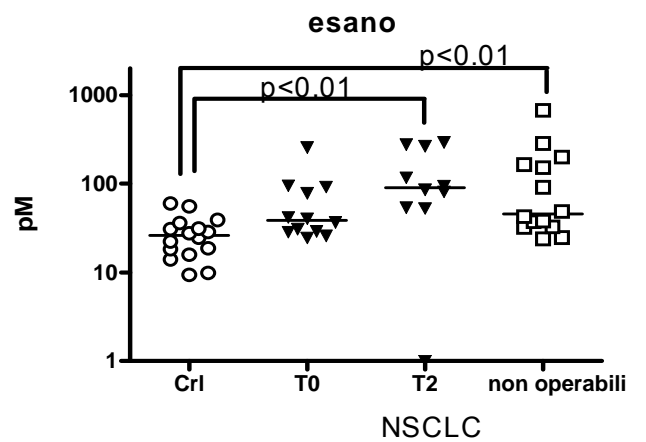
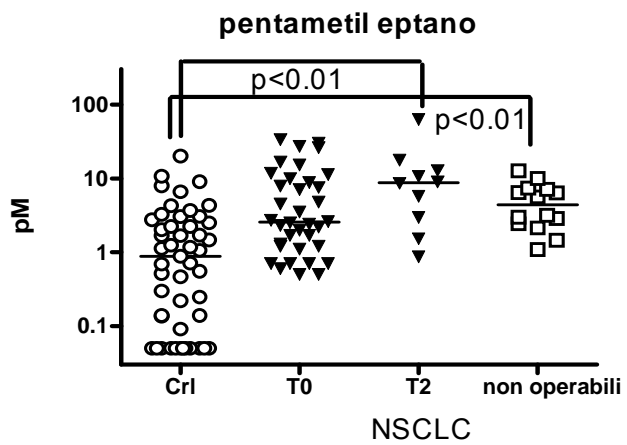
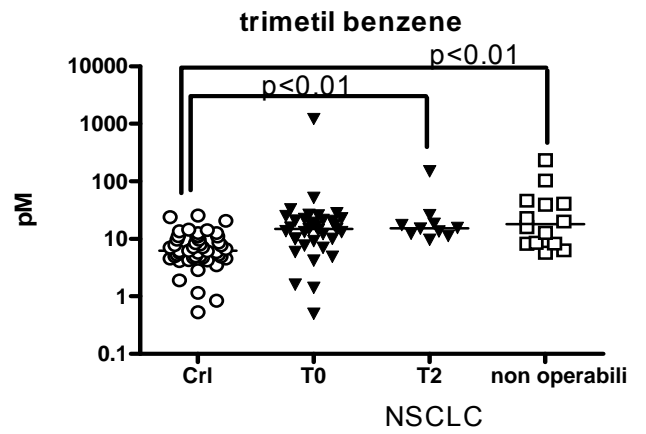
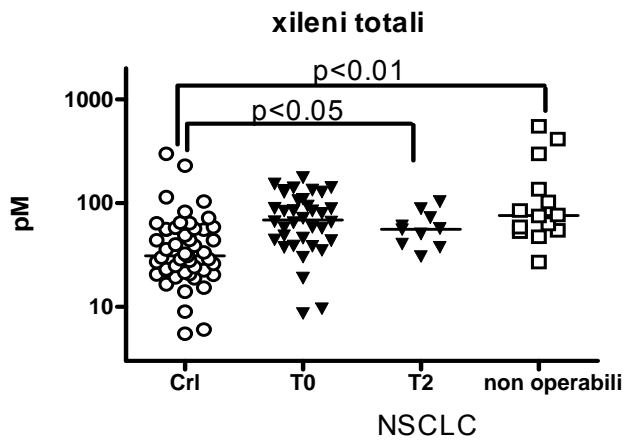
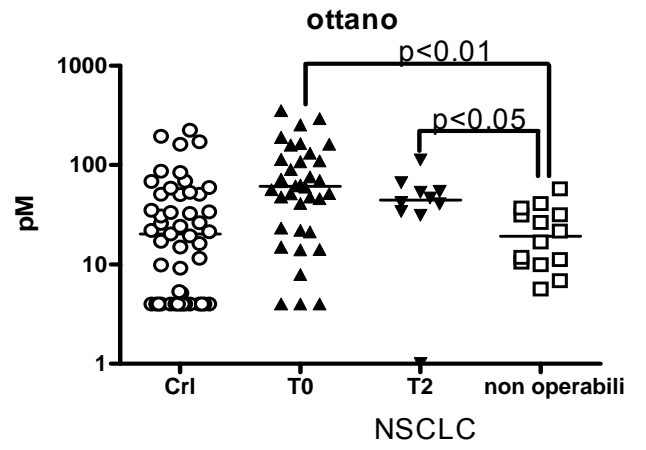
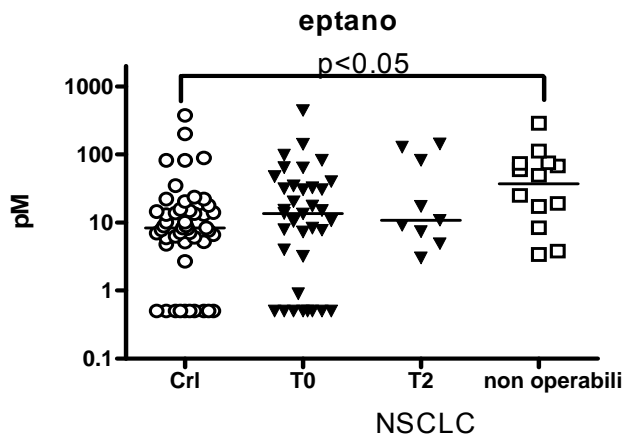


**Figura 7.** Classificazione dei casi con l'analisi logistica multinomiale. \*\*casi classificati correttamente. Nella totalità, l'82.5% dei soggetti sono classificati in modo corretto.

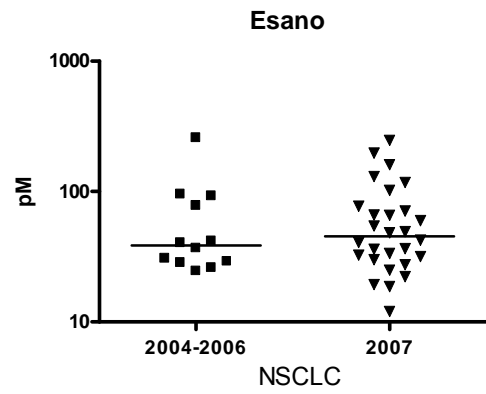
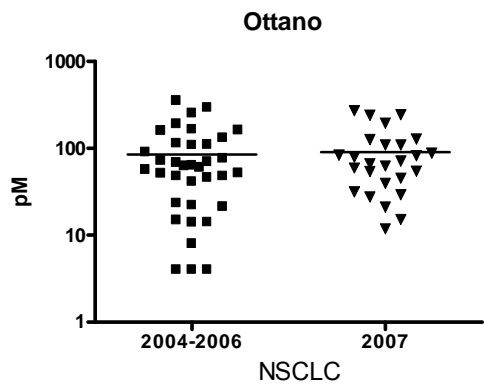
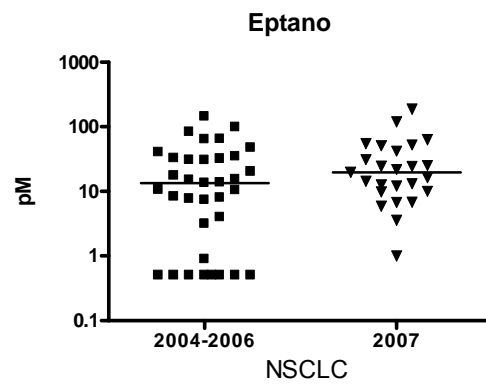
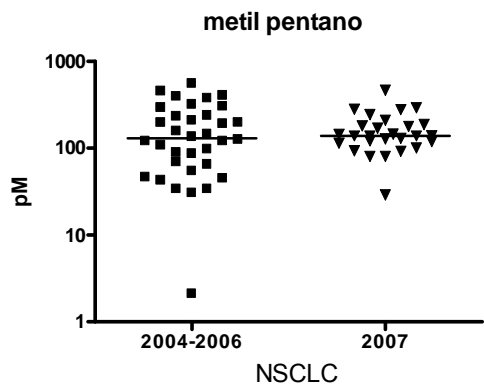
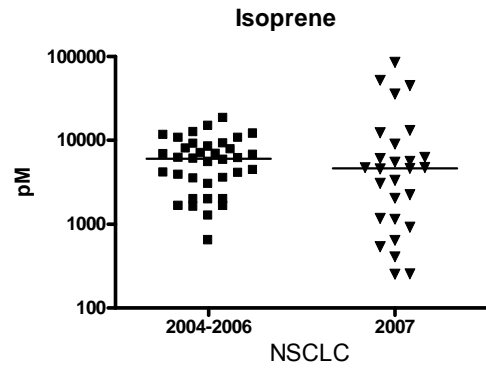
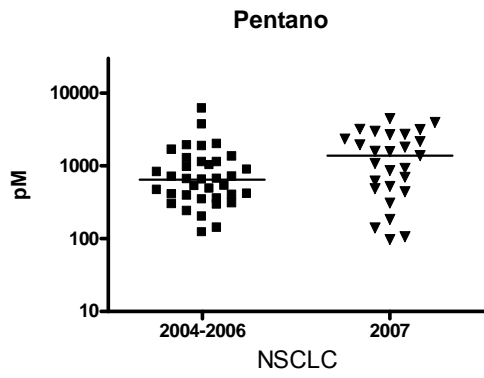


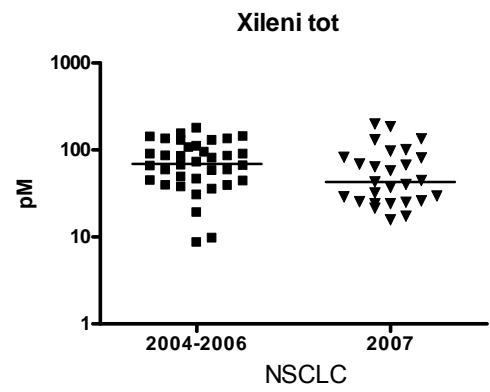
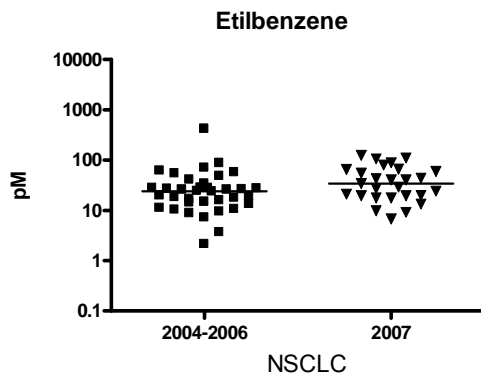
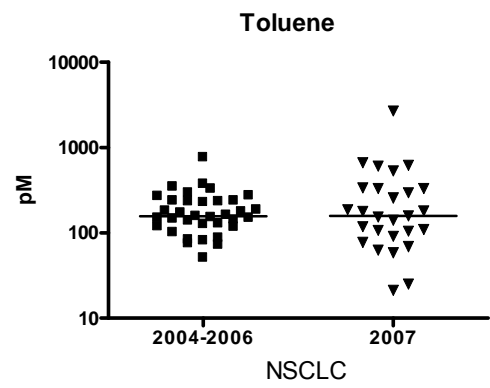
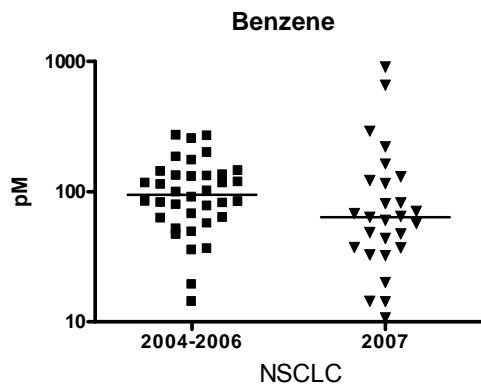
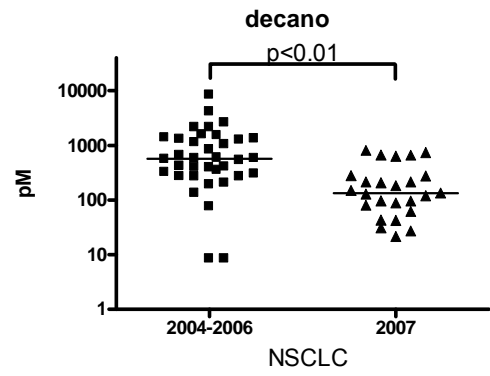
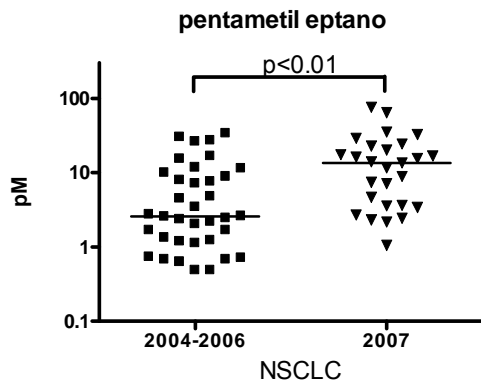
**Figura 8.** Distribuzioni delle concentrazioni dei singoli VOCs nell'espriato di controlli, pazienti NSCLC a diverso stadio. T0 e T1 si riferiscono ai NSCLC Stadio IA e IB valutati rispettivamente prima e 3 anni dopo l'intervento chirurgico.

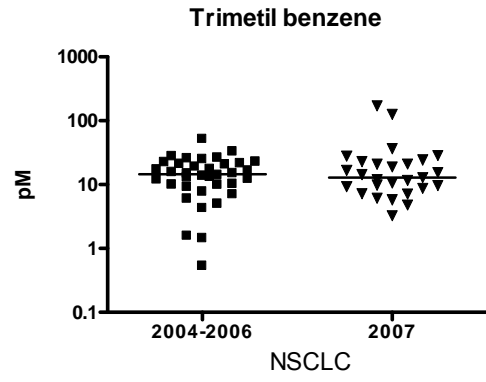
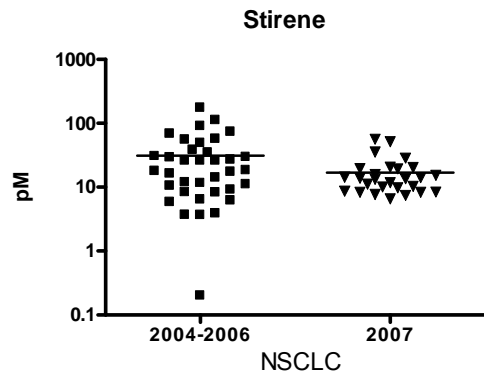




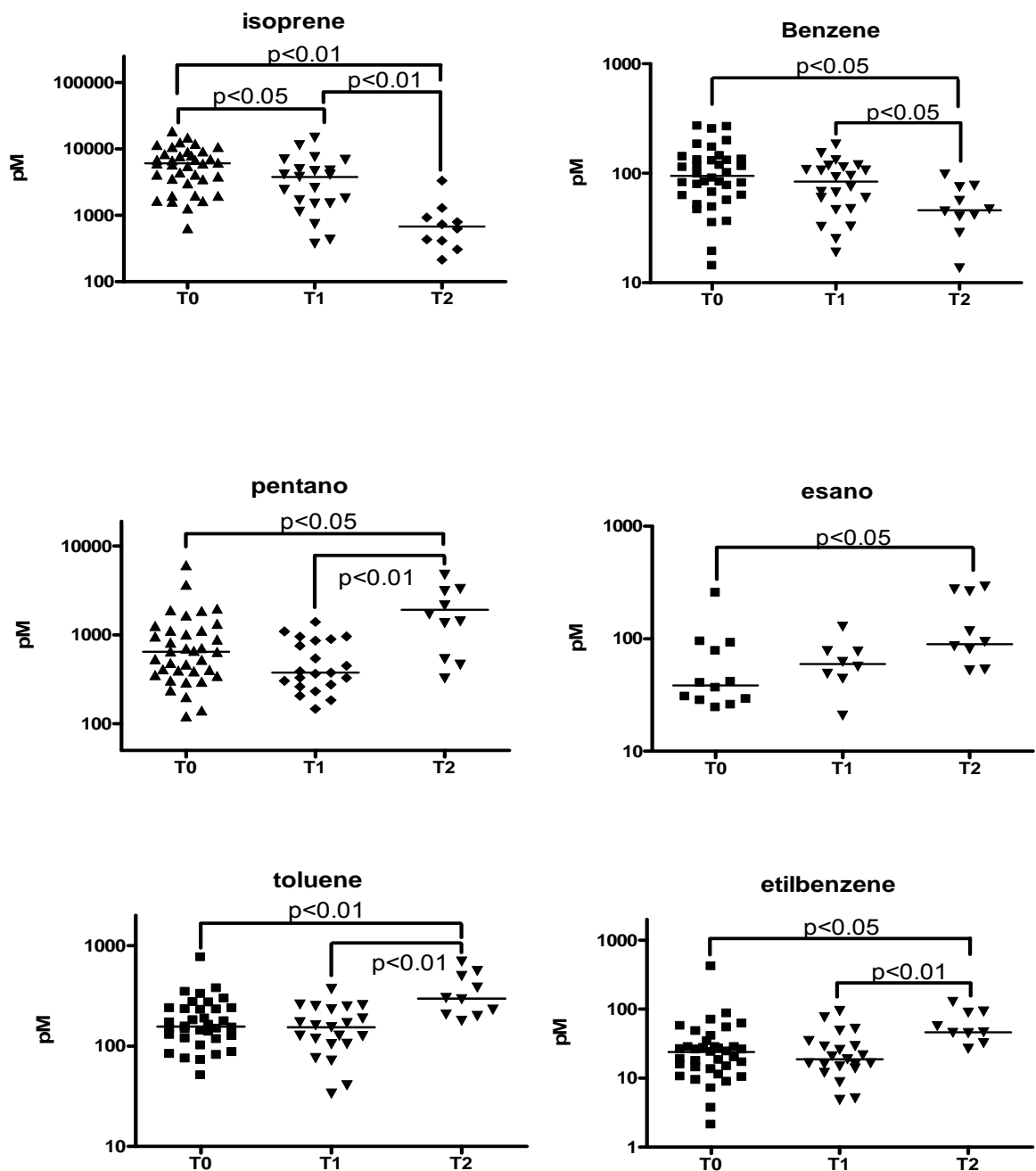
**Figura 9.** Distribuzioni delle concentrazioni e le relative mediane dei VOCs nell'aria esalata dei pazienti NSCLC Stadio IA e IB coinvolti nel primo studio e in quelli relativi al secondo reclutamento (Studio di conferma dei dati). I livelli dei VOCs nei due gruppi sono stati quindi confrontati con il test non parametrico di Mann-Whitney per campioni indipendenti.



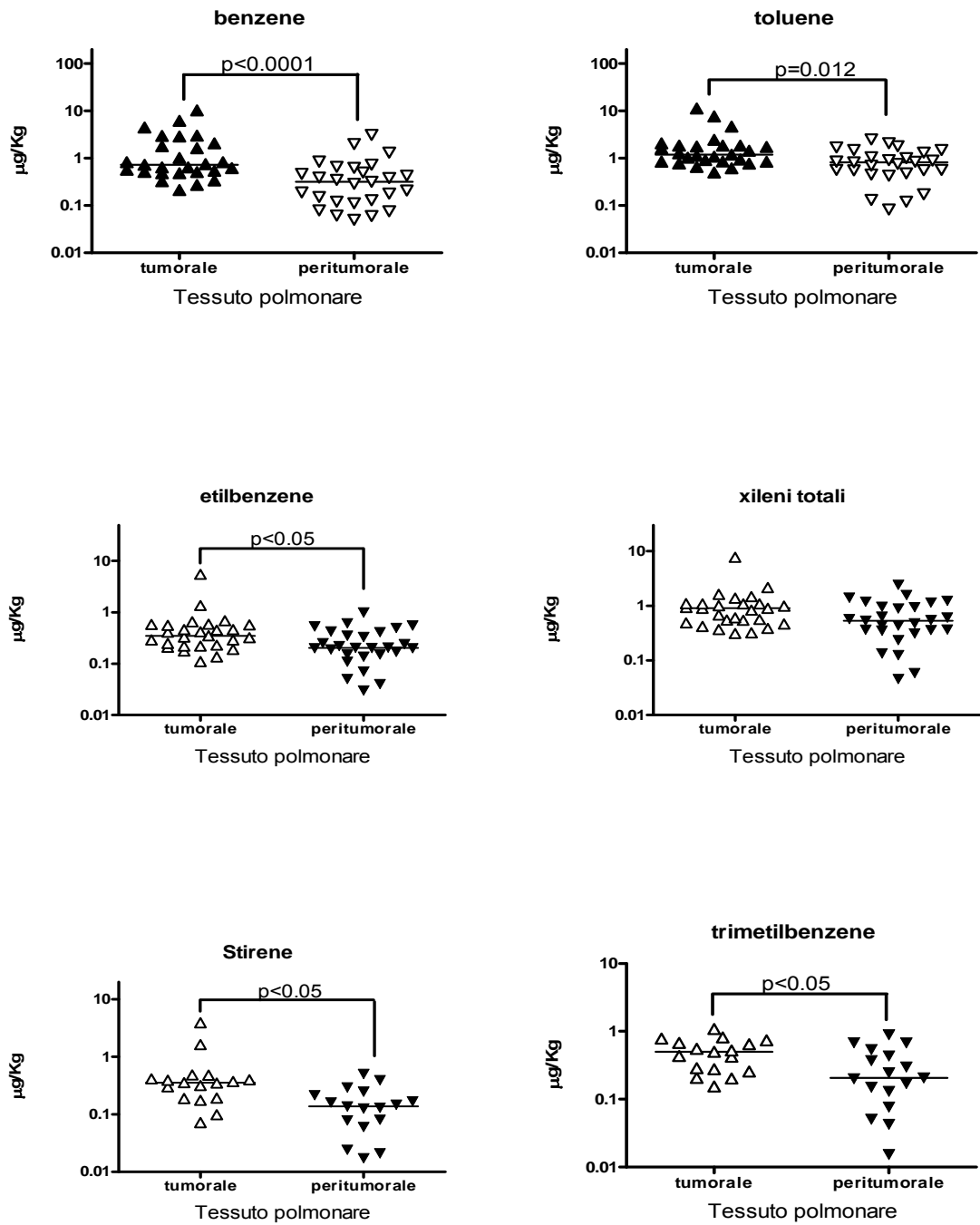




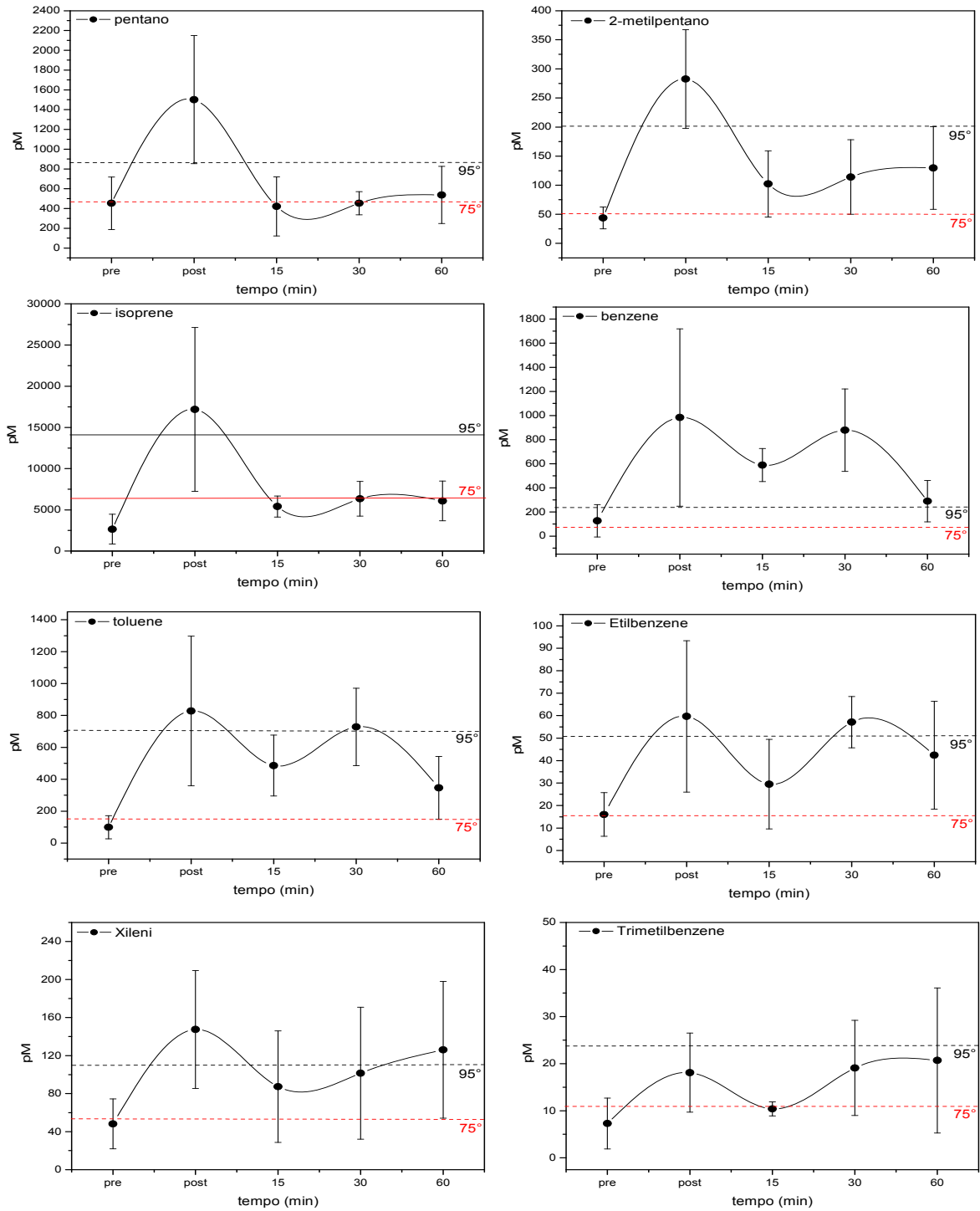
**Figura 10.** Distribuzioni dei dati e le relative significatività dello studio longitudinale dei pazienti NSCLC Stadio IA e IB. Sono riportati solo i VOCs per i quali è stata evidenziata una variazione significativa. T0= prima dell'operazione chirurgica, T1=3 anni dopo l'operazione chirurgica



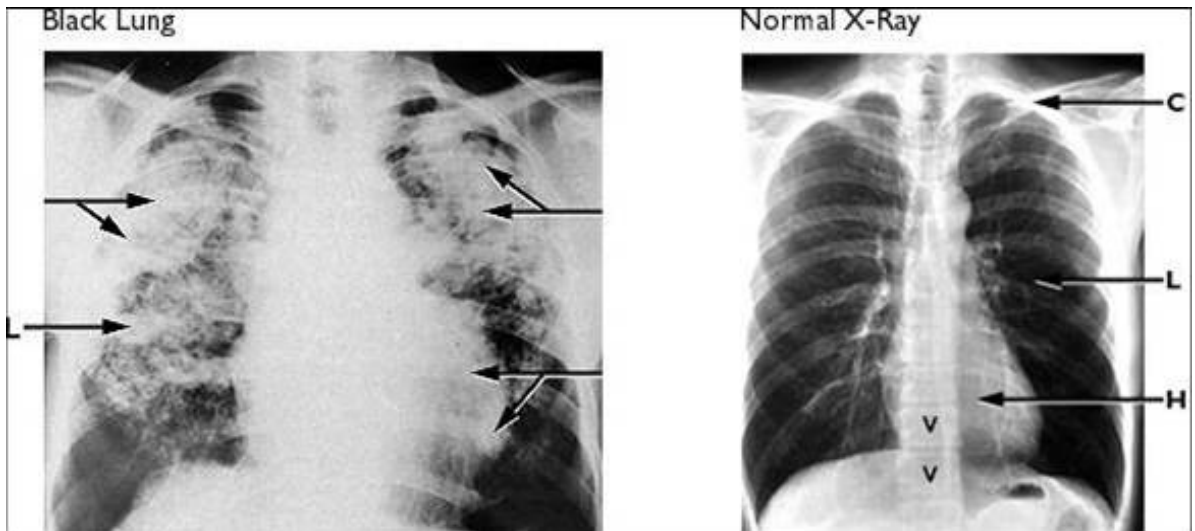
**Figura 11.** Distribuzione degli idrocarburi aromatici nel tessuto polmonare tumorale e peri-tumorale di pazienti NSCLC Stadio IA e IB.



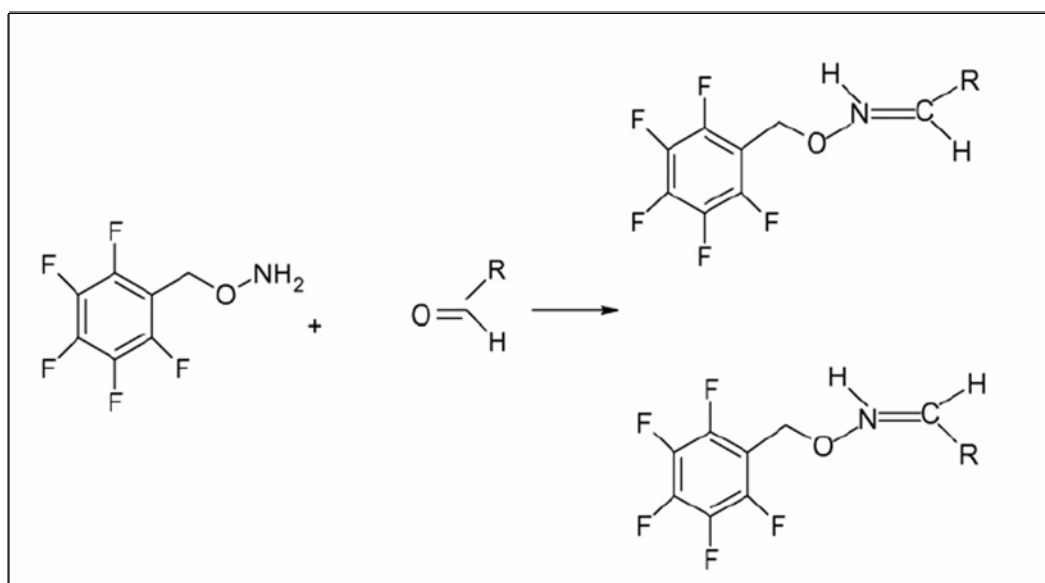
**Figura 12.** Effetto acuto del fumo di sigaretta sul profilo quantitativo dei VOCs selezionati misurati nell'espriato prima (pre) e dopo (a diversi intervalli di tempo: POST, 15 min, 30 min e 60 min) il consumo di una sigaretta.



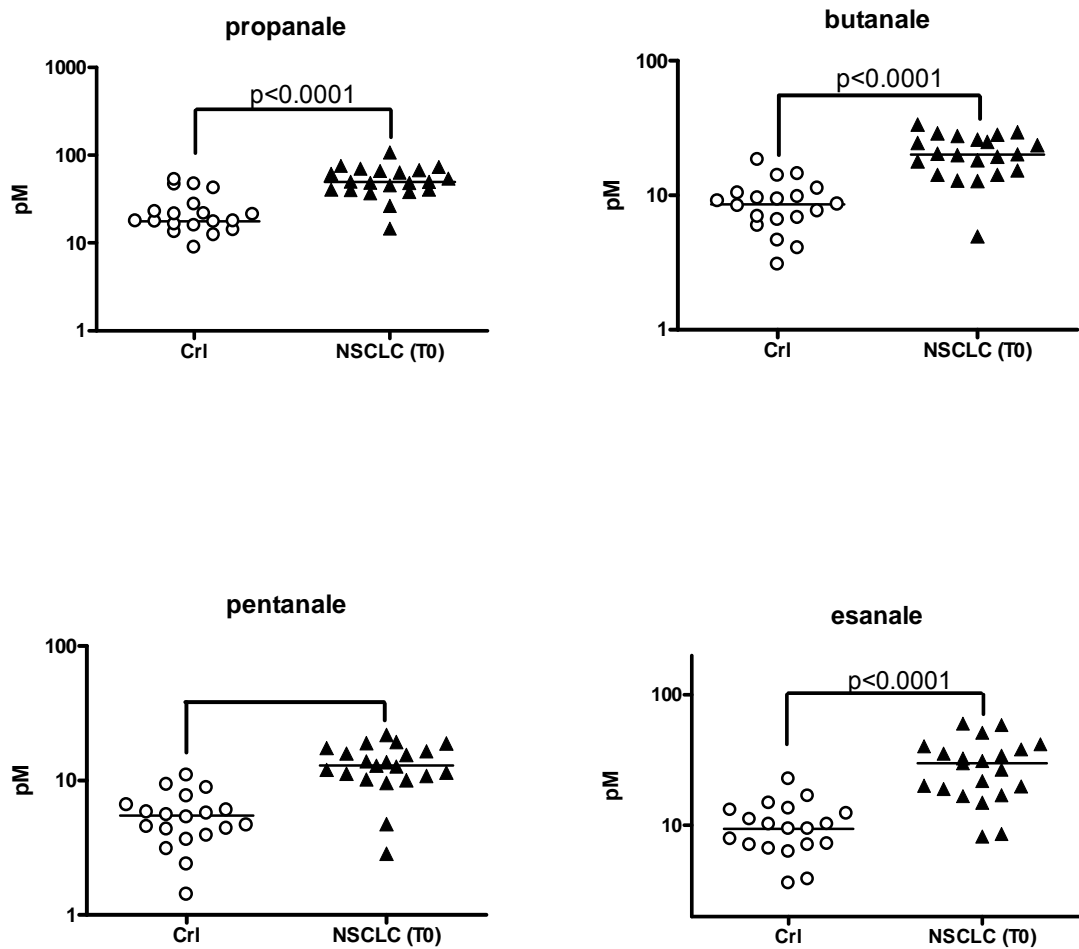
**Figura 13.** Aspetto radiologico di un polmone di un soggetto sano e di uno affetto da antracosi

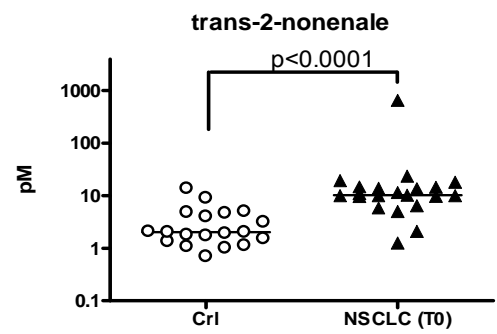
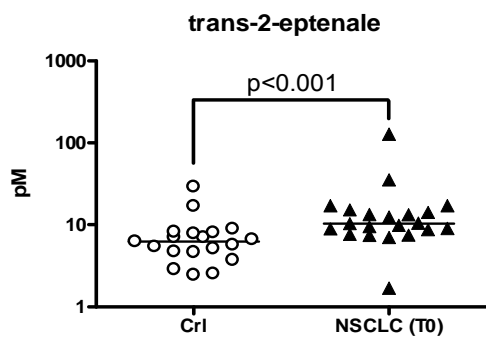
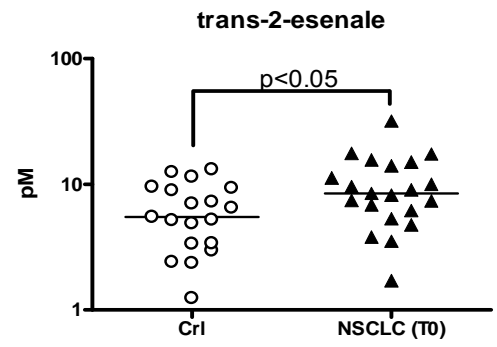
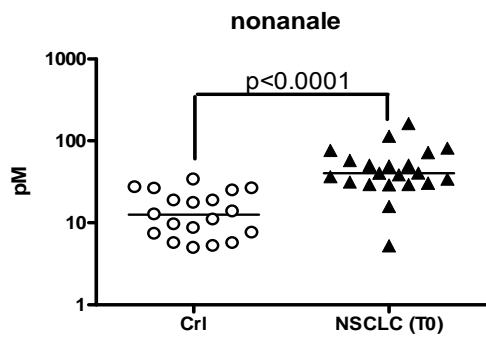
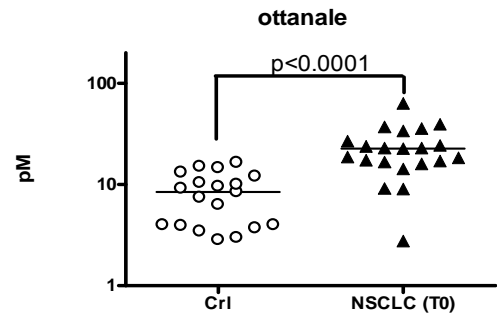
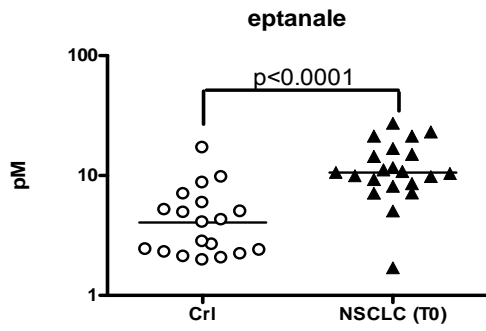


**Figura 14.** Reazione di derivatizzazione delle aldeidi con PFHBA. Ogni aldeidi viene trasformata in due basi di Schiff una *cis* ed una *trans*. L'analisi di ogni singola aldeide in GC/MS produrrà due picchi cromatografici.

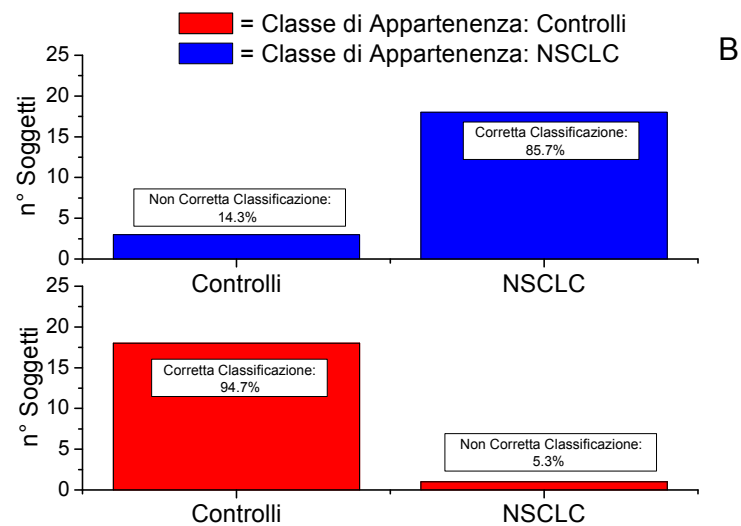
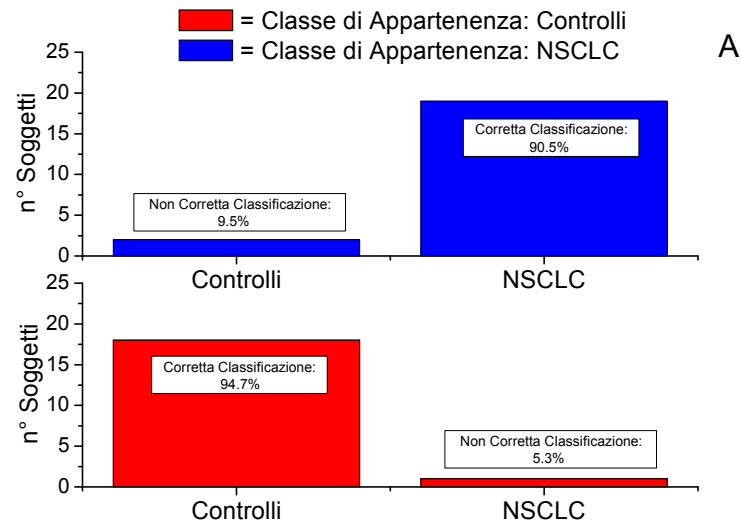


**Figura 15.** Distribuzione delle concentrazioni delle aldeidi nell'aria espirata dei controlli e dei pazienti NSCLC Stadio IA e IB prima dell'intervento chirurgico e le corrispondenti differenze significative. (Test non parametrico di Mann-Whitney per campioni indipendenti).





**Figura 16.** Potere classificatorio del propanale e del butanale nei confronti dei controlli e dei pazienti NSCLC (Stadio IA e IB), calcolato con la regressione logistica e l'analisi del discriminante.



## **10 TABELLE**

WHO 1982	IASLC 1988	WHO 1999
Displasia/Carcinoma in situ		<b>Lesioni preinvasive</b> (displasia, ca. in situ)
Carcinoma a cellule squamose		<b>Carcinoma a cellule squamose e varianti</b> (papillare, a cellule chiare, a piccole cellule, basaliode)
<b>Carcinoma a piccole cellule:</b>	<b>Carcinoma a piccole cellule:</b>	<b>Carcinoma a piccole cellule:</b>
a cellule di avena	puro a piccole cellule	a piccole cellule
a cellule intermedie	misto a piccole cellule/ a cellule giganti	
combinato (con elementi squamosi e ghiandolari)	combinato (con elementi squamosi e ghiandolari)	<b>Carcinoma combinato</b> (con elementi squamosi e ghiandolari)
<b>Adenocarcinoma:</b>		<b>Adenocarcinoma</b>
Adenocarcinoma acinoso		<b>Adenocarcinoma acinoso</b>
Adenocarcinoma papillare		<b>Adenocarcinoma papillare</b>
Carcinoma bronchiolo-alveolare		<b>Carcinoma bronchiolo-alveolare</b>
Carcinoma solido con mucina		<b>Carcinoma solido con mucina</b>
		<b>Adenocarcinoma misto</b>
		<b>Varianti di adenocarcinoma:</b> fetale, mucinoso, ad anello, a cellule chiare
<b>Carcinoma anaplastico a larghe cellule:</b>		<b>Carcinoma anaplastico a larghe cellule:</b>
Carcinoma a cellule giganti		Carcinoma a cellule giganti
Carcinoma a cellule chiare		Varianti: neuroendocrino, basaliode, a cellule chiare, linfoepitelioma-simile
Carcinoma adenosquamoso		Carcinoma adenosquamoso
<b>Altri</b>		<b>Altri</b>

**Tabella 1.** Classificazione Istologica dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, 1982), con le modifiche proposte dalla International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC, 1988), e la nuova classificazione dell'WHO, la cui pubblicazione è prevista per la fine del 1999

<b>carcinoma occulto</b>	Tx	N0	M0
<b>stadio 0</b>	Tis	N0	M0
<b>stadio 1°</b>	T1	N0	M0
<b>stadio 1B</b>	T2	N0	M0
<b>stadio 2°</b>	T1	N1	M0
<b>stadio 2B</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>stadio 3°</b>	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
<b>stadio 3B</b>	qualsiasi T	N3	M0
	T4	qualsiasi N	M0
<b>stadio 4</b>	qualsiasi T	qualsiasi N	M1

**Tabella 2.** Stadi del carcinoma polmonare.

<b>Metodo</b>	<b>Sensibilità</b>	<b>Specificità</b>
VOCs (Poli <i>et al.</i> 2005)	72.2%	93.6%
VOCs (Philips <i>et al.</i> 2003)	85.9%	82.6%
Naso elettronico (Machado <i>et al.</i> 2005)	71.4%	91.9%
PET (Pastorino <i>et al.</i> 2003)	81.8%	90.0%
DNA circolante (Sozzi <i>et al.</i> 2003)	88.0%	86.0%

**Tabella 3.** Valori di sensibilità e specificità di tecniche diagnostiche a bassa invasività o non invasive per la diagnosi del tumore al polmone.

<b>Metabolita</b>	<b>Provenienza</b>
Acetone	Metabolismo dei corpi chetonici
Isoprene	Metabolismo del colesterolo
Metiletilchetone	Metabolismo dei lipidi
Ammoniaca	Deamminazione degli aa
Acidi grassi volatili	Metabolismo dei lipidi
CO	Degradazione dell'eme
Dimetil-ammina	Colina
Dimetil-solfuro	Metionina
Etantiolo	Metionina

**Tabella 4.** Esempio di alcune sostanze determinabili nell'aria espirata e loro probabile provenienza metabolica.

	<b>NSCLC</b>	<b>BPCO</b>	<b>CONTROLLI</b>	<b>FUMATORI</b>
SOGGETTI (N°)	36	23	49	35
ETA' (mediana, anni)	67.2	70.2	55.7	54.1
SESSO (maschi/femmine)	28/8	16/7	27/22	30/5
ABITUDINE AL FUMO (F/Ex/N)	2/28/6	1/19/3	0/0/49	34/0/0

**Tabella 5:** Caratteristiche demografiche dei gruppi investigati. Lista delle abbreviazioni: F= attualmente fumatori, Ex= ex fumatori, N= non fumatori. NSCLC= soggetti con tumore non a piccole cellule, BPCO= broncopatia cronica ostruttiva.

**Tabella 6.** Livelli di VOCs misurati nell'aria espirata di controlli asintomatici (fumatori e non), soggetti NSCLC e BPCO. Le concentrazioni sono espresse come mediane (25° -75° percentile).

	<b>Controlli (10<sup>-12</sup> M)</b>	<b>NSCLC (10<sup>-12</sup> M)</b>	<b>BPCO (10<sup>-12</sup> M)</b>	<b>Fumatori (10<sup>-12</sup> M)</b>
<b>Pentano</b>	268.0 (107.7 – 462.7)	647.5 (361.3 – 1112.5)	477.7 (261.5 – 1547.4)	511.4 (241.3 – 1128.3)
<b>Isoprene</b>	3789 (1399 – 6589)	6041 (3130 – 8863)	1758 (453 – 4981)	7243 (1361 – 16968)
<b>2-metilpentano</b>	27.7 (3.4 – 50.3)	139.5 (65.7 – 298.8)	44.7 (21.7 – 63.8)	109.8 (62.8 – 173.5)
<b>Benzene</b>	44.7 (27.7 – 68.6)	94.5 (62.2 – 132.2)	73.3 (51.8 – 95.4)	269.2 (84.6 – 745.1)
<b>Eptano</b>	8.4 (5.0 – 15.3)	13.5 (1.5 – 34.0)	47.3 (13.9 – 98.0)	98.0 (40.3 – 161.7)
<b>Toluene</b>	80.8 (58.9 – 140.0)	158.8 (118.7 – 237.5)	158.5 (103.5 – 269.7)	453.5 (169.6 – 745.7)
<b>Ottano</b>	20.2 (4.0 – 50.8)	61.0 (22.4 – 112.9)	52.5 (31.9 – 147.2)	33.5 (19.7 – 57.8)
<b>Etilbenzene</b>	13.6 (10.8 - 15.1)	24.0 (13.6 – 32.6)	51.1 (26.9 – 132.7)	39.7 (21.7 – 74.1)
<b>Stirene</b>	12.3 (5.3 – 21.8)	17.9 (8.5 – 37.2)	87.6 (56.0 – 148.8)	7.2 (2.8 – 41.6)
<b>Xileni totali</b>	31.1 (21.1 – 56.4)	68.9 (43.6 – 108.4)	94.8 (49.7 – 131.9)	85.8 (60.1 – 185.2)
<b>Trimetilbenzene</b>	6.2 (4.7 – 11.0)	14.9 (9.3 – 22.1)	18.5 (10.4 – 25.4)	18.9 (11.9 – 44.9)
<b>Pentametileptano</b>	0.9 (0.1 – 2.6)	2.5 (1.2 – 9.7)	2.0 (1.2 – 7.6)	5.8 (1.2 – 16.5)
<b>Decano</b>	208.7 (14.3 – 405.5)	568.0 (277.9 – 1321.6)	737.3 (524.6 – 1177.6)	239.2 (60.0 – 884.0)

	<b>NSCLC vs. Controlli</b>	<b>BPCO vs. Controlli</b>	<b>Smokers vs. Controlli</b>	<b>NSCLC vs. BPCO</b>	<b>NSCLC vs. Fumatori</b>	<b>BPCO vs. Fumatori</b>
Isoprene	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	p<0.01
2-metilpentano	p<0.001	p<0.05	p<0.001	p<0.001	n.s.	p<0.05
Pentano	p<0.001	p<0.05	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.
Benzene	p<0.001	n.s.	p<0.001	n.s.	p<0.001	p<0.05
Eptano	n.s.	p<0.01	p<0.001	n.s.	p<0.001	n.s.
Toluene	p<0.001	n.s.	p<0.001	n.s.	p<0.001	p<0.01
Ottano	p<0.001	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Etilbenzene	p<0.01	p<0.001	p<0.001	p<0.05	n.s.	n.s.
Stirene	n.s.	p<0.001	n.s.	p<0.001	n.s.	p<0.001
Xileni totali	p<0.001	p<0.001	p<0.001	n.s.	n.s.	n.s.
Trimetilbenzene	p<0.01	p<0.001	p<0.001	n.s.	n.s.	n.s.
Pentametileptano	p<0.001	n.s.	p<0.001	n.s.	n.s.	n.s.
Decano	p<0.001	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

**Tabella 7.** Differenza statistica relativa fra i gruppi

	<b>Controlli (MR)</b>	<b>NSCLC (MR)</b>	<b>BPCO (MR)</b>	<b>Fumatori (MR)</b>
Isoprene	1.8	4,2	3,1	3,3
2-Metilpentano	<b>*25.5</b>	40,7	11,8	48,8
Benzene	1.2	5,9	1,9	4,7
Eptano	1.2	2,6	2,0	7,4
Toluene	<b>*7.0</b>	11,3	39,5	81,9
Ottano	1.5	2,9	2,9	8,2
Etilbenzene	1.4	4,2	3,6	2,3
Stirene	0.7	1,6	3,4	2,6
Xileni totali	1.6	2,3	11,2	0,9
Trimetilbenzene	0.8	1,8	2,4	2,2
Pentametileptano	1.2	2,8	3,5	3,6
Decano	0.7	2.0	1,6	4,4
Isoprene	0.6	1,7	2,2	0,7

**Tabella 8.** Rapporto tra le mediane (MR) dei livelli dei VOCs misurati nell'esalato e nell'ambiente. I valori di MR sono stati calcolati dall'equazione:  $MR = \text{mediana dei VOCs nell'esalato} / \text{mediana dei VOCs nell'ambiente}$ .

\* $p < 0.05$  valore di significatività tra i controlli e l'ambiente calcolati con il test di Mann-Whitney.

	Gruppi	Fattori		
		1	2	3
<b>Isoprene</b>	1			0.797
<b>2-metilpentano</b>	1			0.562
<b>Pentano</b>	1			0.531
<b>Etilbenzene</b>	2	0.851		
<b>Trimetilbenzene</b>	2	0.794		
<b>Toluene</b>	2	0.773		
<b>Benzene</b>	2	0.728		
<b>Eptano</b>	2	0.629		
<b>Decano</b>	3		0.878	
<b>Stirene</b>	3		0.704	
<b>Ottano</b>	3		0.643	
<b>Pentameteptano</b>	3		0.592	

**Table 9.** Analisi fattoriale

(10-12M)	Controlli	NSCLC Stadio IA e IB (T0)	NSCLC Stadio non operabile
Isoprene	3789 (1399 – 6589)	6041 (3130 – 8863)	4248 (971.6 – 8031.0)
2-metilpentano	27.7 (3.4 – 50.3)	139.5 (65.7 – 298.8)	161.9 (91.95 – 2079.0)
Pentano	268.0 (107.7 – 462.7)	647.5 (361.3 – 1112.5)	486.3 (323.1 – 1038.0)
Etilbenzene	13.6 (10.8 - 15.1)	24.0 (13.6 – 32.6)	32.8 (23.5 – 85.2)
Xileni totali	31.3 (21.1 – 56.4)	68.9 (43.6 – 108.4)	75.9 (53.9 – 218.0)
Trimetilbenzene	6.2 (4.7 – 11.0)	14.9 (9.3 – 22.1)	18.0 (8.3 – 43.5)
Toluene	80.8 (58.9 – 140.0)	158.8 (118.7 – 237.5)	319.9 (144.3 – 484.0)
Benzene	44.7 (27.7 – 68.6)	94.5 (62.2 – 132.2)	196.2 (131.4 – 406.6)
Eptano	8.4 (5.0 – 15.3)	13.5 (1.5 – 34.0)	37.4 (6.1 – 74.9)
Esano	26.1 (17.1 – 33.7)	38.5 (28.7 – 84.9)	45.6 (32.5– 182.3)
Stirene	12.3 (5.3 – 21.8)	17.9 (8.5 – 37.2)	13.8 (5.3 – 26.8)
Ottano	20.2 (4.0 – 50.8)	61.0 (22.4 – 112.9)	19.3 (10.3– 34.3)
Pentameteptano	0.9 (0.1 – 2.6)	2.5 (1.2 – 9.7)	4.4 (2.3 – 7.3)

**Tabella 10.** Concentrazioni dei VOCs nei controlli e nei pazienti NSCLC allo Stadio IA e IB e allo Stadio non operabile. I valori sono espressi intermini di mediane (25°-75°). L'aumento della gradazione di colore è concorde con un aumento delle concentrazioni misurate.

	<b>T<sub>0</sub></b>	<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>
Pentano	647.5 (388.5-1013)	529.5 (329.6-960.0)	1569.0 (497.9-3214)
Isoprene*	6121 (4069-9031)	4125 (2415-7407)	678.9 (359.8-1111.0)
2-metilpentano	139.5 (68.8-291.6)	123.5 (81.1-227.6)	87.9 (35.5-278.9)
Benzene	95.7 (62.9-132.2)	99.6 (60.0-119.2)	46.0 (34.6-76.0)
Eptano	15.1 (0.9-34.6)	18.7 (9.5-39.5)	10.8 (6.1-105.5)
Toluene	161.9 (118.7-232.5)	160.3 (119.0-232.7)	297 (202.6-297.0)
Ottano	65.7 (45.8-131.4)	49.7 (28.5-102.5)	44.3 (32.6-60.4)
Etilbenzene	24.0 (14.8-28.0)	19.7 (15.7-34.5)	46.4 (38.6-90.9)
Stirene	22.1 (11.5-38.1)	18.0 (12.1-43.1)	21.3 (11.8-26.4)
Xileni totali	69.0 (45.8-105.6)	67.8 (51.2-129.4)	56.2 (38.9-80.4)
Trimetilbenzene	15.2 (10.1-22.3)	13.2 (10.2-22.5)	15.3 (11.7-22.3)
Pentameteptano	2.6 (1.7-10.0)	2.5 (1.1-8.8)	8.8 (2.2-15.2)
Esano	38.5 (28.7-84.9)	59.5 (46.6-77.5)	90.0 (53.0-270.5)

**Table 11.** Confronto dei livelli di VOCs tra T<sub>0</sub> (prima dell'intervento chirurgico) e dopo l'intervento chirurgico: T<sub>1</sub> (dopo 1 mese) e T<sub>2</sub> (dopo 3 anni).

Il colore più scuro evidenzia le sostanze che risultano aumentate al tempo T<sub>3</sub>, mentre quelle in grigio le sostanze per le quali è stato evidenziato un calo nelle concentrazioni. Per le altre sostanze non si è vista alcuna variazione dei livelli nello studio longitudinale.\* p<0.05.

	PRE vs POST	PRE vs 15 min	PRE vs 30 min	PRE vs 60 min	POST vs 15 min	POST vs 30 min	POST vs 60 min
pentano	p<0.05	n.s	n.s	n.s	p<0.05	p<0.05	p<0.05
metilpentano	p<0.01	n.s	n.s	n.s	p<0.05	p<0.05	p<0.05
Isoprene	p<0.05	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
Benzene	p<0.01	p<0.05	p<0.05	n.s	n.s	n.s	p<0.05
Toluene	p<0.01	p<0.05	p<0.05	p<0.05	n.s	n.s	n.s
etilbenzene	p<0.05	n.s	p<0.05	n.s	n.s	n.s	n.s
Xileni	p<0.01	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
Trimetilbenzene							
Stirene							

**Tabella 12.** Differenza statistica relativa fra le concentrazioni dei VOCs misurate nell'aria esalata prima (PRE) e dopo (POST, 15, 30 e 60 min) il consumo di una sigaretta.

	Controlli	T0	T1 (4 mesi)	T0 vs T1 (p)
Propanale	17.8 (15.2-34.9)	49.7 (40.4-67.0)	70.9 (55.4-93.2)	P<0.05
Butanale	8.6 (6.6-10.4)	20.2 (14.8-26.7)	22.4 (4.0-34.3)	n.s.
Pentanale	5.3 (3.9-6.6)	12.9 (10.5-17.0)	15.7 (13.5-30.5)	P<0.01
Esanale	9.4 (7.1-13.1)	30.0 (18.0-39.2)	30.3 (25.2-57.7)	P<0.05
Eptanale	4.1 (2.3-5.9)	10.6 (8.3-15.9)	9.0 (6.1-18.6)	n.s.
Ottanale	8.4 (3.9-12.0)	22.7 (16.3-30.4)	12.1 (7.6-19.9)	n.s.
Nonanale	12.5 (7.3-24.6)	40.5 (29.9-64.9)	22.5 (5.6-38.2)	n.s.
trans-2-esenale	5.5 (3.4-9.3)	8.4 (5.7-14.6)	4.2 (2.9-18.2)	n.s.
trans-2-eptenale	6.1 (4.2-8.1)	10.4 (8.2-14.7)	7.9 (5.1-10.9)	n.s.
trans-2-nonenale	2.0 (1.3-4.6)	10.2 (8.0-14.6)	5.4 (4.3-16.5)	n.s.

**Tabella 13.** Concentrazioni delle aldeidi nei controlli e nei pazienti NSCLC allo Stadio IA e IB prima (T0) e 4 mesi dopo (T1) l'intervento chirurgico. I valori sono espressi in termini di mediane (25°-75°). La gradazione di colore è concorde con un aumento di concentrazione. Nell'ultima colonna sono riportati i confronti statistici fra i valori T0 e T1 dei pazienti NSCLC.

Research

Open Access

## Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study

Diana Poli<sup>1,2</sup>, Paolo Carbognani<sup>3</sup>, Massimo Corradi<sup>1,2</sup>, Matteo Goldoni<sup>1,2</sup>, Olga Acampa<sup>2</sup>, Bruno Balbi<sup>4</sup>, Luca Bianchi<sup>4</sup>, Michele Rusca<sup>3</sup> and Antonio Mutti\*<sup>2</sup>

Address: <sup>1</sup>National Institute of Occupational Safety and Prevention Research Center at the University of Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italy, <sup>2</sup>Laboratory of Industrial Toxicology, Dept. of Clinical Medicine, Nephrology and Health Sciences, University of Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italy, <sup>3</sup>Unit of Thoracic Surgery, University of Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italy and <sup>4</sup>Respiratory Dept. and Lung Function Unit of Maugeri Foundation, Via Pinidolo 23, 25064 Gussago (Bs), Italy

Email: Diana Poli - [dpoli7@unipr.it](mailto:dpoli7@unipr.it); Paolo Carbognani - [paolo.carbognani@unipr.it](mailto:paolo.carbognani@unipr.it); Massimo Corradi - [massimo.corradi@unipr.it](mailto:massimo.corradi@unipr.it); Matteo Goldoni - [matgold@libero.it](mailto:matgold@libero.it); Olga Acampa - [olga.acampa@tin.it](mailto:olga.acampa@tin.it); Bruno Balbi - [bbalbi@fsm.it](mailto:bbalbi@fsm.it); Luca Bianchi - [lbianchi@fsm.it](mailto:lbianchi@fsm.it); Michele Rusca - [michele.rusca@unipr.it](mailto:michele.rusca@unipr.it); Antonio Mutti\* - [antonio.mutti@unipr.it](mailto:antonio.mutti@unipr.it)

\* Corresponding author

Published: 14 July 2005

Received: 22 March 2005

*Respiratory Research* 2005, **6**:71 doi:10.1186/1465-9921-6-71

Accepted: 14 July 2005

This article is available from: <http://respiratory-research.com/content/6/1/71>

© 2005 Poli et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** Non-invasive diagnostic strategies aimed at identifying biomarkers of lung cancer are of great interest for early cancer detection. The aim of this study was to set up a new method for identifying and quantifying volatile organic compounds (VOCs) in exhaled air of patients with non-small cells lung cancer (NSCLC), by comparing the levels with those obtained from healthy smokers and non-smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease. The VOC collection and analyses were repeated three weeks after the NSCLC patients underwent lung surgery.

**Methods:** The subjects' breath was collected in a Teflon<sup>®</sup> bulb that traps the last portion of single slow vital capacity. The 13 VOCs selected for this study were concentrated using a solid phase microextraction technique and subsequently analysed by means of gas chromatography/mass spectrometry.

**Results:** The levels of the selected VOCs ranged from  $10^{-12}$  M for styrene to  $10^{-9}$  M for isoprene. None of VOCs alone discriminated the study groups, and so it was not possible to identify one single chemical compound as a specific lung cancer biomarker. However, multinomial logistic regression analysis showed that VOC profile can correctly classify about 80 % of cases. Only isoprene and decane levels significantly decreased after surgery.

**Conclusion:** As the combination of the 13 VOCs allowed the correct classification of the cases into groups, together with conventional diagnostic approaches, VOC analysis could be used as a complementary test for the early diagnosis of lung cancer. Its possible use in the follow-up of operated patients cannot be recommended on the basis of the results of our short-term nested study.

## Background

Breath analysis seems to be a promising approach to identify new biomarkers of inflammatory and oxidative lung processes, and different volatile organic compounds (VOCs) of endogenous or exogenous origin have been analyzed to study lung diseases [1] and characterize environmental and occupational exposure to chemical pollutants [2].

During the 1970s, Pauling *et al.* [3] determined more than 200 components in human breath, some of which have subsequently been associated with different pathological conditions on the basis of their effect and/or their metabolic origin.

In 1985, Gordon *et al.* identified several alkanes and monomethylated alkanes in the exhaled air of lung cancer patients [4], an observation that aroused interest because of the possible use of exhaled biomarkers for early detection of the disease. Classical screening procedures, such as chest radiography and sputum cytology, have not decreased the number of deaths due to lung cancer [5], but promising results have recently been obtained using novel imaging techniques such as low-dose helicoidal computed tomography [6], although cost effectiveness and possible over-diagnosis seem to be serious issues. There is therefore a considerable need for non-invasive diagnostic procedures aimed at identifying lung cancer at an early stage and adding specificity to imaging techniques.

In 1999, Phillips *et al.* [7] selected 22 VOCs – mainly alkanes and benzene derivatives – to distinguish subjects with and without lung cancer, and have recently modified the VOC pattern subject to statistical analysis by reducing them to nine [8]. Selected alkanes and methylated alkanes have proved to be highly discriminating in distinguishing lung cancer patients from healthy controls, but breath analyses can be affected by both clinical and analytical confounding variables [9]. The published studies have included mixed groups of patients with primary small or non-small cell lung cancer (NSCLC) and lung metastases, and did not compare VOC levels in lung cancer patients with those in asymptomatic smokers or subjects suffering from chronic obstructive pulmonary disease (COPD), both of which may precede or be associated with the development of lung cancer and which may characterise the people undergoing screening procedures [10,11]. Furthermore, there are no data supporting the usefulness of VOC analysis in the follow-up of patients after tumour resection. Finally, only a qualitative approach has been used to identify selected VOCs, without any attempt to quantify the individual components. Actual breath concentrations could increase the statistical power of compar-

isons aimed at identifying differences between groups and between repeated measurements in the same individuals.

The aim of this study was to set up a new method for identifying and quantifying selected VOCs in exhaled air, and apply it to a cross-sectional study of NSCLC and COPD patients, and healthy control smokers and non-smokers, and a short-term follow-up study of patients undergoing surgery for NSCLC.

## Methods

### Study design

The design of the present study included a cross-sectional investigation during which 13 selected VOCs were measured in air exhaled by NSCLC and COPD patients, and asymptomatic control smokers and non-smokers. A subsequent nested short-term follow-up study of the NSCLC patients was carried out with repeat VOC sampling and analysis about three weeks (range 2 – 4) after they had undergone tumor resection ( $T_1$ ).

### Subjects

We enrolled 36 patients who underwent tumor resection because of histological evidence of NSCLC at the University of Parma's Department of Thoracic Surgery. The assessments of tumour size and nodes were based on the International Union Against Cancer TNM staging system [12], and all of the patients were classified as having stage Ia, Ib and IIa lung cancer. None of the patients received radiation or chemotherapy before surgery.

The study also included 25 subjects with clinically stable, mild to moderate COPD, all of whom were diagnosed on the basis of the GOLD guidelines [13]. In brief, the entry criteria, consisted of a post-bronchodilator  $FEV_1$  of <80% the predicted value, an  $FEV_1/FVC$  ratio of <70%,  $\beta_2$ -agonist-reversibility at baseline  $FEV_1$  of <200 ml and/or 15%, and the absence of clinical asthma or other significant respiratory diseases. None of them had experienced any worsening in symptoms over the previous eight weeks.

The asymptomatic controls were 35 smokers and 50 non-smokers. The smokers had to have normal spirometry values ( $FEV_1$  and  $FEV_1/FVC$ ) and not be suffering from chronic bronchitis; the non-smokers had to have no pulmonary symptoms or a history of pulmonary disease, and normal lung spirometry results. The smokers did not smoke for at least one hour before breath collection.

Twenty-six of the NSCLC patients agreed to repeat the breath collection during a follow-up visit 15–30 days after surgery; the other 10 were excluded from the nested follow-up study because their clinical condition had significantly worsened.

**Table 1: Demographic characteristics of studied groups.**

	NSCLC	COPD	Controls	Smokers
Subjects (n°)	36	25	50	35
Age (median, years)	67.2	70.2	55.7	54.1
Sex (male/female)	28/8	18/7	27/23	30/5
Current smokers	2	1	0	35
Ex smokers	28	21	0	0
Ever smokers	6	3	50	0
*Pack-years	20	20	n.a.	25 ± 2.6
FEV1 (% predicted)	69.8 ± 15.2	61.7 ± 13.4	105.6 ± 9.1	101.8 ± 10.2

The ex-smokers subjects had stopped smoking for at least one year. \* Pack-years (mean ± SD) among current smokers. NSCLC = non-small cell lung cancer; COPD = chronic obstructive pulmonary disease; n.a. = not applicable.

Table 1 shows the characteristics of the study subjects, all of whom gave their informed consent.

#### Breath collection

After carrying out a series of experiments in order to establish a reliable sampling procedure, we modified the breath sampling procedure recommended by the manufacturer of a commercially available device (Bio-VOC® sampler, Markes International Ltd, Rhondda Cynon Taff, UK) (Figure 1). Briefly, after 60 minutes' rest, the subjects were asked to perform a single slow vital capacity breath into a one-way valve connected to a Teflon®-bulb, which traps the last portion of exhaled air (150 ml).

Twenty environmental samples were taken from the rooms in which the subjects performed the test in order to compare breath and ambient air VOC levels.

#### VOC extraction and analysis

After breath collection, 1 µL of *n*-heptane-*d*<sub>16</sub> and styrene-*d*<sub>8</sub> methanolic solution ( $1.5 \times 10^{-5}$  M) was added to each sample as internal standard (IS) for respectively aliphatic and aromatic compounds. The exhaled VOCs and IS were extracted by means of SPME using a 75 µm Carboxen/PDMS fibre (Supelco, Bellefonte, PA, USA), which was put into the Bio-VOC® breath sampler for 30 min at room temperature and then thermally desorbed in GC injection port at 280°C. The GC/MS analysis was carried out using a Hewlett-Packard HP 6890 gas chromatograph coupled with an HP 5973 mass selective detector (Palo Alto, CA, USA). The VOCs were separated on an Equity™-1 column (30 m, 0.25 mm i.d., 1.0 µm film, Supelco) and acquired in *full-scan* mode in 40–350 *m/z* range.

Thirteen VOCs (seven aliphatic and six aromatic compounds) were selected, each of which was identified by means of its mass spectrum and confirmed by comparing its retention time with that of pure standard and charac-

teristic fragment ions; only the substances that did not interfere with co-eluting compounds were chosen.

The preliminary experiments addressed methodological issues, defined standard operating procedures, and validated analytical methods of VOC collection and analysis. The factors affect the SPME process, such as adsorption and desorption times and sampling temperature, were optimized. The extraction time profile at room temperature (22°C) was 30 min and not markedly different among the compounds. The SPME fibre was immediately transferred to the GC-injector port in order to avoid the loss of the extracted substances and avoid analyte evaporation [14]. No carry-over effects were observed when desorption was performed at 280°C for 5 min.

The method was validated by studying the linear range, and the limits of detection and precision. Linearity was established over four orders of magnitude ( $10^{12}$ - $10^{-8}$  M,  $r^2 > 0.98$ ) and the limits of detection, calculated as a signal/noise ratio of about 3, was about  $10^{-12}$  M for all the compounds. Analytical precision, calculated as % RSD, was within 3.1–13.7% for all of the intra- and inter-day determinations on standards. The gaseous standards were directly prepared in the Bio-VOC® bulb filled with helium, 1 µL of VOC methanolic standard solution, 1 µL of IS ( $1.5 \times 10^{-5}$  M), and 6 µL of deionised water. The standards were stabilised at room temperature for almost one hour and remained stable up to 60 hours.

#### Statistical analysis

As the benzene and toluene levels had a log-normal distribution (the Kolmogorov-Smirnov normality test) parametric tests were used for the cross-sectional study (one-way ANOVA followed by the Games Howell post-hoc test). Non-parametric statistics (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's Post Hoc test) were used for the other VOCs, whose distribution was not normal even after log-



**Figure 1**

**Breath collection and VOC extraction.** The subjects performed a single slow vital capacity into a Teflon® bulb (Bio-VOC® breath sampler) (a) which traps the last portion of exhaled air (150 mL); the VOCs were extracted by directly inserting a 75 mm Carboxen/PDMS SPME fiber (30 min) into the bulb (b).

transformation. The cases were classified by means of multinomial logistic regression using group codes as the dependent variable and all of the VOC concentrations (except total xylenes because of their high correlation with ethylbenzene:  $r > 0.95$ ) as predictors. Interpretable factors based on VOC levels were obtained by means of principal component analysis (Varimax rotation with Kaiser's normalization) [15]. The Keiser Meyer Olkin (KMO) test was used to test sample adequacy (considered acceptable if the KMO constant was  $> 0.60$ ), and the number of factors was chosen on the basis of the flex point of the graph of decreasing eigenvalues; the percentage of variance explained was also recorded.

In the case of the follow-up study, Student's *t* test for repeated measures was applied to the benzene and toluene levels; Wilcoxon's test was used for all of the other VOCs.

A *p* value of  $< 0.05$  was considered significant for all of the statistical analyses. SPSS 13.0 (SPSS inc. Chicago, IL, USA)

and PRISM 3.0 (Graphpad, San Diego, CA) were used for the statistical analyses.

## Results

Tables 2 and 3 respectively summarise the VOC levels and the statistical significances of the between-group differences. As all of the VOCs showed significant differences between at least two group pairs, the overall *p* values of the Kruskal-Wallis and ANOVA tests for individual VOCs fell between  $7.5 \times 10^{-13}$  (for Ethylbenzene) to  $1.6 \times 10^{-3}$  (isoprene). For these highly significant differences, adjustments for multiple testing calculated using Holm's test (less conservative than Bonferroni's test [16]) did not affect the results. The levels of 10 of the 13 substances were significantly higher in the NSCLC patients than in control non-smokers; the levels of 9 were higher in the COPD patients and control smokers than in control non-smokers.

The NSCLC patients had significantly higher 2-methylpentane and isoprene levels and significantly lower

**Table 2: Exhaled VOC levels in studied groups**

	Controls (10 <sup>-12</sup> M)	NSCLC (10 <sup>-12</sup> M)	COPD (10 <sup>-12</sup> M)	Smokers (10 <sup>-12</sup> M)
Isoprene	3789 (1399 – 6589)	6041 (3130 – 8863)	1758 (453 – 4981)	7243 (1361 – 16968)
2-Methylpentane	27.7 (3.4 – 50.3)	139.5 (65.7 – 298.8)	44.7 (21.7 – 63.8)	109.8 (62.8 – 173.5)
Pentane	268.0 (107.7 – 462.7)	647.5 (361.3 – 1112.5)	477.7 (261.5 – 1547.4)	511.4 (241.3 – 1128.3)
Ethylbenzene	13.6 (10.8 – 15.1)	24.0 (13.6 – 32.6)	51.1 (26.9 – 132.7)	39.7 (21.7 – 74.1)
Xylenes total	31.1 (21.1 – 56.4)	68.9 (43.6 – 108.4)	94.8 (49.7 – 131.9)	85.8 (60.1 – 185.2)
Trimethylbenzene	6.2 (4.7 – 11.0)	14.9 (9.3 – 22.1)	18.5 (10.4 – 25.4)	18.9 (11.9 – 44.9)
Toluene	80.8 (58.9 – 140.0)	158.8 (118.7 – 237.5)	158.5 (103.5 – 269.7)	453.5 (169.6 – 745.7)
Benzene	44.7 (27.7 – 68.6)	94.5 (62.2 – 132.2)	73.3 (51.8 – 95.4)	269.2 (84.6 – 745.1)
Heptane	8.4 (5.0 – 15.3)	13.5 (1.5 – 34.0)	47.3 (13.9 – 98.0)	98.0 (40.3 – 161.7)
Decane	208.7 (14.3 – 405.5)	568.0 (277.9 – 1321.6)	737.3 (524.6 – 1177.6)	239.2 (60.0 – 884.0)
Styrene	12.3 (5.3 – 21.8)	17.9 (8.5 – 37.2)	87.6 (56.0 – 148.8)	7.2 (2.8 – 41.6)
Octane	20.2 (4.0 – 50.8)	61.0 (22.4 – 112.9)	52.5 (31.9 – 147.2)	33.5 (19.7 – 57.8)
Pentamethylheptane	0.9 (0.1 – 2.6)	2.5 (1.2 – 9.7)	2.0 (1.2 – 7.6)	5.8 (1.2 – 16.5)

Concentrations expressed as median values(25<sup>th</sup> -75<sup>th</sup> percentile).

**Table 3: Statistical differences between groups.**

	NSCLC vs. Controls	COPD vs. Controls	Smokers vs. Controls	NSCLC vs. COPD	NSCLC vs. Smokers	COPD vs. Smokers
Isoprene	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0.05	n.s.	P < 0.01
2-Methylpentane	p < 0.001	p < 0.05	p < 0.001	p < 0.001	n.s.	P < 0.05
Pentane	p < 0.001	p < 0.05	p < 0.05	n.s.	n.s.	n.s.
Ethylbenzene	p < 0.01	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.05	n.s.	n.s.
Xylenes total	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	n.s.	n.s.	n.s.
Trimethylbenzene	p < 0.01	p < 0.001	p < 0.001	n.s.	n.s.	n.s.
Toluene	p < 0.001	n.s.	p < 0.001	n.s.	p < 0.001	P < 0.01
Benzene	p < 0.001	n.s.	p < 0.001	n.s.	p < 0.001	P < 0.05
Heptane	n.s.	p < 0.01	p < 0.001	n.s.	p < 0.001	n.s.
Decane	p < 0.001	p < 0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Styrene	n.s.	p < 0.001	n.s.	p < 0.001	n.s.	P < 0.001
Octane	p < 0.001	p < 0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Pentamethylheptane	p < 0.001	n.s.	p < 0.001	n.s.	n.s.	n.s.

The significance of the multiple comparisons inside the individual univariate tests. ANOVA followed by Games Howell Post Hoc test for benzene and toluene, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's Post Hoc test for all the other VOCs were performed.

ethylbenzene and styrene levels than the COPD patients, and significantly lower benzene, heptane and toluene levels than the control smokers. In comparison with the control smokers, the COPD patients had lower 2-methylpentane, benzene and toluene levels, and higher styrene levels.

Exhaled breath of non-smoking controls had higher levels of isoprene and heptane than the environmental air, whereas NSCLC and COPD patients and control smokers showed higher levels of almost all substances (data not shown).

Principal component analysis (table 4), with a KMO constant of 0.83, distinguished three factors with eigenvalues

>1, of which the third was the flex point of the graph of decreasing eigenvalues. The first grouped benzene, heptane, toluene, ethylbenzene, trimethylbenzene with an explained variance of 27.5% (total xylenes were excluded because of their high correlation with ethylbenzene:  $r > 0.95$ ); the second grouped octane, styrene, pentamethylheptane and decane with an explained variance of 20%, and the third grouped pentane, isoprene and methylpentane with an explained variance of 19%. The total explained variance of the model was therefore 66.5%.

In order to test the discriminant power of the exhaled VOC pattern, a multinomial logistic regression was made using the coding group as the output variable and the concentration of all of the VOCs except total xylenes as pre-

**Table 4: Principal Components analysis of variables.**

	Group	Factors		
		1	2	3
Isoprene	1			0.797
2-Methylpentane	1			0.562
Pentane	1			0.531
Ethylbenzene	2	0.851		
Trimethylbenzene	2	0.794		
Toluene	2	0.773		
Benzene	2	0.728		
Heptane	2	0.629		
Decane	3		0.878	
Styrene	3		0.704	
Octane	3		0.643	
Pentamethylheptane	3		0.592	

dictors: concentrations were used because they are direct measures with an intrinsic experimental error and therefore more appropriate than the ratio between exhaled breath and air VOC concentration, a function derived from two different experimental measures by means of mathematical manipulations. Figure 2 shows the correct classification of cases into four groups as the Cox and Snell pseudo R-square of the model was 0.83 (goodness-of-fit test). In general, 82.5% of subjects were correctly classified: a maximum of 87.8% for control non-smokers and a minimum of 72.2% for the NSCLC patients. Analysis of residuals did not reveal any particular cases with an undue influence on the model or the overall classification. On the basis of these results, the overall sensitivity (calculated as NSCLC true positive/ true positive + false negative) was 72.2% and overall specificity (calculated as NSCLC true negative/ true negative + false positive) was 93.6%.

In the follow-up study of the NSCLC patients, only isoprene and decane significantly decreased after surgery ( $p < 0.05$ , table 5).

## Discussion

Non-invasive diagnostic strategies aimed at identifying biomarkers of early lung cancer probably require the use of a panel rather than single substances [17]. The main finding of our study was that none of selected VOCs alone distinguished the NSCLC patients from the other study groups (i.e. non of them was a specific biomarker of NSCLC), but overall VOC concentrations were highly discriminant (>70%). Owing to the limited sensitivity and specificity of VOC analysis, a NSCLC diagnosis only based on only VOC concentrations in exhaled breath cannot be rec-

ommended at this stage. We did not calculate positive and negative predictive values, as they are highly dependent on the prevalence of the condition being examined in the population at hands. Owing to the low prevalence of NSCLC even in selected groups at high risk, the positive predicted value of exhaled VOCs is expected to be low, and should probably be used to rule out, rather than to confirm NSCLC in subjects with suspect nodules.

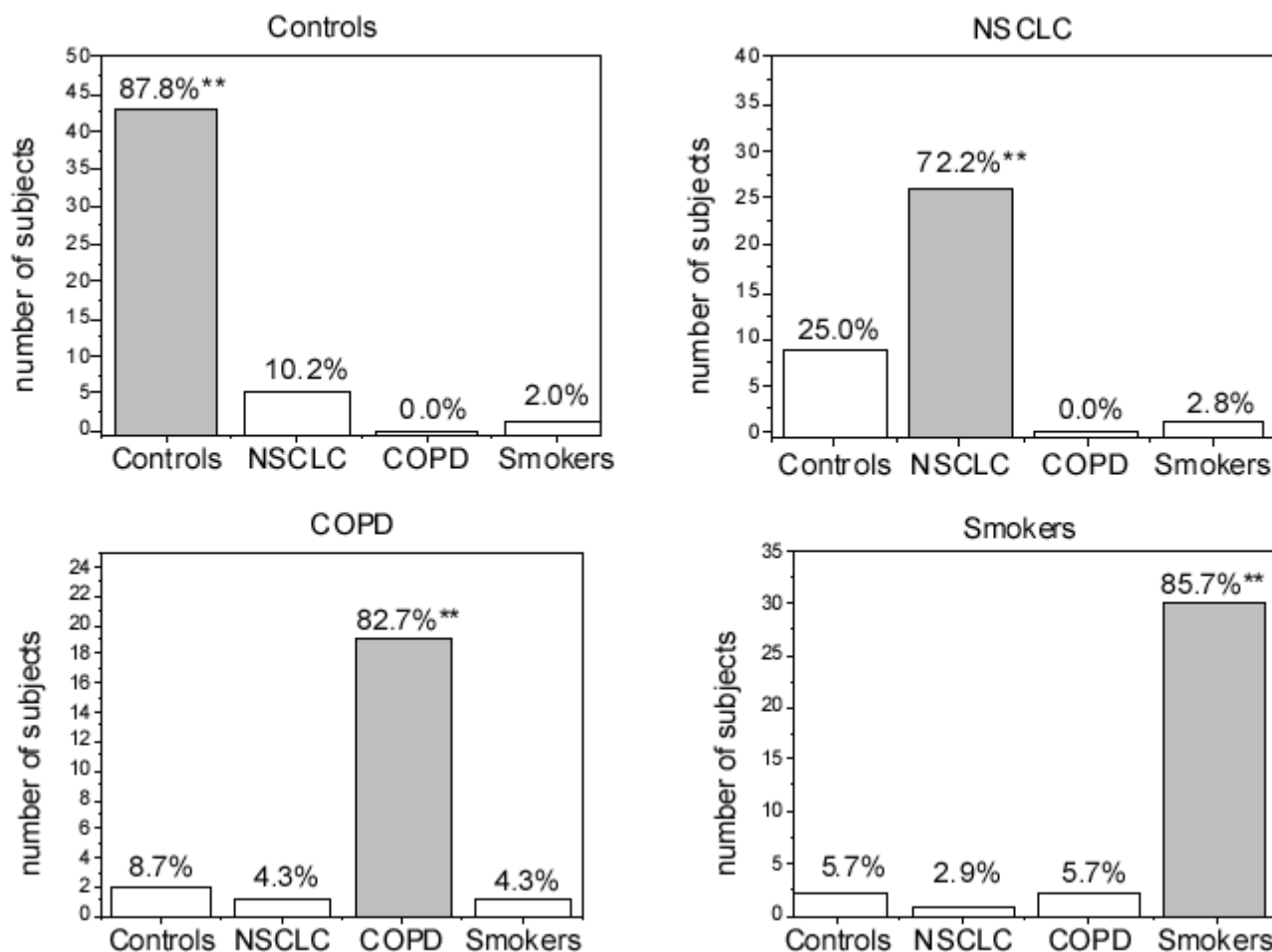
Moreover, exhaled breath analysis is a particularly interesting strategy but is still hampered by the lack of a standardised breath collection system and putative exhaled biomarkers.

Our simple method of breath collection has a number of advantages: *i*) it samples a fixed volume of air and discards anatomic dead space air; *ii*) its fixed resistance allows a reasonably constant expiratory flow; *iii*) it has no carry-over effects and permits the addition of internal standards to the breath samples, which improves data reproducibility; and *iv*) it is a well-tolerated, suitable for screening purpose, and also applicable to difficult clinical and psychological conditions such as those observed in NSCLC patients.

Further studies are needed to evaluate the VOC levels obtained from repeated expirations or tidal breathing, but the collection procedures require respiratory devices equipped with instruments that control ventilatory pattern [18], and this may limit their widespread application.

We selected 13 VOCs from the chromatographic profile of exhaled breath on the basis of the detectability of the peak and their biological significance, ten of which have been previously used for discriminant lung cancer analysis by Phillips *et al.* [7]; the other three were markers of oxidative stress such as pentane with its methylated form (2-methylpentane), and toluene, which is closely related to cigarette smoke.

The fact that we identified fewer VOCs than Phillips *et al.* [7] may have been partially due to differences in our breath sampling procedures: rather than concentrating the breath sample in a sorbent trap [19], we collected breath VOCs from a single expiration and extracted them using SPME fibre. The SPME technique may be less sensitive, but has the advantages of not requiring sample preparation or any specific equipment for GC analysis [20]; furthermore, it allowed us to measure most of the substances of interest proposed in the literature. Another reason for the difference in VOC identification may be the different clinical characteristics of lung cancer patients: we enrolled early-stage NSCLC patients because they may benefit more from early detection strategies.



**Figure 2**  
**Classification of cases with multinomial logistic regression analysis.** \*\* Correctly classified cases. 82.5% of the subjects were correctly classified.

There were no significant differences between the level of most of the VOCs in the exhaled air of the control non-smokers and those in the ambient air, which suggests that ambient levels may influence the VOCs exhaled by healthy non-smokers (data not shown). However, the VOC levels in diseased patients were not explainable solely by ambient VOC concentrations during breath collection, because the samples of all of the study subjects were collected in the same place. The NSCLC and COPD patients and the control smokers had generally higher levels of all of the exhaled VOCs than the control non-smokers (except for isoprene in the COPD group), which reflects differences in exhaled air composition due to pathological conditions or smoking rather than environmental contamination.

Various approaches have been adopted in an attempt to distinguish endogenous substances from exogenous contaminants, such as correcting exhaled VOC concentrations by subtracting inspiratory VOC levels or by calculating alveolar gradients [7]. However, although these methods are easy to perform, they do not take into account the complexity of pulmonary adsorption and exhalation of volatile substances [2].

Although the exact origin of exhaled VOCs remains to be demonstrated, principal components analysis (PCA) factorised the compounds into three groups (table 4) and suggests some fascinating hypotheses. It may be particularly relevant in distinguishing substances of endogenous

**Table 5: VOCs levels at T<sub>0</sub> (before surgery) and T<sub>1</sub> (after surgery).**

	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>
<b>Isoprene</b>	<b>6121 (4069–9031)</b>	<b>*4125 (2415–7407)</b>
<b>2-Methylpentane</b>	139.5 (68.8–291.6)	123.5 (81.1–227.6)
<b>Pentane</b>	647.5 (388.5–1013)	529.5 (329.6–960.0)
<b>Ethylbenzene</b>	24.0 (14.8–28.0)	19.7 (15.7–34.5)
<b>Xylenes total</b>	69.0 (45.8–105.6)	67.8 (51.2–129.4)
<b>Trimethylbenzene</b>	15.2 (10.1–22.3)	13.2 (10.2–22.5)
<b>Toluene</b>	161.9 (118.7–232.5)	160.3 (119.0–232.7)
<b>Benzene</b>	95.7 (62.9–132.2)	99.6 (60.0–119.2)
<b>Heptane</b>	15.1 (0.9–34.6)	18.7 (9.5–39.5)
<b>Decane</b>	<b>625.0 (322.6–1392)</b>	<b>*443.0 (197.0–920.7)</b>
<b>Styrene</b>	22.1 (11.5–38.1)	18.0 (12.1–43.1)
<b>Octane</b>	65.7 (45.8–131.4)	49.7 (28.5–102.5)
<b>Pentamethylheptane</b>	2.6 (1.7–10.0)	2.5 (1.1–8.8)

\* means a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ). The data are expressed as median (25<sup>th</sup>–75<sup>th</sup> percentile).

origin from those influenced by confounding factors mainly related to tobacco smoke.

Isoprene, pentane and 2-methylpentane are grouped together (group 1, factor 3). These substances can be considered mainly endogenous compounds even though pentane and its methylated forms are also present in vehicle engine exhausts [21] and isoprene is also a constituent of tobacco smoke [22]. In humans, isoprene is formed from acetylCoA and is the basic molecule in cholesterol biosynthesis [23], and pentane comes from human lipid peroxidation [24]. The grouping of these with 2-methylpentane is in line with the results of a previous study that considered methylated alkanes as a secondary product of human oxidative stress [25], although the exact source of methylated alkanes is still debated [26].

Of the group 1 substances, 2-methylpentane levels were higher in NSCLC patients than in the control non-smokers and COPD patients, which suggests its potential usefulness in screening procedures (probably in combination with other relevant biomarkers). In line with previous observations [27], pentane levels were higher in the exhaled air of the patients with NSCLC and COPD and asymptomatic smokers than in the control non-smokers, but did not differentiate the first three groups from each other.

Also in line with previously published studies [27,28], isoprene levels were significantly higher in the breath than in the environmental samples (data not shown), and higher in the NSCLC patients and control smokers than in the COPD patients. The between-group differences are difficult to interpret, but are probably related to the moderate effect of cigarette smoke on isoprene levels, and par-

tially to the lung destruction (emphysema) often affecting COPD patients. In this regard, although no studies have compared breath isoprene levels in NSCLC and COPD patients, lower levels have been observed in the exhaled breath of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) in comparison with those without ARDS [29].

The substances belonging to group 2 (factor 1) could be classified mainly as smoking-related exogenous compounds because their levels were higher in the control smokers than control non-smokers. Ethylbenzene may be of particular interest because of its ability to distinguish NSCLC and COPD patients, and control non-smokers.

The substances belonging to group 3 (factor 2) are heterogeneous and it is therefore more difficult to interpret the between-group differences in the levels of the individual substances.

The results of the VOC analysis of our nested short-term follow-up study of surgically treated NSCLC patients showed that only isoprene and decane levels significantly decreased after surgery (Table 5), thus indicating that breath VOC analysis cannot be recommended as a short-term follow-up procedure in such patients.

## Conclusion

Although none of the individual exhaled VOC alone was specific for lung cancer, a combination of 13 VOCs does allow the classification of cases into groups. Exhaled VOC analysis may therefore be useful in improving the specificity and sensitivity of conventional diagnostic approaches to lung cancer. However, these findings will require validation in larger clinical studies.

### List of abbreviation used

COPD = Chronic Obstructive Pulmonary Disease; GC/MS = Gas Chromatography/Mass Spectrometry; IS = internal standard; NSCLC = Non-Small Cells Lung Cancer; PCA = Principal Components Analysis; SPME = Solid Phase Microextraction; VOC = Volatile Organic Compound; trimethylbenzene = 1,2,4-trimethylbenzene; pentamethylheptane = 2,2,4,6,6-pentamethylheptane.

### Competing interests

All authors excluded any competing interest.

### Authors' contributions

DP: substantial contribution to conception and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, involved in drafting the articles.

PC: substantial contribution to conception and design, collection of samples, revision of the draft critically for important intellectual content.

MC: substantial contribution to conception and design, analysis and interpretation of data, involved in drafting the articles.

MG: substantial contribution to conception and design, statistical analysis and interpretation of data, involved in drafting the articles.

OA: collection of samples, revision of the draft critically for important intellectual content.

BB: substantial contribution to conception and design, collection of samples, revision of the draft critically for important intellectual content.

MR: substantial contribution to conception and design, collection of samples, revision of the draft critically for important intellectual content.

AM: substantial contribution to conception and design, statistical analysis and interpretation of data, involved in drafting the articles, final approval of the version to be published.

### Acknowledgements

This study was supported in part by Ricerca Finalizzata 2003 from Italian Ministry of Health and in part by grant R01 HL72323 from the National Heart, Blood and Lung Institute (NHLBI; Bethesda, USA). Its contents are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of the NHLBI or National Institute of Health.

We thank E. Zaffignani for her cooperation during the study.

### References

- Miekisch W, Schubert JK, Noeldge-Schomburg GF: **Diagnostic potential of breath analysis – focus on volatile organic compounds.** *Clin Chim Acta* 2004, **347**:25-39.
- Imbriani M, Ghittori S: **Gases and organic solvents in urine as biomarkers of occupational exposure: a review.** *Int Arch Occup Environ Health* 2005, **78**:1-19.
- Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P: **Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971, **68**:2374-2376.
- Gordon SM, Szidon JP, Krotoszynski BK, Gibbons RD, O'Neill HJ: **Volatile organic compounds in exhaled air from patients with lung cancer.** *Clin Chem* 1985, **31**:1278-1282.
- Humphrey LL, Teutsch S, Johnson M, U.S. Preventive Services Task Force: **Lung cancer screening with sputum cytologic examination, chest radiography, and computed tomography: an update for the U.S. Preventive Services Task Force.** *Ann Intern Med* 2004, **140**:740-753.
- Gohagan JK, Marcus PM, Fagerstrom RM, Pinsky PF, Kramer BS, Prorok PC, Ascher S, Bailey W, Brewer B, Church T, Engelhard D, Ford M, Fouad M, Freedman M, Gelmann E, Gierada D, Hocking W, Inampudi S, Irons B, Johnson CC, Jones A, Kucera G, Kvale P, Lappe K, Manor W, Moore A, Nath H, Neff S, Oken M, Plunkett M, Price H, Reding D, Riley T, Schwartz M, Spizarny D, Yoffie R, Zylak C: **THE LUNG SCREENING STUDY RESEARCH GROUP. Final results of the Lung Screening Study, a randomized feasibility study of spiral CT versus chest X-ray screening for lung cancer.** *Lung Cancer* 2005, **47**:9-15.
- Phillips M, Gleeson K, Hughes JM, Greenberg J, Cataneo RN, Baker L, McVay WP: **Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study.** *Lancet* 1999, **353**:1930-1933.
- Phillips M, Cataneo RN, Cummin AR, Gagliardi AJ, Gleeson K, Greenberg J, Maxfield RA, Rom WN: **Detection of lung cancer with volatile markers in the breath.** *Chest* 2003, **123**:2115-2123.
- Ost D, Shah RD, Fein D, Fein AM: **To screen or not to screen: a volatile issue in lung cancer.** *Chest* 2003, **123**:1788-1792.
- Bach PB, Elkin EB, Pastorino U, Kattan MW, Mushlin AI, Begg CB, Parkin DM: **Benchmarking lung cancer mortality rates in current and former smokers.** *Chest* 2004, **126**:1742-1749.
- Papi A, Casoni G, Caramori G, Guzzinati I, Boschetto P, Ravenna F, Calia N, Petruzzelli S, Corbetta L, Cavallese G, Forini E, Saetta M, Ciaccia A, Fabbri LM: **COPD increases the risk of squamous histological subtype in smokers who develop non-small cell lung carcinoma.** *Thorax* 2004, **59**:679-681.
- Sobin LH, Wittekind C: **TNM classification of malignant tumours.** *International Union against Cancer* 6th edition. New York: Wiley-Liss; 2002.
- Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, et al.: **Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**:1256-1276.
- Arthur CL, Pawliszyn J: **Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers.** *Anal Chem* 1990, **62**:2145-2148.
- Edwards RD, Jurvelin J, Koistinen K, Saarela K, Jantunen M: **VOC source identification from personal and residential indoor, outdoor and workplace microenvironment samples in EXP-OLIS-Helsinki, Finland.** *Atmos Environ* 2001, **35**:4829-4841.
- Roback PJ, Askins RA: **Judicious Use of Multiple Hypothesis Tests.** *Conserv Biol* 2005, **19**:261-267.
- Andriani F, Conte D, Mastrangelo T, Leon M, Ratcliffe C, Roz L, Pelosi G, Goldstraw P, Sozzi G, Pastorino U: **Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers.** *Int J Cancer* 2004, **108**:91-96.
- Cope KA, Watson MT, Foster WM, Sehnert SS, Risby TH: **Effects of ventilation on the collection of exhaled breath in humans.** *J Appl Physiol* 2004, **96**:1371-1379.
- Phillips M: **Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath.** *Anal Biochem* 1997, **247**:272-278.
- Lord H, Pawliszyn J: **Evolution of solid-phase microextraction technology.** *J Chromatogr A* 2000, **885**:153-193.
- Tsai JH, Chiang HL, Hsu YC, Weng HC, Yang CY: **The speciation of volatile organic compounds (VOCs) from motorcycle engine exhaust at different driving modes.** *Atmos Environ* 2003, **37**:2485-2496.

22. Darrall KG, Figgins JA, Brown RD, Phillips GF: **Determination of benzene and associated volatile compounds mainstream cigarette smoke.** *Analyst* 1998, **123**:1095-1101.
23. Stone BG, Besse TJ, Duane WC, Evans CD, DeMaster EG: **Effect of regulating cholesterol biosynthesis on breath isoprene excretion in men.** *Lipids* 1993, **28**:705-708.
24. Pitkänen OM, Hallman M, Andersson SM: **Determination of ethane and pentane in free oxygen radical-induced lipid peroxidation.** *Lipids* 1989, **24**:157-159.
25. Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, Grodman R, Gunawardena R, Naidu A: **Effect of oxygen on breath markers of oxidative stress.** *Eur Respir J* 2003, **21**:48-51.
26. Mitsui T, Kondo T: **Inadequacy of theoretical basis of breath methylated alkane contour for assessing oxidative stress.** *Clin Chim Acta* 2003, **333**:93-94.
27. Mitsui T, Naitoh K, Tsuda T, Hirabayashi T, Kondo T: **Is endogenous isoprene the only coeluting compound in the measurement of breath pentane?** *Clin Chim Acta* 2000, **299**:193-198.
28. Jones AW, Lagesson V, Tagesson C: **Determination of isoprene in human breath by thermal desorption gas chromatography with ultraviolet detection.** *J Chromatogr B* 1995, **672**:1-6.
29. Miekisch W, Schubert JK, Vagts DA, Geiger K: **Analysis of volatile disease markers in blood.** *Clin Chem* 2001, **47**:1053-1060.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

*"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."*

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)

