



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA PREVENZIONE

XXVIII CICLO

UTILITÀ E LIMITI DELLA DIAGNOSI DI PATOLOGIE POLMONARI E PLEURICHE ASBESTO-CORRELATE

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Antonio Mutti

Tutor:
Chiar.mo Prof. Matteo Goldoni

Dottoranda:
Silvia Bonini

Riassunto

L'apparato respiratorio rappresenta il bersaglio di numerose sostanze tossiche aerodisperse che rivestono un ruolo chiave nella patogenesi della maggior parte delle patologie polmonari e pleuriche, sia benigne che maligne. Nonostante per alcune di esse siano noti specifici fattori di rischio, le sole attività di prevenzione primaria non sono sufficienti a limitarne la diffusione. Si rende quindi necessario attuare adeguate misure di prevenzione secondaria per la diagnosi di malattie potenzialmente curabili allo stadio iniziale, in modo da aumentare l'efficacia dei trattamenti terapeutici e le possibilità di guarigione.

Un approccio non invasivo per lo studio dei meccanismi fisiopatologici alla base delle patologie polmonari e pleuriche potrebbe essere effettuato anche con nuove metodiche (es. naso elettronico), al fine di identificare e validare nuovi biomarcatori per un più specifico approccio diagnostico.

Il lavoro scientifico ha riguardato inizialmente l'identificazione di un indicatore o di un gruppo di indicatori dotati di potere diagnostico sufficientemente elevato per poter discriminare precocemente, nell'ambito di soggetti con pregressa esposizione ad asbesto, patologie benigne, sia polmonari che pleuriche, da patologie maligne.

Successivamente l'attenzione è stata rivolta alla diagnosi precoce di patologie neoplastiche a carico del solo parenchima polmonare, valutando il potere discriminante di un *pattern* di composti organici volatili (VOCs, tra cui pentano, 2-metilpentano, esano, etilbenzene, eptanale e trans-2-nonenale) raccolti con metodiche non invasive e dotati di potere diagnostico tale da discriminare patologie benigne da patologie maligne potenzialmente curabili in soggetti ad alto rischio di sviluppare cancro del polmone.

Infine abbiamo tentato di ottimizzare i parametri di impostazione e raccolta di un nuovo strumento: il naso elettronico.

Su di esso esistono alcuni lavori in letteratura in cui ne vengono descritte le potenzialità in ambito diagnostico per il riconoscimento di specifici *pattern* suggestivi di patologie polmonari, sia flogistiche (TBC, BPCO) che neoplastiche (mesotelioma, NSCLC). Purtroppo nessuno di questi lavori definisce le condizioni ottimali di utilizzo, i limiti dello strumento e le interferenze di fattori ambientali e soggettivi riguardo al segnale elaborato. Il lavoro si è concentrato soprattutto sull'indagine delle condizioni ottimali di utilizzo e sull'eventuale condizionamento del segnale da parte di determinate variabili ambientali (es. umidità) o individuali (es. fumo, cibo, alcol).

Parole chiave: patologie polmonari e pleuriche, aria esalata, biomarcatori, diagnosi precoce.

Abstract

The respiratory tract is the target for many airborne substances which have a key role in the pathogenesis of benign and malignant lung and pleural diseases.

Although some specific risk factors are known, primary prevention may not be able to limit their spread. Therefore, it is necessary to apply secondary prevention's strategies for early diagnosis, in order to improve the feasibility of treatments and recovery.

A noninvasive approach to assess the pathophysiological mechanisms underlying lung and pleural diseases can also be done with new diagnostic techniques (eg. electronic nose), which may be used to identify and validate new biomarkers.

My scientific steps initially focused on the identification of a single biomarker or a group of biomarkers with a diagnostic power to distinguish benign and malignant diseases, in a group of people former exposed to asbestos.

The next aim was the early diagnosis of malignant diseases of the lung: we analyzed the diagnostic power of a pattern of VOCs collected with non-invasive methods (pentane, 2-methyl-pentane, hexane, ethylbenzene, heptanal and trans-2-nonenal), with a diagnostic discriminant power to distinguish benign from malignant diseases in a group of people at high risk to develop lung cancer.

At the same time we also tried to develop a new method to collect biological materials in order to analyze these biomarkes in low-cost matrices, such as exhaled air; in particular we tried to optimize the setting and collecting parametres of a new device: the electronic nose.

There are some papers in literature which describe its potentialities in recognizing specific patterns suggestive of lung disease, both inflammatory (TB, COPD) and neoplastic (mesothelioma, NSCLC). Unfortunately none of these works defines the optimal conditions of use, the limits of the device, and the interferences of environmental or human factors on the processed signal. Our work was aimed to study the optimal condition of use and the

possible signal interference of environmental (eg humidity) or human (smoke, food, alcohol) variables.

Keywords: lung and pleural diseases, exhaled air, biomarkers, early diagnosis.

1. INTRODUZIONE	1
1.1 PATOLOGIA NEOPLASTICA POLMONARE MALIGNA	1
1.1.1 Epidemiologia.....	1
1.1.2 Fattori di rischio	2
1.1.3 Patogenesi.....	4
1.1.4 Classificazione	6
1.1.5 Diagnosi e stadiazione.....	7
1.1.6 Terapia	8
1.1.7 Prognosi.....	10
1.1.8 Diagnosi precoce e <i>screening</i> del NSCLC	11
1.2 PATOLOGIA NEOPLASTICA PLEURICA	13
1.2.1 Epidemiologia.....	13
1.2.2 Fattori di rischio	14
1.2.3 Patogenesi.....	15
1.2.4 Classificazione	17
1.2.5 Diagnosi e stadiazione.....	18
1.2.6 Terapia	19
1.2.7 Prognosi.....	20
1.2.8 Diagnosi precoce e <i>screening</i> del mesotelioma	20
1.3 PATOLOGIE BENIGNE ASBESTO CORRELATE.....	20
1.4 METODOLOGIE PER LA DIAGNOSI PRECOCE DI TUMORE POLMONARE E PLEURICO.....	25

2. SCOPO.....	31
3. PARTE SPERIMENTALE	32
3.1 STUDIO I.....	32
3.1.1 Materiali e metodi	32
3.1.1.1 Pazienti.....	32
3.2	39
3.2.1 MATERIALI E METODI.....	39
3.2.1.7.....	43
3.3 STUDIO III.....	47
3.3.1 Materiali e metodi	49
3.3.3 RISULTATI	53
3.3.2.1 Ottimizzazione dei parametri di raccolta del naso elettronico	53
3.3.2.1.1 Scelta dell'ago.....	53
3.3.2.1.2 Valutazione del tipo di <i>sampling bag</i> per la raccolta dell'aria esalata.	53
3.3.2.2 Ottimizzazione dei parametri di funzionamento del naso elettronico	54
4.1 STUDIO I.....	60
4.2 STUDIO II.....	63
4.3 STUDIO III.....	68
5. CONCLUSIONI.....	75

1. INTRODUZIONE

1.1 PATOLOGIA NEOPLASTICA POLMONARE MALIGNA

1.1.1 Epidemiologia

Per patologia neoplastica del polmone si intende una categoria diagnostica che comprende l'insieme delle neoplasie maligne originatesi dai tessuti epiteliali (carcinomi) che compongono i bronchi e il parenchima polmonare. Oltre il 95% delle neoplasie polmonari maligne è rappresentato dal carcinoma del polmone, mentre sarcomi e linfomi (che originano nel contesto delle strutture polmonari) costituiscono meno del 5% delle neoplasie polmonari.

Esiste una distinzione fondamentale tra neoplasie primitive, che originano dalle strutture polmonari propriamente dette, e neoplasie secondarie, che sono rappresentate da metastasi di tumori maligni derivanti da altri organi (es. prostata, mammella, fegato e rene).

Il carcinoma del polmone rappresenta la neoplasia maligna con il maggior tasso di incidenza e mortalità nel mondo: dati recenti indicano che vi siano circa 1.35 milioni di nuovi casi nel mondo e 1.18 milioni di morti, con la massima frequenza negli Stati Uniti d'America ed in Europa; le misure di prevenzione verso il fumo di tabacco hanno portato progressivamente ad una costante diminuzione del tasso di mortalità nei soggetti di sesso maschile, mentre nelle donne è stato osservato un andamento opposto [1]. Il carcinoma del polmone risulta essere meno frequente nei Paesi in via di sviluppo, nonostante sia stato documentato un notevole incremento di incidenza in Paesi come Cina ed India, nei quali verosimilmente è subentrata una maggior abitudine al consumo di sigarette [2, 3].

L'incidenza del carcinoma polmonare aumenta all'aumentare dell'età, la fascia maggiormente colpita risulta essere quella compresa tra i 50 e i 70 anni [4] e la mortalità resta ancora alta, con una sopravvivenza a 5 anni invariata negli ultimi 20 anni, ed assestata attorno al 10-15% [1].

In Italia nel 2004 sono morte 32840 persone per cancro polmonare: esso rappresenta la prima causa di morte per cancro nell'uomo e la seconda nella donna.

1.1.2 Fattori di rischio

Come nel caso delle altre patologie neoplastiche, il cancro del polmone presenta una eziopatogenesi multifattoriale. Il fumo di sigaretta è considerato il principale agente eziologico: secondo alcuni autori esso sarebbe responsabile di circa il 90% dei tumori polmonari maligni nei Paesi sviluppati [5]. Secondo uno studio Americano il fumo di sigaretta sarebbe responsabile dell'87% dei casi di cancro polmonare, con un'incidenza che aumenta considerevolmente in caso di esposizioni prima dei 25 anni di età [6, 7]. Il rischio percentuale di sviluppare cancro del polmone aumenta con l'aumentare del tempo di esposizione, il numero di sigarette fumate e l'intensità di inalazione del fumo [8]. In particolare a parità di esposizione (quantificabile in pacchi-anno) al di sotto di 15-20 sigarette/die il rischio risente maggiormente dell'intensità rispetto alla durata dell'esposizione, mentre al di sopra di 20 sigarette/die si osserva un andamento opposto [8]. Il rischio di insorgenza di cancro sembra inoltre ridursi gradualmente negli ex fumatori rispetto ai non fumatori, in relazione al tempo trascorso dalla sospensione dell'abitudine, senza mai uguagliare però quello dei non fumatori [9].

Il fumo di sigaretta è un aerosol formato da una fase vapore e da una fase particolata, costituita da particelle di circa 2.5 μm di diametro, nella quale sono contenuti circa 60 cancerogeni certi, inclusi radioisotopi provenienti dal decadimento del radon, benzopirene, alcune nitrosamine, elementi metallici [10]. Anche l'esposizione passiva a fumo di sigaretta rappresenta un fattore di rischio per l'insorgenza di cancro al polmone: in presenza di tale esposizione il rischio sembra aumentare del 15-20% [11].

L'esposizione a fumo di tabacco è stata classificata come cancerogena di gruppo I per l'uomo [12]. Sebbene il fumo rappresenti la principale causa di cancro al polmone, soltanto

una porzione di fumatori svilupperà nel corso della vita la malattia [13] e circa il 25% di tutti i tumori polmonari insorgono in non fumatori [14].

Tra gli altri fattori di rischio correlati al tumore polmonare sono state descritte anche le esposizioni professionali ad agenti cancerogeni, sia chimici che fisici. L'esposizione professionale sarebbe responsabile di una percentuale di carcinomi al polmone variabile tra l'1% e il 40%: tale variabilità potrebbe risentire di differenze temporali e geografiche nonché della distribuzione delle attività che espongono a cancerogeni, che può variare tra le varie Nazioni ma anche all'interno dello stesso Paese [15]. I principali agenti cancerogeni professionali sono rappresentati da idrocarburi aromatici policiclici, metalli (cromo, nichel, cadmio, berillio, arsenico), asbesto, radon e fumo passivo [16].

Anche l'inquinamento atmosferico è considerato un fattore causale per lo sviluppo di cancro polmonare e sarebbe responsabile del 5-7% dei tumori [17].

Secondo alcuni studi anche alcuni virus sarebbero in grado di intervenire nello sviluppo di cancro polmonare: la loro capacità oncogena è stata ampiamente dimostrata nel modello animale [18, 19] e recenti evidenze suggeriscono il ruolo potenziale di *papillomavirus*, *poliomavirus*, *simian virus 40*, *virus BK* e *citomegalovirus* nella patogenesi della suddetta malattia [20, 21].

Oltre ai fattori ambientali, anche i fattori genetici sono implicati nell'eziopatogenesi del carcinoma polmonare: la presenza di anomalie ereditarie a carico della proteina tumorale *p53* (come la Sindrome di Li-Fraumeni) e della proteina del retinoblastoma (*Rb*) predispongono alla malattia [22]. Diversi studi hanno inoltre mostrato che la diversa suscettibilità individuale all'insorgenza di cancro al polmone potrebbe essere almeno in parte spiegata dal polimorfismo genetico degli enzimi della biotrasformazione [23, 24], dei sistemi di riparazione del DNA [25, 26] e di altre proteine (fattori di controllo del ciclo cellulare, recettori, fattori di crescita).

Anche soggetti affetti da enfisema o broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), che in parte testimoniano l'esposizione massiva a fumo di sigaretta, hanno maggiore probabilità di sviluppo di cancro del polmone [27, 28], come pure una pregressa infezione tubercolare pare rappresenti un rischio per lo sviluppo di carcinoma, evento che prende il nome di *carcinoma su cicatrice* (che descrive l'innescò del processo neoplastico nel sito in cui è avvenuto il processo tubercolare) [29].

Si è osservato inoltre un incremento nel rischio d'insorgenza di carcinoma polmonare, indipendentemente dal fumo, in chi presenta una familiarità positiva per tale neoplasia [30, 31].

1.1.3 Patogenesi

La cancerogenesi polmonare è un processo multifasico derivante dall'accumulo di alterazioni genetiche che innescano un insieme di modificazioni in geni critici che contribuiscono all'iniziazione/insorgenza, sviluppo e progressione del cancro [32-34]. Negli ultimi anni sono state identificate e caratterizzate alterazioni genetiche ed anomalie molecolari frequentemente associate al cancro del polmone tra cui mutazioni a carico di specifici oncogeni quali *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog* (kRAS), e geni oncosoppressori come p53, aberrazioni cromosomiche come delezioni di 3p e 9p e anomalie epigenetiche in grado di alterare la struttura del DNA e di essere trasmesse attraverso la replicazione cellulare come l'ipermetilazione del DNA, che causa l'inattivazione di numerosi geni (es. *fragile histidine triad protein* [FHIT], *glutathione S-transferase pi gene* [GSTP1], *O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase* [MGMT]), l'acetilazione e la metilazione degli istoni [35-37].

Le suddette alterazioni determinano l'acquisizione di alcune caratteristiche peculiari delle cellule neoplastiche quali autosufficienza nei segnali di crescita, insensibilità ai segnali antiproliferativi, evasione della morte cellulare programmata, potenziale replicativo

illimitato, attività angiogenetica, invasività e metastatizzazione, perdita del differenziamento [38].

Un ruolo fondamentale nel processo di cancerogenesi sembra essere svolto dallo stress ossidativo che, causando l'ossidazione di macromolecole quali DNA, lipidi e proteine, ne altererebbe struttura e funzioni. Il fumo di sigaretta, come gli altri cancerogeni ambientali ed occupazionali citati precedentemente, sembra in grado di esplicare il suo potere cancerogeno attraverso un incremento della formazione di specie reattive derivate dall'ossigeno (ROS): i danni causati al DNA, se non riparati, possono condurre ad alterazioni della trascrizione genica, errori di replicazione ed instabilità genomica [39, 40]. Allo stesso modo il danno ossidativo a carico degli acidi grassi polinsaturi che compongono le membrane cellulari potrebbe generare reazioni durante le quali si possono formare composti intermedi altamente instabili in grado di interagire con il DNA [41, 42].

I ROS sono in grado di attivare fattori di trascrizione e l'attivazione di specifiche vie di trasduzione del segnale come *Mitogen-activated protein kinases* (MAP chinasi)/*activator protein 1* (AP-1) e *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), che regolano a loro volta la trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione e differenziazione cellulare, nell'apoptosi e nella neoangiogenesi [43-46].

Le cellule tumorali presentano inoltre un incrementato stress ossidativo, con conseguente aumento della produzione di ROS, dovuto alla stimolazione oncogenica, all'aumentata attività metabolica e ad alterazioni mitocondriali, tutti processi in grado di favorire la progressione neoplastica [45, 47].

Anche la flogosi cronica, caratteristica di alcune patologie polmonari quali la BPCO, sembra contribuire all'insorgenza dello stress ossidativo, fenomeno che spiegherebbe il legame tra alcune patologie e l'aumentato rischio di insorgenza del cancro polmonare [48-50]. L'infiammazione cronica sembra condurre alla formazione di un microambiente caratterizzato dall'aumentata presenza di cellule flogistiche, iperproduzione di ROS/specie

reattive derivate dall'azoto (RNS), presenza di numerosi fattori di crescita, citochine e chemochine in grado di causare modificazioni epigenetiche, stimoli proliferativi e neoangiogenesi [50-53].

1.1.4 Classificazione

La maggioranza dei tumori polmonari maligni origina dalle cellule dell'epitelio bronchiale ed è quindi rappresentata per il 90-95% da carcinomi, mentre solo per il 5% è costituita da carcinoidi bronchiali e il 2-5% da tumori mesenchimali o derivati dal tessuto linfatico [54].

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) suddivide le neoplasie epiteliali in 4 principali tipi istologici:

- carcinoma squamocellulare o epidermoidale, che insorge generalmente nei bronchi di grosso calibro interessando prevalentemente le regioni ilari;
- adenocarcinoma, che origina dalle cellule mucipare dell'epitelio dei bronchi di calibro inferiore ed ha uno sviluppo prevalentemente periferico;
- carcinoma a piccole cellule, a localizzazione prevalentemente centrale, caratterizzato da alta aggressività;
- carcinoma a grandi cellule, tumore indifferenziato la cui diagnosi avviene generalmente per esclusione.

Ai fini terapeutici e prognostici si ritiene più opportuno distinguere le neoplasie polmonari in 2 grandi gruppi:

- carcinoma polmonare a piccole cellule (*Small Cell Lung Cancer*, SCLC), che rappresenta circa il 17% dei tumori polmonari; si tratta di un tumore aggressivo a rapida crescita con diffusione metastatica precoce e, nonostante presenti alta sensibilità ai trattamenti radio e chemioterapici, la sopravvivenza mediana risulta compresa tra i 10 e i 16 mesi se il tumore si presenta in forma limitata, e tra i 6-12 mesi per le forme estese [55];

- carcinoma polmonare non a piccole cellule (*Non Small Cell Lung Cancer*, NSCLC), che comprende i restanti 3 istotipi definiti sopra e rappresenta circa l'80% di tutti i tumori polmonari; esso presenta i migliori risultati terapeutici e prognostici.

I restanti casi di neoplasie polmonari maligne possono essere distinti in:

- carcinoidi, originantesi da cellule del sistema neuroendocrino, che rappresentano circa l'1% dei tumori polmonari;
- sarcomi, tumori derivanti dal tessuto connettivo, che rappresentano circa lo 0.1% dei tumori polmonari;
- altri istotipi, tra cui i linfomi, che rappresentano meno del 2% dei tumori polmonari.

1.1.5 Diagnosi e stadiazione

La sintomatologia del cancro al polmone è piuttosto aspecifica e nella maggior parte dei casi diviene manifesta soltanto negli stadi avanzati; di conseguenza la diagnosi è di solito posta tardivamente o il tumore viene individuato in maniera occasionale.

Dal punto di vista anamnestico il paziente può presentarsi con sintomi quali dispnea, emoftoe, tosse cronica stizzosa, sibili, disfonia, dolore toracico, cachessia, disfagia e/o ippocratismo digitale. La radiografia (RX) del torace è generalmente il primo esame che viene eseguito per dare informazioni sulla presenza di una massa, sul coinvolgimento dei linfonodi mediastinici e sulla presenza di versamento pleurico. Qualora le informazioni provenienti dalla radiografia del torace non risultassero esaustive, si dovrà procedere con esami di secondo livello come la tomografia assiale computerizzata (TAC), che consente una valutazione più accurata delle lesioni di piccole dimensioni e di tutte le strutture toraciche e mediastiniche. Il passo successivo è rappresentato dalla biopsia, che, nel caso di lesione neoplastica confinata a livello periferico, si svolge attraverso una biopsia percutanea TC guidata; viceversa, una lesione neoplastica centrale deve essere indagata con una biopsia svolta in corso di broncoscopia.

Un ruolo importante è svolto dall'analisi citologica dello sputo, soprattutto per le forme di tumore centrale; questa analisi, unitamente ad altre procedure come l'RX del torace in soggetti a rischio (forti fumatori sopra i 50 anni), può avere un ruolo nella diagnosi precoce di carcinoma del polmone [56].

Le informazioni diagnostiche così ottenute vengono integrate con quelle derivanti dalla tomografia a emissione di positroni (PET), che consente di ottenere informazioni morfologico-funzionali sull'attività metabolica della lesione, utile in particolare nello studio del nodulo polmonare solitario e nella valutazione dell'eventuale interessamento linfonodale secondario, toracico ed extratoracico [57].

Le forme di tumore polmonare vengono classificate utilizzando il sistema internazionale TNM (*Tumor Nodes Metastasis*) adottato dall'*American Joint Committee on Cancer* [58], che considera l'estensione del tumore primitivo (parametro T), la localizzazione di linfonodi coinvolti (N) e la presenza di metastasi a distanza (M), come riportato in Tabella I. La combinazione dei suddetti parametri rappresenta i diversi stadi di malattia e permette la distinzione in categorie che si differenziano per le diverse opzioni terapeutiche e la prognosi (Tabella II).

1.1.6 Terapia

I comuni trattamenti terapeutici del cancro del polmone comprendono chirurgia, chemioterapia e radioterapia. La chirurgia toracica con accesso toracotomico rappresenta il primo presidio terapeutico nei pazienti affetti da NSCLC confinato ad un polmone e limitato allo stadio IIIA [59].

Le procedure chirurgiche comprendono la resezione atipica (rimozione del tessuto neoplastico e di piccola parte del parenchima polmonare che lo circonda), la segmentectomia (rimozione di una sezione di parenchima ventilato da un bronco segmentale), la lobectomia, la bilobectomia e la pneumonectomia [59]. Nei pazienti con riserva funzionale adeguata, la lobectomia costituisce l'opzione di scelta, in quanto

minimizza la possibilità locale di recidiva, mentre nei pazienti che non hanno un'adeguata riserva funzionale, la resezione atipica costituisce una valida alternativa [60].

La chirurgia toracica video assistita (*Video-Assisted Thoracic Surgery, VATS*), che costituisce un approccio mini-invasivo, e le procedure di lobectomia condotte con questo metodo possono presentare vantaggi nel più rapido recupero post-operatorio, nella più breve degenza e nei diminuiti costi ospedalieri [61].

Il carcinoma polmonare a piccole cellule viene trattato primariamente con la chemioterapia e la radioterapia, poiché la chirurgia non ha dimostrato influenzare la sopravvivenza. Alcune ricerche hanno tuttavia dimostrato che pazienti con SCLC confinato e senza coinvolgimento linfonodale risultino trarre giovamento, in termini di sopravvivenza, dall'associazione di chirurgia e chemioterapia [62-64]. I farmaci comunemente usati sono il cisplatino e l'etoposide [65]; possono essere anche usate combinazioni con carboplatino, gemcitabina, paclitaxel, vinorelbina, topotecano ed irinotecano [66, 67].

Nei casi di carcinoma polmonare a piccole cellule potenzialmente curabili, l'irradiazione del torace è raccomandata in associazione alla chemioterapia [68].

La chemioterapia rappresenta anche il primario approccio terapeutico in caso di NSCLC metastatico. La combinazione di regime dipende dal tipo di tumore: spesso i carcinomi non a piccole cellule vengono trattati con cisplatino o carboplatino in combinazione con gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, etoposide o vinorelbina [69].

La radioterapia è spesso associata alla chemioterapia nei pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule che non possono essere sottoposti all'intervento chirurgico. L'uso della radioterapia adiuvante per i NSCLC è ancora controverso, benché diversi benefici siano stati documentati nei tumori con coinvolgimento dei linfonodi mediastinici [70, 71].

Sia per i NSCLC che per i SCLC, i pazienti possono trarre giovamento per il controllo del dolore e dei sintomi attraverso piccole dosi di radioterapia (radioterapia palliativa).

I recenti miglioramenti nell'ottimizzazione e nella formazione dell'immagine radiografica hanno condotto allo sviluppo di tecniche di radioterapia stereotassica per il trattamento di carcinoma del polmone in fase iniziale. Questa metodica viene primariamente utilizzata in quei soggetti che, presentando co-morbidità, non possono essere candidati all'exeresi chirurgica [72].

1.1.7 Prognosi

La prognosi si basa sul tipo istologico e sulla stadio del tumore. Il carcinoma polmonare a piccole cellule ha una prognosi infausta, benché interventi di radioterapia e chemioterapia mirata nella forma localmente delimitata siano in grado di aumentare la sopravvivenza a 5 anni fino al 5% [54]. Nelle forme di NSCLC la sopravvivenza dipende soprattutto dalla classificazione, benché debba essere sempre considerata la presenza di patologie concomitanti. La stadiazione clinica (cTNM), ovvero basata sui reperti strumentali pre-operatori come la TC, la PET e la videotoracoscopia, e la stadiazione patologica (pTNM), basata sull'analisi anatomo-patologica e microscopica delle stazioni linfonodali e dei frammenti prelevati in seguito all'intervento di chirurgia toracica, presentano talvolta discrepanze a discapito della classificazione pre-operatoria [73].

La corretta stadiazione della malattia è quindi elemento imprescindibile per definire il trattamento terapeutico.

Ulteriori elementi prognosticamente sfavorevoli sono la presenza di sindromi paraneoplastiche come la sindrome di Cushing, la sindrome da inappropriata secrezione di vasopressina (*antidiuretic hormone*, ADH) e l'ipercalcemia. La comparsa di sindromi mediastiniche come disfonia, disfagia, grave dispnea e sindrome della vena cava superiore testimoniano la presenza di una malattia estesa, con rapida evoluzione verso l'*exitus* [74]. La presenza di polmonite da ostruzione, atelettasia e versamento pleurico sono condizioni che, oltre a condizionare la stadiazione e quindi la prognosi,

rappresentano ulteriori condizioni di comorbidità che devono essere trattate con terapie specifiche e mirate.

La sopravvivenza globale è rimasta pressochè invariata negli ultimi 20 anni, e si attesta attorno al 10-15% a 5 anni (Tabella III).

1.1.8 Diagnosi precoce e *screening* del NSCLC

La diagnosi precoce di cancro del polmone, in particolare NSCLC, più frequente e a prognosi più favorevole, appare un presupposto fondamentale per ottenere i migliori risultati terapeutici e migliorare ulteriormente la sopravvivenza. L'identificazione di una neoplasia ad uno stadio iniziale, quando ancora non ha causato sintomi e quando l'intervento precoce sia in grado di modificare il corso naturale della malattia, rappresenta l'obiettivo dello *screening* oncologico.

Grazie al continuo perfezionamento delle tecniche di *imaging*, negli ultimi anni si sta manifestando un crescente interesse verso l'applicabilità dei programmi di *screening* al cancro del polmone: la TC a basse dosi (LDTC) è una metodica più sensibile rispetto alla tradizionale RX, in grado di rilevare anche alterazioni di pochi millimetri con una dose limitata di radiazioni, ma nonostante ciò sembra non ci sia corrispondenza con la riduzione delle diagnosi in stadio avanzato e la mortalità.

Tuttavia, prima di assumere pienamente l'applicabilità clinica della LDTC, alcuni autori hanno preferito attendere la conclusione di uno studio randomizzato in corso alcuni anni fa e conclusosi nel giugno 2011, il *National Lung Cancer Screening Trial* (NLST). Esso confrontava due metodologie di diagnosi del cancro polmonare: TC spirale a basso dosaggio (*low-dose helical computed tomography*) e RX standard. Lo studio ha mostrato che i partecipanti sottoposti a TC spirale avevano una riduzione di mortalità per cancro polmonare dal 15 al 20% in meno rispetto a quelli sottoposti a RX: ciò equivaleva a circa 3 morti in meno ogni 1000 persone sottoposte a TC rispetto al gruppo di soggetti sottoposti a RX in un periodo di osservazione di circa 7 anni (17.6 per 1000 vs. 20.7 per 1000,

rispettivamente). L'adenocarcinoma e il carcinoma squamocellulare venivano diagnosticati più frequentemente nelle fasi iniziali rispetto al carcinoma a piccole cellule [75].

La valutazione dell'appropriatezza degli interventi di *screening* per il cancro polmonare è stata oggetto di una revisione di recente pubblicazione[76]: uno degli aspetti caratterizzanti questo documento consiste nel fatto che le evidenze sono state acquisite filtrando sistematicamente la letteratura in base alla qualità dei singoli studi disponibili. In tale documento veniva ribadita la validità dello studio condotto dal *National Cancer Institute* sopra citata [75]. Nel documento venivano inoltre affrontati tutti i temi collaterali inerenti questo approccio diagnostico, in particolare la dosimetria cumulativa di Radiazioni Ionizzanti (RI) conseguente alla diagnostica per immagini seriata e la possibilità della *overdiagnosis*, ossia la messa in evidenza di neoformazioni polmonari maligne che potrebbero non assumere significato clinico per motivi quali la lenta crescita tumorale ed il ruolo di patologie concomitanti o sopravvenute tali da poter comportare il decesso. In sintesi l'opinione degli esperti depone per un'evidenza positiva nell'applicazione della metodica, per la modesta rilevanza di rischio aggiuntivo da RI e per la difficoltà di definire l'esistenza o meno del fenomeno della *overdiagnosis* sulla base dei risultati ad oggi disponibili.

Nonostante le conclusioni del *Board* americano, gli autori delle Linee Guida della Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale (SIMLII) per la Sorveglianza Sanitaria degli Esposti ad Agenti Cancerogeni e Mutageni in Ambiente di Lavoro non hanno ritenuto opportuno inserire la suddetta modalità di indagine nei protocolli ufficiali di sorveglianza sanitaria, conferendole una valenza di forte raccomandazione [77].

Le metodiche di *imaging* attualmente in uso permettono di riscontrare lesioni anche di piccole dimensioni, ma i criteri morfologici e/o funzionali non sono sempre sufficienti a porre una diagnosi definitiva; ciò comporta la necessità di ricorrere a procedure invasive (broncoscopia, aspirato transtoracico, biopsia). Ulteriore problema è rappresentato dal

riscontro di lesioni nodulari solitarie di piccole dimensioni (<1 cm), frequente reperto occasionale alla TC, di non sicuro inquadramento nosologico e non facilmente tipizzabili con la biopsia. La gestione di questi particolari casi è legata alla probabilità di malignità intrinseca alla lesione stessa: se bassa è raccomandabile un *follow-up* clinico-radiologico (con ripercussioni psicologiche per il paziente che vive nella costante preoccupazione di un viraggio verso la malignità), mentre se alta prevale l'atteggiamento interventistico, purtroppo sempre gravato da una percentuale non trascurabile di falsi positivi, morbilità e mortalità [78-80].

1.2 PATOLOGIA NEOPLASTICA PLEURICA

1.2.1 Epidemiologia

La patologia neoplastica della pleura può essere primitiva o secondaria. Il coinvolgimento metastatico secondario è molto più frequente dei tumori primitivi; le neoplasie che maggiormente diffondono alla pleura sono quelle polmonari e della mammella, e, in secondo luogo, i carcinomi ovarici. Il tumore che nasce dalle cellule del mesotelio (strato intermedio dei 3 foglietti tissutali embrionali) viene definito mesotelioma, e può avere origine in 4 zone del corpo: nel torace, nell'addome e, molto raramente, nella cavità che circonda il cuore e nella membrana che riveste i testicoli. Il mesotelio è uno strato cellulare a significato epiteliale che avvolge le grandi cavità sierose (cavità pleurica, peritoneale e pericardica).

Il mesotelioma maligno è un tumore raro che colpisce più frequentemente gli uomini, ma sebbene non frequente, la sua importanza si è accresciuta negli ultimi anni a causa dell'aumento di incidenza verificatosi nei soggetti esposti all'asbesto. Nei cantieri navali delle regioni costiere degli Stati Uniti e della Gran Bretagna e nelle miniere del Canada e del Sud Africa più del 90% dei mesoteliomi è correlato all'esposizione ad asbesto. Il rischio di sviluppare un mesotelioma negli individui pesantemente esposti al minerale varia dal 7

al 10%. Il periodo di latenza per lo sviluppo di un mesotelioma correlato all'asbesto è variabile (25-45 anni).

In Italia esso rappresenta lo 0.4% di tutti i tumori diagnosticati nell'uomo e lo 0.2% di quelli diagnosticati nelle donne; ciò equivale a dire che si verificano 3.4 casi di mesotelioma ogni 100.000 uomini e 1.1 ogni 100.000 donne [81].

L'età media alla diagnosi è di 69.2 anni, senza differenze apprezzabili per genere (70.1 anni nelle donne e 68.8 negli uomini). Fino a 45 anni la malattia è rarissima (solo il 2.3% del totale dei casi registrati in Italia) e la percentuale di casi con un'età alla diagnosi inferiore a 55 anni è pari al 9.4% del totale. Il 71.6 % dei casi è di genere maschile [81].

Dai dati più recenti sembra che questo tumore nelle donne italiane sia in lieve ma costante aumento [82].

1.2.2 Fattori di rischio

Il principale fattore di rischio per lo sviluppo di mesotelioma è l'esposizione ad asbesto, in particolare alla crocidolite, appartenente al gruppo degli anfiboli, sia per le sue proprietà geometriche (rigidità ed elevato diametro), sia per l'elevata biopersistenza nei tessuti, sia per il suo contenuto in ferro, in grado di favorire la produzione di ROS: la maggior parte di questi tumori colpisce infatti individui che sono entrati in contatto con tale sostanza sul posto di lavoro.

Non esiste una soglia oltre la quale si può essere certi della pericolosità dell'amianto, in teoria anche l'inalazione di basse dosi di fibre può provocare il cancro, ma i rischi aumentano con l'aumentare dell'esposizione, sia in termini di tempo, sia di quantità: essi sono quindi molto elevati nelle persone che hanno lavorato in fabbriche per la produzione o la lavorazione di oggetti contenenti amianto. Anche i familiari di questi lavoratori sono a rischio, dal momento che le fibre di amianto si possono attaccare ai vestiti ed essere trasportate dal posto di lavoro fino a casa.

Altri fattori di rischio meno comuni per lo sviluppo di mesotelioma sono l'esposizione agli zeoliti, in particolare l'erionite (minerali con caratteristiche chimiche simili a quelle dell'amianto), alle radiazioni rivolte verso torace e addome (in particolare la chemioterapia), a cancerogeni chimici quali il diossido di torio (contenuto nel torotrasto, usato come mezzo di contrasto nella diagnostica a raggi X fino agli anni 50) e le pleuriti croniche [83-85].

In ultimo, solo di recente, si è ipotizzato che alcuni casi di mesotelioma potrebbero essere il risultato di mutazioni genetiche a trasmissione familiare, e pertanto non correlati all'esposizione ad asbesto, ma ad una ancora indefinita predisposizione genetica [86].

1.2.3 Patogenesi

La patogenicità delle fibre di asbesto per l'uomo è anzitutto dipendente dalle dimensioni, che devono essere tali da permetterne non solo l'inalazione, ma anche la penetrazione all'interno degli alveoli polmonari.

Il comportamento aerodinamico delle fibre condiziona la loro possibilità di raggiungere le vie respiratorie più periferiche e di depositarvisi: esso determina la loro "respirabilità" o "biodisponibilità" e di conseguenza, insieme alle loro caratteristiche chimiche, la permanenza nel tessuto biologico (bioresistenza), rendendo difficile il tentativo di inglobamento ed eliminazione da parte dei macrofagi interstiziali.

A seconda delle dimensioni, le fibre inalate possono andare incontro a diversi destini: se sufficientemente piccole, esse possono superare gli alveoli polmonari e raggiungere i linfonodi ilari per via linfatica; da questi, sempre attraverso il circolo linfatico, possono raggiungere il grosso intestino o la pleura. Le fibre di dimensioni maggiori si fermeranno agli alveoli e, proseguendo verso l'alto nella scala dimensionale, parallelamente si arresteranno a livelli via via superiori nell'albero bronchiale e nelle prime vie respiratorie.

Alcuni anni fa Chiappino [87] ha sostenuto l'ipotesi che solo le fibre ultrafini, ossia le fibre con diametro inferiore a 0.4 μm , visibili soltanto in microscopia elettronica, siano in grado

di attraversare la barriera polmone-pleura, costituendo perciò il vero agente causale delle patologie asbesto-correlate, in particolare del mesotelioma.

Altri autori hanno illustrato le possibili diverse vie metaboliche attraverso le quali l'asbesto agirebbe come cancerogeno [88]. Lo schema proposto da questi autori presenta sei possibili meccanismi:

- il primo implica che le fibre di asbesto penetrino nelle cellule bersaglio interagiscano con il DNA provocando aberrazioni cromosomiche (mutazioni): a seconda della gravità e della localizzazione della mutazione, alcune cellule non sopravvivono, altre cellule possono sopravvivere e continuare a funzionare normalmente, altre ancora possono subire un'espressione anormale del DNA, che potrebbe costituire la tappa d'iniziazione nel processo della cancerogenesi. Le fibre di asbesto interagiscono prontamente con le proteine sia all'esterno sia all'interno delle cellule;

- il secondo meccanismo dipende dalla capacità delle fibre di asbesto di interagire con frammenti di DNA e di agire come veicolo per questi frammenti verso l'interno della cellula, consentendo l'inserimento nel DNA del genoma;

- il terzo meccanismo consiste nel legame tra fibre di asbesto e tubulina, una proteina che costituisce l'apparato del fuso necessario alla separazione dei cromosomi durante la divisione cellulare. E' ancora sconosciuto se le anomalie cromosomiche siano parte del processo di induzione della cancerogenesi dovuta all'asbesto, oppure se esse possano essere alterazioni secondarie non specifiche che evolvono nel corso della progressione della crescita delle cellule maligne;

- il quarto meccanismo sarebbe legato alla capacità delle fibre di asbesto di trasferire elettroni verso molecole cellulari dopo essere entrate nella cellula, oppure interagendo sulla superficie di membrana; le molecole cellulari a loro volta interagirebbero col DNA genomico provocando mutazioni;

- il quinto meccanismo si identifica con l'attività promozionale dell'asbesto, secondo cui esso sarebbe in grado di legarsi a specifici siti di membrana e causare effetti epigenetici che altererebbero l'accrescimento e le funzioni della cellula. Queste alterazioni cellulari nell'espressione del DNA di una cellula già iniziata (cellula trasformata) sarebbero in grado di provocare la sua progressione verso una cellula cancerosa e, stimolando le specie reattive dell'ossigeno, provocare una seconda mutazione (trasformazione) necessaria per la formazione di una cellula cancerosa. La formazione di ROS e RNS potrebbe essere catalizzata dalla presenza di ferro nelle fibre di asbesto o attraverso reazioni supplementari sulla superficie della fibra stessa;

- il sesto meccanismo consiste infine in un processo infiammatorio indotto dall'asbesto, in quanto le fibre stesse attraggono i macrofagi. Alcuni di questi macrofagi verrebbero distrutti rilasciando ROS e frammenti di DNA, provocando la secrezione di fattori stimolanti la crescita dei macrofagi con rigenerazione cellulare nei siti di deposito. La liberazione di ROS può indurre mutazioni nelle cellule vicine che si trovano in fase replicativa; i frammenti di DNA derivati dai macrofagi distrutti possono legarsi alle fibre di asbesto, venire trapiantati in cellule confinanti ed inseriti nel DNA genomico.

1.2.4 Classificazione

Il mesotelioma maligno è una lesione diffusa che coinvolge ampiamente gli spazi pleurici e si associa, in genere, ad un cospicuo versamento e all'invasione diretta delle strutture toraciche. Il polmone colpito viene permeato e circondato da uno spesso strato di tessuto neoplastico, di consistenza piuttosto molle, aspetto gelatinoso e colore grigio-rossastro.

Esso insorge sempre dalla pleura parietale.

All'esame bioptico il mesotelioma pleurico può presentarsi sotto diversi aspetti: flogosi aspecifica, noduli (diametro <5 mm) o vegetazioni (diametro >5 mm), ispessimenti, pachipleuriti e placche. Dal punto di vista istologico esso viene distinto in:

- epiteliomorfo, forma più comune (60-70% dei casi), costituito da cellule cuboidali o cilindriche appiattite, che formano strutture papillari e tubulari simili a quelle di un adenocarcinoma;
- sarcomatoide (10-20% dei casi), che ricorda un sarcoma fusocellulare, in particolare il fibrosarcoma;
- misto, che mostra aspetti sia di tipo epiteliale che sarcomatoide.

Talvolta risulta difficile differenziare un mesotelioma epiteliomorfo da un adenocarcinoma polmonare; depongono a favore del primo i seguenti fattori [89]:

- positività delle colorazioni per mucopolisaccaridi acidi, inibita da una precedente digestione con ialuronidasi;
- negatività della colorazione immunistochemica per l'antigene carcinoembrionario (CEA) e per altri antigeni associati a glicoproteine epiteliali, *markers* generalmente espressi per l'ADK;
- forte positività per la presenza delle citocheratine, con rinforzo della colorazione in sede perinucleare più che alla periferia cellulare;
- presenza, alla microscopia elettronica, di microvilli ed abbondanti tonofilamenti, ma assenza di ciglia o di corpi lamellari.

1.2.5 Diagnosi e stadiazione

La sintomatologia tipica di esordio è conseguenza del versamento pleurico, pertanto il paziente avvertirà dispnea e dolore toracico, ai quali si possono associare perdita di peso e progressiva astenia. La contemporanea presenza di un versamento pleurico di difficile diagnosi e di dolore al torace dovrebbe sempre fare ipotizzare un mesotelioma tra le possibili diagnosi. Nelle fasi più avanzate della malattia, la profonda invasione della parete toracica determina la presenza di dispnea che si presenta anche a riposo.

Oltre ad anamnesi ed esame obiettivo, ci si avvale di strumenti quali RX o TC, analisi su liquido pleurico e biopsia; la TC risulta più sensibile rispetto alla RX standard nel valutare

la presenza e l'estensione del tumore, nonché la valutazione dell'invasione a livello mediastinico, parietale e addominale.

La PET non è raccomandata nella stadiazione poiché meno sensibile della TAC, ma sembra però di potenziale aiuto nella stadiazione stessa, sia per quanto concerne l'estensione locale di malattia, sia per la valutazione della diffusione linfonodale. Essa inoltre può essere utile sia nella distinzione tra lesioni benigne e maligne che nel *follow-up* (la positività delle lesioni sembra correlata all'efficacia delle terapie effettuate).

Per quanto riguarda la stadiazione, ne esistono diverse elaborate da vari autori nel corso degli anni [90-92], anche se attualmente la più utilizzata risulta essere quella dell'*International Mesothelioma Interest Group* (IMIG) del 1995 [93] (Tabella IV).

1.2.6 Terapia

Non esistono linee guida precise per trattamento di questa neoplasia a prognosi prevalentemente infausta: nello stadio 1 e in limitati casi degli stadi 2 e 3 è prevista la pleurectomia con decorticazione oppure la pleuro-pneumonectomia, ai quali si può associare la chemioterapia ipertermica intracavitaria (lavaggio continuo del campo operatorio con farmaci chemioterapici ad alte temperature, con lo scopo di sterilizzare la zona e ridurre il rischio di recidive).

Negli stadi più avanzati è prevista la terapia trimodale (chirurgia, chemioterapia, radioterapia), mentre allo stadio 4 sono previsti solo interventi di palliazione, tra cui la pleurodesi (procedura che consiste nel far aderire i due foglietti pleurici tramite mezzo chimico, meccanico o biologico, al fine di prevenire versamenti); il mezzo chimico usato più frequentemente per indurre questo fenomeno è il talco (talcaggio).

Contro il dolore si utilizzano analgesici, radioterapia e chemioterapia palliativa: la combinazione migliore sembra essere premetrexed+cisplatino, supplementata da vitamina B12 e folati per prevenire la mielodepressione (controindicata in soggetti con ridotta clearance della creatinina).

1.2.7 Prognosi

La sopravvivenza mediana varia tra i 12 ed i 15 mesi dall'inizio della sintomatologia, e tra gli 8 ed i 10 mesi dalla diagnosi. Allo stato attuale più del 75% dei pazienti muore entro l'anno e praticamente nessuno sopravvive a 5 anni. Ciò è dovuto al ritardo con cui viene effettuata la diagnosi. Fattori prognostici favorevoli sono la giovane età, il buon *performance status*, lo stadio iniziale della malattia. Il trattamento combinato andrebbe iniziato il più precocemente possibile evitando di affrontare la malattia in uno stadio avanzato con pazienti in condizioni generali compromesse.

1.2.8 Diagnosi precoce e *screening* del mesotelioma

Una volta determinati la causa del mesotelioma e gli individui ad alto rischio, lo *screening* (con TC e possibilmente biomarcatori sierici) rappresenta una possibilità teorica.

Inoltre la possibilità di disporre di segnali rilevabili con tecniche di laboratorio su substrati biologici facilmente accessibili, capaci di rilevare la presenza iniziale di un processo neoplastico o, preferibilmente, l'instaurarsi di una condizione biologica prodromica del futuro sviluppo di un mesotelioma è un'ambizione che da diversi anni attrae la ricerca scientifica. Attualmente, secondo le indicazioni del Centro Nazionale Applicazione Biotecnologie in Oncologia (CNABO), i marcatori tumorali non devono essere utilizzati in programmi di *screening* sulla popolazione generale per lo scarso valore predittivo positivo determinato dalla frequenza relativamente bassa della malattia nella popolazione sottoposta a *screening*.

1.3 PATOLOGIE BENIGNE ASBESTO CORRELATE

Le patologie non neoplastiche asbesto correlate possono essere localizzate sia a livello della pleura che del parenchima polmonare.

A livello pleurico possiamo trovare tre tipi di manifestazioni [94]:

- placche pleuriche, ispessimenti circoscritti che interessano esclusivamente la pleura parietale (diaframmatica compresa). Esse sono di norma multiple, bilaterali, talvolta simmetriche, hanno estensione e spessore variabili, risparmiano caratteristicamente apici e seni costofrenici e possono calcificare. Finchè mantengono le caratteristiche sopra riportate, esse non compromettono la funzionalità respiratoria e non degenerano in mesotelioma: possono pertanto essere considerate manifestazioni benigne e segno di una pregressa esposizione ad amianto.

Sono un reperto frequente in una popolazione professionalmente esposta (riscontrabile, in un *follow up* di 30 anni, in più del 50% dei soggetti). Generalmente vi è un periodo di latenza piuttosto lungo tra l'inizio dell'esposizione e la comparsa delle placche (dai 10 ai 30 anni).

Le placche pleuriche bilaterali localizzate alla pleura parietale costituiscono una lesione abbastanza specifica da asbesto. Non è stata dimostrata alcuna correlazione tra la comparsa delle placche ed i livelli di esposizione, esse sembrano maggiormente correlate alla durata dell'esposizione che alla dose di amianto a cui il soggetto è stato esposto: la presenza di placche è stata infatti descritta anche in relazione a livelli di esposizione relativamente bassi (esposizioni ambientali). Le placche pleuriche sono nettamente demarcate, hanno superficie liscia o irregolare e un colorito bianco-perlaceo. Microscopicamente sono formazioni ialine, avascolari e quasi acellulari. I fasci di collagene ialino hanno una caratteristica struttura a tessuto intrecciato. La calcificazione è comune. Il mesotelio che le ricopre è, di regola, intatto;

- ispessimento pleurico diffuso (condizione alquanto rara), costituito da un ispessimento di tipo fibroso e calcifico. Esso rappresenta una lesione cicatriziale aspecifica della pleura parietale e viscerale, solitamente bilaterale e simmetrica a carico dei campi medi e inferiori; per definizione deve interessare almeno un terzo

della superficie polmonare, con uno spessore di almeno 5 mm. Esso è quasi sempre asintomatico e, se particolarmente esteso, può causare sintomi al paziente quali dispnea, dolore toracico puntorio e alterazioni del profilo di funzionalità polmonare (pneumopatia restrittiva);

- versamento pleurico benigno, evento patologico relativamente poco frequente nella pratica clinica, considerato come la più precoce delle manifestazioni pleuriche dovute all'esposizione ad asbesto: esso può presentarsi anche dopo pochi anni dall'inizio dell'esposizione. Esso si riscontra nel 3% circa dei soggetti esposti ad asbesto, usualmente è asintomatico, unilaterale e autolimitante; è caratterizzato dalla presenza di essudato, a carattere emorragico nel 50% dei casi.

Tra le patologie a carico del parenchima polmonare possiamo invece riscontrare [94]:

- atelettasia rotonda, lesione benigna, a localizzazione polmonare sottopleurica, con aspetto radiologico in genere nodulare. Essa può essere associata all'esposizione ad asbesto, a seguito di versamenti pleurici benigni ricorrenti cui segue l'invaginazione della pleura viscerale con il collasso del parenchima circostante, oppure può essere causata da una zona di fibrosi pleurica viscerale che esercita trazione sul parenchima polmonare vicino. Essa è caratterizzata dalla presenza di masse circolari di 2-7 cm costituite da tessuto fibroso denso, trascinato all'interno di tessuto polmonare atelettasico. Sono usualmente asintomatiche, ma all'RX possono mimare un quadro neoplastico;
- asbestosi, pneumoconiosi definita come fibrosi interstiziale del polmone secondaria all'inalazione e alla ritenzione di un considerevole numero di fibre di asbesto, usualmente dopo prolungata esposizione. Le fibre di asbesto vengono dapprima fagocitate dai macrofagi alveolari e così trasportate al centro dell'acino, dove si accumulano all'interno delle pareti dei bronchioli respiratori di I e II ordine, dando luogo ad una reazione fibrotica locale. Le fibre hanno una modesta azione tossica

diretta sui macrofagi, ma determinano soprattutto un effetto di maturazione e richiamo dei macrofagi stessi.

I macrofagi, oltre all'azione fagocitica, svolgono un'azione di secrezione e di regolazione, modulando la produzione di collagene da parte dei fibroblasti.

Il fattore di crescita derivato dalle piastrine (*Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF) sembra essere la principale citochina che porta alla proliferazione fibroblastica, mentre il fattore di crescita trasformante β (*Transforming Growth Factor- β* , TGF- β), prodotto dai macrofagi, agisce sui fibroblasti determinando la produzione di fibronectina e procollagene. Il processo fibrotico così innescato si estende perifericamente a tutto l'acino, determinando una fibrosi interstiziale diffusa. La fibrosi inizia in sede subpleurica, a livello dei lobi inferiori, diffondendosi poi al lobo medio e alla lingula; i lobi inferiori sono la zona più colpita.

La lesione iniziale è una fibrosi peribronchiale causata dalle fibre di asbesto localizzate negli alveoli e nei bronchioli respiratori terminali. I macrofagi alveolari fagocitano molte fibrille, con conseguente morte cellulare e attrazione di una rete di fibrille di reticolina. Talora diversi macrofagi possono tentare di digerire una fibra di lunghe dimensioni. Il liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) mostra un aumento del contenuto di cellule, con incremento della percentuale di neutrofili. Si attivano i fibroblasti e si deposita del collagene. Le alterazioni macroscopiche portano a polmoni piccoli e fibrotici, spesso con formazioni "a favo d'api" osservate nei lobi inferiori. Microscopicamente, le pareti alveolari appaiono ispessite; ci possono essere aree di fibrosi diffusa; la presenza di corpuscoli dell'asbesto è un reperto comune.

Il *College of American Pathologists* ha sviluppato un criterio di classificazione patologica dell'asbestosi basato sia sull'estensione, sia sulla gravità del coinvolgimento del parenchima polmonare [95].

Per quanto riguarda l'estensione, essa viene graduata sul piano anatomico come segue:

- A: implicazione occasionale degli alveoli respiratori;
- B: implicazione maggiore rispetto alla precedente, ma coinvolgimento dei bronchioli inferiore al 50%;
- C: coinvolgimento dei bronchioli superiore al 50%.

Per quanto riguarda la gravità sono previsti i seguenti livelli:

- grado 0: assenza di fibrosi;
- grado I: fibrosi peribronchiale che interessa la parete alveolare di almeno un bronchiolo respiratorio;
- grado II: fibrosi che interessa anche i dotti alveolari o due o più setti alveolari;
- grado III: fibrosi avanzata di tutti gli alveoli tra due bronchioli adiacenti;
- grado IV: rimodellamento a favo d'api con grossi spazi dilatati (superiori a 1 cm) visibili nel parenchima.

I sintomi principali dell'asbestosi sono la dispnea, la tosse e il dolore toracico di tipo puntorio. La dispnea può essere variabile, ma con decorso progressivo; tuttavia, quando compare significa che la malattia ha già raggiunto una fase avanzata.

La tosse con escreato è un segno comune: possono essere inoltre presenti dolore toracico di tipo pleurítico e senso di costrizione toracica. Questi sintomi, tuttavia, possono anche essere rappresentativi di una malattia concomitante, quale il cancro polmonare o un versamento pleurico. Nelle regioni postero-laterali delle basi polmonari, a fine inspirazione, possono essere uditi rantoli secchi, a scroscio, che non scompaiono dopo un colpo di tosse. Nelle fasi avanzate della malattia si possono osservare dita a bacchetta da tamburo.

La diagnosi di asbestosi è basata (come proposto dall'*American Thoracic Society* [96] e confermato dal Documento di Helsinki [97, 98]) sui seguenti criteri:

- evidenza di definita fibrosi interstiziale, come indicato da una o più delle seguenti manifestazioni: crepitii a fine inspirazione all'auscultazione del torace; riduzione dei volume polmonari e/o del test di diffusione alveolo-capillare del monossido di carbonio (DL_{CO}); presenza di reperti radiografici o HRCT suggestivi di patologia interstiziale polmonare; segni istologici di fibrosi interstiziale;
- storia documentata di esposizione ad asbesto con appropriato periodo di latenza dall'inizio dell'esposizione al momento della presentazione (solitamente 15 o più anni, ma almeno 10), e/o presenza di marcatori di esposizione (es. placche pleuriche o riscontro di quantità sufficienti di fibre/corpuscoli dell'asbesto nel BAL o nel tessuto polmonare);
- esclusione di altre condizioni compatibili con patologia parenchimale diffusa.

1.4 METODOLOGIE PER LA DIAGNOSI PRECOCE DI TUMORE POLMONARE E PLEURICO

L'approccio molecolare nella diagnosi del cancro del polmone e della pleura è complementare alle tecniche di diagnostica per immagini ed ha lo scopo di aumentarne la specificità, in modo tale da contribuire a confermare o escludere la diagnosi con metodiche poco o nulla invasive.

Negli ultimi anni sono stati individuati nuovi approcci, in particolare lo studio delle alterazioni molecolari presenti nelle cellule neoplastiche. Tali alterazioni si possono considerare validi bersagli per lo sviluppo di test diagnostici basati su tecniche molecolari, come la presenza di particolari *pattern* di sostanze volatili nell'aria espirata [99-104].

Per quanto riguarda l'analisi del profilo tumorale su sangue negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi mediante la tecnica dei *microarrays* su DNA complementare (cDNA) e sono stati identificati profili di espressione genica significativamente correlati con

la prognosi [105]. Studi ancora più recenti mostrano il possibile ruolo dei microRNA (miRNA), piccoli RNA non codificanti, generalmente lunghi tra 18-25 nucleotidi, in grado di regolare l'espressione genica a livello post-trascrizionale attraverso la degradazione di specifici RNA messaggeri (mRNA), o attraverso l'inibizione della traduzione in proteina [106]. I livelli dei miRNA nel plasma, a differenza dell'RNA, sono molto stabili, caratteristica che consentirebbe di utilizzarli come nuovi marcatori molecolari non invasivi nella diagnosi del cancro [107]. Incrementi o decrementi nell'espressione dei miRNA potrebbero infatti essere correlati alla regolazione di oncogeni o soppressori tumorali, e perciò esplicitare una funzione importante nell'insorgenza di numerose forme tumorali: l'individuazione di diversi profili di espressione dei miRNA nel tessuto neoplastico rispetto alla sua controparte normale conferma l'ipotesi di un probabile coinvolgimento degli stessi nello sviluppo e progressione tumorale [108]. Evidenze sperimentali hanno mostrato il coinvolgimento dei miRNA nella regolazione dei processi biologici che portano all'acquisizione del potenziale metastatico tra cui adesione, invasione, migrazione, transizione epiteliale-mesenchimale e angiogenesi [109]. Negli ultimi anni è stata inoltre osservata la presenza di miRNA nel plasma umano in diversi tipi di tumore, tra cui quello polmonare e pleurico [110, 111]. Un recente studio ha infine riportato che casi ancora asintomatici di cancro polmonare diagnosticati mediante *screening* con TC sono associati a cambiamento nel profilo dei miRNA circolanti [112].

Un'altra matrice potenzialmente utile per l'analisi di biomarcatori non volatili si è rivelata essere il condensato dell'aria esalata (CAE). Esso è composto per più del 99% da acqua, ma contiene anche particelle in aerosol provenienti dal tratto respiratorio inferiore, in particolare nitrati e nitriti, eicosanoidi, idrogenioni, acqua ossigenata (H₂O₂), prodotti della perossidazione lipidica, citochine, proteine e DNA. Gli studi sulla diagnosi precoce del cancro al polmone compiuti fino ad oggi analizzando il CAE di soggetti malati e confrontandolo con gruppi di controllo sono poco numerosi: i principali hanno riscontrato

un aumento di H₂O₂ [113] e mutazioni di p53 [114], mentre alterazioni di microsatelliti nella regione cromosomica 3p con perdita dell'eterozigosi ed instabilità [115], incrementi di endotelina-1, leptina, Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleuchine 1 e 6 (IL-1, IL-6) [116-118] non sono state confermate in altri laboratori.

Recentemente parecchi lavori hanno mostrato la correlazione tra alcuni VOCs presenti nell'aria esalata e cancro del polmone: Phillips et al. usando un profilo di 22 VOCs hanno saputo discriminare tra pazienti con e senza cancro al polmone [98], mentre Poli et al., usando un profilo di 13 VOCs, hanno saputo classificare correttamente varie patologie polmonari tra cui cancro NSC, con una sensibilità del 71.4% ed una specificità del 91.1% [103]. L'identificazione dei suddetti VOCs prevede come tecnica analitica di prima scelta l'utilizzo della gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS), ma negli ultimi anni stanno emergendo nuove metodiche basate sulla spettrometria quali quella a laser, a mobilità ionica, a mobilità differenziale, nonché dispositivi con sensori.

I marcatori tumorali possono essere definiti come qualsiasi segnale biologico misurabile in una matrice biologica correlato alla presenza del tumore: le sostanze che rispondono a questo requisito sono varie e possono essere espressione sia dell'interazione tra ospite e tumore, sia di un prodotto del metabolismo del tessuto neoplastico.

La disponibilità di biomarcatori è tuttora piuttosto esigua, in particolare per quanto riguarda i tumori di interesse nel campo delle Medicina del Lavoro. Nonostante questa premessa negli ultimi anni in campioni di siero di pazienti neoplastici, tra cui soggetti affetti da neoplasie polmonari, sono stati individuati anticorpi circolanti che reagiscono specificatamente con antigeni associati al tumore, e che possono quindi costituire un precoce indicatore della presenza di cancro [119].

Nel caso del cancro polmonare è possibile che, data l'eterogeneità dell'espressione antigenica, sia necessario avvalersi di un *panel* di test per gli autoanticorpi verso le differenti specie di antigeni associati al tumore, per poter ottenere una efficace ed effettiva

detezione della malattia [120]. Alcuni studi infatti sembrano confermare come la ricerca di più autoanticorpi attivi verso un *panel* di antigeni offra un livello di significatività più elevato in confronto a quello fornito da un solo antigene [121]. Risultano interessanti a questo riguardo i risultati di Patz et al. [122], che hanno proposto un metodo in cui vengono applicati algoritmi che combinano i risultati della misura di marcatori sierici per il cancro al polmone (CEA, alfa-1-antitripsina [AAT], antigene del carcinoma a cellule squamose [SCC]) e le dimensioni di noduli polmonari evidenziati con tecniche di *imaging*: l'applicazione di questi algoritmi sembrerebbe un valido supporto nella gestione di pazienti che presentano noduli di piccole dimensioni di cui non sia possibile definire, inizialmente, la natura benigna o maligna. Lo sviluppo di questa linea di ricerca potrebbe portare a risultati interessanti, consentendo di superare una delle criticità nell'ambito delle tecniche di *imaging*. Sarebbe difatti possibile disporre di uno strumento affidabile per la gestione di noduli polmonari di piccole dimensioni di natura indeterminata, anche se alcuni studi di *follow-up* di soggetti ex esposti ad asbesto non hanno rilevato significative criticità nel *management* [123].

Recenti indagini hanno valutato l'associazione tra mesotelioma e una serie di marcatori sierici, tra cui il Fattore di Crescita dell'Endotelio Vascolare (VEFG) [124], l'Interleuchina 8 (IL-8) [125]; l'antigene polipeptidico tissutale (TPA), l'antigene carboidratico 125 (CA-125) [126], il frammento della citocheratina 21-1 (Cyfra 21-1) [127], la mesotelina solubile e l'osteopontina.

Robinson et al. [128] hanno esaminato con metodica immunoenzimatica i livelli sierici di mesotelina solubile in 48 pazienti affetti da mesotelioma maligno, 160 pazienti con affezioni pleuriche o polmonari di diversa natura (comprendenti placche pleuriche asbesto-indotte, ispessimenti pleurici diffusi, asbestosi e carcinoma polmonare), 40 controlli sani con pregressa esposizione ad asbesto e 28 controlli sani senza storia di esposizione. Il marcatore ha mostrato una sensibilità ed una specificità per il mesotelioma pari

rispettivamente all'83% e al 95%: 40 dei 48 pazienti con tale malattia presentavano livelli sierici di mesotelina aumentati in misura significativa, sia rispetto ai controlli esposti che a quelli non esposti ($p < 0.001$ in entrambi i casi). I livelli di mesotelina, per contro, erano aumentati in misura significativa solamente nell'1.25% dei pazienti con altre affezioni pleuropolmonari, ed in nessun soggetto affetto da carcinoma polmonare. Va evidenziato come nell'ambito dei pazienti affetti da mesotelioma, il 75% presentasse un aumento significativo del marcatore già al momento della diagnosi; risultava inoltre una correlazione tra livelli sierici di mesotelina e dimensioni del tumore. Altro dato interessante in questo studio era il significativo aumento dei livelli sierici di mesotelina sierica in 7 dei 40 controlli esposti all'asbesto, di cui 3 con sviluppo di mesotelioma nei 5 anni successivi all'esame.

Hassan et al. [129] hanno documentato elevati livelli di mesotelina sierica in 40 pazienti su 56 affetti da mesotelioma (71%); il gruppo di questi pazienti includeva 3 casi di mesotelioma peritoneale nei quali i livelli del *marker*, inizialmente elevati, si sono rapidamente azzerati dopo un intervento di chirurgia citoreducitiva. Lo studio ha anche evidenziato elevati livelli di mesotelina in 14 casi su 21 (67%) di carcinoma ovarico, neoplasia con elevato potere metastatizzante a carico delle sierose, ponendo problemi di diagnosi differenziale con il mesotelioma pleurico.

Ulteriore conferma dell'attendibilità della mesotelina come indicatore di mesotelioma è stata fornita da uno studio del 2006, che ha mostrato livelli significativamente più elevati in pazienti affetti da tale malattia rispetto a pazienti con metastasi pleuriche di ADK polmonare ex-esposti ad asbesto [130].

Anche una recente metanalisi ha mostrato il potenziale ruolo di marcatore della mesotelina [131]; tuttavia la sua scarsa sensibilità limita il suo valore aggiunto nella diagnosi precoce.

L'osteopontina è una glicoproteina che svolge un ruolo nei percorsi biomolecolari associati all'oncogenesi asbesto-indotta; Pass et al. [132] ne hanno indagato il suo ruolo potenziale e ne hanno misurato i livelli in 76 pazienti affetti da mesotelioma pleurico maligno, 69

pazienti con patologie respiratorie asbesto-indotte di natura non neoplastica e 45 controlli senza storia di esposizione all'asbesto. I risultati dello studio hanno mostrato un significativo aumento ($p<0.001$) dei livelli sierici nel gruppo dei pazienti affetti da mesotelioma rispetto a quello dei pazienti con patologie non neoplastiche, mentre non è risultata alcuna differenza statisticamente significativa tra quest'ultimo gruppo e quello dei controlli non esposti ($p=0.06$).

Dati più recenti confermano l'importanza della mesotelina e dell'osteopontina, e sostengono l'importanza di una valutazione congiunta dei due marcatori, che accrescerebbe sensibilità e specificità all'informazione, pur tuttavia sottolineando come i dati disponibili siano ancora insufficienti nel definire le reali potenzialità nella diagnosi precoce del mesotelioma maligno [133]. In particolare alcuni studi mostrano una certa utilità dei marcatori sia come indicatori prognostici che nel *follow-up*, ma dal punto di vista diagnostico l'osteopontina sarebbe poco specifica, e la mesotelina avrebbe sensibilità e specificità sufficienti soprattutto nelle forme epiteliali [134, 135].

Sempre il gruppo di lavoro di Pass [136] ha proposto nel 2012 la fibulina-3 come nuovo biomarcatore solubile per la diagnosi di mesotelioma maligno. L'accuratezza diagnostica dei livelli plasmatici di fibulina-3 nelle coorti considerate, in termini di *area under curve* (AUC) ha superato quella di qualsiasi altro marcatore precedentemente considerato. Tuttavia nella coorte di validazione esterna si notava una notevole diminuzione dell'accuratezza diagnostica, equiparabile a quella della mesotelina sierica.

1. SCOPO

Scopo del presente studio è stato inizialmente la valutazione di nuovi indicatori volti a riconoscere precocemente patologie asbesto-correlate sia maligne (mesotelioma pleurico e cancro del polmone) che benigne (asbestosi) al fine di identificare un indicatore o un gruppo di indicatori dotati di potere diagnostico sufficientemente elevato per poter discriminare, nell'ambito di soggetti ad alto rischio di sviluppare patologie asbesto-correlate, patologie benigne da patologie maligne potenzialmente curabili.

L'attenzione è stata successivamente rivolta alla diagnosi precoce di patologie neoplastiche potenzialmente curabili a carico del solo parenchima polmonare: è stato valutato un gruppo di composti organici volatili (VOCs), tra cui pentano, 2-metilpentano, esano, etilbenzene, eptanale e trans-2-nonenale, raccolti con metodiche non invasive, per verificare il loro potere diagnostico nel distinguere patologie benigne da patologie maligne potenzialmente curabili in un gruppo di soggetti ad alto rischio di sviluppare cancro del polmone.

Contemporaneamente è stato messo a punto un sistema per la raccolta di indicatori precoci in matrici facilmente accessibili e a basso costo come l'aria esalata, allo scopo di poterle analizzare anche con strumenti semplici ed economici, come il naso elettronico. È stato compiuto un lavoro di ottimizzazione e standardizzazione dei parametri di impostazione e raccolta di questo nuovo strumento, sul quale esistono numerosi lavori in letteratura, ma del quale mancano descrizioni uniformi circa le condizioni di utilizzo, i limiti e le interferenze di fattori ambientali e soggettivi.

2. PARTE SPERIMENTALE

3.1 STUDIO I.

YKL-40 E MESOTELINA NEL SANGUE DI PAZIENTI AFFETTI DA MESOTELIOMA PLEURICO MALIGNO, CANCRO DEL POLMONE E ASBESTOSI

Scopo di questo studio trasversale è stato quello di investigare un *panel* di biomarcatori indipendenti che potessero migliorare la sensibilità e la specificità della singola mesotelina come biomarcatore di mesotelioma maligno in soggetti con pregressa esposizione professionale ad asbesto.

3.1.1 Materiali e metodi

3.1.1.1 Pazienti

La casistica è costituita da 4 gruppi di individui: il primo include soggetti affetti da patologie polmonari o pleuriche (ispessimento pleurico e/o asbestosi) non maligne asbesto-correlate riconosciute dall'Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro (INAIL) sulla base di esposizione professionale documentata all'asbesto, accompagnata da quadro HRCT positivo. I pazienti affetti da asbestosi sono stati reclutati durante una fase clinicamente stabile di malattia quando si sottoponevano a trattamenti termali supportati dall'INAIL stesso. Gli altri tre gruppi erano costituiti da: pazienti con diagnosi biptica di mesotelioma maligno (MM); pazienti affetti da cancro al polmone reclutati presso l'Università degli Studi di Parma al momento della diagnosi prima di ricevere qualsiasi tipo di trattamento; un gruppo di controllo costituito da pazienti afferenti al Servizio di Endoscopia Toracica della stessa Università per scopi diagnostici, ma che non mostrassero segni di malignità e che non fossero mai stati esposti professionalmente ad asbesto.

I soggetti con stadio tumorale indefinito erano coloro i quali non avevano completato l'iter diagnostico nonostante l'evidenza istologica: sono stati considerati nel campione intero,

ma sono stati esclusi dalla stratificazione successiva a causa della carenza di informazioni.

I soggetti affetti da MM e quelli affetti da NSCLC sono stati stadiati secondo la classificazione TNM.

Da tutti i partecipanti è stato raccolto un campione di sangue venoso. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico locale (approvazione numero 9509).

3.1.1.2 Marcatori sanguigni

Le concentrazioni sieriche/plasmatiche di tutti i biomarcatori (mesotelina, YKL-40, VEGF, endotelina-1, IL-8, fibulina-3) sono state misurate usando specifici saggi immunoenzimatici disponibili in commercio (*enzyme-linked immunosorbent assays*, ELISA).

La presenza di peptidi solubili correlati alla mesotelina (SMRPs) è stata valutata usando il saggio immunoenzimatico Mesomark[®] (*Fujirebio Diagnostic Inc.*, Malven, PA, USA), basato su due differenti anticorpi monoclonali con calibratori (2-32 nm) riferiti ad uno standard preparato dal produttore. La più bassa concentrazione dell'antigene che poteva essere rilevata rispetto allo zero era pari a 0.3 nM.

Il *range* di funzionalità del saggio immunologico di YKL-40 (*Quidel Corporation*, San Diego, CA, USA) variava da 20 (livello minimo di rilevabilità) a 300 ng/ml.

VEGF ed endotelina sono stati entrambi misurati usando saggi enzimatici quantitativi (*R&D Systems*, Minneapolis, MN, USA). Il saggio per VEGF forniva accurate misure in un range tra 31.2–2000 pg/ml, e aveva un limite di rilevabilità pari a 9 pg/ml. La più alta concentrazione dosabile dal *kit* per endotelina-1 umana era pari a 120 pg/ml, ed il limite di rilevabilità era circa pari a 1 pg/ml. I campioni sono stati preparati in accordo con il protocollo di estrazione suggerito dal produttore e le concentrazioni derivate dalle curve *standard* sono state corrette/divise per fattore di ricostituzione.

Il test ELISA ultra-sensibile per IL-8 umana (*Invitrogen Corporation*, Camarillo, CA, USA) aveva un limite di rilevabilità <100 fg/mL, e la più alta concentrazione saggiabile era pari a

25 pg/ml. L'intensità del prodotto colorato è stata letta tramite fotometro termo-controllato *Multiskan Ascent* (*Thermo Labssystem*, Helsinki, Finland). Il coefficiente di variazione intra- ed inter-saggio (CVs) di tutti i saggi era <10% alle differenti concentrazioni.

La concentrazione plasmatica di fibulina-3 è stata quantificata usando il saggio immunoenzimatico prodotto dalla *USCN Life Science Inc.* (Wuhan, P.R. China) in conformità al protocollo del produttore. Il *kit* fornisce accurate misure in un range compreso tra 1.56 e 100 ng/ml ed ha un limite di rilevabilità di 0.55 ng/ml.

3.1.1.3 Analisi statistica

La distribuzione dei dati è stata valutata tramite il test di Kolmogorov-Smirnov. Sia in caso di distribuzioni normali che non-normali, le differenze tra i gruppi sono state valutate usando il test di Kruskal-Wallis seguito dal test di Dunn per confronti multipli. I dati non normalmente distribuiti sono stati espressi come mediana (intervallo interquartile). La correlazione di Spearman è stata usata per testare le relazioni tra coppie di variabili. I valori di odds ratio (OR) non aggiustati o non normalizzati sono stati calcolati usando modelli di regressione logistica binaria o multinominale (usando i controlli come gruppo con OR=1), mentre le OR aggiustate sono state calcolate aggiungendo altre covariate al modello come indicato.

Per testare la sensibilità e la specificità di un marcatore sono state utilizzate curve ROC, con area sotto la curva (AUC) con intervallo di confidenza al 95% per trovare i valori di *cut-off*. Il *cut-off* è qual valore che corrisponde alla massima somma di sensibilità e specificità. I valori di *cut-off* sono stati ulteriormente utilizzati per distinguere gli individui multi-positivi (per esempio coloro che avessero avuto più di un test con un valore uguale o maggiore al valore di *cut-off*). Nel caso in cui fosse stato usato più di un marcatore, per costruire la curva ROC, al posto dei valori dei marcatori, è stata utilizzata la probabilità di appartenere ad un determinato gruppo, calcolata tramite regressione logistica.

L'analisi statistica è stata effettuata usando il *software* IBM SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY, USA) e sono stati considerati significativi valori di p pari a 0.05.

3.1.1.4 Risultati

La Tabella V mostra le caratteristiche dei gruppi studiati, che non sono perfettamente omogenei in termini di genere ($p=0.08$), età ($p<0.01$, i controlli erano significativamente più giovani rispetto agli altri tre gruppi), ed abitudine al fumo ($p<0.01$; i non fumatori variavano dal 13.5% nel gruppo NSCLC al 50% circa negli altri tre gruppi). I risultati tuttavia sono stati controllati per questi possibili fattori di confondimento nei modelli aggiustati. L'influenza della diagnosi [(adenocarcinoma (ADK) vs. carcinoma squamo-cellulare (SCC)] e dello stadio (I vs. II - IV) è stata valutata nei pazienti affetti da NSCLC; in coloro affetti da MM, gli stadi I-IV sono stati considerati separatamente, e la diagnosi di MM epitelioide è stata confrontata con le altre forme.

Mesotelina: in Figura 1 è rappresentato il diagramma di dispersione dei valori di mesotelina sierica. I pazienti affetti da MM mostravano livelli significativamente più elevati rispetto agli altri tre gruppi, con valori di mediana superiori ai valori di controllo; non sono state riscontrate differenze tra i valori degli altri tre gruppi.

Nel gruppo di soggetti affetti da NSCLC, né l'istotipo né lo stadio (I vs. II-III-IV) influenzavano in maniera statisticamente significativa i valori di mesotelina. Si poteva notare un *trend*, per quanto non significativo, verso valori più elevati nel gruppo di pazienti con MM, progredendo dallo stadio I allo stadio IV ($p=0.08$), sebbene l'istologia non mostrasse effetti (epitelioide vs. altre forme). Il genere e l'abitudine al fumo non mostravano effetti significativi sui livelli di mesotelina considerando sia la coorte *in toto*, che i singoli gruppi, ma sono stati ugualmente inclusi nei modelli multivariati. L'età correlava debolmente con i livelli di mesotelina ($r=0.24$; $p<0.01$) considerando l'insieme dei gruppi, e la correlazione raggiungeva valori di r pari a 0.30 nel gruppo di soggetti affetti da MM; l'età poteva pertanto essere considerata un debole fattore di confondimento.

La Tabella VI mostra i valori di OR non aggiustati e aggiustati (per incremento dei valori di mesotelina pari a 1 nM) nei quattro gruppi e nel gruppo MM vs. gli altri; in entrambi i casi i valori di OR non cambiavano quando l'analisi veniva aggiustata per i fattori di confondimento.

Per valutare il potere diagnostico della singola mesotelina nel gruppo di pazienti affetti da MM verso gli altri gruppi *in toto* è stata costruita una curva ROC (Figura 2). L'AUC era pari a 0.85 (0.79-0.91), significativamente maggiore di 0.5. Il valore di *cut-off* era pari a 1.26 nM, con una sensibilità del 74% e una specificità dell'86.1%. In Figura 3 sono mostrati i risultati derivanti dall'applicazione di questo valore al gruppo di MM considerando stadio e istologia (epitelioide vs. altre forme): la sensibilità raggiungeva i massimi livelli nei soggetti affetti da MM epitelioide allo stadio III-IV (88.8%), e i minimi nei pazienti affetti da MM epitelioide allo stadio I-II (57.1%).

YKL-40: La Figura 4 mostra l'andamento dei livelli sierici di YKL-40, che apparivano più elevati nel gruppo di soggetti affetti da MM. I pazienti affetti da NSCLC mostravano valori maggiori rispetto ai controlli, ma questi non correlavano con l'istotipo e lo stadio (I vs. II-III-IV). Non abbiamo riscontrato un andamento significativo raggruppando i diversi MM (I-II-III-IV e istologia). Genere e abitudine al fumo non mostravano effetti significativi sui livelli di YKL-40, nè considerando l'intera coorte nè i gruppi singolarmente, ma sono stati comunque inclusi nei modelli multivariati. L'età correlava in maniera modesta con i livelli di YKL-40 ($r= 0.40$, $p<0.01$) considerando l'intera coorte, e la correlazione raggiungeva valori di r pari a 0.49 nel gruppo di controllo; l'età può pertanto essere considerata un possibile fattore di confondimento.

La Tabella VII mostra i valori di OR non aggiustati e aggiustati (per incremento dei valori di YKL-40 pari a 1 pg/ml) nei quattro gruppi e nel gruppo MM vs. gli altri.

La curva ROC (Figura 5) utilizzata per valutare il potere diagnostico del singolo YKL-40 nel gruppo di soggetti affetti da MM rispetto agli altri tre gruppi mostrava un'AUC pari a 0.78

(0.71-0.85), significativamente superiore a 0.5. Il valore di *cut-off* era pari a 167 pg/ml, con una sensibilità del 68% e una specificità del 74.3%.

IL-8, VEGF, Endotelina-1. L'andamento di queste tre proteine è mostrato nelle Figure 6A-C. I livelli di IL-8 e VEGF erano significativamente più elevati nel gruppo di soggetti affetti da MM rispetto ai controlli ($p < 0.001$ e $p < 0.01$, rispettivamente). I livelli di endotelina-1 non si sono mai mostrati significativi nei casi rispetto ai controlli. Sulla base di questi dati, indipendentemente dalla stratificazione e dai fattori di confondimento, possiamo affermare che questi biomarcatori siano insufficientemente specifici per scopi diagnostici, e non verrà data nessuna ulteriore descrizione delle analisi.

Fibulina-3. In Figura 7 è mostrata la distribuzione dei livelli di fibulina-3, che era molto maggiore nei soggetti affetti da MM rispetto a quelli affetti da NSCLC ($p < 0.01$) ed ai gruppi di controllo ($p < 0.05$), ma non significativamente diversa da quella dei soggetti affetti da asbestosi. In ogni caso dobbiamo sottolineare che la fibulina-3 sierica è stata testata in un limitato numero di pazienti, poiché abbiamo iniziato ad analizzarla su campioni raccolti dopo la comparsa in letteratura di dati circa la sua utilità come importante marcatore di MM, al fine di validare la scoperta di Pass [136].

Analisi multivariata. Sulla base dei risultati descritti sopra, abbiamo inserito mesotelina e YKL-40 in un modello di regressione logistica multivariata per valutare se la loro combinazione avesse un potere diagnostico maggiore rispetto alla singola proteina. Per fare ciò abbiamo utilizzato un modello non aggiustato (MM vs. altri gruppi) ma, allo stesso tempo, abbiamo anche testato il modello multinominale non aggiustato e i modelli aggiustati binario/multinominale, allo scopo di rafforzare la significatività delle differenze. In entrambi i modelli, aggiustato e non aggiustato, le due variabili risultavano sempre significative nel gruppo MM (mesotelina: p values compresi tra 0.001 e 0.003; YKL-40 p values compresi tra < 0.001 e 0.018), con una sensibilità del 72% e una specificità del 83.8% al valore di *cut-off*.

Combinando i dati relativi ai due marcatori, usando un modello di regressione logistica, non si otteneva alcun miglioramento della sensibilità. Il modello non creava problemi di multicollinearità, ma mesotelina ed YKL-40 erano sufficientemente correlate da spiegare il risultato, e non assicuravano sufficiente inter-indipendenza per il loro uso combinato ($r=0.45$, $p<0.01$) considerando il campione *in toto* (Figura 8). In ogni caso la Figura 8 suggerisce chiaramente che l'uso di entrambi i test in serie per i soggetti positivi al primo test, e in parallelo per quelli negativi al primo test potrebbe essere clinicamente utile, dato che solo cinque pazienti affetti da MM (10%) mostravano entrambi i valori al di sotto dei *cut-off* calcolati usando le curve ROC.

3.2 STUDIO II

ANALISI DELL'ARIA ESALATA IN CASI SOSPETTI DI CANCRO DEL POLMONE

NON-SMALL-CELL: UNO STUDIO TRASVERSALE

Scopo di questo studio è stato misurare biomarcatori esalati in soggetti che si erano presentati in ospedale a causa di sospetto cancro al polmone (es. per positività a test diagnostici strumentali di primo livello e presenza di segni/sintomi compatibili con la patologia), allo scopo di valutare la loro capacità come test diagnostici di secondo livello, dotati di buona sensibilità e specificità ($\geq 80\%$). Abbiamo inoltre investigato il ruolo dell'esposizione a fumo di sigaretta come possibile variabile diagnostica o fattore di confondimento.

3.2.1 MATERIALI E METODI

3.2.1.1 Pazienti

Nello studio sono stati coinvolti pazienti con sospetto cancro al polmone ad uno stadio diagnostico tardivo (broncoscopia, biopsia chirurgica e intervento chirurgico) e soggetti con segni radiologici di lesioni polmonari/bronchiali afferenti all'Unità di Pneumologia ed Endoscopia Toracica, Chirurgia Toracica e Radiologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma. Nello specifico, i casi e i controlli sono stati reclutati tra soggetti afferenti all'Unità di Pneumologia a causa di sintomi (es. emottisi, tosse inspiegata o persistente, dispnea, perdita di peso, raucedine, dolore durante il respiro o la tosse, astenia, polmoniti o bronchiti ricorrenti) o segni radiologici (es. noduli non calcifici) verosimilmente imputabili a cancro del polmone.

Pazienti con noduli caratterizzati da un *pattern* diffuso, centrale, con calcificazioni laminate o a *popcorn*, non sono stati considerati reclutabili. Per la definizione di sospetta lesione maligna sono stati adottati i seguenti criteri: presenza di almeno un nodulo non calcifico $>500 \text{ mm}^3$ con un diametro $>8 \text{ mm}$, volume di raddoppiamento stimato <400 giorni, o un

nodulo parzialmente solido con componente solida >5 mm con TC ripetuta dopo 3 mesi [137, 138]. In pazienti con bronchiectasie localizzate è stata effettuata broncoscopia per diagnosticare lesioni intrabronchiali locali [139]. I criteri di esclusione sono stati: forme di cancro diverse rispetto a NSCLC, diagnosi incompleta o misure/informazioni incomplete.

Da ogni paziente è stato ottenuto il consenso informato scritto al momento del reclutamento. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma e condotto in conformità alla Dichiarazione di Helsinki.

La pregressa abitudine tabagica è stata valutata sulla base delle risposte dei soggetti e calcolata con l'indice pacchi-anno per fumatori ed ex fumatori; l'esposizione recente è stata valutata sulla base dei livelli di cotinina urinaria, un metabolita della nicotina, previa richiesta di non fumare per almeno un'ora prima della raccolta dell'urina.

Le diagnosi cliniche sono state formulate tramite i mezzi più idonei nell'interesse dei pazienti. I soggetti sono stati suddivisi tra coloro con diagnosi istologica di NSCLC (gruppo NSCLC) e quelli con lesioni non cancerose (gruppo non-NSCLC).

Nessuno dei pazienti era un consumatore abituale di alcool (<100 ml alcool/die) ed è stato richiesto di non assumere alcool durante la notte precedente la visita.

3.2.1.2 Raccolta ed analisi del condensato dell'aria esalata

Il condensato dell'aria esalata (EBC) è stato raccolto usando un condensatore portatile (TURBODECCS[®]; Medivac, Parma, Italy) ad una temperatura di raccolta costante pari a -5°, come descritto in precedenti lavori [140]. Ai soggetti è stato chiesto di respirare a volume corrente attraverso un boccaglio per 10 minuti, ed i campioni sono stati conservati alla temperatura di -80° fino al momento dell'analisi. Il perossido di idrogeno (H₂O₂) è stato misurato usando un kit commerciale "Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay" (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) con un limite di rivelazione (LOD) pari a 0.01 µM. I campioni sono stati analizzati entro 2-3 giorni dalla raccolta per evitare instabilità [141].

3.2.1.3 Raccolta ed analisi dell'esalato

Ai soggetti è stato chiesto di eseguire un singolo respiro a capacità vitale lenta (SVC) all'interno di un tubo Bio-VOC[®] in modo da raccogliere gli ultimi 150 ml di aria esalata. I campioni sono stati estratti usando una tecnica di micro-estrazione in fase solida (SPME) ed analizzati tramite GC – MS, come descritto in precedenti lavori [103, 142].

Sono stati misurati i seguenti biomarcatori: A) VOCs (idrocarburi alifatici ed aromatici) come 2-metilpentano, pentano, esano, eptano, benzene, etil-benzene, xileni (totali: *m*- + *p*- + *o*-xileni), toluene, stirene, pentametileptano e trimetilbenzene; B) aldeidi lineari come propanale, *n*-butanale, *n*-pentanale, *n*-esanale, *n*-eptanale, *n*-ottanale, *n*-nonenale, *trans*-2-esanale, *trans*-2-eptanale e *trans*-2-nonenale. Tutti gli analiti sono stati estratti inserendo le fibre direttamente nel Bio-VOC[®] per 30 minuti a temperatura ambiente e poi desorbiti termicamente a 280°C.

Le sostanze del gruppo A sono state estratte usando una fibra *Carboxen/PDMS* di 75 µm (*Supelco*, Bellefonte, PA, USA), aggiungendo ad ogni campione rispettivamente *n*-eptano-d16 e stirene-d8 come *standard* interni. Le sostanze del gruppo B sono state estratte usando una fibra *PDMS/DVB* di 65 µm e derivatizzazione su fibra, con pentanofluorobenzil-idrossilamina come agente di derivatizzazione e 2-metilpentanale come *standard* interno.

In entrambi i casi l'analisi GC-MS è stata eseguita tramite gas cromatografo Hewlett-Packard HP 6890 accoppiato a detettore selettivo di massa HP 5973 (Palo Alto, CA, USA), con acquisizione in modalità di monitoraggio selettivo ionico (SIM). Gli analiti sono stati separati tramite colonna HP-5 MS (*Agilent Technologies*; ID 30m x 0.25mm; film di 0.50 µm). Il LOD per tutti i composti era circa pari a 1×10^{-12} M.

3.2.1.4 Raccolta ed analisi della cotinina urinaria

Da ogni soggetto al momento dell'arruolamento è stato raccolto un campione di urina, conservato alla temperatura di -80° fino all'analisi. La cotinina urinaria è stata determinata

tramite diluizione isotopica in cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC-MS-MS) usando uno spettrometro di massa a triplo-quadrupolo *AB SCIEX API 4000* (*AB SCIEX*, Framingham, MA, USA) equipaggiato con interfaccia *TurboIonSpray* per *elettrospray* pneumaticamente assistito (ESI) come descritto in precedenti lavori [143]. La cotinina è stata normalizzata per la creatinina urinaria come *marker* di diluizione.

3.2.1.5 Calcolo della numerosità del campione

La prevalenza attesa di diagnosi di cancro al polmone in casi sospetti è circa pari al 40-50% [144, 145], data una frequenza stimata del 50%, $n=120$ soggetti producono una deviazione *standard* (DS) del 5% e un intervallo di confidenza (IC) al 95% del 18% (es. dal 41 al 59%). Sarebbero sufficienti 60 soggetti in ogni gruppo per avere almeno un test significativo ($\alpha=0.05/10$ e $\beta=0.20/10$, con la miglior correzione possibile all'univariata), quando l'incremento nel gruppo NSCLC era vicino alla relativa DS (0.5 quando il valore medio è posto a 1) del gruppo di controllo. Il numero atteso è pari a $n=46-53$ soggetti per gruppo, anche con differenti aggiustamenti non parametrici. Tuttavia $n=55$ soggetti per gruppo assicurano un'AUC della curva ROC significativa, pari a 0.65 ($\alpha=0.05$; $\beta=0.20$). Tutti i calcoli sono stati eseguiti con PASS 11 (*NCSS*, Kaysville, UT, USA). Considerando i criteri di esclusione sono stati arruolati 155 soggetti.

3.2.1.6 Analisi statistiche

I dati sono stati analizzati usando il *software* SPSS 21.0 (*SPSS*, Chicago, IL, USA). Sono stati sempre utilizzati test non parametrici poiché i dati deviavano in maniera significativa dalla normalità, e le variabili continue sono state espresse come mediana e intervallo interquartile (IQ). I due gruppi sono stati confrontati utilizzando il test di Mann-Whitney per le variabili continue, e il test del chi quadro per le variabili categoriche; i confronti fra più di due gruppi sono stati effettuati usando il test di Kruskal-Wallis seguito dal test *post hoc* di Dunn. Data la non-normalità dei residui della regressione lineare, le correlazioni tra variabili sono state testate usando il test di correlazione dei ranghi di Spearman. La

regressione logistica binaria è stata utilizzata per valutare se i gruppi erano distinguibili, con il gruppo come variabile dipendente e le concentrazioni dei biomarcatori, l'età e i pacchi-anno come variabili predittive. Le probabilità predette di appartenere ad un gruppo usando la regressione logistica (o le variabili individuali quando sono usati da soli) sono state inserite in una curva ROC e sono stati calcolati l'AUC ed i punti di flesso. Un valore di p pari a 0.05 è stato considerato significativo sia per l'analisi univariata che multivariata.

3.2.1.7 Risultati

Inizialmente sono stati arruolati 155 soggetti, ma ne sono stati esclusi dieci per dati incompleti, tre per diagnosi di microcitoma, tre per carcinoide ed uno con metastasi polmonari; pertanto l'analisi è stata basata su 138 casi (Tabella VIII). I soggetti la cui diagnosi istologica era compatibile con NSCLC venivano inclusi nel gruppo NSCLC ($n=71$); l'istotipo risultato più frequente era l'ADK (66.2%) e lo stadio I il più rappresentato (63.3%). I casi con una diagnosi finale diversa dal cancro sono stati inclusi nel gruppo non-NSCLC ($n=67$), nel quale la diagnosi prevalente era di nodulo benigno solitario o multiplo (47.8%). I gruppi erano simili in termini di genere, ma vi erano differenze significative per quanto riguarda abitudine al fumo ed età: nel gruppo NSCLC i soggetti erano leggermente più anziani, con una minor percentuale di non fumatori e un indice pacchi-anno più elevato, ma non vi erano differenze nei livelli di cotinina. Sono state utilizzate curve ROC per testare il potere discriminante dei pacchi-anno, dell'età, e della somma pacchi-anno + età (regressione logistica). L'AUC dei soli pacchi-anno era pari a 0.70 (0.61-0.79) con un valore di *cut-off* pari a 30 pacchi-anno (sensibilità=65.2%, specificità=71.2%). L'AUC della sola età era pari a 0.63 (0.53-0.72), con un valore di *cut-off* pari a 67.5 (sensibilità=57.7%; specificità=67.2%). L'AUC di pacchi-anno + età era pari a 0.73 (0.64-0.81), senza alcun miglioramento di sensibilità e specificità.

Le concentrazioni dei biomarcatori sono riportate in Tabella IX. Quattro componenti erano significativamente più elevati nel gruppo NSCLC (etilbenzene<esano<H₂O₂-EBC<*trans*-2-

nonenale) e altri tre (pentano, 2-metilpentano ed eptanale) raggiungevano la significatività statistica ($p < 0.1$). Ottanale, *trans*-2-esanale e *trans*-2-eptanale mostravano valori di $p < 0.2$, e sono stati considerati possibili fattori di confondimento nell'analisi multivariata. Considerando singolarmente i composti più significativi, l'AUC della curva ROC relativa a H₂O₂-EBC era pari a 0.63 (0.53-0.72) con un valore di *cut-off* pari a 0.21 μM (sensibilità 63.4% e specificità 61.2%), e l'AUC del *trans*-2-nonenale era pari a 0.64 (0.55-0.74) con un valore di *cut-off* pari a 4.1 pM (sensibilità 60.6% e specificità 62.7%).

Le concentrazioni di H₂O₂-EBC e *trans*-2-nonenale correlavano debolmente solo con l'indice pacchi-anno nel gruppo NSCLC ($r = 0.33$, $p < 0.01$ e $r = 0.29$, $p = 0.02$, rispettivamente). L'età non correlava con la concentrazione di alcun biomarcatore. Il *trans*-2-nonenale correlava debolmente con la cotinina urinaria solo nel gruppo NSCLC ($r = 0.29$, $p = 0.02$).

La multi-collinearità rivelava alcune correlazioni critiche tra eptanale ed ottanale ($r = 0.75$), eptanale e *trans*-2-esanale ($r = 0.67$), ottanale e *trans*-2-nonenale ($r = 0.62$) e *trans*-2-eptanale e *trans*-2-nonenale ($r = 0.62$). Per tale ragione ottanale, *trans*-2-esanale e *trans*-2-eptanale sono stati esclusi dall'analisi multivariata.

Nel gruppo NSCLC l'istotipo tumorale (ADK vs. SCC) e il grado (I-II vs. III-IV) mostravano un lieve effetto sull'esano (le concentrazioni erano maggiori nei pazienti affetti da ADK, $p = 0.019$). Nel gruppo non-NSCLC la stratificazione sulla base della patologia (noduli vs. bronchiectasie vs. altro) non mostrava alcuna differenza significativa.

Abbiamo dapprima confrontato i gruppi NSCLC e non-NSCLC usando due modelli di regressione logistica: 1) 7 biomarcatori: H₂O₂-EBC, pentano, 2-metilpentano, esano, etilbenzene, eptanale, *trans*-2-nonenale; 2) gli stessi sette biomarcatori + pacchi-anno + età. I risultati sono riportati in Tabella X. Il *trans*-2-nonenale risultava sempre significativo e l'esano e (in minor misura) l'eptanale erano vicini alla significatività, mentre H₂O₂-EBC perdeva la sua significatività nel modello 2, indicando un'interferenza delle covariate. La

probabilità di appartenenza calcolata tramite modello di regressione logistica è stata inclusa nelle curve ROC mostrate in Figura 9. Il valore di *cut-off* del modello 1 mostrava sensibilità del 60.6% e specificità del 67.7%, quello del modello 2 una sensibilità del 72.5% ed una specificità del 75.8%. L'esclusione di alcuni biomarcatori dai 2 modelli (l'inclusione di sole variabili significative e/o variabili con valori di $p < 0.1$) o dell'età ha influenzato solo marginalmente i risultati.

Il *pattern* dei marcatori esalati è stato ulteriormente testato in due sottogruppi (Tabella X):

- 1) soggetti con scarsa o nulla esposizione pregressa a fumo di sigaretta (≤ 10 pacchi-anno): $n=30$ nel gruppo non-NSCLC e $n=13$ nel gruppo NSCLC;
- 2) soggetti con esposizione ≤ 30 pacchi-anno (valori di *cut-off* indicati dalla curva ROC relativa ai pacchi-anno): $n=47$ nel gruppo non-NSCLC e $n=24$ nel gruppo NSCLC.

Nel sottogruppo ≤ 10 pacchi-anno, l'AUC della curva ROC relativa all' H_2O_2 -EBC era pari a 0.82 (0.68-0.95) con un valore di *cut-off* pari a 0.26 μM (sensibilità 77% e specificità 76.7%) e quella del *trans-2-nonenale* era pari a 0.88 (0.77-0.98) con un valore di *cut-off* pari a 4.6 pM (sensibilità pari a 84.6% e specificità pari a 83.3%). Tra i possibili modelli multivariati usando le sostanze mostrate in Tabella X, il modello che combina età + H_2O_2 -EBC + *trans-2-nonenale* mostrava un'AUC pari a 0.92 (0.83-1.10), con una sensibilità dell'85.6% e una specificità del 90.0% al valore di *cut-off* (Figura 10a). Inoltre, nonostante l'età, l'uso dei valori di *cut-off* come valori discriminanti nell'uso combinato di H_2O_2 -EBC e *trans-2-nonenale* indicava un solo caso di NSCLC i cui valori cadevano sotto entrambi i valori di *cut-off* (veri negativi 19/20 o 95%) e solo un caso non-NSCLC i cui valori cadevano sotto entrambi i valori di *cut-off* (veri positivi 9/10 o 90%) (Figura 10b).

Nel sottogruppo ≤ 30 pacchi-anno, l'AUC della curva ROC relativa all' H_2O_2 -EBC era pari a 0.72 (0.59-0.86) con un valore di *cut-off* pari a 0.27 μM (sensibilità 70.8% e specificità 72.3%) e quella del *trans-2-nonenale* era pari a 0.73 (0.60-0.86) con un valore di *cut-off* pari a 4.7 pM (sensibilità pari a 75% e specificità pari a 73.3%). Tra i possibili modelli

multivariati usando le sostanze mostrate in Tabella 4, il modello che combina età + H₂O₂-EBC + *trans*-2-nonenale + esano mostrava un'AUC pari a 0.85 (0.75-0.95), con una sensibilità del 76% e una specificità dell'80% al valore di *cut-off* (Figura 11a). Inoltre, nonostante l'età, l'uso dei valori di *cut-off* come valori discriminanti nell'uso combinato di H₂O₂-EBC e *trans*-2-nonenale indicava tre casi di NSCLC i cui valori cadevano sotto entrambi i valori di *cut-off* (veri negativi 14/17 o 82.3%) e tre casi non-NSCLC i cui valori cadevano sotto entrambi i valori di *cut-off* (veri positivi 9/10 o 90%) (Figura 11b).

I livelli di cotinina non modificavano l'AUC delle curve ROC in tutti i modelli testati.

3.3 STUDIO III

SVILUPPO E VALIDAZIONE DEL NASO ELETTRONICO PER L'ANALISI DI *PATTERN* DI COMPOSTI ORGANICI VOLATILI NELL'ARIA ESALATA

Il termine naso elettronico, coniato nei primi anni 90, indica uno strumento di classificazione progettato per ottenere misure ripetibili, identificare e classificare miscele odorigene attraverso un metodo senso-strumentale: esso considera la miscela *in toto*, indipendentemente dalle singole sostanze presenti in un determinato campione, al contrario delle tecniche analitiche (es. GC-MS), che consentono un riconoscimento tramite analisi quali-quantitativa dei singoli componenti del campione.

Esso è costituito da un *array* di sensori chimici a bassa selettività e da un sistema di riconoscimento del *pattern* olfattivo. Inizialmente il flusso gassoso deve essere introdotto all'interno dello strumento attraverso un sistema di trasporto che permetta l'esposizione dell'*array* di sensori al campione; i sensori sono costituiti da un substrato sul quale è depositato uno strato di materiale attivo che interagisce con la miscela di gas aspirati generando variazioni delle sue proprietà fisiche, che vengono trasdotte in un segnale elettrico o ottico.

Esistono 4 diversi tipi di naso elettronico, che si differenziano sulla base dei diversi tipi di sensori:

- quelli basati sulla variazione della conducibilità elettrica, e quindi su variazioni di resistenza del sensore (ossidi di metallo, polimeri conduttivi), molto accurati, con tempi di risposta rapidi ma piuttosto sensibili all'umidità e con sensori a emivita limitata;
- quelli basati su variazioni di massa, che inducono variazioni di frequenza (microbilance, sensori ad onda acustica superficiale), anch'essi molto accurati ma piuttosto sensibili a umidità e temperatura;

- quelli basati su variazioni della tensione di soglia, che comporta una variazione di corrente–tensione (MOSFET, ossia *transistor* metallo-ossido-semiconduttore a effetto di campo), economici e di piccole dimensioni ma non sensibili a tutte le classi di composti;
- quelli basati su variazioni dell'indice di rifrazione, che determina variazioni dell'intensità luminosa (fibre ottiche).

I principali modelli di naso elettronico presenti in commercio si possono inoltre classificare sulla base della tipologia di strumentazione:

- a tecnologia singola (*Cyranose 320, FOX, SAGAS*, etc.)
- a tecnologia combinata, ossia sensori chimici accoppiati a classici sistemi analitici (*Prometheus, ZNose, GDA2*, etc.).

I principali settori di applicazione di questi strumenti sono il settore alimentare (identificazione delle diverse tipologie di alimenti come olio, pesce, frutta, etc. per la valutazione della qualità) e delle bevande (in particolare nell'analisi dell'aroma di caffè), il settore ambientale (investigazioni relative al monitoraggio della qualità dell'aria, acqua e suolo) e recentemente anche nel settore della diagnostica medica [99, 146-156].

Uno dei punti di forza di questo tipo di dispositivi consiste soprattutto negli aspetti commerciali quali la semplicità di utilizzo (assenza di trattamenti pre-analitici del campione), la facile trasportabilità e le ridotte dimensioni.

Un problema attuale legato all'utilizzo di questi strumenti soprattutto in ambito biomedico è l'assenza di procedure standardizzate per la fase di addestramento e acquisizione dei dati.

3.3.1 Materiali e metodi

3.3.1.1 *Cyranose 320*

Il prototipo *Cyranose 320* (*Sensigen*, Baldwin Park, CA, USA) è un naso elettronico portatile a tecnologia singola, costituito da 32 sensori polimerici.

Trattandosi di un comparatore di vapori, esso deve essere dapprima addestrato a riconoscere una serie di vapori chimici creando uno *smellprint*, una sorta di immagine digitale della miscela; una volta istruito, se messo a contatto con un vapore non noto, lo strumento compara il nuovo *smellprint* con quelli presenti nella sua memoria.

La misura dei vapori è basata su cambiamenti di resistenza di ogni singolo sensore chimico nel *chip* costituito da 32 sensori presente al suo interno: ciò consiste in una misura differenziale, e la risposta dei sensori viene misurata come $(R_{\max}-R_0)/R_0$, con R_0 che rappresenta la resistenza durante un flusso basale, e R_{\max} la massima resistenza durante l'esposizione a un campione di vapore.

Lo strumento è dotato di (Figura 12):

- a. un sistema di campionamento
- b. sensori chimici
- c. un sistema in grado di processare e manipolare il segnale.
 - a. Il primo è dotato di vie di campionamento indipendenti che permettano le misure delle diverse resistenze dei sensori. All'interno dello strumento una valvola ed una pompa sono utilizzate per epurare e campionare i vapori. Il processo di epurazione fornisce aria ambiente ai sensori per la misura di R_0 , oltre che ripulire i sensori dopo il campionamento. Il processo di campionamento consente ai vapori di raggiungere il *chip*, che è mantenuto a temperatura costante all'interno del naso.
Durante il ciclo di epurazione la valvola del naso è in posizione aperta e consente ai vapori di entrare tramite l'ingresso laterale ed arrivare al sensore. Il vapore è poi

eliminato tramite la porta di uscita sul lato opposto: questo ciclo fornisce la misura R_0 .

Durante il ciclo di campionamento la valvola è chiusa e consente ai vapori di essere aspirati tramite l'accesso sul lato superiore dello strumento e di giungere ai sensori. Durante la fase di campionamento viene misurata la massima variazione nelle resistenze (indifferentemente in positivo o in negativo), registrata come R_{max} .

- b. I sensori chimici rispondono allo spazio di testa dei vapori a cui sono esposti. Attraversando la sonda di ogni singolo sensore la risposta è differente ed il *pattern* che si ottiene rappresenta ciascun spazio di testa. La tecnologia dei sensori di questo particolare strumento consiste in un *nosechip* di 32 chemoresistori individuali rivestiti da un sottile film in carbonio configurati all'interno di una sonda. Il materiale di rivestimento dei sensori viene depositato attraverso 2 cavi elettrici su un substrato di alluminio. Quando il film è esposto ad analiti in fase di vapore, la matrice agisce come una spugna e si gonfia mentre assorbe l'analita: questo incremento volumetrico genera un aumento nella resistenza poiché le vie di conduzione in carbonio vengono interrotte. Quando l'analita viene allontanato, il polimero lo rilascia e riprende la sua forma originale, ripristinando la via di conduzione del segnale. Ogni polimero usato nel *chip* è unico dal punto di vista chimico ed assorbe gli analiti a differenti livelli, creando un *pattern* di risposta differenziale attraverso la sonda.
- c. La processazione del segnale converte la risposta grezza del sensore in un valore che viene integrato nelle analisi statistiche per consentire di elaborare un *pattern*. Lo strumento misura il calo di voltaggi attraverso ogni sensore nella sonda e li converte nelle resistenze. Esso registra i cambiamenti differenziali delle resistenze e li sottomette per la pre-processazione, post-processazione del segnale e l'analisi statistica. Il dato viene poi convertito nel massimo cambiamento di resistenza

causato dall'esposizione dei sensori all'analita. Il relativo cambio di resistenza per un particolare sensore è definito come risposta del sensore: $\Delta R/R_0 = (R_{\max} - R_0)/R_0$.

Uno *smellprint* è generato dopo che i dati sono stati elaborati per tutti e 32 i sensori; solitamente le risposte vengono normalizzate usando la formula:

$$\text{Normalized } (\Delta R/R_0)_i / \sum |\Delta R/R_0|_j$$

I componenti dello strumento con cui il campione viene a contatto, dal momento dell'aspirazione a quello dell'espulsione sono:

- acciaio (ago e perno al quale questo è fissato)
- poliparaxilene (rivestimento dei condotti e delle camere)
- polibutilene tereftalato, fluoroelastomero e acciaio (componenti della valvola)
- carbone e polimeri (sensori)
- polifenilene sulfide e fluoroelastomero (componenti della pompa).

Nessuno dei suddetti composti è in grado di interagire chimicamente con i VOCs potenzialmente presenti nei nostri campioni.

Il sistema analitico completo di Cyranose 320 è completato da un *software* da installare su PC, che consenta di scegliere i parametri di configurazione del flusso e trasmetterli, tramite connettore, allo strumento.

I parametri di flusso da impostare sono i seguenti:

- basale, per cui bisogna inserire la durata di aspirazione (libera) e la velocità della pompa;
- campionamento, per cui bisogna inserire durata e velocità di aspirazione della pompa;
- epurazione, per cui bisogna inserire, come sopra, un tempo ed una velocità;
- tempo di rimozione dell'ago dallo spazio di testa (generalmente 0 poiché operazione immediata in presenza di operatore);

- velocità della pompa, a scelta tra 3, preimpostate e non modificabili: bassa (50 cc/min), media (120 cc/min) e alta (180 cc/min);
- riscaldamento: consente di regolare la temperatura del sensore, che dovrebbe essere almeno 7°C al di sopra di quella ambientale (la T predefinita presente sullo strumento è pari a 42°C). Una temperatura troppo bassa creerebbe una risposta dei sensori troppo ampia; al contrario una temperatura eccessiva causerebbe una variazione troppo piccola;
- selezione del filtro digitale: consente di smorzare le resistenze di fondo, ed andrebbe sempre impostato.

Esiste una seconda parte di impostazioni riguardanti la selezione di ciascuno dei 32 sensori e il tipo di analisi statistica per l'interpretazione dei dati, sezione che non abbiamo considerato in quanto le analisi sono state effettuate in maniera autonoma dallo strumento, valutando le resistenze dei singoli sensori registrate su appositi database.

3.3.1.2 Sistema di raccolta dell'aria esalata

Sarà sperimentato un nuovo sistema per frazionare e raccogliere l'aria esalata (Figura 13): il corpo principale è costituito da un boccaglio con filtro raccordato a una valvola a due vie, controllata da un sensore ad infrarossi che misura la concentrazione di CO₂ esalata all'ingresso del circuito. Solo la frazione d'aria con CO₂>C50% sarà raccolta, escludendo perciò il volume morto delle vie aeree.

Tutti i materiali usati saranno monouso e un sistema di auto-apprendimento renderà il sistema indipendente dalla variabilità inter-individuale di CO₂ esalata.

Verrà raccolto per ogni soggetto almeno un litro dell'ultima porzione di aria esalata (10-15 esalazioni).

3.3.3 RISULTATI

3.3.2.1 Ottimizzazione dei parametri di raccolta del naso elettronico

3.3.2.1.1 Scelta dell'ago

Inizialmente è stato preso in considerazione il tipo di ago più idoneo alle nostre condizioni di aspirazione dell'aria esalata: il materiale in dotazione con lo strumento prevedeva aghi di tipo smussato (*Blunt Tip* stile 3) da 20' in acciaio inossidabile, ideali per l'analisi di campioni in contenitori aperti ma non adatti alle nostre condizioni. Dovendo raccogliere l'esalato in apposite *sampling bag* da 1l dotate di membrana perforabile con ago penetrante, gli aghi in dotazione le laceravano causando perdite del contenuto all'esterno e non garantendo pertanto l'isolamento dell'aria raccolta; abbiamo pertanto optato per aghi a becco di flauto (*Bevel Tip* stile 2). Dopo numerose prove con aghi monouso, ritenuti più igienici (evitano contaminazioni tra le analisi), previo approvazione da parte del responsabile della ditta produttrice *Sensigen*, abbiamo optato per aghi di calibro 21'. Questo diametro rappresenta infatti un buon compromesso tra diametri maggiori, potenzialmente in grado di danneggiare la membrana della *sampling bag*, e diametri troppo piccoli, verosimilmente in grado di causare troppa resistenza al flusso durante l'aspirazione, nonché frequenti episodi di ostruzione da parte della gomma componente la membrana.

3.3.2.1.2 Valutazione del tipo di *sampling bag* per la raccolta dell'aria esalata

Abbiamo considerato 2 diversi tipi di bag: *Tedlar[®] Gas Sampling Bag* e *Supel[™] Inert Gas Sampling Bag* (entrambe *Sigma-Aldrich*, Saint Louis, MO, USA).

Entrambe sono costituite dallo stesso materiale, difluoruro di polivinilidene (PVDF), ma le principali differenze sono elencate in Tabella XII

Date le basse concentrazioni (nM-pM) dei VOCs nell'aria esalata, è importante valutare a priori se l'utilizzo di un materiale rispetto all'altro possa alterare la risposta del naso elettronico.

Per questo studio sono stati reclutati 10 soggetti sani di età compresa tra 30–45 aa, non affetti da malattie neoplastiche o flogistiche in atto, e da ciascuno, tramite l'apposito sistema di raccolta precedentemente descritto, sono state raccolte 2 diverse *sampling bags* di aria esalata e costruito, in maniera indipendentemente dal *software* in dotazione con lo strumento, il grafico di risposta dei sensori (Figura 14).

Le risposte dei 32 sensori sono apparentemente sovrapponibili ad eccezione di 4 sensori (5, 6, 23, 31) noti per essere più instabili soprattutto in presenza di sostanze polari. L'aria esalata raccolta nelle *Supel™ Inert Gas Sampling Bag* ha mostrato maggiori oscillazioni nella risposta dei sensori. Questo tipo di *sampling bags*, meno costose ma anche meno resistenti a livello dei punti di maggior pressione (innesto della valvola), sono apparse meno idonee allo scopo.

3.3.2.2 Ottimizzazione dei parametri di funzionamento del naso elettronico

3.3.2.2.1 Velocità della pompa

La velocità di aspirazione della pompa prevede la scelta tra 3 opzioni: flusso basso (50 cc/min), medio (120 cc/min) e alto (180cc/min).

Per la valutazione sono stati raccolti due campioni di esalato: il primo appartenente a soggetto sano a digiuno da 2 ore, il secondo da soggetto sano dopo aver fumato e digiunato da 2 ore.

Aspirazione a basso flusso. L'aspirazione a basso flusso ha mostrato che la velocità di aspirazione di 50 cc/min non consente di rilevare differenze tra i due campioni in esame. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che la quantità assoluta degli agenti chimici che raggiunge i sensori risulta al di sotto del limite di rilevazione dello strumento; esso pertanto

non risulterebbe in grado di discriminare l'effetto del fumo sulla variazione sia della concentrazione sia del *pattern* dei composti organici volatili presenti nell'aria esalata.

In Figura 15a è riportato il grafico di distribuzione delle misure relative ai due soggetti: la distribuzione dei valori appare molto ampia.

Aspirazione ad alto flusso. Anche l'aspirazione ad alto flusso (180 cc/min) non consente di discriminare fra i due soggetti considerati. Nel diagramma riportato in Figura 15b si può notare un'ampia distribuzione delle misurazioni relative ai 2 soggetti: ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che da un lato l'aumento del flusso determina certamente un aumento della quantità assoluta degli agenti chimici che impattano sui sensori, ma dall'altro esso può determinare il superamento dei volumi di *breakthrough* (per effetto dello *stripping* del flusso) e/o del tempo di risposta dei sensori, inficiando così la capacità dello strumento di discriminare l'aria esalata dei due soggetti.

Aspirazione a medio flusso. L'aspirazione a medio flusso (120 cc/min) si è mostrata essere la più idonea a rendere riproducibili le misure. In Figura 15c i punti appaiono visibilmente ben raggruppati rispetto ai 2 grafici precedenti. Tale flusso consente infatti di ottenere un buon compromesso tra la quantità assoluta degli agenti chimici che impattano sui sensori e il tempo di risposta dei sensori stessi. Questo risultato è fortemente legato alle concentrazioni (10^{-9}M – 10^{-12}M) relativamente basse dei composti organici volatili presenti nell'aria espirata.

3.3.2.2 Tempi di campionamento

La prima impostazione da selezionare manualmente riguarda il tempo di epurazione dello strumento, da effettuare prima dell'inizio dei campionamenti (ed ogni qualvolta esso stia a riposo per lunghi periodi, ossia alcune ore). Tale impostazione consente di evitare l'effetto memoria: i sensori a riposo, infatti, interagiscono costantemente e sono in equilibrio con l'umidità presente nell'ambiente.

Il tempo di epurazione minimo consigliato dalla ditta produttrice per effettuare questa procedura è di 6 minuti: non rispettandolo è frequente incorrere nell'effetto "*first sniff*", ossia la comparsa di una misurazione con valori molto differenti (*outliers*) rispetto a quelli ottenuti nelle successive misurazioni.

Per quanto riguarda la scelta dei tempi di campionamento abbiamo considerato la relazione tra tempo di epurazione ed effetto memoria: il primo deve essere sufficientemente lungo da garantire il ritorno del segnale al livello basale per tutti i 32 sensori. Anche il tempo di aspirazione deve avere una durata sufficiente per garantire la completa raccolta dei composti presenti nell'aria esalata (testimoniata dalla comparsa di un *plateau* di tutti i 32 sensori). Le prove hanno mostrato che un tempo di epurazione pari a 30 secondi è sufficiente a garantire il completo ritorno ai valori di resistenze al tempo basale (e quindi a garantire una completa pulizia dei sensori), ed un tempo di raccolta di 60 secondi garantisce il raggiungimento del *plateau*, come mostrato nel grafico riportato in Figura 16.

Al termine di ogni aspirazione lo strumento necessita di un ulteriore tempo di epurazione per garantire la pulizia di tutti i 32 sensori: anche in questo caso, dopo numerosi tentativi, abbiamo optato per un tempo di 200 sec, più che sufficiente a garantire il ritorno del segnale dei 32 sensori al pari del basale.

3.3.2.3 Effetto delle variabili ambientali e individuali

3.3.2.3.1 Temperatura

Lo strumento prima dell'utilizzo prevede l'impostazione della temperatura del substrato: ciò consente all'utilizzatore di attivare o disattivare il sensore che regola la temperatura dei sensori, e di specificarne la temperatura. La temperatura pre-impostata sullo strumento era di 42°C; secondo le indicazioni del costruttore essa dovrebbe essere almeno sette gradi centigradi sopra la temperatura ambiente, ed in ogni caso non inferiore a 35°C: in

caso contrario le prestazioni dello strumento potrebbero non essere ottimali causando una maggior variabilità nella risposta dei sensori.

Le prove di ottimizzazione sono state effettuate durante i mesi estivi in un ambiente non climatizzato: durante l'utilizzo dello strumento compariva frequentemente il segnale di surriscaldamento (riconoscibile per la comparsa di una scritta lampeggiante sul *display*): dopo numerosi tentativi con differenti valori crescenti di temperatura abbiamo osservato che impostando il suddetto valore a 50°C il segnale di surriscaldamento non compariva più; sarà tuttavia necessario un adattamento durante i mesi invernali, onde evitare che la differenza tra ambiente e temperatura impostata sia troppo ampia da generare scarsa o nulla risposta dei sensori.

3.3.2.3.2 Umidità

L'umidità potrebbe influenzare le prestazioni dello strumento poiché i suoi sensori (costituiti da polimeri) non sono selettivi: essi infatti interagiscono con il vapore acqueo come qualsiasi altra sostanza chimica, ma senza degradarsi. Se l'umidità ambientale e quella del substrato non differiscono notevolmente tra loro, la risposta dei sensori sarà attendibile. Il problema si pone in situazioni in cui questa differenza sia più consistente: abbiamo provato a ricostruire questa situazione riempiendo delle *sampling bags* sia con solo azoto puro sia con sola aria ambiente, aggiungendo successivamente acqua deionizzata a concentrazioni sovrapponibili all'aria ambiente (100 µl per 1 l di aria) e a completa saturazione (1 ml per 1 l di aria).

Attivando tutti e 32 i sensori abbiamo osservato come lo strumento faticava a riconoscere tra livelli di umidità sovrapponibili all'aria ambiente rispetto a livelli di completa saturazione (Figura 17a e 17b).

La suddetta analisi è stata ripetuta eliminando i sensori indicati come maggiormente sensibili alle sostanze polari (05, 06, 23 e 31), rendendo il risultato ancora più evidente (Figura 18a e 18b).

Non è stato possibile eseguire l'analisi selezionando i soli sensori polari in quanto insufficienti nel fornire una risposta integrata.

3.3.2.3.3 Valutazione del fattore di risposta dei sensori rispetto alle diverse classi di agenti chimici

Per la validazione dello strumento si è poi proceduto ad analizzare alcuni fattori inquinanti normalmente presenti nell'ambiente o negli alimenti, in particolare etanolo (classe 1), esanale (classe 2), acetone (classe 3), acido acetico (classe 4), 2-metilpentano (classe 5), esano (classe 6) e toluene (classe 7), rapportati all'azoto puro (classe 8), come riportato in Tabella XIII.

Dapprima le *Tedlar*[®] bag sono state riempite con azoto puro, e successivamente è stato aggiunto 1 µl di ciascuna delle suddette sostanze.

La maggior parte dei sensori risponde maggiormente, anche se in misura diversa, alla presenza di acido acetico, seguito da esanale, etanolo, esano, acetone, 2-metilpentano e toluene. I sensori 5, 6, 10, 22, 23, 30 e 31 invece rispondono in maniera positiva all'acido acetico ed in misura negativa a tutte le altre sostanze. La risposta dei sensori all'azoto è quasi sempre rappresentata da valori negativi, tranne nel caso dei sensori 3, 9, 12, 25, 29 e 32. Un discorso a parte deve essere fatto per il sensore 17, che risponde in maniera positiva all'acido acetico e più debolmente ad etanolo, esanale ed esano, ed in maniera negativa alle altre sostanze (Figura 19a e 19b).

3.3.2.3.4 Valutazione dell'influenza "in vivo" delle diverse condizioni del soggetto sulla risposta dei sensori

Nella fase preliminare dello studio è stato necessario valutare come le abitudini personali del soggetto (es. consumo di cibo, bevande alcoliche, *chewing-gum*, digiuno) potessero influire sulla risposta del naso elettronico in modo da poter standardizzare le condizioni di raccolta dell'aria esalata.

La validazione è stata proseguita valutando la risposta dei sensori del naso elettronico *in vivo* in seguito ad analisi di esalato appartenente allo stesso soggetto ma in diverse condizioni rappresentative della vita quotidiana, ossia dopo aver bevuto una sostanza alcolica e 2 ore dopo l'assunzione della stessa, dopo aver mangiato, dopo l'assunzione di caffè, dopo aver fumato, a digiuno da 8 ore e dopo aver masticato un *chewing-gum*. L'istogramma relativo alla risposta è rappresentato nelle Figure 20a e 20b.

Quasi tutti i sensori, ad eccezione di 1 e 4, rispondono maggiormente, anche se in misura diversa, alla presenza di caffè nell'esalato, seguita da quella di alcool, fumo. Le situazioni che evocano la risposta minore sono il digiuno e l'assunzione di *chewing-gum*; il digiuno risulta generare la risposta minore per i sensori 3, 6, 8, 9, 12, 27-29, mentre per i restanti la risposta più bassa è evocata dal *chewing-gum*. I sensori 1 e 4 invece rispondono meglio alla presenza di alcool, seguita da caffè e dalle successive sostanze nell'ordine sopra riportato.

3. DISCUSSIONE

4.1 STUDIO I

I livelli mediani di mesotelina nei nostri casi e controlli sono in linea con dati precedenti analizzati da Hollevoet et al. [131], ossia significativamente più elevati nei soggetti con diagnosi di MM confermata istologicamente. Il valore di *cut-off* pari a 1.26 nM, che mostrava una sensibilità del 74% ed una specificità dell'86.1%, risulta praticamente identico a quello riportato precedentemente da Van den Heuvel et al. (1.3 nM) [157] e molto simile a quello riportato da Cristaudo et al. (1 nM) [158], Beyer et al (1.5 nM) [159], e Di Serio et al. (1.5 nM) [160].

Questo è il primo studio, a nostra conoscenza, che mostra la presenza di elevate livelli di YKL-40 nel siero di soggetti affetti da MM ma, sebbene ciò consenta di distinguere pazienti affetti da MM da controlli sani, la sensibilità e la specificità risultano minori rispetto a quelle della mesotelina. Kim et al. [161] hanno riscontrato elevati livelli di YKL-40 in effusioni pleuriche di soggetti con patologie polmonari (con i livelli più elevati riscontrati in coloro che avevano effusioni essudative), e livelli elevati anche in pazienti affetti da cancro al polmone in stadi precoci. Anche Thöm et al. [162] hanno identificato i livelli di YKL-40 come biomarcatore prognostico indipendente in soggetti affetti da NSCLC metastatico.

Come si può evincere dai dati mostrati in Tabella I, la prevalenza di MM è circa la stessa per uomini e donne: ciò appare in contrasto con i dati epidemiologici [82], ma in corrispondenza di siti petrolchimici, aree industriali, etc., il tasso relativo di mortalità per MM appare essere ancora maggiore per le donne [163].

La stratificazione dei nostri casi di MM sulla base dell'istologia e dello stadio tumorale rivelava una correlazione al limite della significatività tra lo stadio e le concentrazioni di mesotelina, ma nessuna correlazione con YKL-40. Sebbene il numero di pazienti affetti da mesotelioma sarcomatoide nella nostra casistica fosse limitato, la nostra scoperta di non riscontrare elevati livelli di biomarcatori risultava in linea con risultati precedentemente

riportati, e con l'assenza di over-espressione di mesotelina in questo sottotipo istologico [164]. I livelli di mesotelina erano significativamente elevati solo nel gruppo di pazienti affetti da MM in stadio avanzato rispetto a quelli ai primi stadi, ma ciò potrebbe essere spiegato dal limitato numero di pazienti nei differenti stadi, e dell'attuale difficoltà della stadiazione.

Tuttavia, sebbene la concentrazione di YKL-40 fosse poco probabilmente valutabile nella diagnosi di MM, essa potrebbe migliorare la specificità diagnostica della mesotelina. In una simulazione includente 1000 pazienti affetti da MM e 1000 pazienti appartenenti agli altri gruppi (prevalenza = 50%), 503/539 pazienti affetti da MM risultavano positivi sia alla mesotelina (prevalenza 93.3%) che a YKL-40 (prevalenza 11.5%), e 83/723 risultavano negativi sia alla mesotelina che a YKL-40, mentre il tasso di prevalenza pazienti positivi/negativi e negativi/positivi in totale era del 56%. Nonostante la prevalenza simulata iniziale, appare abbastanza chiaro che i falsi positivi fossero rari nei pazienti con doppia positività ai marcatori (solo 36 sugli iniziali 1000 controlli) e che i falsi negativi fossero rari nei soggetti con doppia negatività (solo 83 sugli iniziali 1000 pazienti affetti da MM). Ciò indicava chiaramente che i due gruppi fossero rispettivamente ad alto e basso rischio di MM, con possibili differenziazioni in corso di diagnosi. D'altra parte, la prevalenza di MM restava sostanzialmente la stessa nei singoli gruppi positivi, indicando che essi avrebbero dovuto essere entrambi trattati come ad alto rischio.

I pazienti affetti da MM mostravano anche livelli più elevati di IL-8, VEGF e fibulina-3 rispetto ai controlli, ma non sono state riscontrate differenze in questi livelli tra pazienti affetti da cancro al polmone rispetto a quelli affetti da asbestosi, tranne che per la fibulina-3. Noi non abbiamo confermato i risultati di Pass et al. poiché nel nostro studio non vi erano differenze nei livelli di fibulina-3 tra pazienti affetti da MM e pazienti affetti da asbestosi. I livelli di endotelina-1 apparivano invece sovrapponibili nei 4 gruppi considerati.

La prevalenza di asbestosi nel nostro studio risultava minore rispetto a quella di MM: ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che l'asbestosi ha un periodo di latenza più breve rispetto al MM; inoltre i nostri casi di asbestosi, essendo una malattia professionale, sono stati estrapolati dagli archivi delle malattie occupazionali riportate e riconosciute dall'INAIL [165], e ciò potrebbe averne causato una sottostima.

La forza di questo studio sta nel fatto che abbiamo reclutato controlli non selezionati tra pazienti afferenti alla nostra U.O. di Broncoscopia a scopo diagnostico, cosa che ha fornito un campione rispecchiante la realtà.

4.2 STUDIO II

In questo lavoro abbiamo esaminato l'utilità di un *pattern* di biomarcatori respiratori ottenuti con metodi non invasivi combinandoli con l'esposizione a fumo di sigaretta in soggetti con sospetto cancro del polmone. Il potere diagnostico delle molecole esalate risultava accettabile, ma incrementava se combinato con l'esposizione a fumo di sigaretta. Cosa più importante, il potere diagnostico di H₂O₂-EBC e trans-2-nonenale (ed in minor misura dell'esano) risultava buono in soggetti con esposizione al fumo bassa o moderata (≤30 PY). L'utilizzo della HRCT potrebbe risultare utile nella gestione di casi con piccoli noduli polmonari singoli nella popolazione sottoposta a *screening* per cancro al polmone, ma la sua combinazione con un *pattern* di biomarcatori potrebbe ridurre il tasso di falsi positivi.

Un nuovo aspetto di questo studio era l'uso dell'aria esalata con un approccio sul campo; ciò presentava due vantaggi principali: 1) il gruppo non-NSCLC era formato da soggetti con segni/sintomi compatibili con cancro, ma con una diagnosi finale diversa dal cancro (ciò evitava *bias* di selezione di gruppo); 2) la diagnosi era sconosciuta al momento della raccolta dell'esalato e dell'analisi, assicurando un disegno di studio completamente in cieco.

Lo svantaggio di questo approccio risultava nella non omogeneità del gruppo non-NSCLC, cioè non potevamo completamente escludere un effetto della malattia sulla composizione dell'aria esalata. Si rendono necessari ulteriori studi su gruppi più ampi. Lo studio è stato focalizzato su pazienti affetti da NSCLC per la miglior prognosi negli stadi precoci. Altre forme di cancro al polmone, come lo *small-cell*, non sono state considerate.

I VOCs nella fase gassosa dell'esalato misurati in questo studio mostravano un potere discriminante pari almeno all'80% nei lavori precedenti [103, 142]. Alcune sostanze volatili selezionate erano parzialmente sovrapposte a quelle proposte da altri autori [166], ma con alcune differenze: abbiamo escluso l'isoprene poiché non correlato in modo specifico allo stress ossidativo/esposizione, ed il decano a causa del suo significato biologico dubbio.

Abbiamo aggiunto il *n*-esano come possibile biomarcatore di esposizione ambientale [167] e le forme *2-trans* dell'eptanale, ottanale e nonenale come prodotti di perossidazione lipidica [168]. Va sottolineato che il *trans-2-nonenale* è usato anche come aromatizzante della birra [169] e, sebbene nessuno dei nostri pazienti fosse un consumatore abituale di alcool, non potevamo escludere completamente il ruolo del consumo di birra sui livelli di questo biomarcatore esalato. Le altre sostanze, come 1-ottene, 2-butanone, 3-idrossi-2-butanone, 2-idrossiacetaldeide e 4-idrossiesanale non sono state incluse nell'analisi, poiché avrebbero richiesto ulteriori ottimizzazioni [170, 171].

Infine, abbiamo aggiunto H₂O₂-EBC poiché considerato un debole biomarcatore di infiammazione e stress ossidativo [172], anche se altri biomarcatori nell'EBC sono attualmente sotto revisione nella ricerca sul cancro al polmone.

Per valutare la ripetibilità dei VOCs nell'esalato abbiamo confrontato i nostri risultati con quelli di precedenti studi, riscontrando che le concentrazioni sono sovrapponibili. Di conseguenza, nonostante la variabilità biologica di misure campione, la loro affidabilità analitica poteva essere sostenuta.

Come atteso, il nostro *pattern* di sostanze copriva solo una parte di quelle identificate nell'aria esalata [173, 174]. La nostra scelta è stata basata sul loro significato biologico e sulla loro riproducibilità nell'esalato/EBC, ma ovviamente il nostro *pattern* non può considerarsi definitivo. In ogni caso l'uso di sostanze esalate a differente volatilità evitava parzialmente limitazioni nell'interpretazione dei dati a causa del coefficiente di partizione tra i vari comparti dell'organismo.

Dato che età, genere e abitudine al fumo sono tutti fattori di rischio per il cancro al polmone, abbiamo valutato in modo quantitativo l'esposizione a fumo di sigaretta usando variabili che rappresentavano sia l'esposizione pregressa (pacchi-anno) che quella recente (cotinina urinaria). Una prima importante scoperta è stata che i pacchi-anno, soli o in combinazione all'età, mostravano un discreto potere diagnostico (AUC della curva ROC

0.7 - 0.73), con un valore di *cut-off* stimato di 30 PY in pazienti con sospetto cancro al polmone. Ciò sottolineava l'utilità del quantificare l'esposizione a tabacco unitamente alla distinzione qualitativa non-, ex- o fumatori; lo stesso discorso non valeva per la cotinina urinaria, indicando l'importanza preponderante della passata abitudine al fumo.

Tra i biomarcatori considerati, le differenze tra i gruppi sono abbastanza limitate ma interessanti: le concentrazioni di etilbenzene, esano, H₂O₂-EBC e *trans*-2-nonenale erano significativamente più elevate nel gruppo NSCLC, mentre quelle di pentano, 2-metilpentano ed eptanale erano vicine alla significatività. I risultati relativi all'H₂O₂-EBC erano consistenti con dati precedenti in gruppi selezionati [175]. Tuttavia l'eptano, il *trans*-2-nonenale, il pentano e la sua forma metilata, il 2-metilpentano erano possibili *markers* di stress ossidativo, mentre l'etilbenzene e l'esano potevano essere considerati composti parzialmente esogeni.

Come atteso, nessuna delle sostanze esalate mostrava sufficienti sensibilità e specificità. Un modello univariato con i soli VOCs mostrava un potere diagnostico solo tendente alla significatività (AUC della curva ROC= 0.68), che cresceva se combinato all'età e ai pacchi-anno (AUC= 0.80).

I risultati più sorprendenti e promettenti si sono ottenuti dopo la classificazione basata sull'abitudine al fumo. L'analisi è stata fatta in relazione ai soggetti con ≤10 PY (non fumatori, lievi fumatori o ex fumatori) e a quelli con ≤30 PY, i migliori valori di *cut-off* trovati usando le curve ROC.

Nel sottogruppo ≤10 PY, sia H₂O₂-EBC che *trans*-2-nonenale mostravano un buon potere diagnostico (AUC 0.82 e 0.88 rispettivamente) indicando che, quando il fumo di tabacco rappresentava un limitato fattore di confondimento, lo stress ossidativo era chiaramente rilevabile nei pazienti affetti da NSCLC. La combinazione di età + H₂O₂-EBC + *trans*-2-nonenale mostrava un'AUC pari a 0.92, con una sensibilità dell'85.6% ed una specificità del 90.0% ai valori di *cut-off*. In ogni caso questi risultati necessitano di essere confermati

attraverso uno studio di adeguata numerosità usando i valori *cut-off* di H₂O₂ e *trans-2-nonenale* che abbiamo trovato nel nostro studio (0.26 µM e 4.6 pM) (Figura 3b). Altri fattori potrebbero tuttavia influenzare i livelli nell'EBC, perciò tali marcatori dovrebbero essere usati soltanto per discriminare i casi sospetti [176].

Risultati interessanti sono stati ottenuti anche nel sottogruppo ≤30 PY: l'AUC della curva ROC per H₂O₂-EBC era pari a 0.72, con un valore di *cut-off* pari a 0.27 µM, 0.73 per il *trans-2-nonenale*, con un valore di *cut-off* pari a 4.7 pM. L'AUC della combinazione età + H₂O₂-EBC + *trans-2-nonenale* + esano era pari a 0.85. L'intensa esposizione a fumo di sigaretta poteva tuttavia essere un fattore limitante per l'uso dei nostri biomarcatori in soggetti con più di 30 PY, in particolare nel caso di H₂O₂-EBC. I valori di H₂O₂ sono infatti influenzati positivamente dal fumo di sigaretta [177], poiché H₂O₂ è anche presente nella fase catramosa dello stesso [178]. Infine è anche noto che l'abitudine al fumo generi stress ossidativo, correlato alle mutazioni a carico del DNA delle cellule polmonari [179].

Nel gruppo non-NSCLC veniva riscontrata una debole ma significativa correlazione tra H₂O₂ e PY. Essa potrebbe tuttavia essere stata influenzata in maniera negativa da altre patologie polmonari, poiché veniva completamente persa nel gruppo NSCLC [180, 181]. Sebbene i nostri risultati potrebbero essere spiegati da svariati meccanismi tra cui cambiamenti nella permeabilità polmonare, necrosi cellulare e danno tissutale, così come dall'effetto confondente del fumo di tabacco, questo è stato il primo studio a suggerire come il fumo di tabacco potesse avere un ruolo negativo sul potere discriminante dell'aria esalata.

Sebbene lo studio fosse stato disegnato per testare il potere diagnostico complessivo dei biomarcatori esalati in casi di sospetto cancro al polmone, la sua numerosità non è stata sufficiente a permettere considerazioni sugli altri fattori di confondimento, come stadio e istotipo di tumore. Abbiamo riscontrato differenze marginali quando i soggetti venivano stratificati per i suddetti fattori, ma sarebbero necessari ulteriori dati poiché più del 60% dei

pazienti era affetto da NSCLC al I stadio. Non abbiamo inoltre dati riguardanti la presenza di BPCO per nessuno dei gruppi considerati. Infine, l'uso di dispositivi di raccolta dell'aria esalata, in grado di concentrare l'aria proveniente da espirazioni multiple, potrebbe aver accresciuto l'identificazione del picco cromatografico. Sono attualmente in fase di studio ulteriori metodi volti a migliorare il sistema di raccolta, allo scopo di identificare nuove sostanze dotate di significato biologico e di confrontare i risultati con approcci quali microsonde, omica e naso elettronico [102, 154, 183-184]; anche la combinazione di naso elettronico e analisi dello sputo [185] risulterebbe essere di particolare interesse.

4.3 STUDIO III

La comparsa di numerosi lavori scientifici che provino l'efficacia del naso elettronico come strumento diagnostico potenzialmente applicabile nella diagnosi precoce di patologie neoplastiche e flogistiche (in particolare a carico del polmone) e la mancanza di procedure standardizzate che consentano di rendere le misure il più possibile riproducibili ci ha indotti a considerare le numerose variabili che possano condizionare la reale affidabilità dello strumento.

Tali variabili possono essere distinte in due grandi gruppi: quelle legate al funzionamento del naso elettronico, e quelle legate al soggetto dal quale proviene il campione di aria esalata da analizzare; entrambe queste variabili possono a loro volta essere suddivise in variabili non modificabili (per le quali l'operatore non può prendere alcun provvedimento se non tenere conto della loro esistenza) e variabili modificabili (sulle quali possono essere messi a punto sistemi di standardizzazione).

Le variabili non modificabili legate allo strumento sono la composizione dei singoli elementi che costituiscono l'apparato analitico del naso (valvole, pompa, sensori), per lo più costituite da materiali chimicamente inerti, ma che potrebbero in qualche modo influenzare la risposta ad alcuni tipi di VOCs (ad esempio trattenendoli con legami che non consentano l'impatto con i sensori) e la sensibilità dello strumento stesso, che si aggira attorno a 0.1 ppm [186]. Queste due variabili andrebbero sempre tenute in considerazione ogniqualvolta si decida di utilizzare lo strumento a fini diagnostici, poiché potenzialmente in grado di causare una sottostima della reale composizione dell'aria esalata.

Per quanto riguarda le variabili modificabili legate al funzionamento del naso elettronico possiamo menzionare le condizioni ambientali nelle quali viene effettuata l'analisi, la scelta del tipo di *sampling bag* per la raccolta, dell'ago da applicare per consentire l'aspirazione dei gas all'interno dello strumento e le impostazioni dello strumento stesso, che non vengono quasi mai menzionate nei lavori scientifici presenti in letteratura.

Il naso elettronico viene dichiarato dal costruttore come poco influenzabile dalla temperatura e dall'umidità presenti nell'ambiente; nonostante ciò abbiamo provato ad eseguire alcune prove raccogliendo sia azoto che aria ambiente a diverse concentrazioni di umidità: concentrazioni di vapore acqueo sovrapponibili a quelle presenti nello spazio alveolare e condizioni di completa saturazione dell'aria campionata generavano *smellprints* molto simili tra loro, e nettamente diversi da quelli ottenuti in condizioni di raccolta in assenza di umidità (azoto puro). Ciò farebbe ipotizzare che l'umidità condizioni in maniera non sottovalutabile la risposta dei sensori in varie fasi, soprattutto in quella di analisi, in cui l'umidità dell'aria alveolare potrebbe alterare la risposta sia intra- che inter-individuale [187, 188]. Anche la temperatura può condizionare il funzionamento dello strumento: come dichiarato dal costruttore stesso e come confermato dalle nostre prove effettuate nei mesi estivi in ambiente non climatizzato, temperature elevate possono causarne il surriscaldamento (con relativa comparsa del segnale HTR sul *display*).

La scelta del tipo di *sampling bag* nella quale effettuare la raccolta dell'aria esalata rappresenta un'altra variabile che potrebbe condizionare l'esito delle analisi: tra i vari tipi presenti in commercio (Tedlar[®], Supel, Mylar, Kynar, etc.), la più adottata negli studi sull'aria esalata risulta essere la Tedlar[®] [189]. Nonostante il materiale costituente le *sampling bags* da noi analizzate sia sempre lo stesso, le altre caratteristiche fisiche potrebbero essere responsabili della differenza riscontrata negli *smellprints*: la *Supel Sampling bag* mostrava le maggiori variazioni durante il campionamento, soprattutto a carico dei sensori più sensibili ai composti polari. Tale situazione potrebbe essere spiegata dal fatto che essa è meno permeabile al vapore acqueo rispetto alla Tedlar[®] (Tabella XII): le sostanze più polari sarebbero pertanto in grado di diffondere meno rapidamente e condizionare maggiormente la risposta dei sensori, come affermato anche da altre valutazioni effettuate [190-192]. Non va tuttavia sottovalutato il fenomeno di condensa che avviene quando l'esalato viene esposto a sbalzi di temperatura passando dalle vie aeree

all'ambiente, fenomeno che tende infatti a ridurre la concentrazione dei composti meno volatili.

Sia per quanto riguarda il tipo di ago da utilizzare che per le impostazioni dello strumento non abbiamo trovato alcuna indicazione in letteratura: nel primo caso la nostra scelta è ricaduta su materiali monouso, sia per motivi igienici, sia per evitare contaminazioni dovute al passaggio dello stesso da un campione all'altro.

Nel caso delle impostazioni abbiamo invece fatto numerose prove sia riguardo la velocità della pompa (dove il miglior compromesso tra quantità assoluta degli agenti chimici che impattano sui sensori e tempo di risposta degli stessi è stato raggiunto con flussi pari a 120 cc/min) sia riguardo i tempi di campionamento (tempo di epurazione che consenta di evitare l'effetto memoria, tempo di campionamento necessario a garantire la completa analisi del campione, secondo tempo di epurazione necessario a ripulire i sensori da VOCs eventualmente residuati), ed abbiamo optato per le seguenti impostazioni:

medium flow

baseline purge: 30 sec

sample draw: 60 sec

air purge: 10 sec

sample purge: 200 sec.

I suddetti tempi sono condivisi anche da autori di alcuni studi pubblicati in letteratura tra cui Dragonieri e Sterk [153].

L'analisi dell'esalato andrebbe eseguita il prima possibile dopo la raccolta (meglio se entro 6 ore), onde evitare alterazioni nella sua composizione [190]; nel nostro caso le analisi sono state eseguite pochi minuti dopo la raccolta.

Circa il 90% dei VOCs esalati risulta essere influenzato da caratteristiche individuali del soggetto dal quale proviene l'aria esalata; queste caratteristiche possono esse suddivise in due grandi gruppi: non modificabili e modificabili. Le prime sono legate a caratteristiche

intrinseche del singolo individuo, per le quali esiste una variabilità biologica sulla quale non è possibile intervenire se non nella fase di analisi statistica, al fine di rendere le differenze il più uniformi possibili. Esse sono rappresentate da sesso, età, metabolismo individuale e presenza di patologie concomitanti in grado di inficiare il *pattern* esalato.

L'età e il sesso, a causa delle differenze ormonali e metaboliche, potrebbero avere un'influenza sul profilo di composti organici volatili rilevati dai sensori: i VOCs sono infatti condizionati dal profilo metabolico della singola persona, a sua volta regolato da variazioni nei livelli ormonali non solo di androgeni ed estrogeni, ma da tutto il complesso degli ormoni steroidei (che, seguendo ritmi circadiani, potrebbero anche essere responsabili di variazioni nel profilo dei VOCs a seconda del momento della giornata in cui vengono raccolti [188]), come anche da quelli tiroidei, che subiscono variazioni legate in parte al processo di invecchiamento; esistono tuttavia risultati controversi riguardo queste variabili [193-196].

Anche la presenza di patologie interferenti con il sistema endocrino potrebbe essere in grado di aumentare le variabilità del profilo di VOCs esalati, così come patologie a carico dell'apparato respiratorio come la BPCO [149, 154].

Le differenti etnie dei soggetti presi in esame potrebbero comportare alterazioni nel profilo dei VOCs esalati: Aman et al. hanno riscontrato, nell'ambito di uno studio che valutava soggetti affetti da ulcera peptica/cancro allo stomaco, differenze a carico di alcuni VOCs (composti aromatici ed alcoli) tra soggetti provenienti dalla Cina rispetto a soggetti provenienti dalla Lettonia [197]; la prove da noi effettuate erano tuttavia su soli soggetti di razza caucasica.

Tra i fattori di rischio modificabili in grado di influenzare il profilo di VOCs esalati troviamo innanzitutto il fumo di sigaretta, seguito da altre abitudini voluttuarie come il consumo di alcool, il tipo di alimentazione, l'utilizzo di farmaci, l'ambiente di vita e di lavoro, il flusso respiratorio basale, l'esercizio fisico.

L'analisi della risposta del naso a sostanze chimiche analizzate singolarmente, e rappresentative dei diversi inquinanti ambientali/prodotti metabolici, ha mostrato come l'acido acetico in particolare solleciti maggiormente i sensori, seguito dall'etanolo e dall'esanale. Questo sembrerebbe indicare come la risposta sia legata alla polarità della molecola in esame o alla sua capacità di creare delle interazioni dipolo-dipolo con il sensore. Infatti questo *trend* risulta enfatizzato per i sensori polari ma veniva mantenuto, anche se con fattori di risposta diversi, nel caso di sensori non polari. L'azoto, agente chimico di piccole dimensioni e inerte, rispondeva negativamente a quasi tutti i sensori. Ciò sembrerebbe far ipotizzare che i sensori siano dotati di cavità nelle quali gli analiti, inserendosi, creino una risposta in seguito a interazioni di tipo dipolo-dipolo o più in generale di Wan der Vaals, attivando così la risposta del sensore. L'azoto, invece, occupando la cavità senza indurre alcuna interazione con il substrato, sembrerebbe deattivare il sensore producendo così una risposta negativa. Basse risposte si avevano anche con le molecole aromatiche. Questo fenomeno risulta di più difficile interpretazione perché se da una parte la loro geometria planare potrebbe spiegare una bassa permanenza nella cavità del sensore, d'altra parte la nuvola elettronica dell'anello aromatico potrebbe interagire in qualche modo con i polimeri del sensore. Questo risultato va in ogni caso considerato perché i soggetti con tumore al polmone ex forti fumatori, pur presentando un'augmentata concentrazione di composti aromatici nell'aria esalata per il loro pregresso adsorbimento da parte del tessuto polmonare, possono determinare una risposta non adeguata rispetto alla reale condizione, sottostimando così la classificazione dei soggetti in esame.

In generale, questi risultati evidenziano come agenti chimici correlati a variabili voluttuarie (es. cibo, fumo, consumo di caffè o alcolici), ad esposizioni lavorative o ambientali possono influire negativamente sulla classificazione dei gruppi selezionati nel caso in cui

tali variabili non vengano tenute sotto controllo attraverso rigorosi sistemi di standardizzazione della raccolta dell'esalato.

Questo potrebbe farci ipotizzare che la presenza di composti più reattivi nell'esalato, in parte condizionate anche dall'uso di sostanze voluttuarie, potrebbe in parte inficiare i risultati, rendendo necessaria una opportuna standardizzazione delle condizioni di raccolta.

Nello studio precedentemente descritto abbiamo infatti mostrato come l'abitudine al fumo influenzasse in maniera significativa il potere diagnostico di un gruppo di biomarcatori: il suo effetto a breve termine potrebbe essere contenuto invitando ad esempio il soggetto a non fumare nelle 2 ore precedenti, mentre resta da chiarire l'influenza dei suoi effetti a lungo termine, causati dalla persistenza di componenti nelle vie aeree in grado di condizionare il tipo di VOCs emessi, e di conseguenza la risposta dei sensori.

L'influenza dell'esercizio fisico sul profilo di VOCs esalati non è stata presa in considerazione nella nostra analisi, sebbene alcuni lavori [199] ne abbiano mostrato il ruolo nel condizionare il *pattern* di VOCs emessi.

Alcuni autori hanno inoltre mostrato che l'atteggiamento del soggetto durante la raccolta dell'esalato potrebbe essere in grado di condizionare la risposta dei sensori: trattenere il respiro prima della raccolta dell'esalato condizionerebbe in maniera significativa il *pattern* di VOCs a causa della maggior concentrazione di gas alveolari [200], così come l'inclusione dello spazio morto anatomico nella raccolta [188, 201, 202]: questa seconda variabile non è stata presa in considerazione in quanto parte del nostro progetto prevedeva anche la messa a punto e validazione di un sistema in grado di escludere lo spazio morto anatomico già al momento della raccolta.

Lo stesso flusso espiratorio del soggetto sembrerebbe in grado di condizionare la risposta dei sensori: Bikov et al. [203] hanno raccolto l'aria esalata con uno strumento in grado di

controllare il flusso, ed hanno mostrato che esso sarebbe in grado di influenzare le concentrazioni delle molecole originantesi dalle vie aeree di conduzione. Nello specifico flussi più elevati (circa 75 ml/sec) sarebbero associati a livelli maggiori di VOCs rispetto a flussi più bassi (circa 50 ml/sec), comportamento già osservato nel caso dell'ossido nitrico (NO) [204]. Questa variabile è solo parzialmente risolta dal nostro sistema di raccolta grazie all'esclusione dello spazio morto anatomico tramite sensore per la CO₂; il problema tuttavia potrebbe essere solo marginale in quanto la raccolta verrebbe effettuata su soggetti con sospetto cancro al polmone, spesso affetti da sintomatologia dispnoica che rende in parte difficoltosa l'esecuzione di flussi espiratori elevati.

In futuro si potrebbe pensare di collegare il sistema di raccolta precedentemente descritto ad uno pneumotacografo, al fine di standardizzare ulteriormente le condizioni di raccolta.

Uno dei grossi limiti derivanti dall'utilizzo dei VOCs nell'aria esalata risiede nel fatto che il polmone è un compartimento in equilibrio, attraverso il flusso alveolo-capillare, con tutto il resto dell'organismo; essendo inoltre il principale organo escretore delle sostanze volatili, esso potrebbe liberare non soltanto composti specifici per la singola patologia oggetto di studio ma anche molecole generate da processi patologici ancora latenti inerenti altri compartimenti dell'organismo.

4. CONCLUSIONI

Nessun marcatore allo stato attuale ha mostrato sufficienti specificità e sensibilità nella diagnosi di mesotelioma maligno: i dati pubblicati sulla mesotelina mostrano infatti un alto tasso di falsi positivi in soggetti sani. Nessun lavoro ha però esaminato i livelli di YKL-40 in soggetti affetti da MM: nel nostro studio trasversale, dove sono state incluse anche altre patologie asbesto-correlate (cancro al polmone e asbestosi) abbiamo validato due biomarcatori indipendenti, YKL-40 e mesotelina, in modo da migliorare la sensibilità della singola mesotelina come marcatore di MM. L'uso di entrambi questi marcatori in soggetti con pregressa esposizione ad asbesto potrebbe predire lo sviluppo di MM ad uno stadio precoce, ma dal punto di vista etico lo *screening* per il mesotelioma pleurico non appare raccomandabile, non solo per la mancanza di indicatori sufficientemente specifici, quanto piuttosto per gli effetti negativi della diagnosi precoce (aumento della sopravvivenza, ossia aumento del tempo che il paziente trascorre malato) senza risultati positivi apprezzabili (mortalità immodificata a causa dell'inefficacia degli interventi terapeutici attualmente disponibili ed alla tendenza alla recidiva locale).

Ricordiamo infatti come lo scopo dello *screening*, inteso come prevenzione secondaria, sia l'individuazione di patologie potenzialmente curabili in fase preclinica, concetti che poco si sposano con le caratteristiche del mesotelioma pleurico maligno.

Per questo motivo il processo di ottimizzazione delle condizioni di utilizzo del naso elettronico è stato compiuto allo scopo di poterlo applicare nella diagnosi precoce di patologie neoplastiche potenzialmente curabili come il cancro del polmone, che, come mostrano le percentuali di sopravvivenza riportate in Tabella III, offre buone possibilità di sopravvivenza quando diagnosticato ad uno stadio precoce.

Il lavoro effettuato con il naso elettronico ha consentito di definire le impostazioni di utilizzo, finora non riportate in nessun lavoro a nostra conoscenza, standardizzare le condizioni di raccolta e comprendere i limiti di cui tenere conto durante l'utilizzo, tra cui

temperatura e umidità ambientali, e presenza di sostanze chimiche esogene ed endogene in grado di condizionare il *pattern* di VOCs. Per la valutazione di queste ultime abbiamo preso come riferimento alcune classi di composti chimici potenzialmente correlati con lo sviluppo di NSCLC analizzati nello Studio II, dove abbiamo mostrato che il potere diagnostico di un *pattern* di biomarcatori esalati misurati tramite GC-MS era complessivamente buono, ma solo se combinato con la pregressa esposizione a fumo di sigaretta. I risultati ottenuti su soggetti senza o con modesta o moderata abitudine al fumo, passata o attuale, mostravano un'AUC ≥ 0.85 all'analisi multivariata, rendendo il pattern di VOCs promettente per questa categoria di pazienti.

L'utilizzo di uno o più test non-invasivi come applicazione di secondo livello potrebbe risultare particolarmente utile nel discriminare pazienti ad alto rischio (sempre positivi ai test) e a basso rischio (sempre negativi ai test) su base probabilistica, suggerendo la possibilità di preservare questi ultimi da un iter diagnostico invasivo, rendendo minimi i falsi negativi e i falsi positivi. Sia per la prosecuzione di questo studio che per il completamento della validazione del naso elettronico si rende necessaria la combinazione del pattern testato con altri biomarcatori e di estendere i risultati a tutti i soggetti con sospetto cancro al polmone.

Uno dei prossimi obiettivi del nostro lavoro, al fine di comprendere meglio i risultati ottenuti con il naso elettronico, sarà quello di raccogliere contemporaneamente due *sampling bags* di aria esalata tramite il sistema di raccolta da noi messo a punto, per poter comparare il segnale ottenuto dai sensori del naso con quello dell'analisi cromatografica in GC-MS, sperando di attribuire un significato biologico alla risposta dei sensori.

Si potrebbe considerare anche l'ipotesi di utilizzare alcune colture cellulari specifiche di cancro al polmone, come la linea A549, al fine di identificare VOCs ancora più specifici.

Bibliografia

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55: 74-108.
2. Liu BQ, Peto R, Chen ZM, Boreham J, Wu YP, Li JY, Campbell TC, Chen JS. Emerging tobacco hazards in China: 1. Retrospective proportional mortality study of one million deaths. *BMJ.* 1998; 317: 1411-1422.
3. Behera D, Balamugesh T. Lung cancer in India. *Indian J Chest Dis Allied Sci.* 2004; 46: 269-281.
4. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 2137-2150.
5. Peto R, Lopez AD, Pan H, Boreham J, Thun M. Mortality from smoking in developed countries 1950–2000: Indirect estimates from National Vital Statistics, Oxford University Press, 2006.
6. Samet JM, Wiggins CL, Humble CG, Pathak DR, Cigarette smoking and lung cancer in New Mexico. *American Review of Respiratory Disease* 1988; 137: 1110–1113.
7. Asomaning K, Miller DP, Liu G, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC. Second hand smoke, age of exposure and lung cancer risk. *Lung Cancer.* 2008; 61: 13-20.
8. Lubin JH, Caporaso NE. Cigarette smoking and lung cancer: modeling total exposure and intensity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 517-523.
9. Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ.* 2000; 321: 323-329.
10. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 733-744.
11. Boffetta P, Agudo A, Ahrens W, Benhamou E, Benhamou S, Darby SC, Ferro G, Fortes C, Gonzalez CA, Jöckel KH, Krauss M, Kreienbrock L, Kreuzer M, Mendes A, Merletti F, Nyberg F, Pershagen G, Pohlman H, Riboli E, Schmid G, Simonato L, Trédaniel J, Whitley E, Wichmann HE, Winck C, Zambon P, Saracci R. Multicenter case-control study of exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer in Europe. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90: 1440-1450.

12. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 83. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. Lyon, France, IARC Press, 2004.
13. WHO, IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 38, Tobacco Smoking, Lyon, France, 1986.
14. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55: 74-108.
15. De Matteis S, Consonni D, Bertazzi PA. Exposure to occupational carcinogens and lung cancer risk. Evolution of epidemiological estimates of attributable fraction. *Acta Biomed.* 2008; 79: 34-42.
16. Veglia F, Vineis P, Overvad K, Boeing H, Bergmann M, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Palli D, Krogh V, Tumino R, Linseisen J, Steindorf K, Raaschou-Nielsen O, Tjonneland A, Gonzalez CA, Martinez C, Dorronsoro M, Barricarte A, Cirera L, Quiros JR, Day NE, Saracci R, Riboli E. Occupational exposures, environmental tobacco smoke, and lung cancer. *Epidemiology.* 2007;18: 769-775.
17. Vineis P, Hoek G, Krzyzanowski M, Vigna-Taglianti F, Veglia F, Airoldi 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 HB, Peeters PH, Lund E E, Agudo A, Martinez C, Dorronsoro M, Barricarte A, Cirera L, Quiros JR, Berglund G, Manjer J, Forsberg B, Day NE, Key TJ, Kaaks R, Saracci R, Riboli E. Lung cancers attributable to environmental tobacco smoke and air pollution in non-smokers in different European countries: a prospective study. *Environ Health.* 2007; 6: 7.
18. Leroux C, Girard N, Cottin V, Greenland T, Mornex JF, Archer F. Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep. *Vet Res.* 2007; 38: 211-228.
19. Palmarini M, Fan H. Retrovirus-induced ovine pulmonary adenocarcinoma, an animal model for lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 1603-1614.
20. Cheng YW, Chiou HL, Sheu GT, Hsieh LL, Chen JT, Chen CY, Su JM, Lee H. The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer Res.* 2001; 61: 2799-2803.
21. Giuliani L, Jaxmar T, Casadio C, Gariglio M, Manna A, D'Antonio D, Syrjanen K, Favalli C, Ciotti M. Detection of oncogenic viruses SV40, BKV, JCV, HCMV, HPV and p53 codon 72 polymorphism in lung carcinoma. *Lung Cancer.* 2007; 57: 273-281.

22. Neri G, Genuardi M. *Genetica umana e medica*. 2008, Elsevier Masson, Milano.
23. Yang M, Choi Y, Hwangbo B, Jin Soo Lee JS. Combined effects of genetic polymorphisms in six selected genes on lung cancer susceptibility. *Lung Cancer* 2007; 57: 135-142.
24. Gresner P, Gromadzinska J, Wasowicz W. Polymorphism of selected enzymes involved in detoxification and biotransformation in relation to lung cancer. *Lung cancer* 2007; 57: 1-25.
25. Wei Q, Cheng L, Amos CI, Wang LE, Guo Z, Hong WK, Spitz MR. Repair of tobacco carcinogen-induced DNA adducts and lung cancer risk: A molecular epidemiologic study. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1764-1772.
26. Spitz JR, Rennard SI. Pathogenesis of COPD. *Semin Respir Crit Care Med* 2005; 26: 142-153.
27. Biesalski HK, Bueno de Mesquita B, Chesson A, Chytil F, Grimble R, Hermus RJ, Köhrle J, Lotan R, Norpoth K, Pastorino U, Thurnham D. European Consensus Statement on Lung Cancer: risk factors and prevention. *Lung Cancer Panel. CA Cancer J Clin*. 1998; 48: 167-176.
28. Burrows B, Knudson RJ, Cline MG, Lebowitz MD. Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. *Am Rev Respir Dis*. 1977; 115: 195-205.
29. Limas C, Japaze H, Garcia-Bunuel R. "Scar" Carcinoma of the Lung. *Chest* 1971; 59: 219-222.
30. Nitadori J, Inoue M, Iwasaki M, Otani T, Sasazuki S, Nagai K, Tsugane S. Association between lung cancer incidence and family history of lung cancer: data from a large-scale population-based cohort study, the JPHC study. *Chest*. 2006; 130: 968-975.
31. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer*. 2005; 93: 825-833.
32. Sato M, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD. A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2007; 2: 327-343.
33. Risch A, Plass C. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer*. 2008; 123: 1-7.
34. Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *Eur Respir J*. 2009; 33: 1485-1497.

35. Panani AD, Roussos C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Lett.* 2006; 239: 1-9.
36. Mitsuuchi Y, Testa JR. Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. *Am J Med Genet.* 2002; 115: 183-188.
37. Osada H, Takahashi T. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene.* 2002; 21: 7421-7434; Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax.* 2003; 58: 892-900.
38. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100: 57-70.
39. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004; 266: 37-56.
40. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2008; 266: 6-11.
41. Miekisch W, Schubert JK, Noeldge-Schomburg GF. Diagnostic potential of breath analysis--focus on volatile organic compounds. *Clin Chim Acta.* 2004; 347: 25-39.
42. Łuczaj W, Skrzydlewska E. DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell Mol Biol Lett.* 2003; 8: 391-413.
43. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44: 239-267.
44. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160: 1-40.
45. Clerkin JS, Naughton R, Quiney C, Cotter TG. Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2008; 266: 30-36.
46. Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett.* 2008; 266: 37-52.
47. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat.* 2004; 7: 97-110.
48. Mannino DM, Aguayo SM, Petty TL, Redd SC. Low lung function and incident lung cancer in the United States: data From the First National Health and Nutrition Examination Survey follow-up. *Arch Intern Med.* 2003; 163: 1475-1480.
49. Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2008; 11: 1-15.

50. Lee G, Walser TC, Dubinett SM. Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer. *Curr Opin Pulm Med.* 2009; 15: 303-307.
51. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res.* 2008; 659: 15-30.
52. Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2008; 18: 3-10.
53. Yao H, Rahman I. Current concepts on the role of inflammation in COPD and lung cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9: 375-383.
54. William D. Travis, Lois B. Travis, Susan S. Devesa, Lung cancer. *Cancer* 1994; 75: 191-202.
55. Ciombor KK, Rocha Lima CM. Management of small cell lung cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2006; 7: 59-68.
56. Fan YG, Hu P, Jiang Y, Chang RS, Yao SX, Wang W, He J, Prorok P, Qiao YL. Association between sputum atypia and lung cancer risk in an occupational cohort in Yunnan, China. *Chest.* 2009; 135: 778-785.
57. Beadsmoore CJ, Screatton NJ. Classification, staging and prognosis of lung cancer. *Eur J Radiol.* 2003; 45: 8-17.
58. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010; 17: 1471-1474.
59. Dionigi R. *Basi teoriche e Chirurgia generale - Chirurgia specialistica (4^a edizione)*, 2006. Elsevier Masson, Padova.
60. El-Sherif A, Gooding WE, Santos R, Pettiford B, Ferson PF, Fernando HC, Urda SJ, Luketich JD, Landreneau RJ. Outcomes of sublobar resection versus lobectomy for stage I non-small cell lung cancer: a 13-year analysis. *Ann Thorac Surg.* 2006; 82: 408-415.
61. Casali G, Walker WS. Video-assisted thoracic surgery lobectomy: can we afford it? *Eur J Cardiothorac Surg.* 2009; 35: 423-428.
62. Lucchi M, Mussi A, Chella A, Janni A, Ribechini A, Menconi GF, Angeletti CA. Surgery in the management of small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1997; 12: 689-693.
63. Rostad H, Naalsund A, Jacobsen R, Strand TE, Scott H, Heyerdahl Strøm E, Norstein J. Small cell lung cancer in Norway. Should more patients have been offered surgical therapy? *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004; 26: 782-786.

64. Brock MV, Hooker CM, Syphard JE, Westra W, Xu L, Alberg AJ, Mason D, Baylin SB, Herman JG, Yung RC, Brahmer J, Rudin CM, Ettinger DS, Yang SC. Surgical resection of limited disease small cell lung cancer in the new era of platinum chemotherapy: Its time has come. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005; 129: 64-72.
65. Murray N, Turrisi AT 3rd. A review of first-line treatment for small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2006; 1: 270-278.
66. Azim HA Jr, Ganti AK. Treatment options for relapsed small-cell lung cancer. *Anticancer Drugs.* 2007; 18: 255-261.
67. MacCallum C, Gillenwater HH. Second-line treatment of small-cell lung cancer. *Curr Oncol Rep.* 2006; 8: 258-264.
68. Wagner H Jr. Radiation therapy in the management of limited small cell lung cancer: when, where, and how much? *Chest.* 1998; 113: 92S-100S.
69. Clegg A, Scott DA, Hewitson P, Sidhu M, Waugh N. Clinical and cost effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, and vinorelbine in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Thorax.* 2002; 57: 20-28.
70. PORT Meta-analysis Trialists Group. Postoperative radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005.
71. Lally BE, Zelterman D, Colasanto JM, Haffty BG, Detterbeck FC, Wilson LD. Postoperative radiotherapy for stage II or III non-small-cell lung cancer using the surveillance, epidemiology, and end results database. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 2998-3006.
72. Hof H, Muentner M, Oetzel D, Hoess A, Debus J, Herfarth K. Stereotactic single-dose radiotherapy (radiosurgery) of early stage nonsmall-cell lung cancer (NSCLC). *Cancer.* 2007; 110: 148-155.
73. Clifton F. Mountain, Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997; 111: 1710-1717.
74. McCrory DC, Colice GL, Lewis SZ, Alberts WM, Parker S. Overview of methodology for lung cancer evidence review and guideline development. *Chest.* 2003; 123: 3S-6S.
75. National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gatsonis C, Marcus PM, Sicks JD. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med.* 2011;365: 395-409.

- 76.** U.S. Department of Health and Human Services – AHRQ Evidence Synthesis Number 103 –Screening for Lung Cancer: Systematic Review to Update the U.S. Preventive Services Task Force Recommendation. Publication No. 13-05188-EF-2013.
- 77.** Pira E, Apostoli P, Bonini S, Catalani S, Corradi M, Cristaudo A, Discalzi G, Garzaro G, Giachino GM, Iavicoli S, Iavicoli I, Mancini G, Mutti A, Romano C, Turbiglio M, Violante FS. Linee Guida per la sorveglianza sanitaria degli esposti ad agenti cancerogeni e mutageni in ambiente di lavoro. Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale. Nuova Editrice Berti 2013.
- 78.** Gould MK, Fletcher J, Iannettoni MD, Lynch WR, Midthun DE, Naidich DP, Ost DE; American College of Chest Physicians. Evaluation of patients with pulmonary nodules: when is it lung cancer?: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007; 132: 108S-130S.
- 79.** Chen TM, Gould M. Evaluation of patients with small, subcentimeter nodules. *Semin Respir Crit Care Med*. 2008; 29: 241-247.
- 80.** Wahidi MM, Govert JA, Goudar RK, Gould MK, McCrory DC; American College of Chest Physicians. Evidence for the treatment of patients with pulmonary nodules: when is it lung cancer?: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007;132: 94S-107S.
- 81.** INAIL. Il registro nazionale dei mesoteliomi. Quarto rapporto. Edizione 2012.
- 82.** Marinaccio A, Binazzi A, Cauzillo G, Chellini E, De Zotti R, Gennaro V, Menegozzo M, Mensi C, Merler E, Mirabelli D, Musti M, Pannelli F, Romanelli A, Scarselli A, Tosi S, Tumino R, Nesti M; Gruppo di lavoro ReNaM. Epidemiological surveillance of malignant mesothelioma cases in Italy: incidence and asbestos exposure figures by the Italian mesothelioma registry (ReNaM). *Epidemiol Prev*. 2007; 31: 23-26.
- 83.** Carbone M, Yang H. Molecular pathways: targeting mechanisms of asbestos and erionite carcinogenesis in mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 2012; 18: 598-604.
- 84.** Goodman JE, Nascarella MA, Valberg PA. Ionizing radiation: a risk factor for mesothelioma. *Cancer Causes Control*. 2009; 20: 1237-1254.
- 85.** Watanabe S, Hitomi S, Nakamura T, Isobe J, Okada K, Chihara K, Aoki M, Tamura K, Wada H, Shimizu Y. A clinical study of six surgically treated patients with malignant tumors arising from chronic pleuritis and pyothorax. *Nihon Kyobu Geka Gakkai Zasshi*. 1989; 37: 281-286.

- 86.** Weiner SJ, Neragi-Miandoab S. Pathogenesis of malignant pleural mesothelioma and the role of environmental and genetic factors. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009; 135: 15-27.
- 87.** Chiappino G. Mesothelioma: the aetiological role of ultrathin fibres and repercussions on prevention and medical legal evaluation. *Med Lav.* 2005; 96: 3-23.
- 88.** Voytek P, Anver M, Thorslund T, Conley J, Anderson E. Mechanisms of asbestos carcinogenicity. *Int J Toxicol* 1990; 9: 541-550.
- 89.** Sheibani K, Stroup RM. Immunopathology of malignant mesothelioma. *Pathology* 1996; 4: 191.
- 90.** Butchart EG, Ashcroft T, Barnsley WC, Holden MP. Pleuropneumonectomy in the management of diffuse malignant mesothelioma of the pleura. Experience with 29 patients. *Thorax* 1976; 31: 15-24.
- 91.** Mattson K. Natural history and clinical staging of malignant mesothelioma. *Eur J Respir Dis* 1982; 63: 87.
- 92.** Lippincott JB. American Joint Committee on Cancer, Handbook for Staging of Cancer, 4th ed. Philadelphia, 1993: 137-138.
- 93.** Rusch VW. A proposed new international TNM staging system for malignant pleural mesothelioma. From the International Mesothelioma Interest Group. *Chest.* 1995; 108: 1122-1128.
- 94.** Mutti A, Corradi M. *Lezioni di Medicina del Lavoro.* 2014. Nuova Editrice Berti.
- 95.** Roggli VL, Gibbs AR, Attanoos R, Churg A, Popper H, Cagle P, Corrin B, Franks TJ, Galateau-Salle F, Galvin J, Hasleton PS, Henderson DW, Honma K. Pathology of asbestosis- An update of the diagnostic criteria: Report of the asbestosis committee of the college of american pathologists and pulmonary pathology society. *Arch Pathol Lab Med.* 2010; 134: 462-480.
- 96.** American Thoracic Society. Diagnosis and initial management of nonmalignant diseases related to asbestos. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170: 691-715.
- 97.** Asbestos, asbestosis, and cancer: the Helsinki criteria for diagnosis and attribution. *Scand J Work Environ Health.* 1997; 23: 311-316.
- 98.** Wolff H, Vehmas T, Oksa P, Rantanen J, Vainio H. Asbestos, asbestosis, and cancer, the Helsinki criteria for diagnosis and attribution 2014: recommendations. *Scand J Work Environ Health.* 2015; 41: 5-15.

- 99.** 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.
- 100.** Di Natale C, Macagnano A, Martinelli E, Paolesse R, D'Arcangelo G, Roscioni C, Finazzi-Agrò A, D'Amico A. Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. *Biosens Bioelectron*. 2003; 18: 1209-1218.
- 101.** Miekisch W, Schubert JK, Noeldge-Schomburg GF. Diagnostic potential of breath analysis--focus on volatile organic compounds. *Clin Chim Acta*. 2004; 347: 25-39.
- 102.** Machado RF, Laskowski D, Deffenderfer O, Burch T, Zheng S, Mazzone PJ, Mekhail T, Jennings C, Stoller JK, Pyle J, Duncan J, Dweik RA, Erzurum SC. Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171: 1286-1291.
- 103.** Poli D, Carbognani P, Corradi M, Goldoni M, Acampa O, Balbi B, Bianchi L, Rusca M, Mutti A. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study. *Respir Res*. 2005; 6:71.
- 104.** Mutti A, Corradi M. Recent developments in human biomonitoring: non-invasive assessment of target tissue dose and effects of pneumotoxic metals. *Med Lav*. 2006; 97: 199-206.
- 105.** Inamura K, Fujiwara T, Hoshida Y, Isagawa T, Jones MH, Virtanen C, Shimane M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Tsuchiya E, Ishikawa S, Aburatani H, Nomura H, Ishikawa Y. Two subclasses of lung squamous cell carcinoma with different gene expression profiles and prognosis identified by hierarchical clustering and on-negative matrix factorization. *Oncogene*. 2005; 24: 7105-7113.
- 106.** UI Hussain M. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell Tissue Res*. 2012; 349: 405-413.
- 107.** Shen J, Todd NW, Zhang H, Yu L, Lingxiao X, Mei Y, Guarnera M, Liao J, Chou A, Lu CL, Jiang Z, Fang H, Katz RL, Jiang F. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Lab Invest*. 2011; 91: 579-587.
- 108.** Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis.

Cancer Cell. 2006; 9:189-198.

109. Lages E, Ipas H, Guttin A, Nesr H, Berger F, Issartel JP. MicroRNAs: molecular features and role in cancer. *Front Biosci.* 2012; 17: 2508-2540.
110. Cuk K, Zucknick M, Madhavan D, Schott S, Golatta M, Heil J, Marmé F, Turchinovich A, Sinn P, Sohn C, Junkermann H, Schneeweiss A, Burwinkel B. Plasma microRNA panel for minimally invasive detection of breast cancer. *PLoS One.* 2013; 8: e76729.
111. Reid G. MicroRNAs in mesothelioma: from tumour suppressors and biomarkers to therapeutic targets. *J Thorac Dis.* 2015; 7: 1031-1040.
112. Bianchi F, Nicassio F, Veronesi G, di Fiore PP. Circulating microRNAs: next-generation biomarkers for early lung cancer detection. *Ecancermedicalscience.* 2012; 6:246.
113. Chan HP, Tran V, Lewis C, Thomas PS. Elevated levels of oxidative stress markers in exhaled breath condensate. *J Thorac Oncol.* 2009; 4: 172-178.
114. Gessner C, Kuhn H, Toepfer K, Hammerschmidt S, Schauer J, Wirtz H. Detection of p53 gene mutations in exhaled breath condensate of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2004; 43: 215-222.
115. Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Mulé G, Resta O, Tommasi S, Mangia A, Carpagnano F, Stea G, Susca A, Di Gioia G, De Lena M, Paradiso A. 3p microsatellite alterations in exhaled breath condensate from patients with non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172: 738-744.
116. Carpagnano GE, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Carpagnano F. Interleukin-6 is increased in breath condensate of patients with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers.* 2002; 17: 141-145.
117. Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Carpagnano F. Endothelin-1 is increased in the breath condensate of patients with non-small-cell lung cancer. *Oncology.* 2004; 66: 180-184.
118. Carpagnano GE, Spanevello A, Curci C, Salerno F, Palladino GP, Resta O, Di Gioia G, Carpagnano F, Foschino Barbaro MP. IL-2, TNF-alpha, and leptin: local versus systemic concentrations in NSCLC patients. *Oncol Res.* 2007; 16: 375-381.
119. Murray A, Chapman CJ, Healey G, Peek LJ, Parsons G, Baldwin D, Barnes A, Sewell HF, Fritsche HA, Robertson JF. Technical validation of an autoantibody test for lung cancer. *Ann Oncol.* 2010; 21: 1687-1693.

120. Chapman CJ, Murray A, McElveen JE, Sahin U, Luxemburger U, Türeci O, Wiewrodt R, Barnes AC, Robertson JF. Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure. *Thorax*. 2008; 63: 228-233.
121. Zhong L, Coe SP, Stromberg AJ, Khattar NH, Jett JR, Hirschowitz EA. Profiling tumor-associated antibodies for early detection of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2006; 1: 513-519.
122. Patz EF Jr, Campa MJ, Gottlin EB, Trotter PR, Herndon JE 2nd, Kafader D, Grant RP, Eisenberg M. Biomarkers to help guide management of patients with pulmonary nodules. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013; 188: 461-465.
123. Pira E, Coggiola M, Bosio D. Early lung cancer detection in an occupational asbestos exposed population: clinical impact of low-dose computed tomography screening. *G Ital Med Lav Ergon*. 2010; 32: 389-393.
124. Kao SC, Harvie R, Paturi F, Taylor R, Davey R, Abraham R, Clarke S, Marx G, Cullen M, Kerestes Z, Pavlakis N. The predictive role of serum VEGF in an advanced malignant mesothelioma patient cohort treated with thalidomide alone or combined with cisplatin/gemcitabine. *Lung Cancer*. 2012; 75: 248-254.
125. Galffy G, Mohammed KA, Dowling PA, Nasreen N, Ward MJ, Antony VB. Interleukin 8: an autocrine growth factor for malignant mesothelioma. *Cancer Res*. 1999; 59: 367-371.
126. Hedman M, Arnberg H, Wernlund J, Riska H, Brodin O. Tissue polypeptide antigen (TPA), hyaluronan and CA 125 as serum markers in malignant mesothelioma. *Anticancer Res*. 2003; 23: 531-536.
127. Filiberti R, Parodi S, Libener R, Ivaldi GP, Canessa PA, Ugolini D, Bobbio B, Marroni P. Diagnostic value of mesothelin in pleural fluids: comparison with CYFRA 21-1 and CEA. *Med Oncol*. 2013; 30:543.
128. Robinson BW, Creaney J, Lake R, Nowak A, Musk AW, de Klerk N, Winzell P, Hellstrom KE, Hellstrom I. Soluble mesothelin-related protein--a blood test for mesothelioma. *Lung Cancer*. 2005; 49: S109-111.
129. Hassan R, Remaley AT, Sampson ML, Zhang J, Cox DD, Pingpank J, Alexander R, Willingham M, Pastan I, Onda M. Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 447-453.
130. Scherpereel A, Grigoriu B, Conti M, Gey T, Grégoire M, Copin MC, Devos P, Chahine B, Porte H, Lassalle P. Soluble mesothelin-related peptides in the

- diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173: 1155-1160.
- 131.** Hollevoet K, Reitsma JB, Creaney J, Grigoriu BD, Robinson BW, Scherpereel A, Cristaudo A, Pass HI, Nackaerts K, Rodríguez Portal JA, Schneider J, Muley T, Di Serio F, Baas P, Tomasetti M, Rai AJ, van Meerbeeck JP. Serum mesothelin for diagnosing malignant pleural mesothelioma: an individual patient data meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2012; 30: 1541-1549.
- 132.** Pass HI, Lott D, Lonardo F, Harbut M, Liu Z, Tang N, Carbone M, Webb C, Wali A. Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1564-1573.
- 133.** Cristaudo A, Foddìs R, Buselli R, Gattini V, Di Palma N, Guglielmi G. Medical surveillance of workers previously exposed to asbestos. *Med Lav.* 2006; 97: 475-481.
- 134.** Cristaudo A, Bonotti A, Simonini S, Vivaldi A, Guglielmi G, Ambrosino N, Chella A, Lucchi M, Mussi A, Foddìs R. Combined serum mesothelin and plasma osteopontin measurements in malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2011; 6: 1587-1593.
- 135.** Cristaudo A, Bonotti A, Simonini S, Bruno R, Foddìs R. Soluble markers for diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Biomark Med.* 2011; 5: 261-273.
- 136.** Pass HI, Levin SM, Harbut MR, Melamed J, Chiriboga L, Donington J, Huflejt M, Carbone M, Chia D, Goodglick L, Goodman GE, Thornquist MD, Liu G, de Perrot M, Tsao MS, Goparaju C. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *N Engl J Med.* 2012; 367: 1417-1427.
- 137.** Marchianò A, Calabrò E, Civelli E, Di Tolla G, Frigerio LF, Morosi C, Tafaro F, Ferri E, Sverzellati N, Camerini T, Mariani L, Lo Vullo S, Pastorino U. Pulmonary nodules: volume repeatability at multidetector CT lung cancer screening. *Radiology.* 2009; 251: 919-925.
- 138.** Humphrey LL, Deffebach M, Pappas M, Baumann C, Artis K, Mitchell JP, Zakher B, Fu R, Slatore CG. Screening for lung cancer with low-dose computed tomography: a systematic review to update the US Preventive services task force recommendation. *Ann Intern Med.* 2013; 159: 411-420.
- 139.** Charokopos N, Tsiamita M, Karkoulas K, Koumoundourou D, Aletra C, Dougenis D, Spiropoulos K. Carcinoid tumour behind bronchiectasis. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2006; 65: 110-113.

140. Mutti A, Corradi M, Goldoni M, Vettori MV, Bernard A, Apostoli P. Exhaled metallic elements and serum pneumoproteins in asymptomatic smokers and patients with COPD or asthma. *Chest*. 2006; 129: 1288-1297.
141. Nowak D, Kalucka S, Białasiewicz P, Król M. Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects. *Free Radic Biol Med*. 2001; 30: 178-186.
142. Poli et al. 2005; Poli D, Goldoni M, Corradi M, Acampa O, Carbognani P, Internullo E, Casalini A, Mutti A. Determination of aldehydes in exhaled breath of patients with lung cancer by means of on-fiber-derivatisation SPME-GC/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010; 878: 2643-2651.
143. Protano C, Andreoli R, Manini P, Vitali M. Urinary trans, trans-muconic acid and S-phenylmercapturic acid are indicative of exposure to urban benzene pollution during childhood. *Sci Total Environ*. 2012; 435-436: 115-123.
144. Van't Westeinde SC, van Klaveren RJ. Screening and early detection of lung cancer. *Cancer J*. 2011; 17: 3-10.
145. van Klaveren RJ, Oudkerk M, Prokop M, Scholten ET, Nackaerts K, Vernhout R, van Iersel CA, van den Bergh KA, van 't Westeinde S, van der Aalst C, Thunnissen E, Xu DM, Wang Y, Zhao Y, Gietema HA, de Hoop BJ, Groen HJ, de Bock GH, van Ooijen P, Weenink C, Verschakelen J, Lammers JW, Timens W, Willebrand D, Vink A, Mali W, de Koning HJ. Management of lung nodules detected by volume CT scanning. *N Engl J Med*. 2009; 361: 2221-2229.
146. D'Amico A, Di Natale C, Falconi C, Martinelli E, Paolesse R, Pennazza G, Santonico M, Sterk PJ; U-BIOPRED study. Detection and identification of cancers by the electronic nose. *Expert Opin Med Diagn*. 2012; 6: 175-85.
147. Incalzi RA, Pennazza G, Scarlata S, Santonico M, Petriaggi M, Chiurco D, Pedone C, D'Amico A. Reproducibility and respiratory function correlates of exhaled breath fingerprint in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. 2012; 7: e45396.
148. Montuschi P, Santonico M, Mondino C, Pennazza G, Mantini G, Martinelli E, Capuano R, Ciabattini G, Paolesse R, Di Natale C, Barnes PJ, D'Amico A. Diagnostic performance of an electronic nose, fractional exhaled nitric oxide, and lung function testing in asthma. *Chest*. 2010 Apr; 137: 790-796.

- 149.** D'Amico A, Pennazza G, Santonico M, Martinelli E, Roscioni C, Galluccio G, Paolesse R, Di Natale C. An investigation on electronic nose diagnosis of lung cancer. *Lung Cancer*. 2010; 68: 170-6.
- 150.** Lai SY, Deffenderfer OF, Hanson W, Phillips MP, Thaler ER. Identification of upper respiratory bacterial pathogens with the electronic nose. *Laryngoscope* 2002; 112: 975-979.
- 151.** Aronzon A, Hanson CW, Thaler ER. Differentiation between cerebrospinal fluid and serum with electronic nose. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005; 133: 16-19.
- 152.** Thaler, ER, Hanson, CW. Use of an electronic nose to diagnose bacterial sinusitis. *American Journal of Rhinology* 2006, 20: 170-172.
- 153.** Dragonieri S, Schot R, Mertens BJ, Le Cessie S, Gauw SA, Spanevello A, Resta O, Willard NP, Vink TJ, Rabe KF, Bel EH, Sterk PJ. An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120: 856-862.
- 154.** Dragonieri S, Annema JT, Schot R, van der Schee MP, Spanevello A, Carratú P, Resta O, Rabe KF, Sterk PJ. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung Cancer*. 2009; 64: 166-170.
- 155.** Lazar Z, Fens N, van der Maten J, van der Schee MP, Wagener AH, de Nijs SB, Dijkers E, Sterk PJ. Electronic nose breathprints are independent of acute changes in airway caliber in asthma. *Sensors (Basel)*. 2010; 10: 9127-9138.
- 156.** Fens N, de Nijs SB, Peters S, Dekker T, Knobel HH, Vink TJ, Willard NP, Zwinderman AH, Krouwels FH, Janssen HG, Lutter R, Sterk PJ. Exhaled air molecular profiling in relation to inflammatory subtype and activity in COPD. *Eur Respir J*. 2011; 38: 1301-1309.
- 157.** van den Heuvel MM, Korse CM, Bonfrer JM, Baas P. Non-invasive diagnosis of pleural malignancies: The role of tumour marker. *Lung Cancer* 2008; 59: 350-354.
- 158.** Cristaudo A, Foddìs R, Vivaldi A, Guglielmi G, Dipalma N, Filiberti R, Neri M, Ceppi M, Paganuzzi M, Ivaldi GP, Mencoboni M, Canessa PA, Ambrosino N, Chella A, Mutti L, Puntoni R. Clinical significance of serum mesothelin in patients with mesothelioma and lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5076-5081.
- 159.** Beyer HL, Geschwindt RD, Glover CL, Tran L, Hellstrom I, Hellstrom KE, Miller MC, Verch T, Allard WJ, Pass HI, Sardesai NY. MESOMARK: A potential test for malignant pleural mesothelioma. *Clin Chem* 2007; 53: 666-672.

- 160.** Di Serio F, Fontana A, Loizzi M, Capotorto G, Maggiolini P, Mera E, Bisceglia L, Molinini R. Mesothelin family proteins and diagnosis of mesothelioma: Analytical evaluation of an automated immunoassay and preliminary clinical results. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 634-638.
- 161.** Kim HR, Jun CD, Lee KS, Cho JH, Jeong ET, Yang SH, Lee YJ, Park DS. Levels of YKL-40 in pleural effusion and blood from patients with pulmonary or pleural disease. *Cytokine* 2012; 58: 336-343.
- 162.** Thöm I, Andritzky B, Schuch G, Burkholder I, Edler L, Johansen JS, Bokemeyer C, Schumacher U, Laack E. Elevated pretreatment serum concentration of YKL-40 – An independent prognostic biomarker for poor survival in patients with metastatic nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2010; 116: 4114-4121.
- 163.** Fazzo L, Minelli G, De Santis M, Bruno C, Zona A, Marinaccio A, Conti S, Pirastu R, Comba P. Mesothelioma mortality surveillance and asbestos exposure tracking in Italy. *Ann Ist Super Sanita* 2012; 48: 300-310.
- 164.** Creaney J, Yeoman D, Naumoff LK, Hof M, Segal A, Musk AW, De Klerk N, Horick N, Skates SJ, Robinson BW. Soluble mesothelin in effusions: A useful tool for the diagnosis of malignant mesothelioma. *Thorax* 2007; 62: 569-576.
- 165.** Marinaccio A, Altavista P, Binazzi A, Comba P, Mastrantonio M, Nesti M, Pasetto R, Scarselli A, Uccelli R, Pirastu R. Pleural cancer mortality and compensated cases of asbestosis in Sardinia Region municipalities (1980-2000). *Epidemiol Prev* 2005; 29: 57-62.
- 166.** Ligor M, Ligor T, Bajtarevic A, Ager C, Pienz M, Klieber M, Denz H, Fiegl M, Hilbe W, Weiss W, Lukas P, Jamnig H, Hackl M, Buszewski B, Miekisch W, Schubert J, Amann A. Determination of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer using solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47: 550-560.
- 167.** de Blas M, Navazo M, Alonso L, Durana N, Gomez MC, Iza J. Simultaneous indoor and outdoor on-line hourly monitoring of atmospheric volatile organic compounds in an urban building. The role of inside and outside sources. *Sci Total Environ.* 2012; 426: 327-335.
- 168.** Ishino K, Wakita C, Shibata T, Toyokuni S, Machida S, Matsuda S, Matsuda T, Uchida K. Lipid peroxidation generates body odor component trans-2-nonenal covalently bound to protein in vivo. *J Biol Chem.* 2010; 285: 15302-15313.

- 169.** Guyot-Declerck C, François N, Ritter C, Govaerts B, Collin S. Influence of pH and ageing on beer organoleptic properties. A sensory analysis based on AEDA data. *Food Qual. Prefer.* 2005; 16: 157-162.
- 170.** Peled N, Hakim M, Bunn PA Jr, Miller YE, Kennedy TC, Mattei J, Mitchell JD, Hirsch FR, Haick H. Non-invasive breath analysis of pulmonary nodules. *J Thorac Oncol.* 2012; 7: 1528-1533.
- 171.** Bousamra M 2nd, Schumer E, Li M, Knipp RJ, Nantz MH, van Berkel V, Fu XA. Quantitative analysis of exhaled carbonyl compounds distinguishes benign from malignant pulmonary disease. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014; 148: 1074-1080.
- 172.** Corradi M, Goldoni M, Caglieri A, Folesani G, Poli D, Corti M, Mutti A. Collecting exhaled breath condensate (EBC) with two condensers in series: a promising technique for studying the mechanisms of EBC formation, and the volatility of selected biomarkers. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2008; 21: 35-44.
- 173.** Amann A, Mochalski P, Ruzsanyi V, Broza YY, Haick H. Assessment of the exhalation kinetics of volatile cancer biomarkers based on their physicochemical properties. *J Breath Res.* 2014; 8: 016003.
- 174.** Haick H, Broza YY, Mochalski P, Ruzsanyi V, Amann A. Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers. *Chem Soc Rev.* 2014; 43: 1423-1449.
- 175.** Zieba M, Suwalski M, Kwiatkowska S, Piasecka G, Grzelewska-Rzymowska I, Stolarek R, Nowak D. Comparison of hydrogen peroxide generation and the content of lipid peroxidation products in lung cancer tissue and pulmonary parenchyma. *Respir Med.* 2000; 94: 800-805.
- 176.** Caglieri A, Goldoni M, Acampa O, Andreoli R, Vettori MV, Corradi M, Apostoli P, Mutti A. The effect of inhaled chromium on different exhaled breath condensate biomarkers among chrome-plating workers. *Environ Health Perspect.* 2006; 114: 542-546.
- 177.** Nowak D, Antczak A, Krol M, Pietras T, Shariati B, Bialasiewicz P, Jeczowski K, Kula P. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur Respir J.* 1996; 9: 652-657.
- 178.** Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 686: 12-27.

- 179.** Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10: 3886-3907.
- 180.** Gupta A, Srivastava S, Prasad R, Natu SM, Mittal B, Negi MP, Srivastava AN. Smoking intensity, oxidative stress and chemotherapy in nonsmall cell lung cancer: a correlated prognostic study. *Biosci Trends*. 2009; 3: 191-199.
- 181.** Nowak D, Kasielski M, Pietras T, Białasiewicz P, Antczak A. Cigarette smoking does not increase hydrogen peroxide levels in expired breath condensate of patients with stable COPD. *Monaldi Arch Chest Dis*. 1998; 53: 268-273.
- 182.** Barash O, Peled N, Tisch U, Bunn PA Jr, Hirsch FR, Haick H. Classification of lung cancer histology by gold nanoparticle sensors. *Nanomedicine*. 2012; 8: 580-589.
- 183.** Queralto N, Berliner AN, Goldsmith B, Martino R, Rhodes P, Lim SH. Detecting cancer by breath volatile organic compound analysis: a review of array-based sensors. *J Breath Res*. 2014; 8: 027112.
- 184.** Chapman EA, Thomas PS, Stone E, Lewis C, Yates DH. A breath test for malignant mesothelioma using an electronic nose. *Eur Respir J*. 2012; 40: 448-454).
- 185.** Hubers AJ, Brinkman P, Boksem RJ, Rhodius RJ, Witte BI, Zwinderman AH, Heideman DA, Duin S, Koning R, Steenbergen RD, Snijders PJ, Smit EF, Sterk PJ, Thunnissen E. Combined sputum hypermethylation and eNose analysis for lung cancer diagnosis. *J Clin Pathol*. 2014; 67: 707-711.
- 186.** Doleman BJ, Lewis NS. Comparison of odor detection thresholds and odor discriminabilities of a conducting polymer composite electronic nose versus mammalian olfaction. *Sensor Actuator B Chem* 2001; 72: 41-50.
- 187.** Fens N, van der Schee MP, Brinkman P, Sterk PJ. Exhaled breath analysis by electronic nose in airways disease. Established issues and key questions. *Clin Exp Allergy*. 2013; 43: 705-715.
- 188.** Thekedar B, Szymczak W, Höllriegl V, Hoeschen C, Oeh U. Investigations on the variability of breath gas sampling using PTR-MS. *J Breath Res*. 2009; 3: 027007.

- 189.** Krilaviciute A, Heiss JA, Leja M, Kupcinskas J, Haick H, Brenner H. Detection of cancer through exhaled breath: a systematic review. *Oncotarget*. 2015; 6: 38643-38657.
- 190.** Mochalski P, Wzorek B, Sliwka I, Amann A. Suitability of different polymer bags for storage of volatile sulphur compounds relevant to breath analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009; 877: 189-196.
- 191.** Mochalski P, King J, Unterkofler K, Amann A. Stability of selected volatile breath constituents in Tedlar, Kynar and Flexfilm sampling bags. *Analyst*. 2013; 138: 1405-1418.
- 192.** Beauchamp J, Herbig J, Gutmann R, Hansel A. On the use of Tedlar® bags for breath-gas sampling and analysis. *J Breath Res*. 2008; 2: 046001.
- 193.** Kushch I, Arendacká B, Stolc S, Mochalski P, Filipiak W, Schwarz K, Schwentner L, Schmid A, Dzien A, Lechleitner M, Witkovský V, Miekisch W, Schubert J, Unterkofler K, Amann A. Breath isoprene--aspects of normal physiology related to age, gender and cholesterol profile as determined in a proton transfer reaction mass spectrometry study. *Clin Chem Lab Med*. 2008; 46: 1011-1018.
- 194.** Lechner M, Moser B, Niederseer D, Karlseder A, Holzknacht B, Fuchs M, Colvin S, Tilg H, Rieder J. Gender and age specific differences in exhaled isoprene levels. *Respir Physiol Neurobiol*. 2006; 154: 478-483.
- 195.** Fuchs P, Loeseken C, Schubert JK, Miekisch W. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. *Int J Cancer*. 2010; 126: 2663-2670.
- 196.** 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.
- 197.** Amal H, Leja M, Broza YY, Tisch U, Funka K, Liepniece-Karele I, Skapars R, Xu ZQ, Liu H, Haick H. Geographical variation in the exhaled volatile organic compounds. *J Breath Res*. 2013; 7: 047102.
- 198.** Cheng ZJ, Warwick G, Yates DH, Thomas PS. An electronic nose in the discrimination of breath from smokers and non-smokers: a model for toxin exposure. *J Breath Res*. 2009; 3: 036003.
- 199.** Dallinga JW, Smolinska A, van Schooten FJ. Analysis of volatile organic compounds in exhaled breath by gas chromatography-mass spectrometry combined with chemometric analysis. *Methods Mol Biol*. 2014; 1198: 251-263.

- 200.** Zetterquist W, Marteus H, Johannesson M, Nordval SL, Ihre E, Lundberg JO, Alving K. Exhaled carbon monoxide is not elevated in patients with asthma or cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2002; 20: 92-99.
- 201.** Lärstad MA, Torén K, Bake B, Olin AC. Determination of ethane, pentane and isoprene in exhaled air--effects of breath-holding, flow rate and purified air. *Acta Physiol (Oxf).* 2007; 189: 87-98.
- 202.** Bikov A, Paschalaki K, Logan-Sinclair R, Horváth I, Kharitonov SA, Barnes PJ, Usmani OS, Paredi P. Standardised exhaled breath collection for the measurement of exhaled volatile organic compounds by proton transfer reaction mass spectrometry. *BMC Pulm Med.* 2013; 13:43.
- 203.** Bikov A, Hernadi M, Korosi BZ, Kunos L, Zsomboki G, Sutto Z, Tarnoki AD, Tarnoki DL, Losonczy G, Horvath I. Expiratory flow rate, breath hold and anatomic dead space influence electronic nose ability to detect lung cancer. *BMC Pulm Med.* 2014; 14: 202.
- 204.** Silkoff PE, McClean PA, Slutsky AS, Furlott HG, Hoffstein E, Wakita S, Chapman KR, Szalai JP, Zamel N. Marked flow-dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155: 260-267.

TABELLE

Tumore primitivo (T)	
TX	Il tumore primitivo non può essere valutato, o la sua esistenza è data dalla presenza di cellule maligne nello sputo o nel lavaggio bronchiale ma esso non è visualizzato tramite imaging o broncoscopia.
T0	Nessuna evidenza di tumore primitivo
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumore ≤ 3 cm nella dimensione maggiore, circondato da polmone o pleura viscerale, no evidenza broncoscopica di invasività oltre il bronco lobare (nè nel bronco principale); diffusione superficiale del tumore nelle vie aeree centrali (confinato alla parete bronchiale).
T1a	Tumore ≤ 2 cm nella sua dimensione maggiore
T1b	Tumor > 2 cm ma ≤ 3 cm nella sua dimensione maggiore
T2	Tumor > 3 cm ma ≤ 7 cm o tumore con una delle seguenti caratteristiche: <ul style="list-style-type: none"> • Invasione della pleura viscerale • Invasione del bronco principale ≥ 2 cm distale dalla carena • Associazione con atelettasia/polmonite ostruttiva estesa alla regione ilare ma non coinvolgente l'intero polmone
T2a	Tumore > 3 cm ma ≤ 5 cm nella sua dimensione maggiore
T2b	Tumore > 5 cm ma ≤ 7 cm nella sua dimensione maggiore
T3	Tumore > 7 cm o che invade direttamente una delle seguenti strutture: <ul style="list-style-type: none"> • Parete toracica (incluso il solco superiore), diaframma, nervo frenico, pleura mediastinica, o pericardio parietale; • O tumore nel bronco principale < 2 cm distale dalla carena ma senza coinvolgimento della stessa; • O associate ad atelettasia/polmonite ostruttiva dell'intero polmone o nodulo(i) separati nello stesso lobo
T4	Tumore di qualsiasi dimensione che invade una delle seguenti strutture: mediastino, cuore, grossi vasi, trachea, nervo laringeo ricorrente, esofago, corpi vertebrali, or carena; o nodulo(i) separati in lobo ipsilaterale differente.
Linfonodi regionali (N)	
NX	Linfonodi regionali non possono essere valutati
N0	No metastasi nodali regionali
N1	Metastasi nella zona peribronchiale ipsilaterale e/o linfonodi ilari ipsilaterali e noduli intrapolmonari, incluso il coinvolgimento per estensione diretta
N2	Metastasi nella regione mediastinica ipsilaterale e/o linfonodo(i) subcarenali
N3	Metastasi nell mediastino controlaterale, controlaterali ilari, scalene ipsilaterali o controlaterali, o linfonodi sovraclaveari
Metastasi a distanza (M)	
MX	Metastasi a distanza non possono essere valutate
M0	No metastasi a distanza
M1	Metastasi a distanza
M1a	Nodulo(i) tumorali separate nel lobo controlaterale; tumore con noduli pleurici o versamenti pleurici (o pericardici) maligni
M1b	Metastasi a distanza

Tabella I. Classificazione TNM del cancro al polmone .

<u>Stadio</u>	T	N	M
Ia	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
Ib	T2a	N0	M0
Ila	T1a	N1	M0
	T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Ilb	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIla	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
IIlb	T4	N2	M0
	T1	N3	M0
	T2	N3	M0
	T3	N3	M0
	T4	N3	M0
IV	T qualsiasi	N qualsiasi	M1a o 1b

Tabella II. Stadio anatomico/gruppo prognostico del cancro al polmone.

Stadio	Descrizione TNM	Sopravvivenza a 5 anni Stadiazione clinica (cTNM)	Sopravvivenza a 5 anni Stadiazione patologica (pTNM)
Ia	T1 N0 M0	61%	67%
Ib	T2 M0 N0	38%	57%
IIa	T1 N1 M0	34%	55%
IIb	T2 N1 M0	24%	39%
IIb	T3 N1 M0	22%	38%
IIIa	T3 N1 M0	9%	25%
IIIa	T1-2-3 N2 M0	13%	23%
IIIb	T4 N0-1-2 M0	7%	<5%
IIIb	T1-2-3 N3 M0	3%	<3%
IV	M1	1%	<1%

Tabella III. Sopravvivenza globale per cancro al polmone.

Tumore primitivo (T)	
T1a	Tumore confinato nella pleura parietale senza coinvolgimento di quella viscerale
T1b	Presenza di foci isolati nella pleura viscerale
T2	Coinvolgimento della pleura parietale e presenza di coinvolgimento del diaframma o della pleura viscerale con estensione al parenchima polmonare
T3	Tumore localmente avanzato resecabile con coinvolgimento sempre ipsilaterale ed interessamento della fascia toracica o tumore completamente resecabile che coinvolge i tessuti molli e la parete toracica o non coinvolgimento trans murale del pericardio
T4	Tumore avanzato non resecabile
Linfonodi (N)	
NX	Linfonodi regionali non possono essere valutati
N0	No metastasi linfonodali regionali
N1	Metastasi nei linfonodi broncopolmonari ipsilaterali o nei linfonodi ilari
N2	Metastasi nei linfonodi mediastinici ipsilaterali
N3	Metastasi nei linfonodi mediastinici controlaterali, mammari interni, sovraclaveari o scalenici
Metastasi (M)	
MX	Metastasi a distanza non possono essere valutate
M0	No metastasi a distanza (note)
M1	Metastasi a distanza presenti

Tabella IV. Classificazione TNM del mesotelioma.

	Controlli	NSCLC	Asbestosi	MM
Numero	66	77	16	50
Genere	46 M; 20 F	56 M; 21 F	9 M; 7 F	26 M; 24 F
Età	61.6 (10.0)	68.1 (8.1)	72.2 (8.7)	70.2 (7.8)
Fumo (no, ex, si)	33-22-11	13-27-37	8-5-3	24-22-4
Diagnosi	34 no DR 13 noduli benigni 4 bronchiectasie 15 altre DR	52 ADK 24 SCC 1 altro		9 MM generico 32 M epitelioide 2 MM sarcomatoide 6 MM bifasico
Stadio		32 IA 15 IB 5 IIA 6 IIB 13 IIIA-B 6 IV		10 IA 4 IB 13 II 13 III 10 IV

Tabella V. Caratteristiche del campione studiato (Studio I).

Legenda: NSCLC: Non-small cell lung cancer; MM: mesothelioma maligno; ADK: adenocarcinoma; SCC: carcinoma squamo-cellulare; DR: diagnosi radiologica.

Modello 1	OR non aggiustata	Modello 2	OR non aggiustata
Controlli (rif)	1	Non-MM	1
NSCLC	1.43 (0.99-2.04)		
Asbestosi	0.95 (0.47-1.90)		
MM	1.93 (1.35-2.76)	MM	1.54 (1.24-1.92)
	OR aggiustata^a		OR aggiustata^a
Controlli (rif)	1	Non-MM	1
NSCLC	1.19 (0.88-1.61)		
Asbestosi	0.87 (0.44-1.72)		
MM	1.66 (1.21-2.29)	MM	1.54 (1.22-1.94)

Tabella VI. OR aggiustate e non aggiustate (intervallo di confidenza al 95%) per incrementi nei valori di Mesotelina pari a 1 nM (Studio I).

Legenda: ^a Fattori di confondimento: età, genere, fumo. MM significativo in tutti i casi con $p < 0.001$

Modello 1	OR non aggiustata	Modello 2	OR non aggiustata
Controlli (rif)	1	Non-MM	1
NSCLC	1.007 (1.003-1.012)**		
Asbestosi	1.004 (0.997-1.010)		
MM	1.014 (1.009-1.019)**	MM	1.009 (1.006-1.012)**
	OR aggiustata^a		OR aggiustata^a
Controlli (rif)	1	Non-MM	1
NSCLC	1.005 (1.000-1.010)*		
Asbestosi	1.002 (0.994-1.009)		
MM	1.011 (1.005-1.016)**	MM	1.008 (1.004-1.012)**

Tabella VII. OR aggiustate e non aggiustate (intervallo di confidenza al 95%) per incrementi nei valori di YKL-40 pari a 1 pg/ml (Studio I).

Legenda: ^a Fattori di confondimento: età, genere, fumo. Significativo con $p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (**).

Caratteristiche	Non-NSCLC (n=67)	NSCLC (n=71)	Significatività
Genere	46 M; 21 F (68.7%; 31.3%)	49 M; 22 F (69.0%; 31.0%)	Ns
Età^c (anni)	64.5 (9.6)	68.3 (8.3)	p=0.01
Fumo			p=0.008
Non fumatori	22	10	
Ex fumatori	29	29	
Fumatori	16	32	
Fumo (pacchi-anno) (fumatori+ex fumatori)	28.8 (12.6-45.6)	43.0 (30.5-57.0)	p=0.002
Cotina urinaria (µg/g creatinina)			
Non fumatori	25.1 (12.7-34.5)	8.22 (2.7-52.3)	Ns
Ex fumatori	21.7 (16.2-50.2)	20.0 (3.9-30.1)	Ns
Fumatori	688.7 (121.8-1135.0)	556.1 (32.7-720.4)	Ns
Totali	29.0 (18.0-92.8)	30.3 (16.2-263.5)	Ns
Diagnosi	Noduli benigni: 32 Bronchiectasie: 11 Altro ^d : 24	ADK ^a : 48 SCC ^b : 23	Non applicabile
Stadio del tumore		IA: 29 IB: 16 IIA: 1 IIB: 6 IIIA: 10 IIIB: 7 IV: 7	Non applicabile

Tabella VIII. Caratteristiche del campione studiato (Studio II).

Legenda: ^a ADK= adenocarcinoma

^b SCC= carcinoma squamo-cellulare

^c Età riportata come media (DS), mentre le altre variabili come mediana (intervallo interquartile)

^d altro include pazienti con lesioni nodulari granulomatose, versamento pleurico, bronchiolite e fibrosi nodulare.

Biomarcatori	Gruppo Non-NSCLC	Gruppo NSCLC	Significatività
H2O2-EBC (µM)	0.17 (0.06-0.45)	0.32 (0.15-0.97)	0.01
Pentano	420 (140-880)	540 (290-1300)	0.053
2-MetilPentano	96 (45-187)	138 (77-235)	0.082
Esano	31 (9-50)	40 (23-77)	0.012
Benzene	85 (46-166)	90 (42-172)	Ns
EtilBenzene	6.6 (4.3-15.3)	10.1 (5.8-26.3)	0.044
TrimetilBenzene	4.2 (2.5-5.5)	4.2 (2.2-9.6)	Ns
Eptano	56 (17-149)	29 (18-110)	Ns
Pentametileptano	4.8 (1.8-13.7)	3.8 (1.6-16.8)	Ns
Toluene	229 (112-469)	210 (79-471)	Ns
Xileni totali	10.6 (7.3-15.7)	12.9 (7.1-21.9)	Ns
Stirene	14 (7-31)	14 (8-29)	Ns
Propanale	65 (40-89)	59 (47-75)	Ns
Butanale	35 (21-50)	34 (21-47)	Ns
Pentanale	23 (15-53)	26 (16-44)	Ns
Esanale	46 (31-73)	49 (31-75)	Ns
Eptanale	11.4 (8-20.3)	14.5 (10.4-21.3)	0.083
Octanale	20 (14-33)	23 (18-31)	0.13
Nonanale	43 (24-1230)	39 (31-62)	Ns
Trans-2-esanale	3.7 (2.4-5.4)	4.9 (2.8-8.9)	0.13
Trans-2-eptanale	3.5 (1.2-7.4)	5.8 (1.4-9.5)	0.17
Trans-2-nonanale	3.0 (1.8-5.0)	4.7 (2.6-9.9)	0.004

Tabella IX. Concentrazione dei biomarcatori nell'aria esalata (Studio II).

Se non diversamente specificato le concentrazioni sono espresse in pM. I dati sono rappresentati come mediana (intervallo interquartile).

	Modello 1	Modello 2
H2O2-EBC (µM)	0.038	0.11
Pentano	0.84	0.59
2-metilpentano	0.44	0.38
Esano	0.058	0.054
Etilbenzene	0.34	0.48
Eptanale	0.080	0.067
Trans-2-nonenale	0.047	0.018
Pacchi-anno	NI	<0.001
Età	NI	0.088

Tabella X. Risultati dei modelli di regressione logistica binaria 1 e 2, con valori di *p* (Studio II).

Legenda: NI= non incluso nel modello.

Pacchi-anno≤10	Non-NSCLC	NSCLC	Sig.
Età (anni)	64.5 (57.0-72.5)	72.0 (67.0-76.5)	0.013
H2O2-EBC (µM)	0.14 (<0.02-0.25)	0.93 (0.25-2.26)	0.001
TriMetilBenzene	4.2 (2.7-6.5)	7.3 (3.6-17.2)	0.048
Ottanale	16.4 (12.6-25.8)	24.4 (18.5-28.2)	0.034
Trans-2-Eptanale	2.9 (1.0-6.5)	7.6 (4.0-28.0)	0.01
Trans-2-Nonenale	2.1 (1.3-4.1)	9.7 (5.2-20.1)	<0.001
Pacchi-anno≤30	Non-NSCLC	NSCLC	Significatività
Età (anni)	65.0 (57.0-69.0)	71.0 (67.0-76.0)	0.002
H2O2-EBC (µM)	0.15 (0.05-0.32)	0.74 (0.16-2.43)	0.002
Esano	32 (9-50)	64 (33-94)	0.008
EtilBenzene	6.4 (4.3-14.8)	9.8 (6.9-35.0)	0.035
TriMetilBenzene	4.0 (2.5-5.2)	7.2 (3.4-12.9)	0.015
Pentanale	22.7 (15.2-54.4)	17.9 (12.8-39.9)	0.042
Trans-2-Eptanale	3.2 (1.0-6.5)	7.2 (1.8-9.5)	0.022
Trans-2-Nonenale	2.7 (1.6-4.9)	6.9 (4.3-12.9)	0.002

Tabella XI. Concentrazioni dei biomarcatori esalati.

Sono mostrate solo le differenze significative. Quando non riportato le concentrazioni sono pM. I dati sono rappresentati come mediana (intervallo interquartile).

	Supel Sampling Bag	Tedlar Sampling Bag
Spessore	0.0762 mm	0.0508
Resistenza alla trazione	42 MPa	55 MPa
Temperatura max di utilizzo	150°C	204°C
Peso specifico	1.78 g/ml	1.70 g/ml
Permeabilità all'ossigeno	58 ml/(m ² *d)	50 ml/(m ² *d)
Permeabilità al vapore acqueo	12-15 g/(m ² *d)	9-57 g/(m ² *d)
Permeabilità all'anidride carbonica	172 ml/(m ² *d)	172 ml/(m ² *d)

Tabella XII. Principali differenze tra i due tipi di *sampling bag* considerati nello studio III.

	Classe	Origine e fattori di confondimento	Kow	Tensione di vapore (20°C)
Etanolo	1 – Composto rappresentativo degli alcoli.	Presente nelle sostanze alcoliche e in alcuni cibi	-0.31	59 hPA
Esanale	2 – Composto rappresentativo delle aldeidi a corta catena	Composto sia esogeno (alimenti e bevande) che endogeno come prodotto di stress ossidativo	1.78	12 hPA
Acetone	3 – Composto rappresentativo dei chetoni a corta catena	Composto sia esogeno (alimenti e bevande) che endogeno come prodotto di varie vie metaboliche (es. metabolismo dei corpi chetonici)	-0.24	233hPa
Acido acetico	4 – Composto rappresentativo degli acidi grassi a corta catena	Composto sia esogeno (alimenti e bevande) che endogeno come intermedio di varie vie metaboliche (es. Acetil CoA)	-0.17	16Pa
2-metil pentano	5 – Composto rappresentativo degli alcani metilati a corta catena	Composto sia esogeno (alimenti e bevande) che endogeno come prodotto di metilazione a seguito di stress ossidativo	3.21	23 kPa
Esano	6 – Composto rappresentativo degli alcani a corta catena	Composto sia esogeno (alimenti e bevande) che endogeno come prodotto finale di stress ossidativo	3.9	17 kPa
Toluene	6 – Composto rappresentativo degli idrocarburi aromatici	Composto per lo più esogeni come contaminante ambientale e presente nel fumo di sigaretta. Tendono ad accumularsi nel tessuto polmonare.	2.73	28.4 kPa

Tabella XIII. Composti chimici analizzati nella fase di validazione del naso elettronico (Studio III).

Legenda: Kow= coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua.

FIGURE

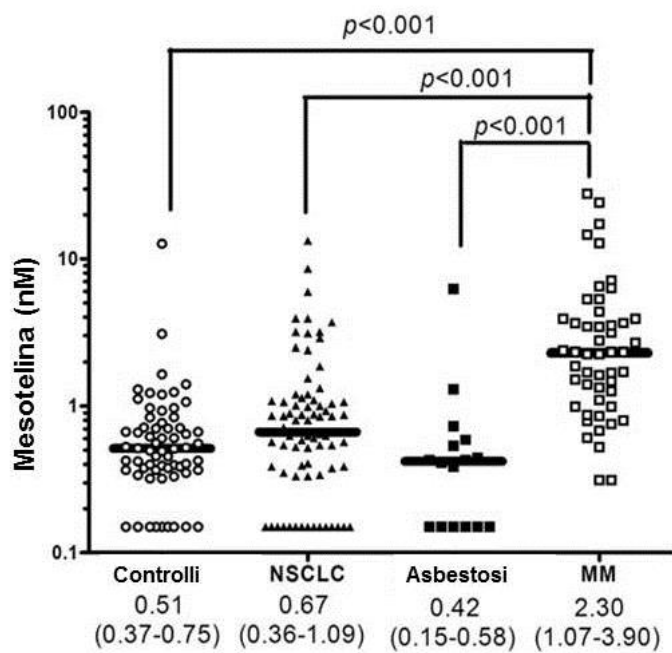


Figura 1. Livelli di mesotelina nei gruppi studiati. I valori sono espressi come mediana (25° - 75° percentile) (Studio I).

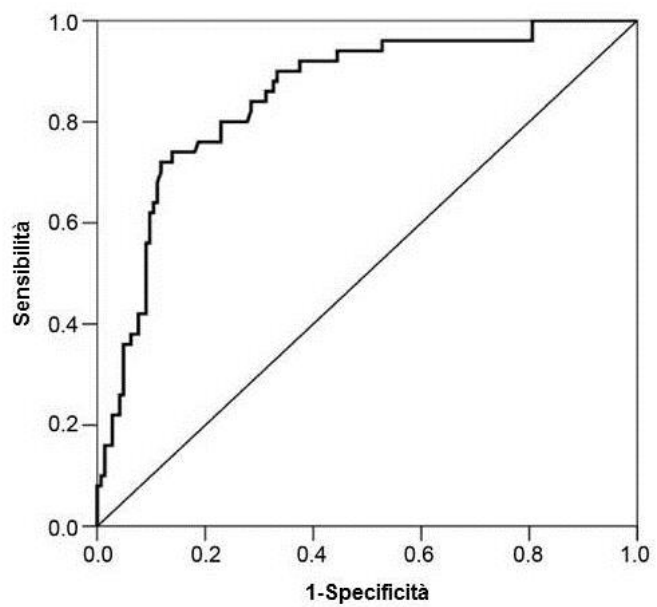


Figura 2. Curva ROC relativa alla mesotelina (Studio I).

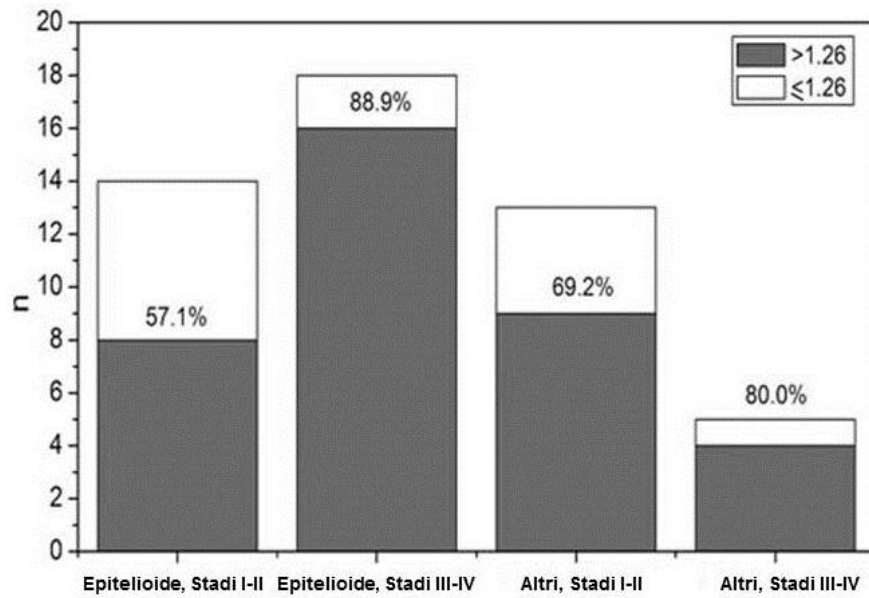


Figura 3. Pazienti affetti da Mesotelioma Maligno (%) con *cut-off* per mesotelina pari a 1.26 nM, stratificati in base all'istologia (epiteloide vs. altri) e allo stadio (I-II vs. III-IV) (Studio I).

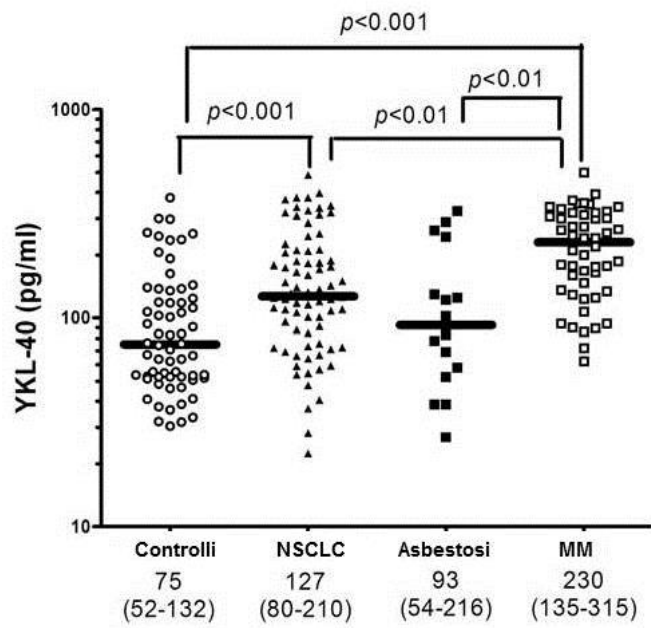


Figura 4. Livelli di YKL-40 nei gruppi studiati. I valori sono espressi come mediana (25°-75° percentile) (Studio I).

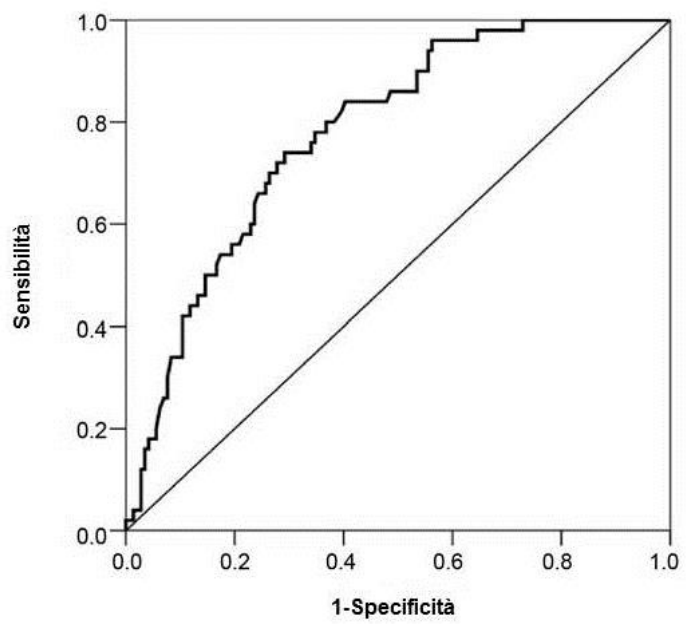


Figura 5. Curva ROC relativa a YKL-40 (Studio I).

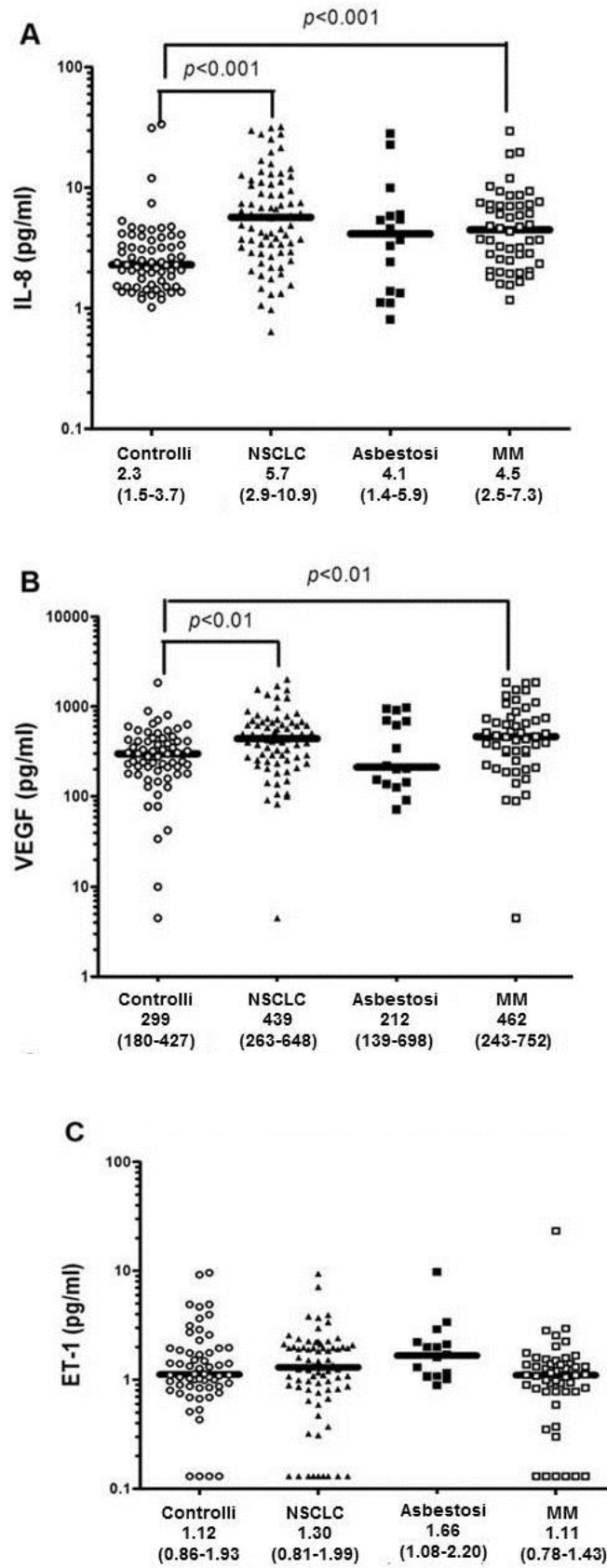


Figura 6. (A) Livelli di Interleuchina-8; (B) Livelli di *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF); (C) livelli di Endotelina 1 nei gruppi studiati. I valori sono espressi come mediana (25°-75° percentile) (Studio I).

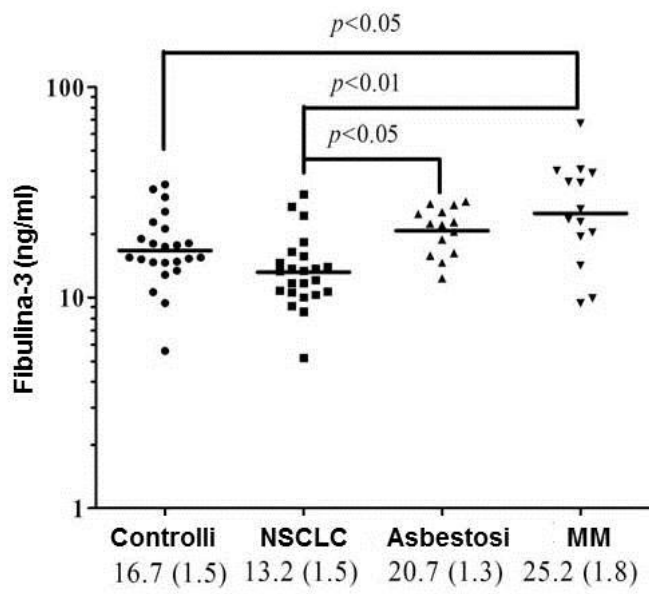


Figura 7. Livelli di Fibulina-3 nei gruppi studiati. I valori sono espressi come media geometrica (DS) (Studio I).

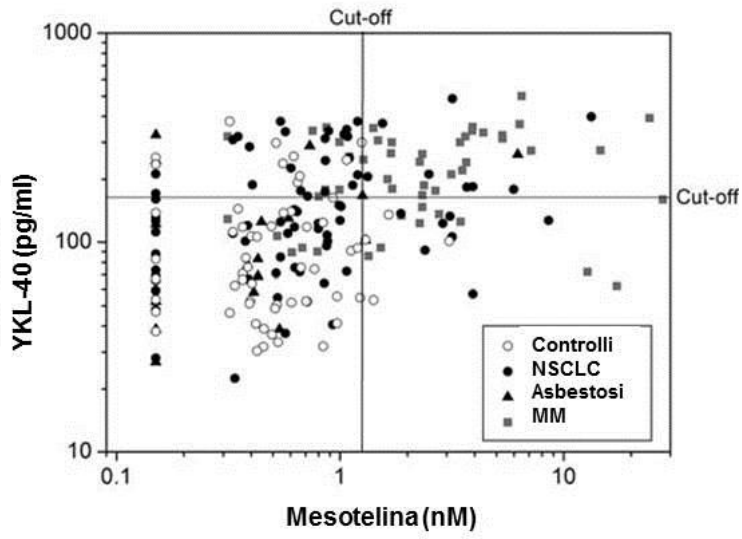


Figura 8. Correlazione tra Mesotelina e YKL-40 nella diagnosi di mesotelioma (Studio I).

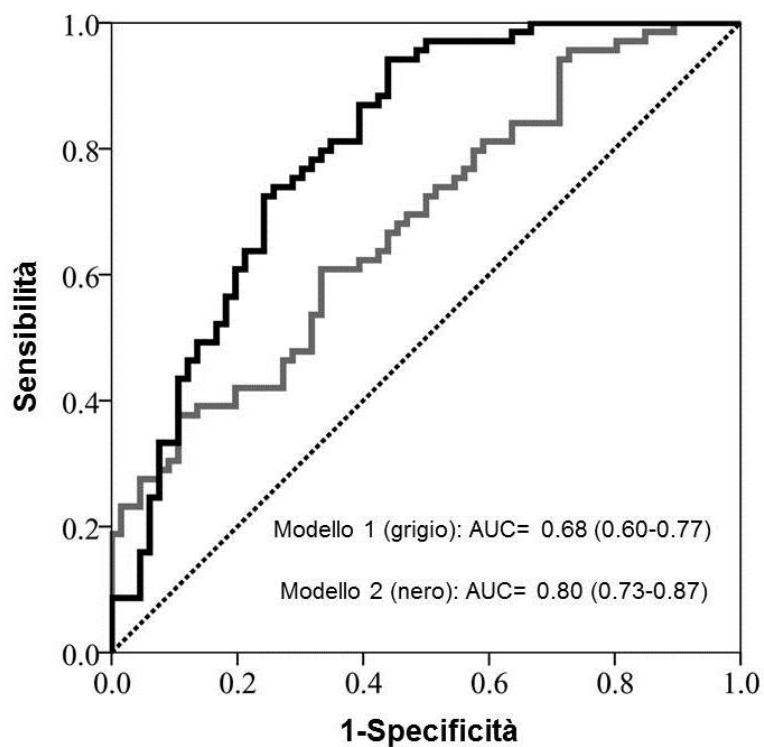


Figura 9: Curve ROC del Modello 1 e 2, con AUC e intervalli di confidenza al 95%. La linea retta rappresenta un'AUC pari a 50 (Studio II).

Legenda: Modello 1= H₂O₂-EBC, pentano, 2-metilpentano, esano, etilbenzene, eptanale, *trans*-2-nonenale.

Modello 2= H₂O₂-EBC, pentano, 2-metilpentano, esano, etilbenzene, eptanale, *trans*-2-nonenale + pacchi-anno + età.

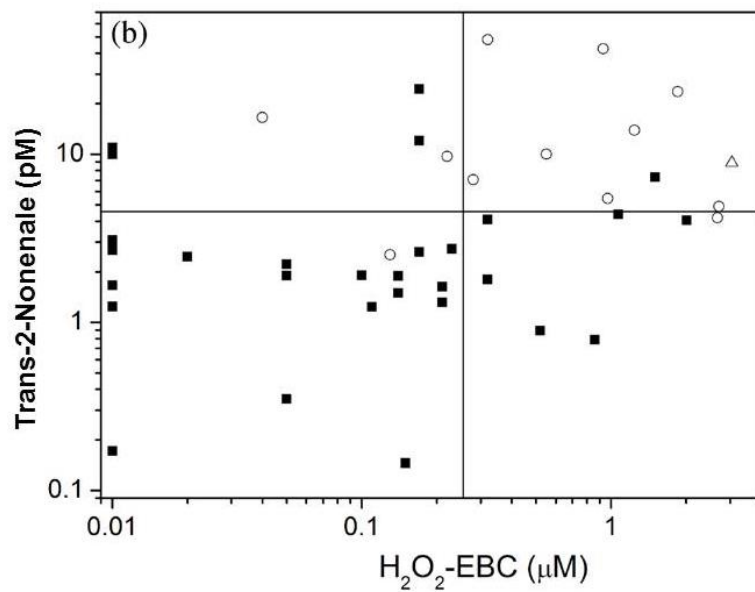
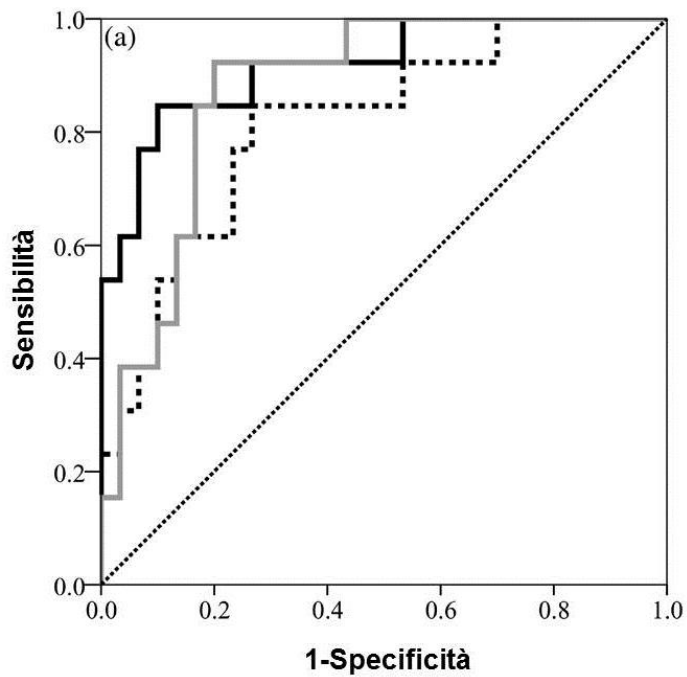


Figura 10. (a) Curva ROC relative a H₂O₂ (linea nera tratteggiata), *trans*-2-nonenale (linea grigia) e loro combinazione con l'età (linea nera continua). (b) Andamento del *trans*-2-nonenale versus H₂O₂-EBC distinto per quadranti sulla base dei valori di *cut-off* identificati tramite curve ROC (Studio II).

Legenda: quadri= pazienti non-NSCLC; cerchi= pazienti NSCLC con diagnosi di ADK; trinagoli= pazienti NSCLC con diagnosi di SCC.

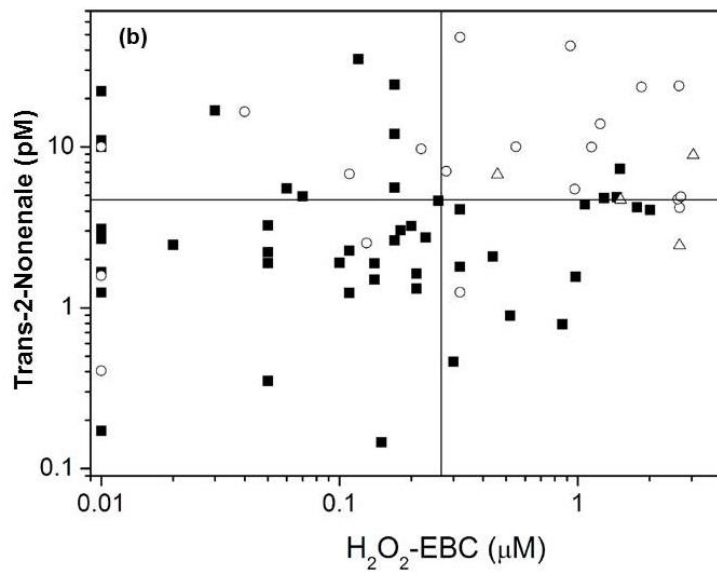
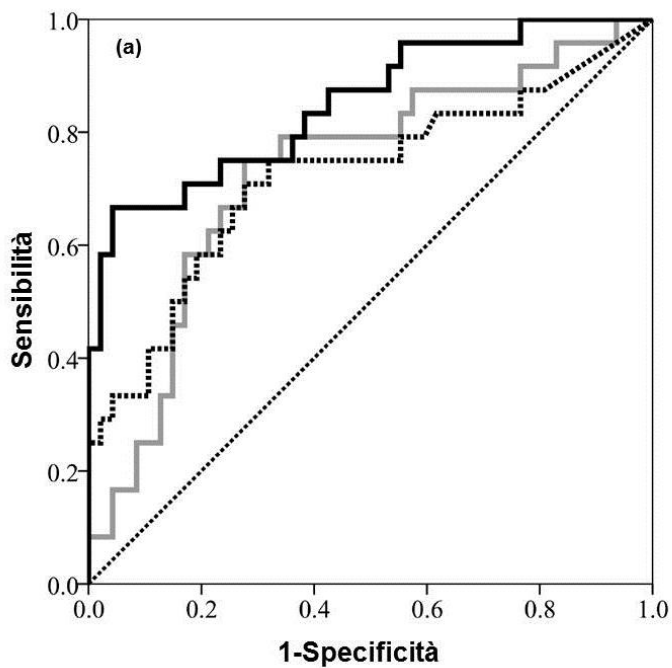


Figura 11. (a) Curve ROC di H₂O₂ (linea nera tratteggiata), *trans*-2-nonenale (linea grigia) e loro combinazione con età + esano (linea nera continua). (b) Andamento del *trans*-2-nonenale vs. H₂O₂-EBC distinta per quadranti basati sui valori di *cut-off* identificati tramite curve ROC.

Legenda: quadri= pazienti non-NSCLC; cerchi= pazienti NSCLC con diagnosi di ADK; triangoli= pazienti NSCLC con diagnosi di SCC.



Figura 12: Naso elettronico Cyranose 320.

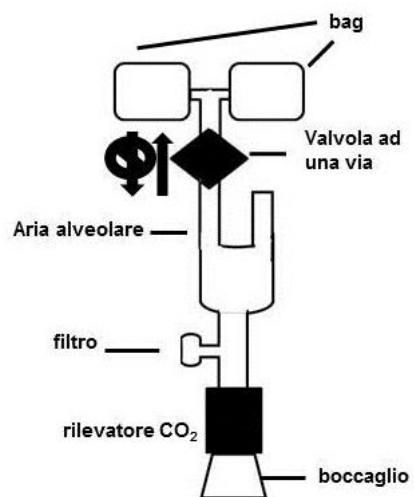


Figura 13. Rappresentazione schematica del sistema di raccolta dell'aria esalata.

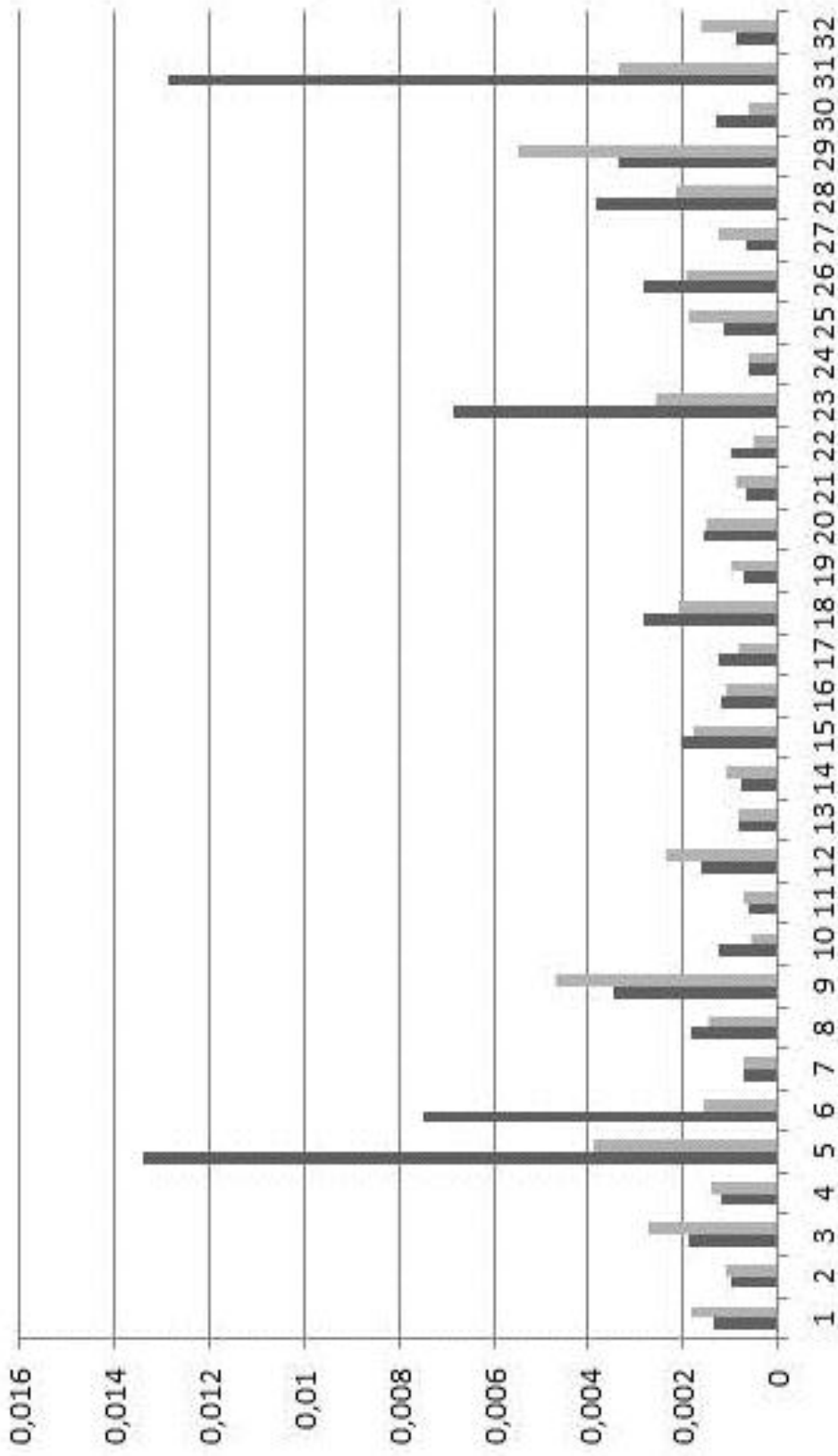


Figura 14. Variazione della resistenza dei 32 sensori nei 2 tipi di sampling bag testate.
 Legenda: Supel™ Inert Gas Sampling Bag (scuro)
 Tedlar® Gas Sampling Bag (chiaro).

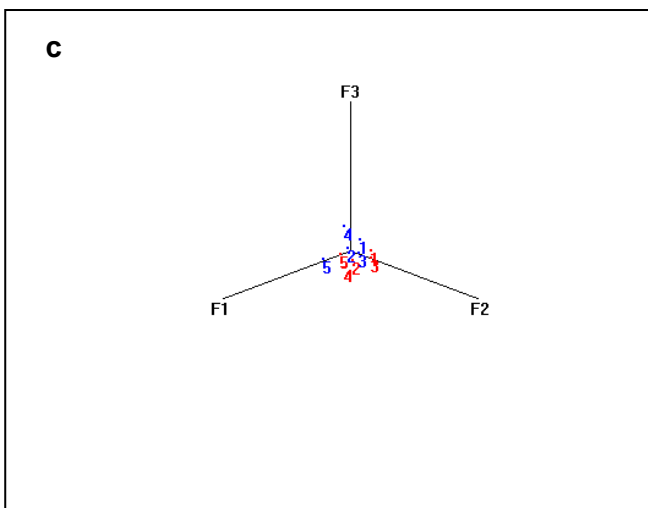
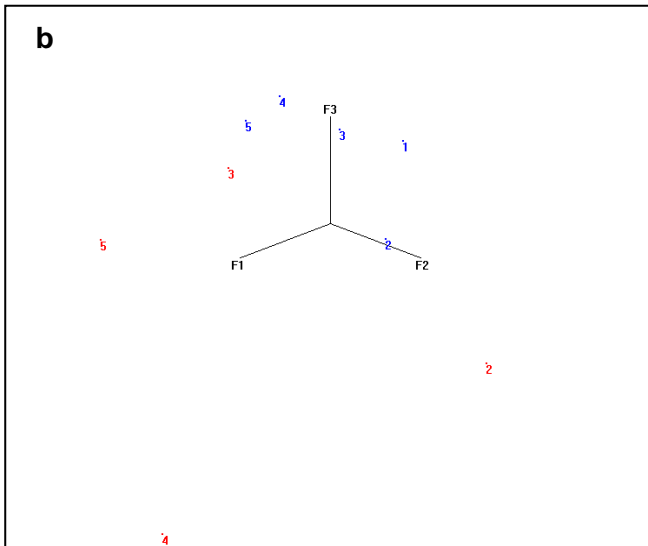
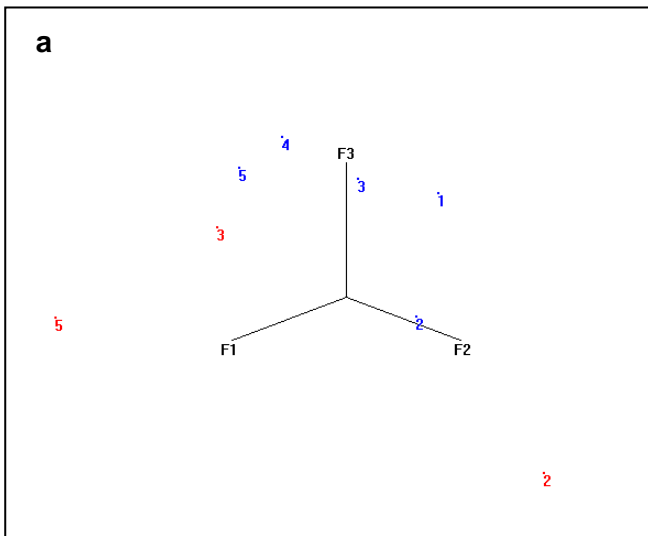


Figura 15. Grafici di distribuzione delle misure relative a VOCs raccolti da due differenti soggetti con flusso di aspirazione a differenti velocità: a) 50 cc/min; b) 180 cc/min; c) 120 cc/min.

Legenda: rosso = soggetto sano dopo aver fumato e digiunato da 2 ore;

blu= soggetto sano a digiuno da 2 ore.

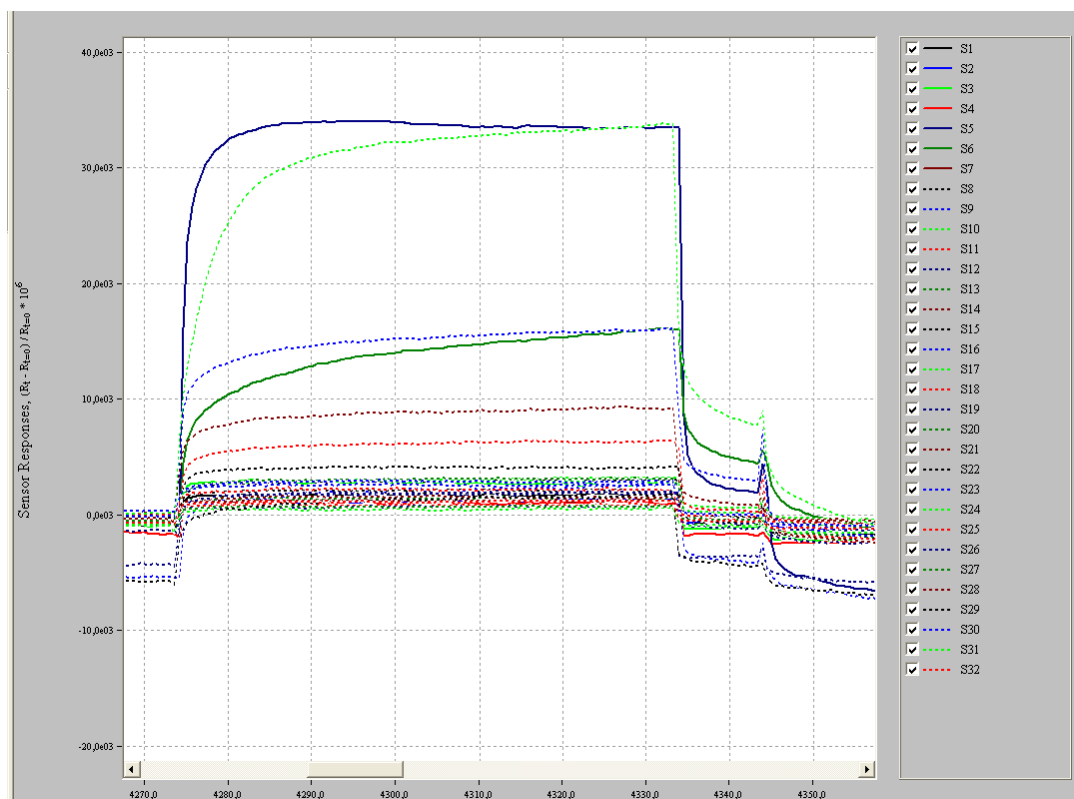


Figura 16. Rappresentazione in tempo reale della risposta dei 32 sensori selezionati con relativa fase di *plateau*.

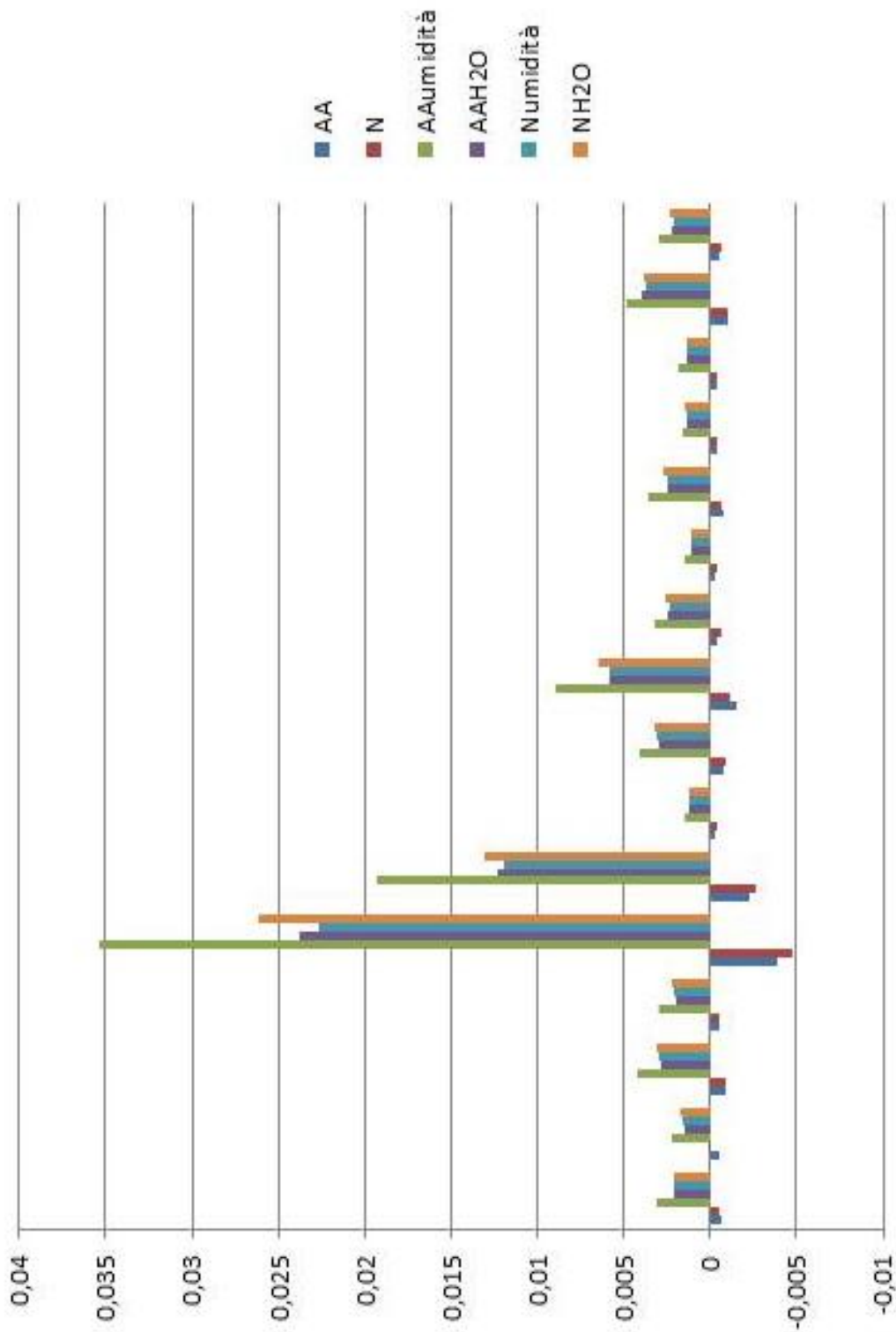


Figura 17a. Istogramma relativo alla risposta dei sensori 1-16 alle differenti condizioni di umidità testate.

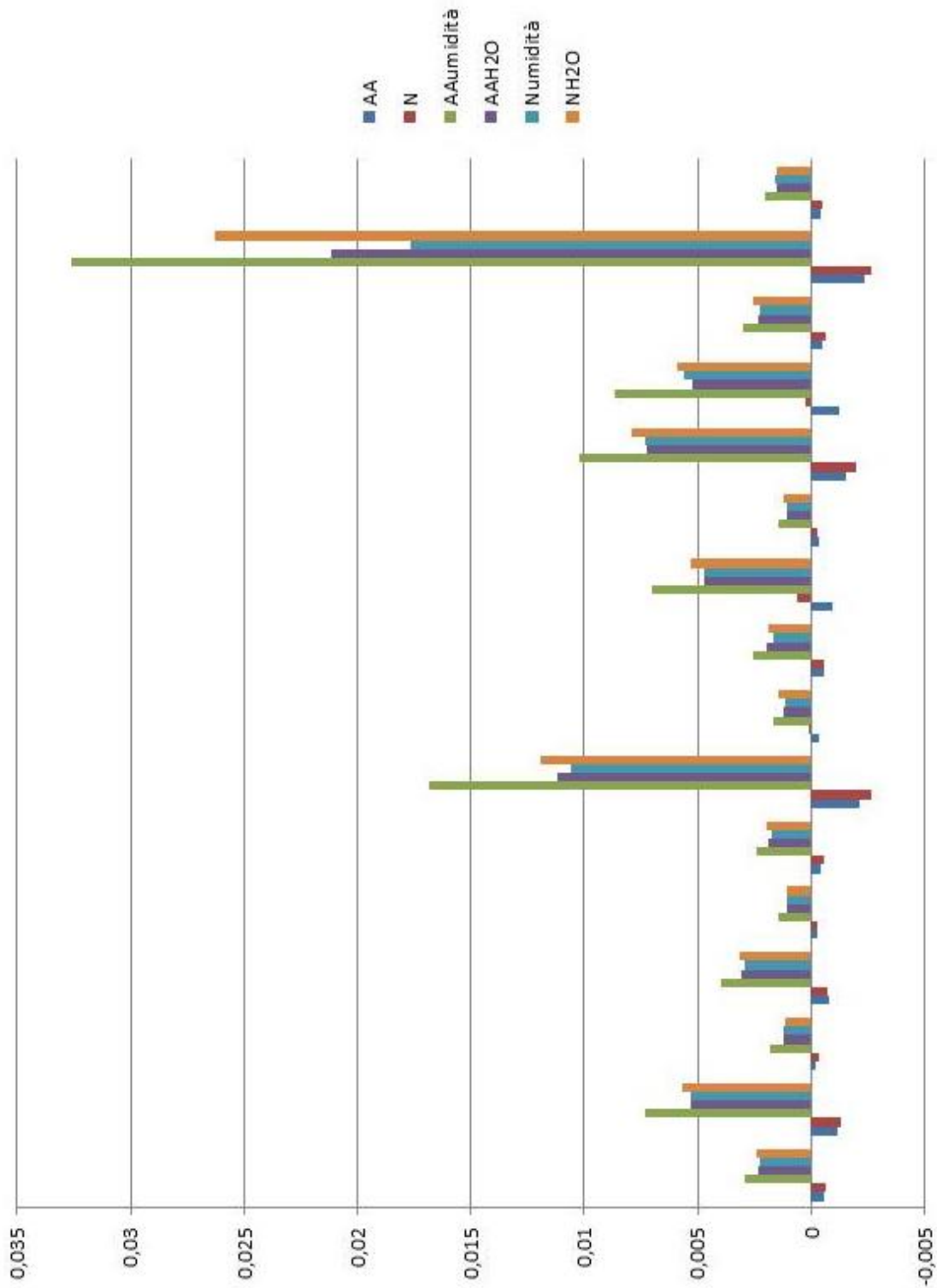


Figura 17b. Istogramma relativo alla risposta dei sensori 17-32 alle differenti condizioni di umidità testate.

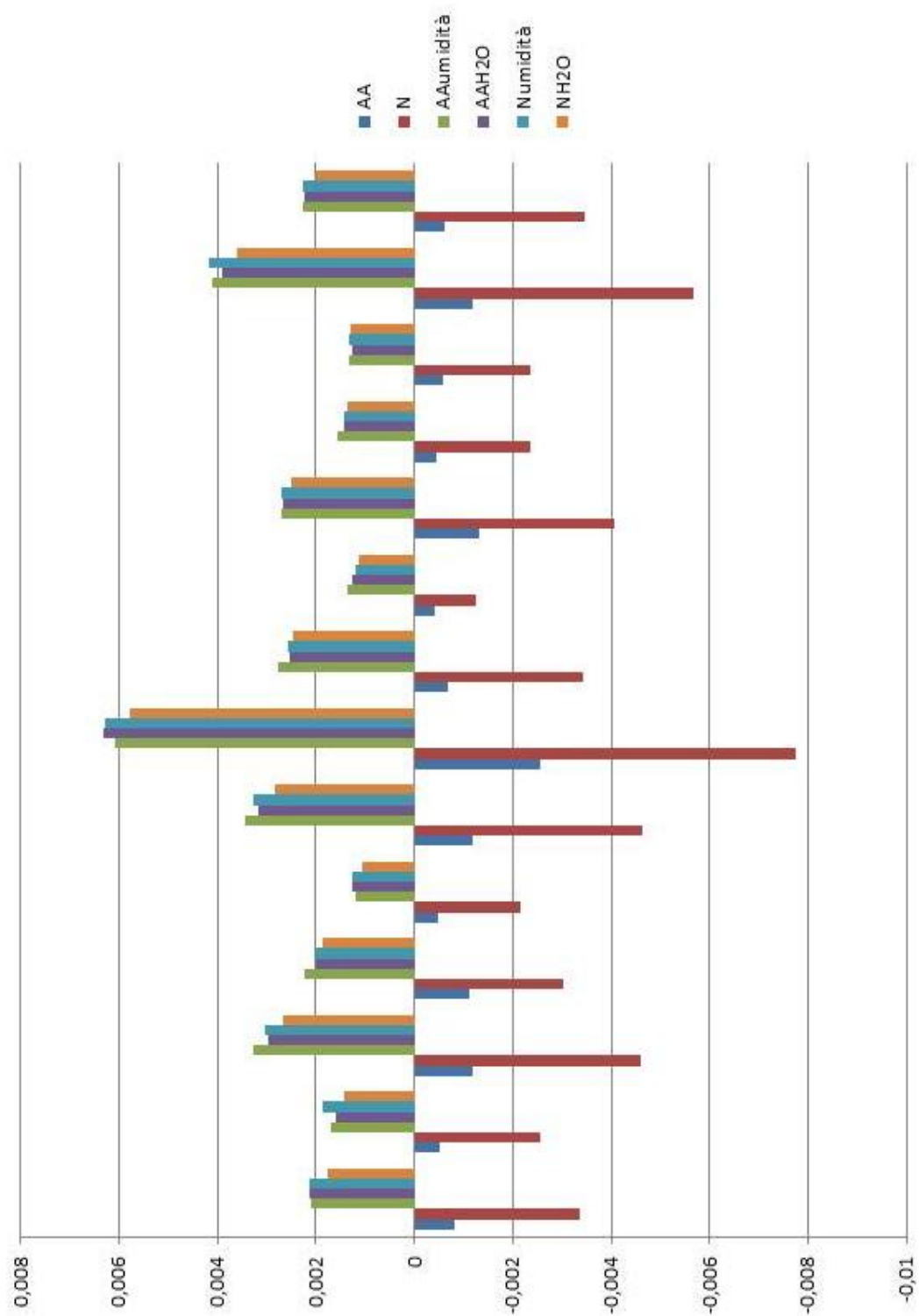


Figura 16a. Istogramma relativo alla risposta dei sensori 1-16, esclusi i due maggiormente sensibili alle sostanze polari (5,6) alle differenti condizioni di umidità testate.

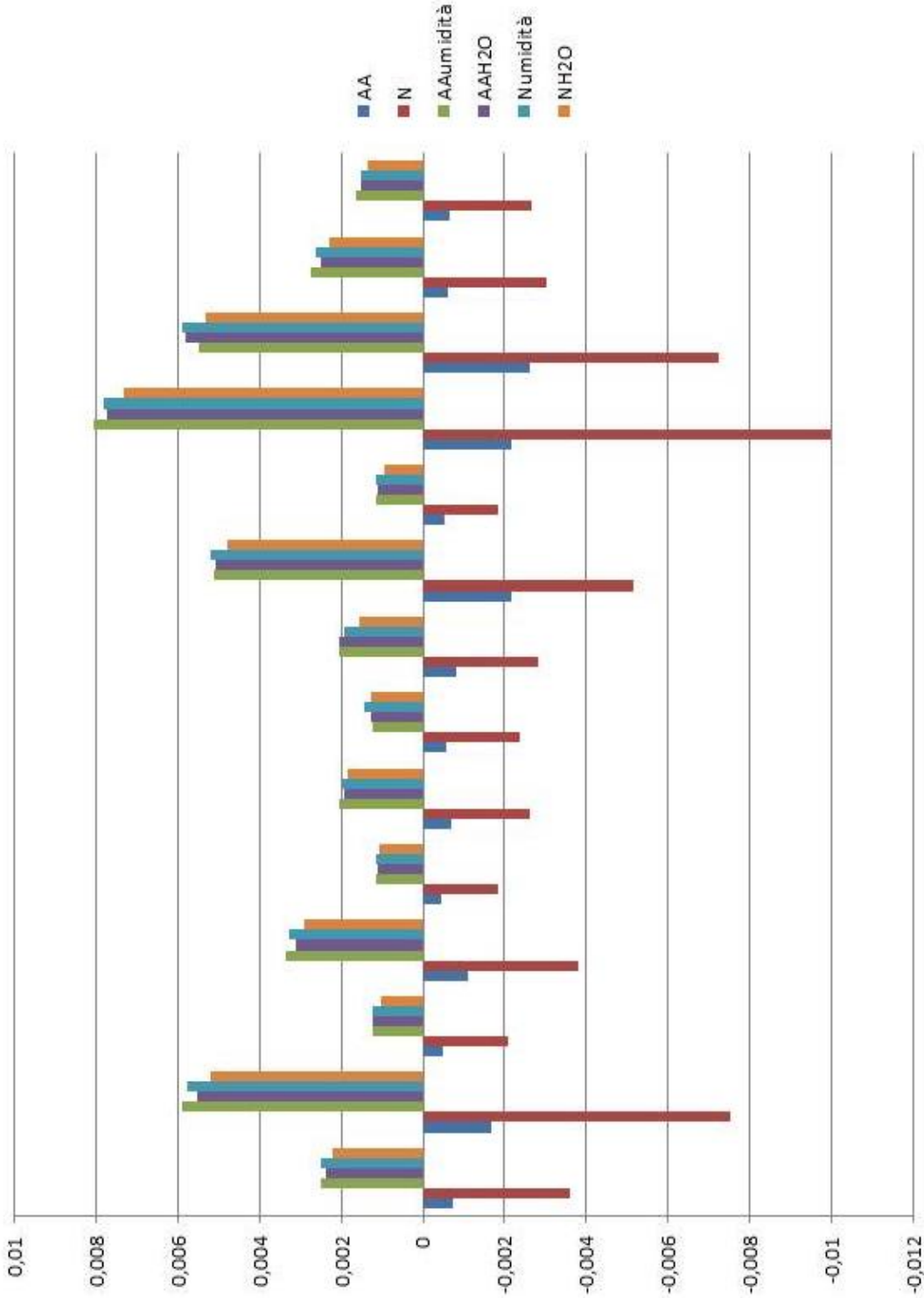


Figura 18b. Istogramma relativo alla risposta dei sensori 17-32, esclusi i due maggiormente sensibili alle sostanze polari (23,31) alle differenti condizioni di umidità testate.

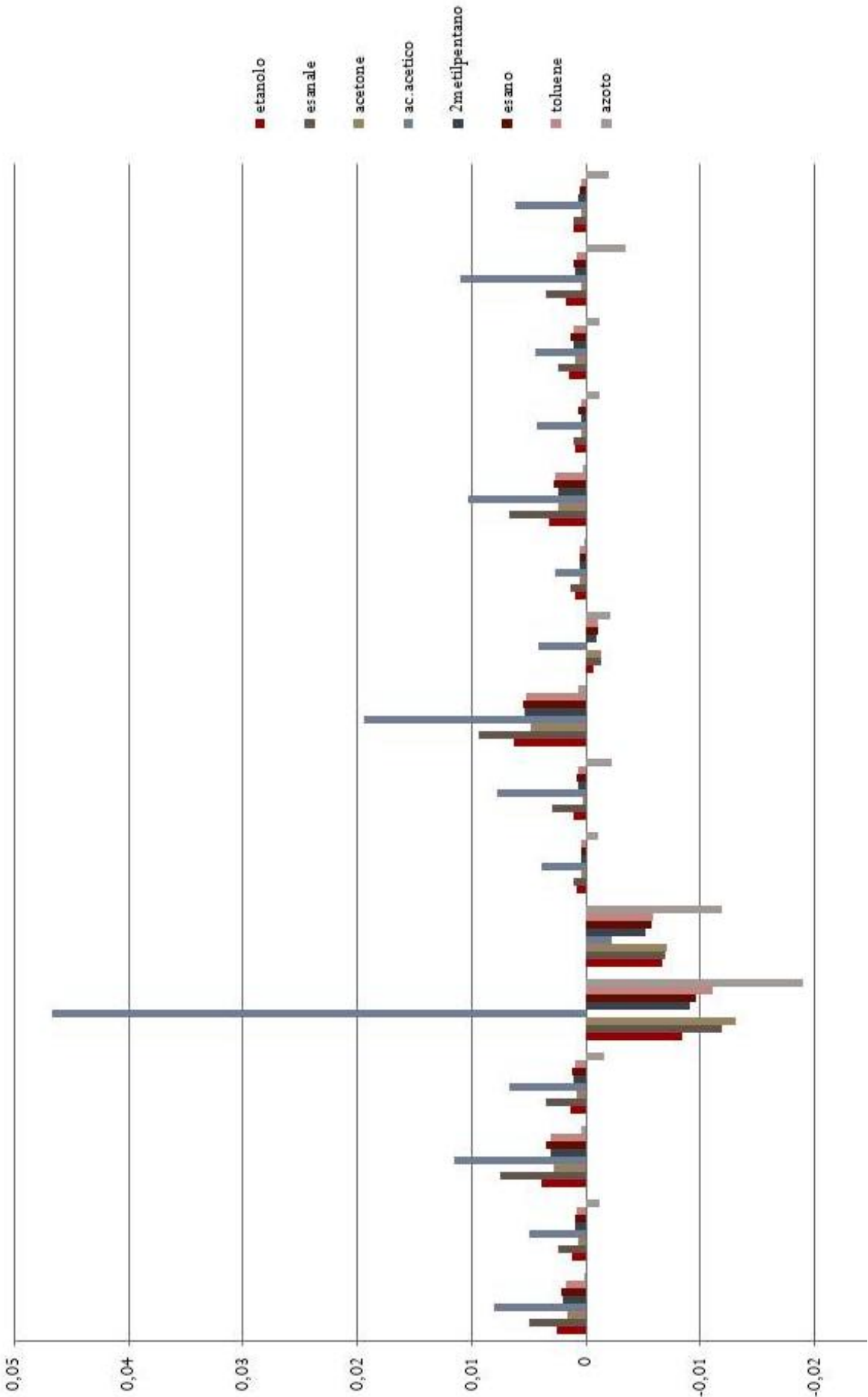


Figura 19a. Istogramma relativo alla risposta dei sensori 1-16 alle diverse classi di agenti chimici testati.

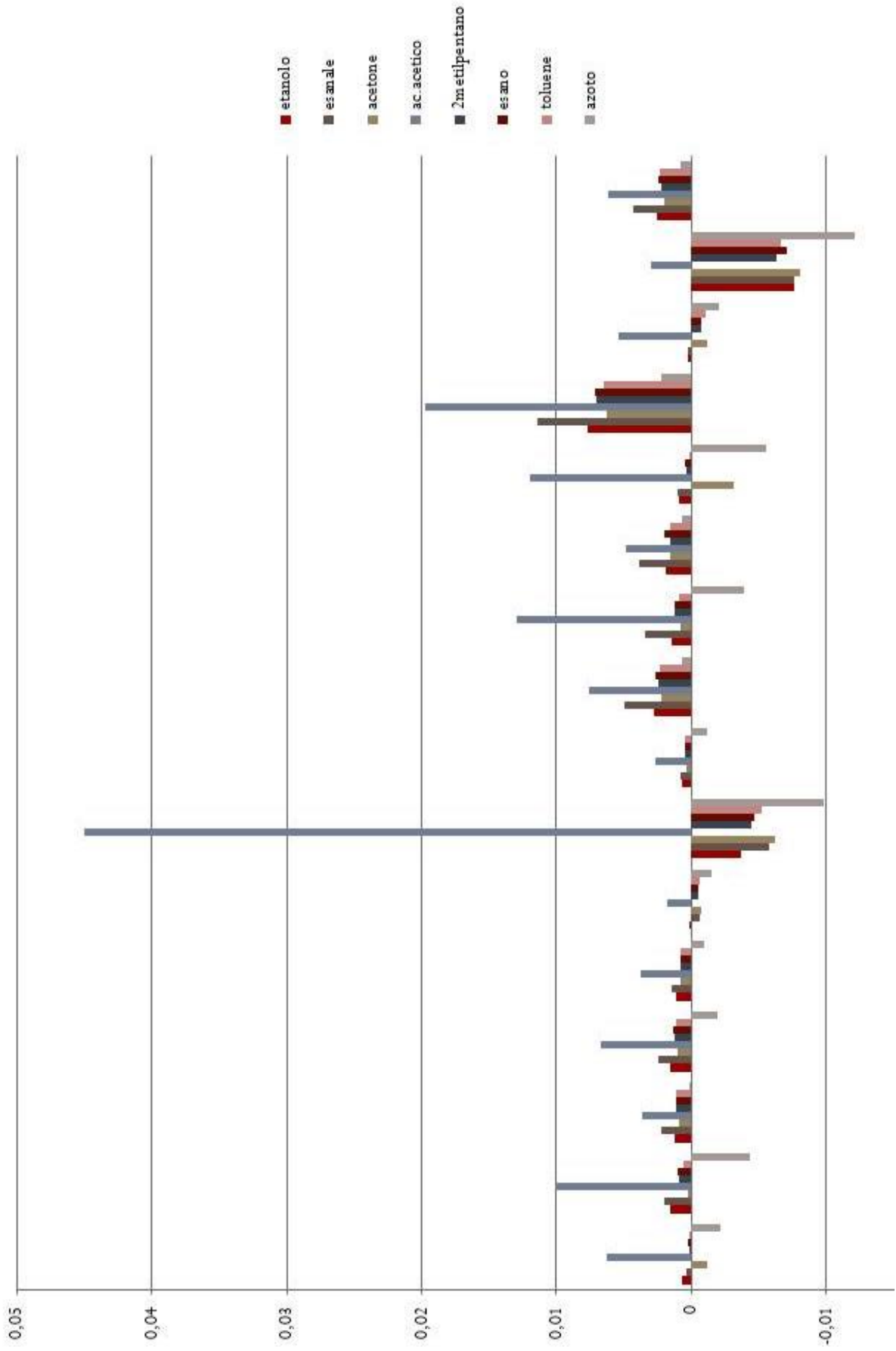


Figura 19b. Istogramma relativo alla risposta dei sensori 17-32 alle diverse classi di agenti chimici testati.

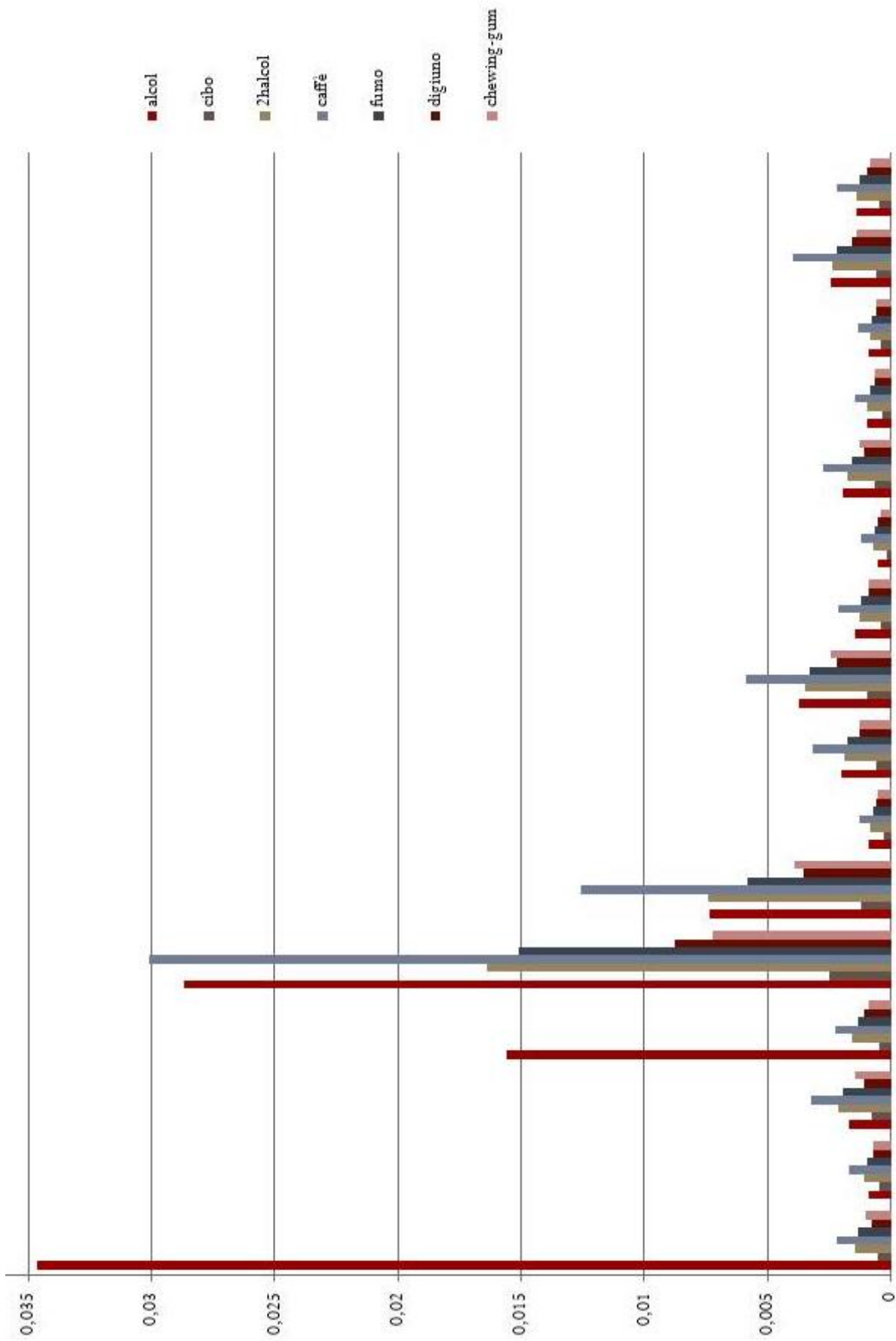


Figura 20a. Istogramma relativo alla risposta dei sensori 1-16 alle diverse condizioni del soggetto testate

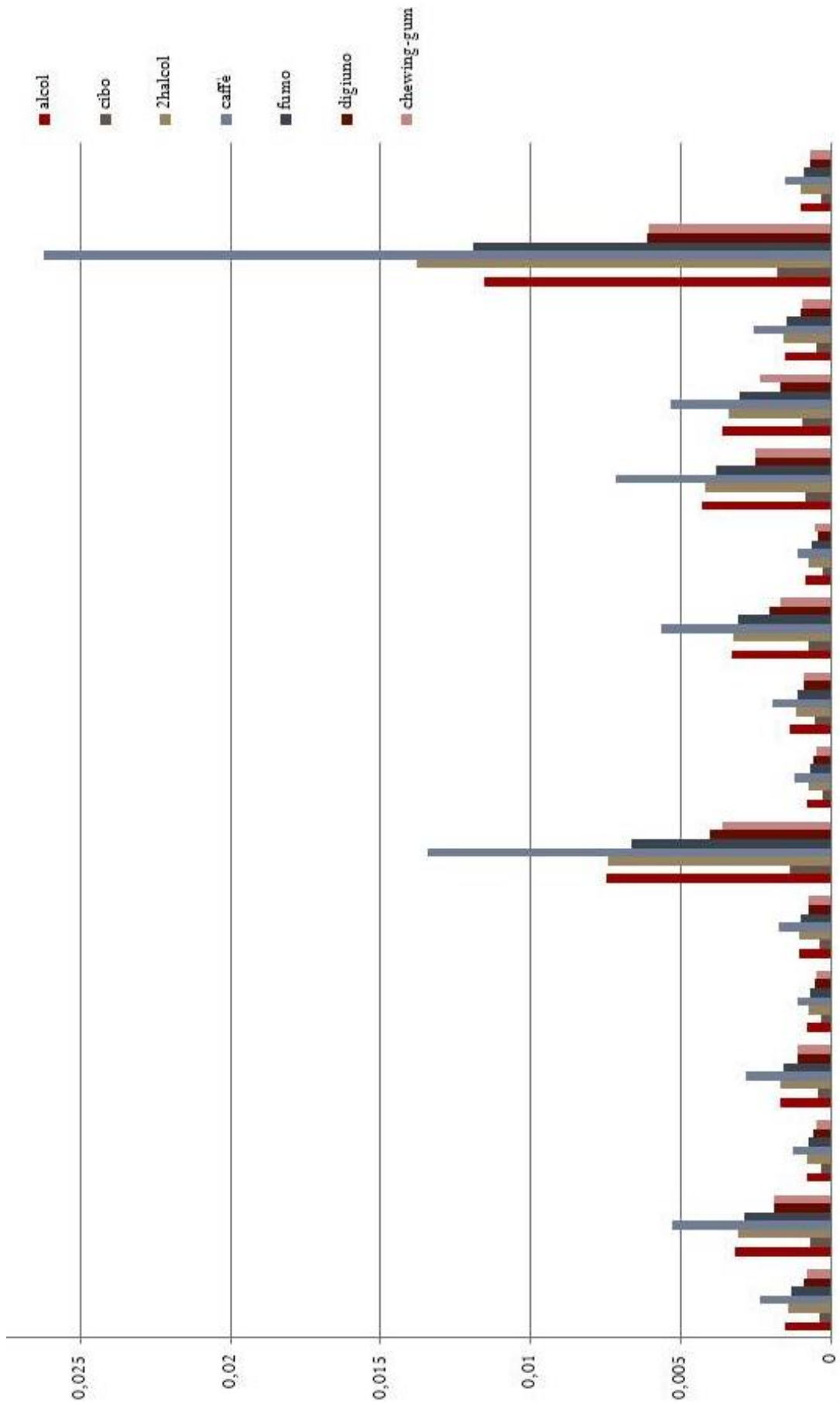


Figura 20b. Istogramma relativo alla risposta dei sensori 17-32 alle diverse condizioni del soggetto testate.