

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA PREVENZIONE**

**XXII CICLO (2007-2009)**

## **METODOLOGIE NON INVASIVE PER LA RICERCA DI NUOVI INDICATORI NELLA DIAGNOSI PRECOCE DI PATOLOGIE POLMONARI**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. ANTONIO MUTTI

Tutor:

Dr. MATTEO GOLDONI

Dottorando:

Dr.ssa OLGA ACAMPA

*Continua ciò che hai cominciato e forse arriverai alla cima,  
o almeno arriverai in alto ad un punto  
che tu solo comprenderai non essere la cima.  
(Seneca)*

## Riassunto

Il polmone rappresenta l'organo bersaglio di numerose sostanze tossiche aerodisperse, che rivestono un ruolo chiave nella patogenesi della maggior parte delle patologie polmonari. Nonostante per alcune di esse siano noti specifici fattori di rischio, le attività di prevenzione primaria da sole non sono sufficienti a limitarne la diffusione. È quindi necessario attuare adeguate misure di prevenzione secondaria per la diagnosi delle malattie in fase iniziale, aumentando l'efficacia dei trattamenti terapeutici e le possibilità di guarigione.

La diagnosi precoce è resa difficoltosa dal fatto che all'esordio i sintomi iniziali sono per lo più sfumati ed aspecifici.

Un approccio non invasivo per lo studio dei meccanismi fisiopatologici alla base delle patologie polmonari, permette di individuare e studiare indicatori biologici di varia natura (dose, effetto e suscettibilità) in diversi contesti clinici e potrebbe affiancare le tradizionali metodiche cliniche strumentali per un più specifico approccio diagnostico.

In questa tesi, sono presentate alcune applicazioni: quantificazione di indicatori di perossidazione lipidica nell'aria esalata di soggetti con tumore polmonare non a piccole cellule, quantificazione di elementi metallici nel condensato dell'aria esalata di soggetti con bronco-pneumopatia cronica ostruttiva prima e dopo un episodio di riacutizzazione ed in soggetti affetti da pneumopatie interstiziali.

Il fattore che accomuna tutti e tre gli studi è la difficoltà nel definire un singolo biomarcatore sufficientemente sensibile e specifico per distinguere non solo i malati dai controlli, ma anche diverse patologie tra loro. Tuttavia, l'utilizzo di un pattern di biomarcatori, assai più sensibile e specifico, potrebbe risultare promettente dal punto di vista diagnostico, se affiancato alle metodiche tradizionali in uso.

*Parole chiave:* metodiche non invasive, aria esalata, biomarcatori, patologie polmonari, diagnosi precoce.

## **Abstract**

The lung is the target organ for many toxic airborne substances which have a key role in the pathogenesis of the most lung diseases. Although specific risk factors are known for some of them, primary prevention alone is not able to limit the spread of lung diseases. Therefore it is necessary to apply measures of secondary prevention for early diagnosis to improve feasibility of treatments and recovery. The early diagnosis is made difficult by the fact that diseases often develop asymptotically and initial symptoms are unspecific.

A non-invasive approach to assess the pathophysiological mechanisms underlying lung diseases can identify biomarkers of various origin (dose, effect and susceptibility) in different clinical settings and may support traditional methods increasing the diagnostic power.

In this work some applications are presented: determination of aldehydes in exhaled air of patients with non-small cell lung cancer, quantification of metallic elements in the exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive lung disease before and after an episode of exacerbation and in patients with interstitial lung disease.

All the three studies are characterised by the difficulty to identify a single biomarker with a sufficient sensitivity and specificity to distinguish not only patients from healthy subjects but also different lung diseases among them. However a pattern of biomarkers, much more sensitive and specific, could be useful as diagnostic approach in combination with traditional methods not only to confirm but also to exclude the disease.

*Keywords:* non-invasive methods, exhaled air, biomarkers, lung diseases, early diagnosis.

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	1
<b>2. METODOLOGIE E INDICATORI NON INVASIVI NELLO STUDIO DI PATOLOGIE POLMONARI</b> .....	4
2.1 ARIA ESPIRATA .....	6
2.1.1 Aria esalata in fase gassosa .....	7
- <i>Ossido nitrico</i> .....	7
- <i>Composti organici volatili</i> .....	8
2.1.2 Condensato dell'aria esalata .....	11
2.2 SANGUE .....	15
<b>3. PATOLOGIE POLMONARI</b> .....	17
3.1 TUMORE POLMONARE .....	17
3.1.1 Epidemiologia .....	17
3.1.2 Fattori di rischio .....	18
3.1.3 Cancerogenesi polmonare .....	21
- <i>Ruolo dello stress ossidativo e dell'infiammazione</i> .....	21
3.1.4 Classificazione .....	23
3.1.5 Diagnosi, stadiazione e prognosi .....	25
3.1.6 Diagnosi precoce e screening nel NSCLC .....	26
3.1.7 Approccio molecolare alla diagnosi precoce .....	29
3.2 BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA (BPCO) .....	32
3.2.1 Epidemiologia e fattori di rischio .....	32
3.2.2 Patogenesi .....	33
3.2.3 Sintomatologia e diagnosi .....	34
3.3.3 Utilità di indicatori non invasivi nella BPCO .....	36
3.3 PNEUMOPATIE INTERSTIZIALI (ILD) .....	37
3.3.1 Epidemiologia e fattori di rischio .....	37
3.3.2 Patogenesi .....	38
3.3.3 Sintomatologia e diagnosi .....	39
3.3.4 Utilità di indicatori non invasivi nelle ILD .....	41
<b>4. SCOPO</b> .....	42
<b>5. PARTE SPERIMENTALE</b> .....	44
5.1 STUDIO I. Determinazione di aldeidi nell'aria esalata di pazienti con tumore polmonare mediante derivatizzazione su fibra SPME-GC/MS .....	44
5.1.1 MATERIALI E METODI .....	46
5.1.1.1 Soggetti dello studio .....	46
5.1.1.2 Raccolta dell'aria espirata .....	47
5.1.1.3 Estrazione ed analisi delle aldeidi .....	47
5.1.1.4 Ottimizzazione dei parametri SPME e validazione del metodo .....	48
5.1.1.5 Analisi statistica .....	48
5.1.2 RISULTATI .....	49
5.1.2.1 Ottimizzazione del metodo .....	49

5.1.2.2	Livelli di aldeidi misurate in campioni di aria esalata ed ambientale .....	49
5.1.2.3	Livelli di aldeidi misurate nell'esalato di soggetti con NSCLC e controlli .....	50
5.2	STUDIO II. Elementi metallici nel condensato dell'aria esalata e nel siero di pazienti con BPCO riacutizzata .....	52
5.2.1	MATERIALI E METODI .....	53
5.2.1.1	Soggetti dello studio .....	53
5.2.1.2	Disegno dello studio .....	53
5.2.1.3	Raccolta ed analisi del CAE .....	54
5.2.1.4	Analisi nel siero .....	54
5.2.1.5	Spirometria .....	55
5.2.1.6	Analisi statistica .....	55
5.2.2	RISULTATI .....	55
Soggetti dello studio .....	55	
Test di funzionalità polmonare .....	56	
Elementi metallici nel CAE .....	56	
Indicatori nel sangue .....	57	
5.3	STUDIO III. Elementi metallici nel condensato dell'aria esalata di pazienti con pneumopatie interstiziali .....	58
5.3.1	MATERIALI E METODI .....	59
5.3.1.1	Soggetti dello studio .....	59
5.3.1.2	Disegno dello studio .....	60
5.3.1.3	Analisi statistica .....	61
5.3.2	RISULTATI .....	61
<b>6.</b>	<b>DISCUSSIONE</b> .....	<b>64</b>
6.1	STUDIO I .....	64
6.2	STUDIO II .....	68
6.2.1	Elementi metallici nel CAE .....	68
6.2.2	Elementi metallici nel sangue .....	70
6.2.3	Proteine nel siero .....	70
6.3	STUDIO III .....	72
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>79</b>
<b>9.</b>	<b>FIGURE E TABELLE</b> .....	<b>112</b>
<b>10.</b>	<b>APPENDICE</b> .....	<b>146</b>

## 1. INTRODUZIONE

Il polmone rappresenta la principale via d'ingresso per le sostanze aerodisperse, data l'ampia superficie dell'epitelio polmonare e gli elevati volumi di aria (circa 7 litri/minuto) che vengono scambiati in maniera continua. L'epitelio bronchiale delle vie aeree e delle regioni alveolari assicura un'estesa superficie (circa 100 m<sup>2</sup>) per lo scambio di gas e costituisce un'interfaccia tra l'ambiente esterno e quello interno; esso riveste anche un ruolo importante in altre funzioni biologiche. Rappresenta un meccanismo difensivo verso l'inalazione di sostanze inquinanti o microrganismi, sia fornendo una barriera fisica alla penetrazione di tali agenti, che intervenendo con meccanismi immunologici cellulari e molecolari alla loro rimozione e inattivazione (Knight and Volgate 2003; Kato and Schleimer 2007).

Le cellule epiteliali partecipano alla risposta infiammatoria regolando sia la risposta immunitaria innata che quella adattativa, attraverso la produzione e liberazione di mediatori pro-infiammatori, di fattori di crescita e chemochine, il richiamo e l'attivazione di cellule infiammatorie e del sistema immunitario (Martin *et al.*, 1997). Contribuiscono anche alla risposta riparativa in seguito a danno, indotto da sostanze pneumotossiche o secondario all'instaurarsi del processo flogistico.

Inoltre, l'epitelio di rivestimento delle vie aeree interviene nel metabolismo e detossificazione di xenobiotici, ad opera di diversi sistemi enzimatici di biotrasformazione presenti a livello polmonare (Zhang *et al.*, 2006; Castell *et al.*, 2005; Hukkanen *et al.*, 2002).

L'apparato respiratorio rappresenta il principale organo bersaglio nell'esposizione ambientale od occupazionale a xenobiotici aerodispersi e la risposta polmonare conseguente alla loro inalazione, riveste un ruolo chiave nella patogenesi della maggior parte delle patologie polmonari.

Le patologie dell'apparato respiratorio sono tra le principali cause di mortalità e morbilità nel mondo e la loro incidenza è in continuo aumento; l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stimato che nel 2030 la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) e le infezioni delle basse vie respiratorie rappresenteranno rispettivamente la terza e la quarta causa di morte a livello mondiale ed il tumore del polmone la sesta (WHO 2008).

L'incremento dell'incidenza delle patologie polmonari sembra essere correlato all'ampia diffusione tra le popolazioni dell'abitudine tabagica e all'inquinamento atmosferico, che rappresentano i principali fattori di rischio di due tra le più diffuse pneumopatie, la BPCO e il tumore polmonare, patologie che sono spesso anche associate tra loro.

Per far fronte ai costi sociali, sanitari ed economici delle patologie respiratorie, presenti e futuri, molti governi (Usa, Europa etc) hanno intrapreso iniziative di prevenzione primaria, promuovendo leggi per il controllo della qualità dell'aria (sia *outdoor* che *indoor*) e la disseuafazione dall'abitudine tabagica, tentando di ridurre l'esposizione ai fattori di rischio maggiormente diffusi (Viviano and Settimo 2003; Direttiva 2004/107/CE; Conferenza permanente 2001; Shafey and Dolwick 2003, WHO Report 2008).

I rischi per la salute legati alle abitudini tabagiche possono persistere anche diversi anni dalla loro sospensione. Il rischio d'insorgenza del cancro polmonare, ad esempio, sembra ridursi gradualmente negli ex-fumatori rispetto ai fumatori, in relazione al tempo trascorso dalla sospensione dell'abitudine tabagica, senza però mai uguagliare quello dei non fumatori (Peto *et al.*, 2000).

Appare quindi molto importante anche l'attuazione di misure di prevenzione secondaria, mirate a diagnosticare le patologie in fase iniziale, aumentando l'efficacia dei trattamenti terapeutici e le possibilità di guarigione.

La diagnosi precoce di una patologia può essere effettuata tramite il tempestivo riconoscimento dei sintomi iniziali della malattia o attuando programmi di screening, indirizzati verso gruppi di popolazione maggiormente a rischio.

Nell'ambito delle patologie respiratorie spesso i sintomi iniziali sono per lo più sfumati e aspecifici e le malattie possono decorrere a lungo in maniera clinicamente silente. Infatti, in molti casi, la diagnosi viene posta tardivamente, quando la sintomatologia diviene manifesta a causa di modificazioni strutturali e/o funzionali irreversibili a carico dell'apparato respiratorio, o può restare misconosciuta (Mannino *et al.*, 2000; Tinkelman *et al.*, 2007).

La difficoltà di effettuare la diagnosi precoce è in gran parte legata al fatto che molte patologie polmonari condividono fattori eziologici, meccanismi patogenetici e sintomatologia clinica. In alcuni casi, poi, la certezza diagnostica è possibile solo in seguito all'attuazione di procedure invasive come la broncoscopia con lavaggio bronco-alveolare, la biopsia bronchiale o transbronchiale o in alcuni casi la biopsia

chirurgica, il cui esito conferma o esclude l'ipotesi diagnostica (Sigurdsson *et al.*, 2009; Rivera and Mehta 2007).

Alcune patologie polmonari, anche se correttamente diagnosticate, sono incurabili e in questi casi è possibile operare solo una prevenzione terziaria, volta alla riduzione della gravità e delle complicanze delle patologie.

Sulla base di queste premesse, è stato sviluppato il percorso di ricerca svolto in questo triennio di dottorato, focalizzato sullo studio di metodologie non invasive per la ricerca di nuovi indicatori nella diagnosi precoce di patologie respiratorie, tra cui particolare attenzione è stata posta verso il tumore polmonare, patologia che nonostante il progresso scientifico presenta tuttora una scarsa prognosi.

## 2. METODOLOGIE E INDICATORI NON INVASIVI NELLO STUDIO DI PATOLOGIE POLMONARI

Il polmone rappresenta la principale via d'ingresso per le sostanze aerodisperse e spesso anche l'organo critico a livello del quale si realizzano i primi effetti causati dall'esposizione ambientale od occupazionale a xenobiotici.

Tali effetti possono essere rappresentati inizialmente da modificazioni di ordine biochimico e/o funzionale, in genere reversibili, o possono determinare alterazioni strutturali; possono essere clinicamente silenti o dar luogo a sintomatologia transitoria o persistente, anche in relazione all'entità dello stimolo e alla risposta polmonare alla sostanza inalata.

Nello studio delle patologie polmonari sono disponibili diversi approcci metodologici, più o meno invasivi, la cui scelta e applicazione si basa sulla sintomatologia accusata dal paziente, sulle ipotesi diagnostiche, sulla tipologia delle informazioni necessarie per la diagnosi e/o il monitoraggio della patologia, tenendo conto anche degli eventuali rischi per il paziente.

Le metodiche d'*imaging* permettono di valutare le modificazioni di carattere morfologico-funzionale del parenchima polmonare e delle strutture toraciche, i test di funzionalità respiratoria consentono di ottenere informazioni sulle alterazioni statiche e dinamiche dei volumi polmonari e degli scambi gassosi. Il riscontro di alterazioni di questo tipo rispecchiano generalmente modificazioni di tipo strutturale, oramai avvenute e poco modificabili.

Per studiare i meccanismi fisiopatologici alla base delle patologie dell'apparato respiratorio ed interromperne il processo, sono da ricercare quelle precoci alterazioni di ordine biologico-funzionale, che si tradurranno solo in un secondo tempo in alterazioni organiche.

La valutazione delle alterazioni biologiche può essere effettuata con le metodiche endoscopiche (lavaggio bronco-alveolare, brushing, biopsia bronchiale e trans-bronchiale) che permettono di campionare direttamente le vie aeree. In questo modo, è possibile rilevare eventuali cambiamenti delle componenti cellulari o dei mediatori presenti e studiare le risposte cellulari e biomolecolari all'esposizione ad agenti pneumotossici o instauratesi in maniera abnorme per causa non nota.

Tali metodiche, seppur d'elezione per lo studio della composizione del fluido bronco-alveolare e del parenchima polmonare, a causa della loro invasività non appaiono però adeguate per un utilizzo routinario nella clinica e nella ricerca, nè proponibili in protocolli di screening o sorveglianza sanitaria in soggetti ad alto rischio e asintomatici.

L'attenzione dei ricercatori si sta rivolgendo sempre più verso metodiche poco o per nulla invasive, che consentano, tramite la determinazione di indicatori biologici, di ottenere informazioni sugli eventi fisiopatologici a livello polmonare, utili per la diagnosi, la valutazione del grado di severità delle malattie, il monitoraggio e la risposta terapeutica e che siano proponibili non solo nei pazienti affetti da patologie polmonari, ma anche per lo studio di soggetti a rischio.

Un indicatore biologico o biomarcatore può essere l'indicatore di processo biologico normale o patologico e/o riflettere la risposta ad uno xenobiotico; si possono distinguere:

- ♦ “indicatori di effetto”: rappresentano alterazioni misurabili di parametri biochimici o funzionali che, in funzione della gravità, possono riflettere semplici adattamenti funzionali o alterazioni dello stato di salute fino alla malattia conclamata.
- ♦ “indicatori di suscettibilità”: rilevano condizioni geneticamente determinate o acquisite che rendono un soggetto particolarmente suscettibile nei confronti di un rischio o di un'esposizione ad uno xenobiotico, potendo presentare effetti avversi già a bassi livelli di esposizione.
- ♦ “indicatori di esposizione”: rappresentano la misurazione di una sostanza esogena o di suoi metaboliti o il prodotto dell'interazione tra questi ed una molecola bersaglio, in matrici biologiche accessibili per ottenere una stima dell'esposizione.

L'avanzamento scientifico nelle metodiche analitiche (genomica, proteomica, metabonomica) applicate allo studio di biomarcatori in matrici biologiche facilmente accessibili, è una grande opportunità per lo studio delle patologie polmonari.

Molte patologie dell'apparato respiratorio si caratterizzano per la presenza di un grado variabile di flogosi e stress ossidativo, processi che appaiono coinvolti sia

nell'insorgenza che nella progressione di patologie polmonari come la BPCO, l'asma, le interstiziopatie polmonari e il tumore polmonare (Park *et al.*, 2009; Ciencewicki *et al.*, 2008). Molte sostanze inquinanti (particolato atmosferico, fumo di sigaretta, inquinanti ambientali) sono in grado di indurre nelle vie aeree una risposta infiammatoria e/o la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) che possono causare un danno a carico di molecole biologiche come lipidi, proteine e DNA (Martin *et al.*, 1997, Ciencewicki *et al.*, 2008).

La formazione di ROS/RNS può avvenire anche per cause endogene, per lo più legate ai normali processi metabolici o all'attivazione delle cellule infiammatorie.

Il sistema respiratorio è dotato anche di meccanismi di difesa antiossidante prevalentemente enzimatici (superossido dismutasi, catalasi e glutazione perossidasi) e da molecole solubili con proprietà antiossidanti (glutazione, Vitamina E, vitamina C, transferrina e altri) (Comhair and Erzurum 2002). Se però, a causa di fattori esogeni o endogeni, si viene a creare uno squilibrio tra la produzione e la rimozione di ROS e RNS, si determina una condizione di stress ossidativo, che può a sua volta amplificare il processo infiammatorio.

Nello studio delle patologie respiratorie riveste quindi fondamentale importanza la valutazione di indicatori di flogosi e stress ossidativo. Tali indicatori possono essere utilizzati per comprendere meglio i meccanismi fisiopatologici alla base dell'insorgenza e della progressione delle patologie ma anche per individuare alterazioni precoci indotte dall'inalazione di inquinanti pneumotossici.

## 2.1 ARIA ESPIRATA

La possibilità di utilizzare l'aria espirata come veicolo per i biomarcatori è un dato conosciuto da tempo in medicina; ad esempio, l'odore dell'alito del paziente è stato utilizzato per secoli come sintomo caratteristico di diverse malattie.

L'aria espirata può essere considerata come un aerosol saturo di vapore acqueo, costituito da una **frazione gassosa**, in cui si ritrovano sostanze ad alta volatilità come i composti organici volatili e i gas permanenti (ad esempio, monossido di carbonio, ossido nitrico, anidride carbonica) e da una **frazione liquida** che veicola all'esterno sostanze idrosolubili o a bassa volatilità (Kharitonov and Barnes 2001a; Kharitonov and Barnes 2006).

Questa matrice risulta particolarmente adatta per lo studio delle patologie polmonari, rappresentando la via di eliminazione dell'apparato respiratorio di sostanze endogene e/o esogene, volatili e non volatili, oltre che per la valutazione di soggetti esposti ad inquinanti aerodispersi ambientali e/o occupazionali (Kharitonov and Barnes 2001a; Paredi *et al.*, 2002; Corradi and Mutti 2005).

### **2.1.1 Aria esalata in fase gassosa**

Nella frazione gassosa dell'aria esalata sono presenti composti inorganici come ossigeno, ossido nitrico, monossido di carbonio e composti organici volatili (idrocarburi, alcoli, chetoni, aldeidi, esteri). Le sostanze volatili presenti nell'esalato possono avere un'origine endogena, essere prodotte localmente nel polmone e nelle vie respiratorie o derivare da processi metabolici ed essere esalate dopo diffusione dal sangue agli alveoli, oppure avere un'origine esogena ed essere eliminate tal quali o dopo trasformazione metabolica.

#### **- Ossido Nitrico**

L'ossido nitrico (NO) è un importante molecola endogena, coinvolta in differenti processi biologici. Viene prodotto per azione dell'enzima nitrico ossido sintetasi (NOS), che converte l'aminoacido L-arginina in NO e L-citrullina. Esistono tre isoforme di NOS, di cui due sono costitutivamente espresse (endoteliale eNOS e neuronale nNOS) ed una inducibile (iNOS), espressa in seguito a stimolo infiammatorio in vari tipi cellulari incluse cellule epiteliali bronchiali, macrofagi alveolari, cellule dell'epitelio nasale. La presenza di NO nell'aria esalata è stata descritta per la prima volta nel 1991 (Gustafsson *et al.*, 1991) e da allora diversi studi hanno riportato alti livelli di NO nell'esalato di soggetti con varie patologie polmonari (Kharitonov, 2004).

A livello del sistema respiratorio l'NO ha molteplici funzioni. È coinvolto nella regolazione della broncodilatazione, del tono vascolare, della secrezione di muco e stimola la clearance mucociliare. Può interagire con le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e formare specie reattive dell'azoto (RNS), che assieme all'NO stesso e ai ROS intervengono nella difesa contro i microrganismi, ma può anche amplificare lo stress ossidativo (Ricciardolo *et al.*, 2004).

La valutazione del NO esalato in pazienti con patologie polmonari potrebbe quindi essere di grande interesse (Taylor *et al.*, 2006; Abba, 2009).

La misurazione dell'NO può essere realizzata sia *on-line* durante un'espiazione lenta, che *off-line* in campioni di aria esalata raccolti in appositi contenitori; la procedura per la misurazione del NO è stata standardizzata dall'American Thoracic Society e dall'European Respiratory Society (ATS/ERS 2005).

La valutazione dell'NO esalato (Fractional Exhaled Nitric Oxide FE<sub>NO</sub>) è utilizzata nello studio dell'infiammazione delle vie aeree, in particolar modo per lo studio dell'asma (Brightling *et al.*, 2005; Zeidler *et al.*, 2003). Nei pazienti con BPCO i dati sono controversi, alcuni autori riportano incrementi di FE<sub>NO</sub> in pazienti con malattia stabile mentre altri valori ridotti o invariati rispetto a soggetti sani. Si ipotizza che tale riscontro possa essere causato dall'eterogeneità dell'infiammazione cronica e dalla presenza di fumatori attivi tra la popolazione di pazienti indagata. Il fumo di sigaretta è in effetti un fattore di confondimento nell'interpretazione dei livelli di NO esalato. Diversi autori hanno riscontrato livelli inferiori di tale mediatore nell'esalato di soggetti sani fumatori rispetto a non fumatori; ciò potrebbe essere causato da un danno cronico presente a livello delle cellule epiteliali delle vie aeree che producono l'NO indotto dal fumo di sigaretta e/o all'inibizione della NOS (Kharitonov *et al.*, 1995; Hoyt *et al.*, 2003).

#### **- Composti organici volatili (VOCs)**

Secondo diversi autori, alcuni VOCs, in particolare alcani ed alcani metilati, rappresenterebbero marcatori di stress ossidativo (Kneepkens *et al.*, 1992; Kneepkens *et al.*, 1994). Nella perossidazione lipidica, i radicali liberi attaccano i principali costituenti delle membrane cellulari, in particolar modo gli acidi grassi polinsaturi (PUFAs), generando reazioni a catena che portano alla formazione di lipidi perossidi, successivamente convertiti in alcani, dieni coniugati e composti carbonilici (aldeidi) (figura 1) (Miekisch *et al.*, 2004); analogamente si formerebbero anche metil-alcani escreti nell'aria espirata (Phillips *et al.*, 2000a).

A causa della presenza di doppi legami, i PUFAs sono particolarmente suscettibili all'attacco dei radicali liberi e poiché nelle membrane cellulari i più abbondanti sono gli acidi grassi ω-3 e ω-6, i prodotti formati in maggiore quantità sono l'etano e il pentano. Poiché mostrano maggior solubilità e rapidità di escrezione nel

respiro rispetto nel sangue, un loro aumento è indice monitorabile di danno ossidativo (Miekisch *et al.*, 2004).

Alcuni studi presenti in letteratura hanno mostrato come la determinazione dell'etano nell'esalato sia un utile indicatore non invasivo per valutare il grado di stress ossidativo presente in varie patologie polmonari. Si sono osservati livelli più alti di etano nell'esalato di pazienti affetti da asma e in pazienti con BPCO rispetto a soggetti sani, ma anche nei pazienti non trattati con steroidi rispetto ai soggetti in trattamento (Paredi *et al.*, 2000a; Paredi *et al.*, 2000b). Analogamente, anche in soggetti affetti da interstiziopatie polmonari, si sono riscontrati livelli più elevati di etano nell'aria esalata rispetto a quelli determinati in un gruppo di controllo; inoltre si è osservato che i valori di etano erano correlati con l'andamento della malattia potendo riflettere non solo il grado di stress ossidativo ma anche l'andamento e la gravità di tali patologie (Kano *et al.*, 2005).

Di particolare interesse è stato il riscontro, circa 20 anni fa, di come nell'esalato di pazienti con tumore polmonare fosse possibile determinare livelli incrementati di alcuni VOCs rispetto a soggetti sani (Gordon *et al.*, 1985; O'Neill *et al.*, 1988).

Tale dato fu confermato successivamente da uno studio che osservò come, in un gruppo di soggetti in attesa di fibrobroncoscopia per il riscontro di anomalie alla radiografia del torace, un gruppo di 22 VOCs (in maggioranza idrocarburi alifatici e benzene-derivati), era in grado di discriminare soggetti con e senza tumore (Phillips *et al.*, 1999a). I più alti livelli di VOCs nei pazienti con tumore furono messi in relazione con una incrementata attività dei ROS nelle cellule tumorali. Lo stesso gruppo di ricerca alcuni anni dopo modificò e ridusse il numero dei VOCs di interesse da 22 a 9 (Phillips *et al.*, 2003a).

Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato come alcuni VOCs erano presenti in maggiori concentrazioni in pazienti con tumore polmonare non a piccole cellule rispetto ai soggetti sani, fumatori e non fumatori e in pazienti con BPCO (Poli *et al.*, 2005). Sebbene nessun composto da solo tra quelli esaminati sia risultato essere in grado di distinguere i soggetti con tumore polmonare dagli altri gruppi esaminati e non sia stato quindi identificato alcun singolo marker specifico di tumore polmonare, il pattern dei livelli dei VOCs selezionati presentava un forte potere discriminante, riuscendo a classificare correttamente i soggetti nei gruppi esaminati nel 80% circa dei casi. Inoltre, in un successivo studio (Poli *et al.*, 2008) si sono confrontati i livelli presenti nell'esalato di pazienti affetti da tumore

polmonare non a piccole cellule, determinati prima dell'intervento di resezione chirurgica, circa un mese dopo e in un ristretto gruppo a tre anni di distanza e si è osservato che, rispetto ai controlli, la maggior parte dei VOCs erano più elevati nei pazienti con tumore, anche dopo un mese e dopo tre anni dalla resezione tumorale. Nei pazienti, i livelli determinati ad un mese di distanza erano pressoché invariati rispetto al basale, eccetto che per l'isoprene i cui livelli erano ridotti, mentre dopo tre anni sia l'isoprene che il benzene mostravano una riduzione, mentre i livelli di pentano, toluene ed etilbenzene erano aumentati.

Il riscontro di livelli per lo più invariati nei pazienti con tumore polmonare dopo un mese dalla resezione tumorale, sembrerebbe legato al fatto che i VOCs esalati non rappresentano specifici biomarcatori di tumore polmonare, quanto piuttosto riflettono modificazioni che accompagnano lo sviluppo del tumore, a carico quindi del tessuto polmonare in toto e non solo della componente cancerosa tissutale.

Il calo dell'isoprene e l'incremento del pentano potrebbero essere la conseguenza della presenza di stress ossidativo cronico che causerebbe la riduzione dell'isoprene per azione di radicali liberi e un incremento di pentano, prodotto della perossidazione lipidica. Più difficile da spiegare sarebbe il diverso comportamento osservato nei livelli di benzene, toluene ed etilbenzene, di verosimile origine esogena legata al fumo di sigaretta o all'inquinamento ambientale; tale dato potrebbe essere legato ad una maggior deposizione ed un più lento rilascio polmonare di toluene ed etilbenzene rispetto al benzene.

Anche molecole esogene, soprattutto composti organici alogenati, possono essere analizzati nell'aria esalata per valutarne l'assorbimento e l'eliminazione corporea, in caso di esposizione ambientale (Pleil *et al.*, 1997).

L'analisi dell'aria esalata, metodica non invasiva, offre quindi la possibilità di valutare diversi indicatori biologici di origine endogena e/o esogena, potenzialmente utili sia per la diagnosi ed il monitoraggio di malattie, che per la valutazione dell'esposizione a composti volatili esogeni. Vi sono però alcuni problemi nell'analisi dell'esalato, legati soprattutto alla standardizzazione delle operazioni di raccolta e alle bassissime concentrazioni degli analiti di interesse, che sono in genere comprese tra le nanomoli ( $10^{-9}$  M) e le picomoli ( $10^{-12}$  M) per litro di aria.

### **2.1.2 Condensato dell'aria espirata**

Il condensato dell'aria espirata (CAE) è un fluido che si ottiene raffreddando l'esalato a basse temperature. Quando l'aria espirata impatta una superficie più fredda si ha il fenomeno fisico del cambio di fase, con formazione di una soluzione acquosa. Il CAE è una matrice costituita prevalentemente da acqua ma contiene anche sostanze non volatili e poco volatili, espirate in forma di aerosol.

Si ritiene che durante la ventilazione, piccole goccioline di fluido si stacchino dal film liquido che riveste le vie respiratorie rimanendo in sospensione e vengano quindi veicolate e trasportate all'esterno dalla corrente di vapore espirata (Hunt, 2002).

La raccolta del CAE è una metodica totalmente non invasiva e generalmente ben tollerata. Si effettua chiedendo al soggetto di respirare a volume corrente attraverso un boccaglio collegato ad un circuito di raffreddamento, che trasforma l'espirato in condensato. La quantità di matrice ottenuta è influenzata da vari fattori, tra cui sono fondamentali il sistema di raccolta e la ventilazione polmonare. Anche la temperatura di raffreddamento ha rilevanza, in quanto è stato dimostrato come questa possa influire sul volume di CAE ottenibile e di conseguenza avere un effetto anche sui livelli dei mediatori (Goldoni et al., 2005).

Di recente sono state pubblicate Linee Guida e raccomandazioni (Horváth et al., 2005) che possono permettere una maggiore standardizzazione della metodica e quindi una più facile confrontabilità dei dati ottenuti in differenti centri di ricerca.

La procedura di raccolta, semplice e non invasiva, avviene senza alterare le mucose delle vie aeree o causare flogosi; queste caratteristiche la rendono frequentemente ripetibile, applicabile anche in soggetti asintomatici per scopi di ricerca e ai pazienti con gravi patologie, per i quali metodiche più invasive non sono attuabili. Inoltre il fatto che il CAE rifletta la composizione del fluido di rivestimento delle vie aeree, rende tale metodica particolarmente adatta per lo studio dei fenomeni fisiopatologici a livello polmonare (Kharitonov and Barnes 2001a; Cepelak and Dodig 2007).

Esistono vari tipi di strumentazioni per la raccolta del CAE (Hunt, 2002) ed il nostro gruppo di ricerca, che già da alcuni anni utilizza questa metodica non invasiva per il campionamento delle vie aeree, ha partecipato alla realizzazione di un sistema per la raccolta del CAE denominato TURBO-DECCS (Transportable

Unit for Research on Biomarkers Obtained from Disposable Exhaled Condensate Collection, Medivac, Parma, Italia) ideato appositamente per la raccolta del condensato (Cagliari *et al.*, 2006). Tale apparecchiatura (figura 2) ha dimensioni contenute, caratteristica che la rende facilmente trasportabile, permettendo di effettuare la raccolta dei campioni biologici direttamente al letto dei pazienti o in azienda, nel caso del monitoraggio di esposizioni occupazionali. È costituita da un sistema refrigerante che si compone di un modulo termoelettrico che provoca l'effetto di Peltier ed è dotata di alloggiamento per la provetta di polipropilene dove si raccoglie il CAE. Un termostato permette di impostare e mantenere costante la temperatura di raccolta con una tolleranza di  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Il soggetto respira a volume corrente attraverso un boccaglio monouso dotato di valvola unidirezionale, connesso direttamente con la provetta tramite un tubo di polietilene.

Il CAE viene utilizzato principalmente con tre scopi: (i) approfondire le conoscenze sulla composizione del fluido di rivestimento delle vie aeree; (ii) valutare le modificazioni dei livelli dei mediatori per migliorare la comprensione riguardo i meccanismi fisiopatologici che s'instaurano nel corso di patologie dell'apparato respiratorio; (iii) utilizzare gli indicatori valutati nel CAE come biomarcatori esalati di patologie respiratorie (Horváth *et al.*, 2005).

Nel CAE sono determinabili vari tipi di molecole e biomarcatori (Hunt, 2002; Kharitonov and Barnes 2001a; Cepelak and Dodig 2007; Horváth *et al.*, 2005), tra cui:

- Perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ): è il prodotto della dismutazione spontanea o enzimatica (ad opera della superossido dismutasi) dell'anione superossido  $\text{O}_2^-$ , che si libera in seguito all'attivazione di cellule infiammatorie, inclusi neutrofili, macrofagi ed eosinofili. Tale molecola, meno reattiva rispetto ad altre specie reattive dell'ossigeno, ha la proprietà di attraversare le membrane biologiche e di entrare in altri compartimenti. La rimozione dell' $\text{H}_2\text{O}_2$  avviene principalmente per azione dell'enzima catalasi che a livello delle vie aeree è presente a basse concentrazioni; l' $\text{H}_2\text{O}_2$  esalata può essere interpretata come indice biologico di stress ossidativo nei polmoni.
- Eicosanoidi: derivano dall'acido arachidonico rilasciato dai fosfolipidi di membrana ad opera di fosfolipasi. Dall'acido arachidonico per azione di ciclo-ossigenasi sono prodotti prostaglandine (PG) e trombossani (TX), mentre la

lipo-ossigenasi porta alla formazione di leucotrieni (LT). Tali molecole rappresentano importanti mediatori dell'infiammazione con diverse azioni biologiche; ad esempio  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e  $\text{TXA}_2$  hanno azione broncocostrittrice,  $\text{PGE}_2$  è un vasodilatatore, LTC-4 e LTD-4 aumentano la permeabilità vascolare, la produzione di muco e inducono broncospasmo, LTB-4 è un fattore chemiotattico per i neutrofili polimorfonucleati e inoltre li attiva, intensificando il rilascio di enzimi lisosomiali e metaboliti reattivi dell'ossigeno.

- Isoprostani: sono degli isomeri delle prostaglandine e derivano dalla perossidazione dell'acido arachidonico, determinata, indipendentemente dall'azione della ciclo-ossigenasi, dai radicali liberi che si formano a causa dello stress ossidativo. Il più importante isoprostano nell'uomo è 8-isoprostano e rappresenta un indicatore di stress ossidativo.
- Prodotti di perossidazione lipidica: La perossidazione lipidica è un processo durante il quale i lipidi contenenti acidi grassi insaturi e i loro esteri vengono ossidati da radicali liberi, generando reazioni a catena che portano alla formazione di lipidi perossidi, successivamente convertiti in alcani, dieni coniugati e composti carbonilici (aldeidi) (Miekisch *et al.*, 2004; Meagher and FitzGerald, 2000). Le aldeidi rappresentano i prodotti finali di tale processo; in seguito alla perossidazione lipidica a carico degli acidi grassi poliinsaturi  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 si formano le aldeidi  $\alpha,\beta$ -insature, come il trans-2-esenale, il trans-2-eptenale ed il trans-2-nonenale mentre le aldeidi lineari rappresentano invece i prodotti finali di degradazione radicalica (Esterbauer *et al.*, 1991). La determinazione delle aldeidi lineari nell'EBC presenta però una serie di problemi legati alla loro volatilità tendendo a ripartirsi tra la fase gassosa e quella liquida dell'espriato.
- Proteine e citochine: Diverse citochine sono state determinate nel CAE anche se i livelli sono generalmente molto bassi e di poco superiori al limite di rivelabilità, il che richiede metodi molto sensibili per le analisi.
- Nitrati, nitriti, nitrosotoli e nitrotirosine: l'NO reagisce con il superossido producendo perossinitriti che possono indurre modificazioni covalenti in numerose molecole biologiche, formando nitroso e nitro-addotti (ad esempio 3-nitrotirosina), oppure può essere intrappolato in biomolecole contenenti

gruppi tiolici, cisteina e glutazione per formare S-nitrosotioi. La valutazione nel CAE dei livelli di tali molecole può fornire un'idea sulla sintesi di NO e sul suo ruolo nello stress ossidativo e nella flogosi delle vie aeree.

- pH: la determinazione dei livelli di pH è un indicatore che riflette l'acidificazione delle vie aeree. Una riduzione del pH è stata osservata in diverse malattie infiammatorie delle vie aeree (Kostikas *et al.*, 2002).

Il CAE è stato utilizzato prevalentemente per lo studio della flogosi e dello stress ossidativo polmonare, processi che accomunano molte patologie respiratorie, come BPCO, asma, interstiziopatie, tumore polmonare (Borrill *et al.*, 2008; Kharitonov and Barnes 2001a; Psathakis *et al.*, 2006; Dalaveris *et al.*, 2009), ma che possono essere anche l'espressione della risposta polmonare ad inquinanti areodispersi. Tale matrice è utilizzabile anche nel monitoraggio biologico di lavoratori esposti ad inquinanti aerodispersi, per valutare l'esposizione e gli effetti precoci. Il nostro gruppo di ricerca ha utilizzato il CAE come nuova metodica sia per valutare l'esposizione occupazionale a metalli che per studiare gli effetti precoci indotti da agenti pneumotossici a livello dell'organo bersaglio.

In particolare, è stata dimostrata l'utilità del CAE come nuova matrice da utilizzare per il monitoraggio biologico in addetti alla cromatura galvanica esposti a cromo esavalente (Cagliari *et al.*, 2006) e in lavoratori impegnati nella produzione di utensili diamantati, esposti a tungsteno e cobalto (Goldoni *et al.*, 2004).

Le concentrazioni dei metalli nel CAE sono risultate correlate con i livelli dei metalli nelle urine; inoltre le forti correlazioni riscontrate tra indicatori di danno ossidativo e livelli dei metalli nel CAE non si sono osservate con le concentrazioni urinarie dei metalli. Questi dati mostrano come il CAE sia una matrice appropriata per lo studio della dose polmonare e degli effetti precoci a carico dell'organo bersaglio in seguito all'esposizione a pneumotossici, in grado di completare le informazioni ottenibili dalle matrici tradizionalmente utilizzate nel monitoraggio biologico.

## 2.2 SANGUE

Alcune proteine secrete dall'epitelio delle vie aeree e presenti alla superficie del tratto respiratorio, si possono ritrovare anche nel sangue.

L'incremento delle concentrazioni sieriche di tali molecole, tra cui le più conosciute sono la CC16, proteina prodotta dalle cellule di Clara e le proteine associate al surfactante (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D), spiegabile con un meccanismo di passaggio attraverso la barriera alveolo-capillare, rifletterebbe le alterazioni dell'integrità dell'epitelio polmonare e l'aumentata permeabilità. La CC-16 sembra avere un ruolo protettivo verso lo stress ossidativo e la risposta infiammatoria, SP-B e SP-C sono prevalentemente implicate nella riduzione della tensione superficiale, mentre SP-A e SP-D sembrano coinvolte nella regolazione della risposta infiammatoria e nella difesa dell'ospite.

La valutazione dei livelli ematici di queste "pneumoproteine", è stata proposta da alcuni autori come metodica non invasiva per indagare i livelli di queste molecole come possibili biomarcatori di danno polmonare, in diverse patologie polmonari o in soggetti esposti a pneumotossici (Hermans and Bernard 1999; Hermans and Bernard 1998; Sorensen *et al.* 2007; Broeckeaert *et al.*, 2000).

L'utilizzo di biomarcatori sistemici determinati nel sangue di pazienti affetti da patologie respiratorie e/o di soggetti esposti ad inquinanti ambientali riveste una certa importanza, in quanto sta divenendo sempre più evidente che mediatori infiammatori rilasciati a livello polmonare in risposta ad inquinanti atmosferici, siano in grado di iniziare una risposta infiammatoria non solo locale ma anche sistemica (Künzli and Tager 2005). Si ritiene infatti, che l'induzione di uno stato flogistico cronico, anche sub-clinico, possa essere uno dei meccanismi fisiopatologici che potrebbero spiegare la relazione tra inquinamento atmosferico, malattie respiratorie (BPCO, asma, tumore polmonare) e patologie non respiratorie (per lo più cardiovascolari). La ricerca e la valutazione di mediatori sistemici potrebbe aiutare a chiarire tali interazioni.

Ad esempio, nella BPCO l'infiammazione cronica non è presente solo a livello delle vie respiratorie ma è anche una condizione sistemica e incrementati livelli ematici di citochine, mediatori infiammatori e proteina C reattiva in pazienti con BPCO rifletterebero questa condizione (Wouters, 2005; Karadag *et al.*, 2008).

La determinazione di indicatori in grado di riflettere ed evidenziare processi implicati nell'insorgenza e nella progressione del tumore polmonare, può essere considerato come un'approccio alternativo e complementare alle metodiche d'*imaging* nella diagnosi precoce di tale patologia. Mutazioni a livello di oncogeni o geni oncosoppressori, modificazioni epigenetiche come la metilazione del DNA, la quantificazione dei livelli di DNA libero circolante, di citochine e fattori di crescita implicati nel controllo della proliferazione e della neoformazione di vasi sanguigni, possono essere determinati in maniera poco invasiva nel sangue e sono stati proposti come possibili marcatori tumorali (Andriani *et al.*, 2004; Pathak *et al.*, 2006; Sozzi *et al.*, 2003; Paci *et al.*, 2009; Kaminska *et al.*, 2006).

## 3. PATOLOGIE POLMONARI

### 3.1 TUMORE DEL POLMONE

#### 3.1.1 Epidemiologia

Il carcinoma polmonare rappresenta la neoplasia maligna più comune e la principale causa di morte per cancro nel mondo occidentale.

Nel 2002 sono stati diagnosticati 1.35 milioni di nuovi casi di tumore polmonare a livello mondiale, circa il 12.4% di tutti i nuovi casi di tumore, anche se si osservano differenze geografiche nell'incidenza di tale neoplasia, maggiormente diffusa nei paesi più industrializzati, in particolare Nord-America ed Europa e meno presente nei paesi in via di sviluppo, in particolare Africa e Sud-America (Parkin *et al.*, 2005). Nel periodo 2001-2005 negli Stati Uniti il tasso d'incidenza corretto per età, era di 87.3/100000 nella popolazione maschile e 55.4/100000 in quella femminile (Jemal *et al.*, 2009). Negli ultimi 20 anni si è osservato un incremento globale di circa il 51% dei casi di tumore polmonare; negli uomini tale incremento appare maggiormente legato alla crescita e all'invecchiamento della popolazione e dati recenti mostrano una lieve riduzione nell'incidenza standardizzata per l'età (-3%), mentre nelle donne si osserva un trend opposto (+22%) (Parkin *et al.*, 2005). Questo andamento è strettamente associato alla variazione del consumo di tabacco che si è verificato nei due sessi negli ultimi decenni.

L'incidenza del carcinoma polmonare aumenta con l'avanzare dell'età e la fascia maggiormente colpita è quella compresa tra i 50 e 70 anni (Kamangar *et al.*, 2006). La mortalità per carcinoma polmonare è ancora elevata, con una sopravvivenza globale a 5 anni del 10-15 %, rimasta pressoché invariata nel corso degli ultimi 20 anni (Parkin *et al.*, 2005), a causa di una diagnosi spesso tardiva. Infatti la neoplasia tende a rimanere a lungo asintomatica e la diagnosi avviene, in oltre la metà dei casi, in stadio avanzato, in seguito al manifestarsi dei sintomi o delle complicanze. L'assenza di validi approcci alla diagnosi precoce, la presenza di metastasi all'epoca della diagnosi e la frequenza di recidive dopo la resezione chirurgica, rendono tuttora la prognosi ancora scarsa. Secondo stime effettuate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità il carcinoma polmonare rappresenterà nel 2030 la sesta causa di morte a livello mondiale (WHO 2008).

La riduzione dell'esposizione ai fattori di rischio (prevenzione primaria) e la diagnosi precoce di carcinoma polmonare (prevenzione secondaria), sia in presenza di sintomi iniziali che in soggetti asintomatici ad alto rischio, costituiscono i mezzi più validi per ridurre l'incidenza e la mortalità del tumore polmonare.

La diagnosi precoce ad uno stadio iniziale della malattia, comporta un miglioramento notevole della prognosi con una sopravvivenza a 5 anni intorno al 70% dopo resezione chirurgica radicale (Mountain, 1997), che può raggiungere l'80-90% se il tumore allo stadio I ha un diametro inferiore ai 3 cm (Patz, 2000b.)

### **3.1.2 Fattori di rischio**

Come altre patologie neoplastiche, il carcinoma polmonare presenta una patogenesi multifattoriale ed una insorgenza multifasica.

Tra i numerosi fattori di rischio che possono contribuire allo sviluppo del carcinoma polmonare, il principale è rappresentato dal fumo di tabacco.

Le prime osservazioni di un'associazione tra il fumo di sigaretta e il tumore polmonare risalgono a metà del secolo scorso e da allora si è osservato un andamento parallelo tra diffusione dell'abitudine tabagica nella popolazione ed incidenza della malattia. In particolare, poiché la cancerogenesi polmonare è un processo multifasico che si verifica nel corso di decenni, l'aumento della prevalenza dell'abitudine tabagica precede di circa trenta anni quello del tumore polmonare e pertanto l'andamento attuale di incidenza e prevalenza del carcinoma polmonare rispecchia il pregresso andamento della diffusione dell'abitudine tabagica nella popolazione (Alberg and Nonemaker, 2008). Si è stimato che nel 2000 l'85% dei casi di tumore polmonare nel sesso maschile e il 47% dei casi nel sesso femminile, siano da attribuirsi al fumo di sigaretta (Parkin *et al.*, 2005).

Il rischio d'insorgenza di carcinoma polmonare nei fumatori è di circa 10-20 volte maggiore, in base all'entità dell'esposizione, rispetto ai non fumatori (Brownson *et al.*, 1998). L'eccesso di rischio osservato nei fumatori è in relazione con diversi fattori come il numero di sigarette fumate al giorno, l'età di inizio e la durata dell'abitudine tabagica, la frequenza e l'intensità di inalazione del fumo (Lubin *et al.*, 2007). In particolare, a parità di esposizione quantificabile in pacchi/anno, al di sotto delle 15-20 sigarette/die il rischio risente maggiormente dell'intensità che non

della durata dell'esposizione, mentre al di sopra delle 20 sigarette/die si osserva una trend opposto (Lubin *et al.*, 2006). Il rischio d'insorgenza del cancro polmonare sembra ridursi gradualmente negli ex-fumatori rispetto ai fumatori, in relazione al tempo trascorso dalla sospensione dell'abitudine tabagica senza però mai uguagliare quello dei non fumatori (Peto *et al.*, 2000).

Il fumo di sigaretta è una miscela complessa costituita da una fase gassosa ed una fase corpuscolata e contiene alcune migliaia di sostanze chimiche (IARC 2004). Tra queste, oltre una sessantina sono riconosciute essere cancerogene, in accordo con le valutazioni della Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) e sono per lo più riconducibili a idrocarburi policiclici aromatici, nitrosamine, amine aromatiche, aldeidi, composti organici volatili, elementi metallici (Hoffmann *et al.*, 2001; IARC 2004). Diversi e complessi sono i meccanismi attraverso cui il fumo causa il cancro, riconducibili al fatto che in esso sono presenti sia cancerogeni diretti e indiretti (molecole che per la loro struttura chimica posseggono caratteristiche di reattività verso il DNA o che possono esplicitare le loro interazioni col DNA solo dopo aver subito delle trasformazioni chimiche), che promotori (figura 3).

Anche l'esposizione passiva a fumo di tabacco, causata dall'inalazione involontaria di una miscela composta da ciò che viene liberato dalla combustione spontanea della sigaretta e dal fumo espirato da un fumatore, rappresenta un fattore di rischio per l'insorgenza del carcinoma polmonare. In presenza di tale esposizione il rischio sembra aumentare del 15-20% (Boffetta *et al.*, 1998) e recentemente il fumo passivo è stato classificato come sostanza cancerogena di Gruppo I per l'uomo (IARC, 2004). Un recente studio europeo multicentrico condotto in soggetti non fumatori ed in ex-fumatori da oltre 10 anni, ha stimato che i casi di tumore polmonare attribuibili all'esposizione a fumo passivo sarebbero compresi tra il 16 e il 24%, per lo più dovuti ad un'esposizione lavorativa (Vineis *et al.*, 2007).

Sebbene il fumo rappresenti la principale causa di tumore polmonare, solo una parte dei fumatori svilupperà nel corso della vita tale patologia neoplastica (WHO and IARC, 1986) e circa il 25% di tutti i tumori polmonari insorgono in non fumatori (Parkin *et al.*, 2005).

Diversi studi epidemiologici hanno sottolineato il ruolo di altri fattori di rischio nella cancerogenesi polmonare: esposizione professionale ad agenti cancerogeni,

inquinamento atmosferico, anomalie genetiche e patologie polmonari preesistenti, come ad esempio la BPCO (Alberg *et al.*, 2005; Bardin-Mikolajczak *et al.*, 2007; Subramanian and Govindan, 2007; Mayne *et al.*, 1999).

Molte attività lavorative possono causare l'esposizione a cancerogeni, sia chimici che fisici e l'esposizione professionale sarebbe responsabile di una percentuale di carcinomi broncogeni variabile tra l'1% e il 40%. Tale variabilità risentirebbe di differenze temporali e geografiche e della distribuzione delle occupazioni/industrie che espongono a cancerogeni, che può variare da paese a paese ma anche all'interno di una stessa nazione (De Matteis *et al.*, 2008). Tra gli agenti cancerogeni occupazionali, i principali sono rappresentati da idrocarburi policiclici aromatici, metalli (cromo, nichel, cadmio, arsenico, berillio), asbesto, fumo passivo e radon (Veglia *et al.*, 2007). Molti di questi composti sono presenti anche nell'ambiente esterno e anche se presenti a concentrazioni generalmente inferiori rispetto a quelli riscontrabili in ambiente lavorativo, rappresentano comunque un potenziale rischio per la salute della popolazione generale.

L'inquinamento atmosferico, miscela eterogenea di composti gassosi, particolato e metalli pesanti, è considerato un fattore causale per il tumore del polmone e sarebbe responsabile del 5-7% dei tumori polmonari (Vineis *et al.*, 2007).

I meccanismi con cui la maggior parte degli inquinanti aeriformi esercita i propri effetti avversi è legata alla capacità di agire direttamente o indirettamente come ossidanti, promuovendo lo stress ossidativo e la risposta infiammatoria cronica (Kampa *et al.*, 2008; Knaapen *et al.*, 2004).

Oltre ai fattori ambientali, anche i fattori genetici e le loro reciproche interazioni sono implicati nell'eziopatogenesi del carcinoma polmonare.

Le diverse caratteristiche individuali, geneticamente determinate, possono modulare l'effetto delle esposizioni ambientali. Diversi studi hanno mostrato che la diversa suscettibilità individuale all'insorgenza del tumore polmonare può essere almeno in parte spiegata dal polimorfismo genetico degli enzimi della biotrasformazione (Yang *et al.*, 2007; Gresner *et al.*, 2007), dei sistemi di riparazione del DNA (Wei *et al.*, 2000; Spitz *et al.*, 2003) e di altre proteine (fattori di controllo del ciclo cellulare, recettori, fattori di crescita). 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 (Nitadori *et al.*, 2006; Matakidou *et al.*, 2005).

### **3.1.3 Cancerogenesi polmonare**

La cancerogenesi polmonare è un processo multifasico caratterizzato dall'accumulo di successive alterazioni genetiche e anomalie epigenetiche in geni critici, che contribuiscono all'iniziazione/insorgenza, sviluppo e progressione del tumore polmonare (Sekido *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2007; Risch and Plass, 2008; Brambilla and Gazdar, 2009).

Il progredire delle metodiche di biologia cellulare e molecolare ha permesso di identificare e caratterizzare alterazioni genetiche e anomalie molecolari frequentemente associate al tumore polmonare (Panani and Roussos, 2006; Mitsuuchi and Testa 2002; Osada and Takahashi 2002; Fong *et al.*, 2003).

Alcune di queste alterazioni genetiche, quali mutazioni a carico di specifici oncogeni (KRAS) e/o geni oncosoppressori (p53), aberrazioni cromosomiche (es. delezioni di 3p e 9p), si riscontrano anche nelle fasi più precoci d'insorgenza del tumore, ossia nelle lesioni pre-neoplastiche. È frequente anche il riscontro di anomalie epigenetiche, che non alterano la sequenza del DNA genico ma la sua struttura e sono trasmissibili con la replicazione cellulare; tra queste vi sono l'ipermetilazione del DNA che causa l'inattivazione di numerosi geni (es p16, FHIT, MGMT, GSTP1) e l'acetilazione e metilazione degli istoni, che si manifesta con alterazioni dell'espressione genica di geni legati a diversi "pathway" cellulari implicati nella cancerogenesi (Bowman *et al.*, 2006).

Tali alterazioni determinano l'acquisizione di alcune caratteristiche peculiari delle cellule neoplastiche (figura 4), quali: autosufficienza nei segnali di crescita, insensibilità ai segnali antiproliferativi, evasione dalla morte cellulare programmata, potenziale replicativo illimitato, attività angiogenetica, invasione tissutale e metastatizzazione, perdita del differenziamento (atipie biochimiche, morfologiche, strutturali) (Hanahan and Weinberg, 2000).

#### **- Ruolo dello stress ossidativo e dell'infiammazione**

Lo stress ossidativo, causando l'ossidazione di macromolecole cellulari come il DNA, lipidi e proteine di cui altera struttura e funzione, sembra avere un importante ruolo nell'insorgenza e nella progressione del tumore polmonare, essendo in grado di determinare sia alterazioni genetiche che epigenetiche (Klaunig and Kamendulis, 2004; Valko *et al.*, 2004).

Il fumo di sigaretta, come anche diversi cancerogeni ambientali e occupazionali, esercitano la loro azione cancerogena attraverso un'aumentata formazione di ROS e radicali liberi (figura 5) (Stavrides, 2006; Risom *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2006; Beyersmann and Hartwig 2008). I ROS sono in grado di causare danni al DNA che, se non riparati, possono portare ad alterazione della trascrizione genica, ad errori di replicazione e instabilità genomica, tutti meccanismi implicati nella cancerogenesi (Klaunig and Kamendulis, 2004; Valko *et al.*, 2004; Franco *et al.*, 2008). Anche il danno ossidativo a carico dei lipidi o delle proteine è implicato nella cancerogenesi. La perossidazione lipidica è un processo causato dal danno ossidativo a carico dei acidi grassi polinsaturi componenti delle membrane cellulari, che genera reazioni a catena (Miekisch *et al.*, 2004; Meagher and FitzGerald, 2000) durante le quali possono formarsi composti intermedi altamente reattivi, che possono interagire con il DNA con azione genotossica e mutagena (Lucrai and Skrzydlewska, 2003).

I ROS possono attivare fattori di trascrizione ed indurre l'attivazione di specifiche vie di trasduzione del segnale come MAP chinasi/AP-1 e il fattore nucleare NF- $\kappa$ B che regolano la trascrizione di geni coinvolti nella regolazione della proliferazione e differenziazione cellulare, nell'apoptosi e nella neoangiogenesi (Klaunig and Kamendulis, 2004; Valko *et al.*, 2006; Clerkin *et al.*, 2008; Ushio-Fukay and Nakamura, 2008).

Inoltre, le cellule tumorali presentano un incrementato stress ossidativo e un'aumentata produzione di ROS, dovuti alla stimolazione oncogenica, all'aumentata attività metabolica, ad alterazioni mitocondriali (Pelicano *et al.*, 2004; Clerkin *et al.*, 2008) che possono favorire la progressione tumorale.

Nel tessuto tumorale di pazienti con carcinoma polmonare si sono riscontrati livelli più elevati di prodotti derivanti dalla perossidazione lipidica, rispetto al tessuto polmonare non neoplastico, che confermerebbe la presenza di un'incrementata perossidazione lipidica nel tessuto tumorale (Pelicano *et al.*, 2004; Zieba *et al.*, 2000; Zieba *et al.*, 2001).

L'infiammazione cronica, caratteristica di alcune patologie polmonari, contribuisce in maniera importante all'insorgenza dello stress ossidativo e questo sembra essere il legame tra tali patologie e l'aumentato rischio d'insorgenza di tumore polmonare (Azad *et al.*, 2008; Mayne *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2009).

È stato osservato che la BPCO, malattia infiammatoria cronica delle vie aeree tra le più diffuse, aumenta il rischio di insorgenza di tumore polmonare (Mannino *et al.*, 2003). Queste patologie condividono diversi fattori di rischio, tra cui il principale è rappresentato dal fumo di sigaretta e secondo diversi studi avrebbero in comune anche un importante meccanismo patogenetico rappresentato dall'infiammazione cronica (Yao and Rahman, 2009).

L'infiammazione cronica porta alla creazione di un microambiente che si caratterizza per l'aumentata presenza di cellule infiammatorie, un'iper-produzione di ROS/RNS, la presenza di diversi fattori di crescita, citochine, chemochine. Ed a sua volta, anche nel microambiente tumorale vi è uno stato di persistente infiammazione.

I possibili meccanismi con i quali l'infiammazione cronica sembra contribuire alla carcinogenesi includono l'induzione di instabilità genomica, modificazioni epigenetiche e alterazione dell'espressione genica, stimolo proliferativo, neoangiogenesi; questi meccanismi sono indotti e sostenuti sia dal danno ossidativo diretto ed indiretto mediato da ROS/RNS, che dall'iper-espressione e liberazione di chemochine, citochine, fattori di crescita, NO e fattori di trascrizione come NF- $\kappa$ B (Kundu and Surh 2008; Allavena *et al.*, 2008; Yao and Rahman, 2009).

#### **3.1.4 Classificazione dei tumori polmonari**

La classificazione istopatologica dei tumori polmonari è alquanto complessa (tabella 1) e comprende sia quelli che originano dagli epitelii bronchiale ed alveolare e che rappresentano oltre il 95% delle neoplasie, che i tumori non epiteliali di origine mesenchimale o derivati dal tessuto linfatico (Travis *et al.*, 2004).

Tuttavia i carcinomi broncopolmonari, che rappresentano la tipologia di tumore polmonare maggiormente diffusa, sono riconducibili a quattro diversi istotipi:

- carcinoma squamoso o epidermide (SCC): insorge generalmente nei bronchi di grosso calibro ed interessa prevalentemente le regioni ilari.
- adenocarcinoma (ADK): origina dalle cellule mucipare dell'epitelio dei bronchi di calibro inferiore ed ha uno sviluppo prevalentemente periferico; si

manifesta frequentemente come nodulo polmonare solitario o addensamento pneumonico.

- carcinoma a grandi cellule: è un tumore indifferenziato la cui diagnosi avviene in genere per esclusione.
- carcinoma indifferenziato a piccole cellule o microcitoma: tumore a prevalente localizzazione centrale, è caratterizzato da un'alta aggressività presentando spesso già all'esordio metastasi regionali o a distanza; costituisce circa il 20% dei carcinomi polmonari.

In base a criteri istopatologici-clinico-terapeutici si è soliti differenziare il carcinoma polmonare in due grandi categorie: il carcinoma a piccole cellule (Small Cell lung Cancer, SCLC) e il carcinoma polmonare non a piccole cellule (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC) che comprende gli altri tre istotipi e rappresenta complessivamente il 75-80% di tutti i carcinomi polmonari. Non solo il NSCLC rispetto al SCLC è la tipologia tumorale maggiormente diffusa, ma è anche quella che presenta i migliori risultati terapeutici e prognostici. Il SCLC è infatti un tumore altamente aggressivo a rapida crescita e con diffusione metastatica precoce e sebbene presenti un'alta sensibilità ai trattamenti radio e chemioterapici, la prognosi rimane scarsa con una sopravvivenza mediana compresa tra i 10 e i 16 mesi se il tumore si presenta in forma limitata e si riduce a 6-12 mesi per la forma estesa (Ciombor and Rocha Lima, 2006).

Tutti i principali istotipi tumorali sono associati con il fumo di sigaretta anche se un più stretto legame si è osservato per il SCC e il microcitoma mentre l'ADK è più frequente tra i non fumatori (Sun *et al.*, 2007). Negli ultimi decenni si è verificato un cambiamento nell'incidenza dei diversi tipi istologici con un progressivo incremento per l'ADK ed una parallela riduzione del SCC; si è ipotizzato che tale andamento sia riconducibile ad una modificazione nella produzione delle sigarette. La produzione di sigarette con filtro e la riduzione del contenuto di nicotina modificherebbero la maniera di fumare, favorendo una maggiore profondità dell'inalazione e della durata della ritenzione del fumo, con un aumento di accumulo di cancerogeni nelle zone periferiche del polmone, in cui è solito svilupparsi l'ADK (Gabrielson, 2006).

### 3.1.5 Diagnosi, stadiazione e prognosi

La sintomatologia del tumore polmonare è alquanto aspecifica e diviene manifesta per lo più negli stadi avanzati, sicché la diagnosi è generalmente posta tardivamente o il tumore viene individuato in maniera occasionale.

Le manifestazioni cliniche più comuni, in relazione alla sede, dimensione, estensione, sono rappresentate da tosse, episodi bronchitici recidivanti nelle forme centrali mentre nelle forme periferiche prevale il dolore toracico; la dispnea è un sintomo frequente in entrambi i casi.

La radiografia del torace e la tomografia assiale computerizzata (TC) sono le modalità più comunemente usate nella valutazione iniziale di un sospetto diagnostico, anche se la TC permette una valutazione più accurata delle lesioni di piccole dimensioni e di tutte le strutture toraciche e mediastiniche e viene inoltre eventualmente utilizzata per valutare l'esistenza di metastasi a distanza.

Le informazioni diagnostiche così ottenute vengono integrate con la tomografia a emissione di positroni (PET) che permette di ottenere informazioni morfologico-funzionali in merito all'attività metabolica della lesione, utile in particolare nello studio del nodulo polmonare solitario oltre che nella valutazione dell'eventuale interessamento linfonodale secondario, toracico ed extratoracico (Beadsmoore and Screatton, 2003).

Indispensabile per la diagnosi è la definizione cito-istopatologica della neoplasia. Le opzioni terapeutiche e la prognosi sono strettamente associate all'istotipo tumorale (NSCLC vs SCLC) e alla stadio di presentazione della neoplasia, che rappresentano i principali requisiti per la programmazione del trattamento del tumore polmonare. La stadiazione del tumore polmonare viene effettuata utilizzando il sistema internazionale TNM (*Tumor Nodes Metastasis*), adottato dall'*Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) e dall'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC), che consente una descrizione dell'estensione anatomica della neoplasia mediante la valutazione di tre parametri: dimensioni del tumore primitivo (T), coinvolgimento di linfonodi regionali (N) e presenza di metastasi a distanza (M) (Mountain, 1997; Mountain, 2000) (tabella 2). La combinazione dei vari parametri permette la distinzione in categorie (tabella 3), che si differenziano per le diverse opzioni terapeutiche e la prognosi e che rappresentano i diversi stadi di malattia (I-IV).

La stadiazione clinica (cTNM) è basata sulle informazioni ottenute dalle indagini diagnostiche e viene utilizzata per impostare il trattamento più opportuno.

La stadiazione patologica (pTNM) è basata sulle informazioni istopatologiche ottenute dall'esame istologico del campione ottenuto con la resezione chirurgica e fornisce una valutazione più accurata dell'estensione della malattia, fornendo informazioni riguardo la radicalità dell'intervento chirurgico, l'eventuale coinvolgimento dei linfonodi loco-regionali, la classificazione istologica e il grado di differenziazione della neoplasia.

La corretta stadiazione della neoplasia è quindi un elemento imprescindibile per definire il trattamento terapeutico più adatto ed efficace. Nel trattamento del paziente con NSCLC, la resezione chirurgica radicale, quando possibile, è la metodica terapeutica di elezione, in quanto in grado di mirare ad una guarigione completa. Negli stadi avanzati la scelta terapeutica dipende da molteplici fattori quali l'estensione dell'interessamento linfonodale, le strutture anatomiche coinvolte, il *performance status*. In questi casi le opzioni praticabili sono rappresentate dalla resezione chirurgica preceduta o seguita da chemio-radioterapia o dal solo trattamento medico (Alberts, 2007).

La sopravvivenza globale, rimasta pressoché invariata negli ultimi venti anni, è del 10-15% a 5 anni (Parkin *et al.*, 2005) ed è fortemente influenzata dallo stadio della malattia. La sopravvivenza a 5 anni dal trattamento prevista per i pazienti allo stadio I varia tra il 60 e l'80 %, allo stadio II è compresa tra il 40 e il 55%, mentre si riduce al 20-25% per i pazienti allo stadio IIIA, al 7% per lo stadio IIIB e solo l'1% dei pazienti al IV stadio sopravvive a 5 anni dalla diagnosi (Mountain, 1997; Scott *et al.*, 2007; Rami-Porta *et al.*, 2007).

Attualmente è in corso una revisione del sistema TNM, sulla base di dati provenienti da oltre 20 nazioni, che vedrà la sua approvazione definitiva entro il 2009. Le modifiche proposte riguarderebbero la ridefinizione dei parametri T ed M, in quanto sembrerebbe esserci un comportamento biologico diverso (in termini di sopravvivenza) dei tumori in base alla dimensione ed alla localizzazione intra-toracica o disseminata delle metastasi, con l'obiettivo di avere categorie prognostiche più precise (Rami-Porta *et al.*, 2009).

### 3.1.6 Diagnosi precoce del NSCLC e screening

La prognosi del carcinoma polmonare è ad oggi ancora scarsa e la sopravvivenza a 5 anni è rimasta pressoché invariata negli ultimi 20 anni, nonostante il progredire degli approcci diagnostici e terapeutici. Al momento della diagnosi in circa il 75% dei casi la malattia è in fase avanzata, localmente o più frequentemente disseminata. Inoltre, sebbene il trattamento chirurgico in molti casi appaia risolutivo, la malattia può recidivare con un tasso stimato che varia tra il 30 e il 70% dei casi, a seconda dello stadio della malattia e del periodo di osservazione (Al-Kattan *et al.*, 1997; Martini *et al.*, 1995; Westeel *et al.*, 2000) e vi è un rischio di sviluppare un secondo tumore polmonare primitivo o metacrono, dell'1-2% per paziente/anno (Johnson *et al.*, 1997). La mancanza di manifestazioni cliniche nelle fasi iniziali della malattia e l'inefficacia terapeutica negli stadi avanzati, rappresentano le principali cause dell'alta mortalità del tumore polmonare.

La diagnosi precoce appare quindi un presupposto fondamentale per ottenere i migliori risultati terapeutici e migliorare quindi la prognosi.

Identificare una neoplasia ad uno stadio iniziale, nel quale non ha ancora causato sintomi ed in cui un intervento precoce è in grado di modificare il corso naturale della malattia, è l'obiettivo dello screening oncologico.

Il ruolo dello screening per il tumore polmonare rimane ancor oggi una questione dibattuta. Negli anni 70'-80' studi randomizzati controllati effettuati in tre importanti Centri americani (*Mayo Clinic*, *John Hopkins Medical Institution* e *Memorial Sloan Kettering Cancer Centre*) condotti su soggetti di età superiore ai 45 anni, forti fumatori (almeno un pacchetto di sigarette/die), sottoposti a radiografia del torace associata o meno ad analisi citologica dell'escreato, non hanno mostrato alcun miglioramento nella mortalità. Tuttavia, lo studio della *Mayo Clinic* osservò una maggiore incidenza del carcinoma polmonare nella popolazione sottoposta a controlli periodici rispetto ad una popolazione di controllo ed un significativo vantaggio in termini di resecabilità e sopravvivenza per stadio (Humphrey *et al.*, 2004; Manser *et al.*, 2003). Con lo sviluppo ed il perfezionamento delle metodiche d'*imaging* si è riaperto l'interesse per l'applicabilità di programmi di screening al carcinoma polmonare. La TC spirale a basso dosaggio è una metodica più sensibile rispetto al radiogramma del torace, in grado di rilevare anche alterazioni di pochi millimetri con una limitata dose di radiazioni. Nel corso degli anni 90' sono

iniziati vari studi che hanno utilizzato tale metodica nello screening di soggetti ad alto rischio. Lo studio denominato *Early Lung Cancer Action Project (ELCAP)* ha confrontato l'impiego della TC spirale a basso dosaggio e del radiogramma standard del torace su 1.000 volontari, fumatori asintomatici di età superiore a 60 anni, riscontrando con la TC neoplasie in stadio iniziale con una frequenza 6 volte maggiore rispetto all'utilizzo del radiogramma del torace (Henschke *et al.*, 1999). Nell'*International Early Lung Cancer Action Program*, condotto su 31567 partecipanti di cui 27456 hanno ripetuto le indagini di screening con un follow-up mediano di 3.3 anni, la diagnosi di carcinoma polmonare è stata ottenuta in 484 casi di cui l'85% in stadio I e gli autori hanno concluso che lo screening annuale con la TC in soggetti ad alto rischio permette di porre diagnosi quando la neoplasia è curabile, con una sopravvivenza stimata a 10 anni dell'88% (Henschke *et al.*, 2006). Risultati discordanti sono stati ottenuti in un'altro studio pubblicato nel 2007 su 3246 soggetti ad alto rischio, fumatori ed ex-fumatori, sottoposti a TC annuale con un follow-up mediano di 3.9 anni. Rispetto ai risultati attesi in termini di incidenza, interventi di resezione tumorale, diagnosi in stadio avanzato e mortalità, le diagnosi sono aumentate di 3 volte, gli interventi chirurgici di 10 volte mentre sono rimaste pressoché invariate le diagnosi in stadio avanzato e la mortalità (Bach *et al.*, 2007a).

Sebbene l'utilizzo delle moderne metodiche d'*imaging* permetta di rilevare un'alta percentuale di lesioni polmonari neoplastiche agli stadi iniziali, non sembra in grado di ridurre le diagnosi in stadio avanzato e la mortalità. Tali risultati sono probabilmente dovuti al fatto che lo screening radiologico è in grado di individuare precocemente le forme tumorali a lenta crescita o indolenti portando ad una sovra-diagnosi, ma non permette di prevenire le forme più aggressive e precocemente metastatiche. Poiché la probabilità di diagnosi di un tumore è in relazione con il suo indice di accrescimento, i tumori a lenta crescita hanno una maggior probabilità di essere individuati in fase asintomatica rispetto a quelli a rapida crescita, che si manifestano clinicamente in maniera precoce. Si deve tener quindi presente nella valutazione del risultato di un programma di screening, la possibilità che l'incremento del numero di tumori diagnosticati in stadio iniziale sia legato alla maggiore probabilità di individuare tumori silenti con una lunga fase pre-clinica (*length-time bias*), con un apparente aumento della sopravvivenza legato anche ad un anticipo diagnostico (*lead-time bias*) e al riscontro di tumori indolenti che

con alta probabilità non si sarebbero mai manifestati (*overdiagnosis bias*) (Patz *et al.*, 2000a; Gomez and Silvestri, 2008; Black, 2007; Reich, 2008).

Inoltre sebbene le moderne tecniche d'*imaging* permettono di ottenere precise informazioni anatomiche e morfologiche e con l'utilizzo della PET anche indicazioni biochimiche e metaboliche delle lesioni individuate, non sempre questi dati sono di per se sufficienti per porre una diagnosi definitiva. Questo comporta che una percentuale non trascurabile di soggetti sottoposti a screening con queste metodiche, risulta falsamente positiva alle indagini e venga sottoposta a procedure invasive per lesioni risultate poi benigne o, nell'impossibilità di una diagnosi istologica pre-operatoria, a resezione chirurgica non necessaria. In alcuni studi che hanno utilizzato la TC spirale nello screening di soggetti ad alto rischio, la percentuale di procedure diagnostiche invasive per lesioni poi risultate benigne varierebbe tra il 20 e il 55% (Diederich and Wormanns, 2004), mentre la percentuale degli interventi chirurgici per noduli polmonari benigni sarebbe di circa il 14-16% a seconda degli studi (Veronesi *et al.*, 2008; Swensen *et al.*, 2005).

Alla luce di tali dati, lo screening del tumore polmonare non è al momento raccomandabile nei soggetti asintomatici; evidenze riguardo il reale beneficio in termini di riduzione della mortalità potranno essere tratte dai risultati degli studi randomizzati controllati in fase di valutazione (Bach *et al.*, 2007; Lopes Pegna and Picozzi, 2009).

### **3.1.7 Approccio molecolare alla diagnosi precoce**

Le metodiche d'*imaging* attualmente in uso per la diagnosi del tumore polmonare, TC e PET, permettono di riscontrare lesioni anche di piccole dimensioni, tuttavia criteri morfologici e/o funzionali non sono sempre sufficienti per porre una diagnosi definitiva. Ciò comporta la necessità di ricorrere a procedure invasive (metodiche endoscopiche broncologiche, agoaspirato transtoracico, biopsia chirurgica) che in un numero non trascurabile di casi escludono la diagnosi di tumore, risultando alla fine non necessarie. Altro problema è la gestione del riscontro di lesioni nodulari solitarie di piccole dimensioni (<1 cm), di frequente riscontro occasionale alla TC, di non sicuro inquadramento radiologico o non facilmente tipizzabili con la biopsia. La strategia ideale nella gestione di questi casi è legata alla probabilità che la lesione stessa ha di essere maligna: se bassa è raccomandabile un follow-up

clinico-radiologico con le ovvie ripercussioni psicologiche per il paziente, che vive nella continua preoccupazione di un viraggio verso la malignità, nel caso opposto prevale l'atteggiamento interventistico, pur sempre gravato da una percentuale non trascurabile di falsi positivi nonché di morbilità e mortalità (Gould *et al.*, 2007; Chen and Gould, 2008; Wahidi *et al.*, 2007).

La comprensione degli eventi molecolari che conducono all'insorgenza e alla progressione del NSCLC è essenziale per migliorare la diagnosi precoce, il trattamento e la prognosi. La cancerogenesi polmonare è un processo multifasico caratterizzato dall'accumulo di successive alterazioni genetiche e anomalie epigenetiche in geni critici, che contribuiscono all'iniziazione/insorgenza, sviluppo e progressione del tumore polmonare (Sekido *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2007; Risch and Plass, 2008; Brambilla and Gazdar, 2009). Il progredire delle metodiche di biologia cellulare e molecolare ha permesso di identificare e caratterizzare alterazioni genetiche e anomalie molecolari frequentemente associate al tumore polmonare (Fong *et al.*, 2003; Panani and Roussos, 2006; Breuer *et al.*, 2005; Osada and Takahashi, 2002; Ocak *et al.*, 2009).

L'approccio molecolare, complementare rispetto alle metodiche d'*imaging*, potrebbe migliorare la specificità delle indagini attualmente in uso, contribuendo ad escludere oltre che a confermare la diagnosi di tumore polmonare (Mutti 2008; Greenberg and Lee, 2007; Patz, 2006).

Molti gruppi di ricerca sul carcinoma polmonare sono impegnati nello studio e validazione di *biomarkers* da applicare nella stratificazione del rischio, nella diagnosi precoce, nella scelta terapeutica e nella valutazione della risposta al trattamento, come indicatori prognostici e nel monitoraggio e riscontro di recidive tumorali (Greenberg and Lee 2007; Brambilla *et al.*, 2003; Sung and Cho 2008; Anglim *et al.*, 2008; Scott and Salgia, 2008; Bharti *et al.*, 2007; Ocak *et al.*, 2009).

L'attenzione si è indirizzata in maniera particolare su metodiche poco o per nulla invasive e quindi particolarmente adatte a scopo di ricerca, da proporre ai soggetti a rischio per un precoce riconoscimento della malattia e facilmente accettabili anche in soggetti asintomatici. Un notevole impulso a tali studi è stato reso possibile dallo sviluppo di nuove tecnologie indirizzate verso lo studio della genomica, proteomica, metabolomica.

In matrici biologiche facilmente accessibili come l'aria esalata, sia nella componente gassosa che nella componente di umidità esalata (CAE) ed il sangue, è possibile identificare alterazioni molecolari frequentemente associate al tumore polmonare (Poli *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2003a; Horvath *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2009; Andriani *et al.*, 2004; Patz *et al.*, 2007), fornendo informazioni aggiuntive potenzialmente in grado di incrementare l'accuratezza diagnostica delle metodiche attualmente in uso nella diagnosi del carcinoma polmonare.

Tali metodiche possono inoltre essere d'aiuto nella ricerca di fattori prognostici, in grado di individuare pazienti per i quali sia necessario programmare strategie terapeutiche integrative alla chirurgia e nello studio dei meccanismi molecolari coinvolti nella risposta a specifici farmaci, in modo da ottimizzare i protocolli terapeutici per garantire la massima efficacia ed il minimo rischio d'insorgenza di gravi effetti collaterali (Singhal *et al.*, 2005; Mizuguchi *et al.*, 2007; Rosell *et al.*, 2006).

## **3.2 BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA**

La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) è una patologia cronica infiammatoria delle vie aeree, prevenibile e trattabile associata a significativi effetti e comorbidità extrapolmonari che possono contribuire alla sua gravità.

Si caratterizza per presenza di un'ostruzione cronica al flusso aereo non completamente reversibile e in genere progressiva, associata ad un'abnorme risposta infiammatoria ad inquinanti ambientali (Rabe *et al.*, 2007).

### **3.2.1 Epidemiologia e fattori di rischio**

Prevalenza, morbilità e mortalità della BPCO variano da Paese a Paese e anche all'interno di una stessa Nazione vi possono essere diversità tra gruppi di popolazione, ma in generale sono direttamente correlate alla prevalenza dell'abitudine tabagica (Rabe *et al.*, 2007).

Secondo stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità l'incidenza della BPCO è in continuo aumento per la persistenza dei fattori di rischio e l'aumento dell'età media della popolazione e nel 2030 rappresenterà la terza causa di morte a livello mondiale (WHO, 2008).

Il principale fattore di rischio nell'insorgenza della BPCO è rappresentato dal fumo di sigaretta e si stima che oltre il 50% dei fumatori andrà incontro all'insorgenza di BPCO nel corso della sua vita (Lundback *et al.*, 2003; Marsh *et al.*, 2006; Rennard and Vestø, 2006). Anche l'esposizione al fumo passivo può contribuire all'insorgenza di BPCO (Eisner *et al.*, 2005).

Altri fattori sembrano avere un ruolo importante nell'insorgenza della patologia (Salvi and Barnes 2009; Viegi *et al.*, 2007). Studi epidemiologici hanno mostrato come l'esposizione occupazionale a polveri organiche ed inorganiche, agenti chimici e fumi, sia responsabile del 15-19% dei casi di BPCO e i settori lavorativi in cui il rischio di BPCO appare maggiore sarebbero rappresentati dai settori metallurgico, minerario, edile, agricolo, tessile e chimico (Trupin *et al.*, 2003; Balmes, 2005; Hnizdo *et al.*, 2002). Nei soggetti non fumatori che sviluppano la malattia, circa il 30% sarebbe riconducibile ad un'esposizione professionale (Rabe *et al.*, 2007).

Rappresentano un importante fattore di rischio per la BPCO anche l'inquinamento *indoor* da biomasse combustibili usate per cucinare e riscaldare ambienti

scarsamente ventilati ed anche lo stato socioeconomico è stato proposto da alcuni autori come fattore predisponente, presumibilmente perchè esprime il grado di esposizione a inquinanti ambientali *outdoor* e *indoor* (Rabe *et al.*, 2007).

Il ruolo dell'inquinamento atmosferico nel favorire l'insorgenza della BPCO è ancora poco chiaro; sebbene si sia osservata un'associazione tra alte concentrazioni di inquinanti aerodispersi e riacutizzazioni di BPCO, restano da chiarire i reali rapporti tra esposizione ad inquinanti atmosferici e incidenza della malattia (Sunyer, 2001; Salvi and Barnes, 2009).

Anche fattori genetici sembrano implicati nell'insorgenza della patologia e fra questi il più documentato è rappresentato dal deficit di alfa-1antitripsina, glicoproteina con attività antiproteasica prodotta dal fegato e in minor misura anche da macrofagi e dalle cellule epiteliali respiratorie. La proteina è codificata da un gene polimorfico e se ne riconoscono oltre 70 varianti, di cui circa una ventina si associano a variazioni rilevanti quantitative e/o qualitative. Il deficit di alfa-1antitripsina determina una maggior suscettibilità ai danni indotti dal fumo di sigaretta e ad altri inquinanti ambientali e nelle forme severe a sviluppo di enfisema polmonare (Russi, 2008).

### **3.2.2 Patogenesi**

Fondamentale nell'insorgenza della BPCO è la risposta infiammatoria ad agenti irritanti come il fumo di sigaretta od altri inquinanti aerodispersi, che si riflette nell'attivazione e nel richiamo di cellule infiammatorie (macrofagi, neutrofilo e linfociti T) a livello delle vie aeree e del parenchima polmonare (Spurzem and Rennard, 2005). Anche le cellule epiteliali alveolari sono implicate nell'attivazione del processo infiammatorio, con produzione di mediatori e molecole di adesione per i neutrofilo. La risposta infiammatoria iniziata in seguito all'inalazione di composti esogeni ossidanti od irritanti, viene perpetuata dal rilascio di mediatori pro-infiammatori, di ossidanti endogeni ed enzimi proteolitici da parte delle cellule infiammatorie stesse, in grado di danneggiare il parenchima polmonare e di amplificare il processo infiammatorio.

Strettamente associati all'infiammazione, altri due processi sono ritenuti importanti nella patogenesi della BPCO: lo stress ossidativo e lo squilibrio del sistema proteinasi/antiproteinasi (Bartal, 2005; Repine *et al.*, 1997). Il rilascio di ROS e di

radicali liberi di origine endogena può associarsi a ossidanti esogeni nel causare un danno ossidativo a carico di molecole biologiche (lipidi, proteine, DNA) e contribuire a determinare uno stato di stress ossidativo che si associa ed amplifica la risposta infiammatoria. Inoltre, lo stress ossidativo sembrerebbe contribuire ad inattivare alcune antiproteinasi ed attivare proteinasi, promuovendo in tal maniera il danno tissutale e l'infiammazione. Il continuo danno infiammatorio e il conseguente processo riparativo, determinano alterazioni anatomo-patologiche caratteristiche, che interessano le vie aeree prossimali, le vie aeree periferiche, il parenchima polmonare e le strutture vascolari del polmone (Hogg, 2004), (figura 6). L'ostruzione cronica delle vie aeree, caratteristica della BPCO, è dovuta a più fattori, alcuni irreversibili (fibrosi della parete bronchiolare, riduzione del ritorno elastico, distruzione del supporto alveolare) mentre altri (accumulo di cellule infiammatorie, muco ed essudato nei bronchioli, contrazione della muscolatura liscia bronchiolare) possono essere parzialmente reversibili.

Le alterazioni a carico del parenchima polmonare, distruzione dei setti alveolari e dilatazione permanente degli alveoli, conduce ad una riduzione degli scambi gassosi fino ad insorgenza di ipossiemia ed ipercapnia (Rabe *et al.*, 2007).

### **3.2.3 Sintomatologia e diagnosi**

La sintomatologia non sempre è correlabile al grado di severità della patologia che viene valutata sulla base del grado di ostruzione. I sintomi caratteristici della BPCO sono la tosse, l'espettorazione e la dispnea cronica e progressiva.

Nelle fasi iniziali della BPCO la sintomatologia può essere assente e la malattia può essere diagnosticata solo con la spirometria. La tosse cronica e l'espettorazione possono anche precedere di molti anni lo sviluppo di limitazione al flusso aereo. Il decorso clinico può essere aggravato da episodi di acuto peggioramento della sintomatologia di entità superiore alla normale variabilità giornaliera, definiti riacutizzazioni, che richiedono terapie mediche addizionali e che sono causate prevalentemente da infezioni o anche dall'esposizione ad inquinanti ambientali, anche se in un terzo dei casi la causa non è individuabile (Celli and Barnes, 2007; Wedzicha, 2002). Le riacutizzazioni della BPCO accelerano il progressivo declino della funzionalità polmonare e rappresentano importanti cause di morbilità e mortalità della malattia (Wedzicha, 2002;

Donaldson *et al.*, 2002; Seemungal *et al.*, 2000). Nella fase più avanzata della malattia, l'ostruzione delle piccole vie aeree, la distruzione parenchimale e le alterazioni dei vasi polmonari riducono gli scambi gassosi a livello polmonare causando un'insufficienza respiratoria cronica che può evolvere verso il "cuore polmonare cronico".

La spirometria è essenziale per la diagnosi di BPCO e fornisce un'indicazione utile della gravità delle alterazioni anatomico-patologiche. Generalmente le alterazioni infiammatorie e strutturali delle vie aeree aumentano con l'aumentare della gravità della malattia e persistono nonostante la cessazione dell'abitudine tabagica.

Le prove di funzionalità respiratoria mostrano nella BPCO un quadro di deficit funzionale di tipo ostruttivo, con una riduzione sia del VEMS (Volume Espiratorio Massimo in un Secondo) che della CVF (Capacità Vitale Forzata) rispetto ai limiti inferiori di normalità dei valori di riferimento adottati per il soggetto.

La valutazione di gravità della malattia si basa sull'entità dei sintomi, sulla gravità delle alterazioni spirometriche e sulla presenza di complicanze (insufficienza respiratoria e scompenso cardiaco destro, calo ponderale ed ipossiemia arteriosa).

La presenza di limitazione al flusso aereo è definita secondo le linee guida GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) (Rabe *et al.*, 2007) da un rapporto VEMS/CVF post-broncodilatatore  $<0.7$  e sono distinguibili quattro stadi di malattia (tabella 4), in base al valore del VEMS rispetto al valore teorico atteso.

La diagnosi di BPCO dovrebbe essere presa in considerazione in tutti i pazienti che presentino dispnea, tosse cronica o espettorazione e/o una storia d'esposizione ai fattori di rischio per la malattia e confermata dalla spirometria per il riscontro di deficit ostruttivo non completamente reversibile dopo broncodilatatore. Nei casi dubbi, possono essere impiegati nella diagnosi differenziale anche le tecniche d'*imaging*, i test funzionali con la valutazione dei volumi polmonari statici e l'emogasanalisi arteriosa.

L'assenza di sintomi nelle prime fasi della patologia e/o la loro scarsa specificità anche in presenza di una ostruzione di grado lieve-moderato, peraltro rilevabile solo con la spirometria, fanno sì che la malattia sia spesso misconosciuta e diagnosticata tardivamente o in alcuni casi non correttamente diagnosticata (Tinkelman *et al.*, 2006). La precoce individuazione della malattia, il suo corretto inquadramento ed il monitoraggio della patologia e delle sue riacutizzazioni, sono

importanti per l'ottimizzazione delle strategie terapeutiche e riabilitative. Sebbene solo la cessazione dell'abitudine tabagica si sia dimostrata come l'unico intervento efficace in grado di mutare il decorso clinico della malattia e di rallentare e mitigare il declino a lungo termine della funzionalità polmonare, la terapia farmacologica si è comunque dimostrata efficace nel ridurre i sintomi, migliorare la tolleranza allo sforzo, la dispnea e l'affaticabilità, ridurre il numero e la severità delle riacutizzazioni, migliorando la qualità di vita del paziente (Anzueto, 2006; Rabe *et al.*, 2007).

### **3.2.4 Utilità di indicatori non invasivi nella BPCO**

La BPCO è una malattia eterogenea in cui l'estensione del processo infiammatorio e il conseguente processo riparativo variano in base all'entità dell'esposizione ai fattori di rischio e alla suscettibilità individuale, potendo manifestarsi con un quadro prevalentemente bronchitico od enfisematoso. Inoltre, in alcuni casi la diagnosi differenziale con altre patologie ostruttive polmonari, come ad esempio l'asma, può non essere semplice.

Biomarcatori di flogosi e stress ossidativo, processi fisiopatologici caratteristici della BPCO, potrebbero essere d'aiuto per individuare i soggetti a rischio per l'insorgenza della patologia e per la diagnosi precoce della malattia, quando ancora la sintomatologia non è chiaramente manifesta e non si sono ancora realizzate modificazioni strutturali irreversibili, o per individuare differenti tipologie di pazienti che rispondono diversamente ai trattamenti terapeutici.

Inoltre, tali indicatori potrebbero contribuire a migliorare la comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base della patologia, portando all'individuazione di potenziali bersagli per nuove terapie, ma anche permettere di valutare il grado di severità della patologia e di monitorarne il decorso, riconoscendo precocemente le riacutizzazioni (Snell and Newbold 2008; Tzortzaki *et al.*, 2006).

Sulla scorta di tali considerazioni, diversi gruppi di ricerca si stanno occupando dell'individuazione e validazioni di biomarcatori determinati in varie matrici biologiche in pazienti con BPCO (Borril *et al.*, 2008; Hurst *et al.*, 2006; Taylor, 2009; Sin and Vesto, 2009).

### **3.3 PNEUMOPATIE INTERSTIZIALI**

Le Pneumopatie Interstiziali (ILD) sono un gruppo eterogeneo e ampio di entità clinico-patologiche caratterizzate da un grado variabile di infiammazione e fibrosi, che coinvolgono il parenchima e l'interstizio polmonare (Riu *et al.*, 2007; King, 2005; ATS/ERS, 2002). La loro classificazione è stata a lungo problematica proprio a causa della loro eterogeneità, ampia variabilità nella presentazione clinica e per la mancanza di una precisa e consistente definizione diagnostica.

Sono stati proposti vari schemi classificativi in base della presentazione clinica (acuta o cronica), al pattern radiologico o alla risposta alla terapia steroidea. Tuttavia il sistema classificativo più utilizzato è quello che si basa sul criterio eziologico, che permette di distinguere le ILD in due gruppi: ad eziologia nota o ad eziologia sconosciuta.

Nel primo gruppo rientrano patologie causate dall'esposizione ambientale od occupazionale a polveri organiche od inorganiche, fumi, gas o vapori, assunzione di alcuni farmaci, esposizione a radiazioni ed associate a disordini sistemici.

Nel gruppo delle patologie interstiziali a causa sconosciuta, che costituiscono circa il 65% delle ILD, rientrano le pneumopatie interstiziali idiopatiche (IIP) e la sarcoidosi, che sono le due entità cliniche più frequenti (Demedts *et al.*, 2001; Riu *et al.*, 2007; Thomeer *et al.*, 2001). Alcuni anni fa è stata proposta una revisione nella definizione e nei criteri diagnostici di alcune pneumopatie, condivisa a livello internazionale, che ha riguardato in particolare le IIP, che sulla base di criteri clinici, radiologici e istopatologici permette di differenziare la fibrosi polmonare idiopatica (IPF) da altre sei diverse entità patologiche (ATS/ERS, 2002).

Lo schema classificativo delle ILD è rappresentato in figura 7.

#### **3.3.1 Epidemiologia e fattori di rischio**

Studi epidemiologici riguardanti le ILD risultano essere particolarmente difficoltosi poiché esistono alcuni fattori limitanti il riconoscimento delle stesse pneumopatie e dei loro possibili agenti eziologici. Tra questi vi sono la complessità diagnostica e classificativa delle ILD, la bassa prevalenza delle patologie nella popolazione generale, la variabilità nelle manifestazioni cliniche, la mancanza di test diagnostici specifici e sensibili, spesso causa di un ritardo diagnostico e di misdiagnosi, la

necessità in alcuni casi di effettuare la biopsia polmonare per la diagnosi definitiva (King *et al.*, 2005; Demedts *et al.*, 2001).

Dati presenti in letteratura mostrano una prevalenza complessiva per le ILD di 81 casi per 100.000 nei maschi e di 67/100.000 per le femmine (Coultas *et al.*, 1994). L'eziologia della maggior parte delle ILD è ancora sconosciuta anche se fattori genetici, ambientali e l'interazione fra questi sembrano avere un ruolo importante nell'insorgenza di tali patologie (Verleden *et al.*, 2001; Steele and Brown 2007). Dati epidemiologici supportano l'ipotesi che fattori ambientali ed occupazionali giochino un ruolo di rilievo nello sviluppo di IPF e sarcoidosi (Taskar and Coultas 2008), le due patologie più frequenti tra le ILD. È stata osservata una significativa associazione tra aumentato rischio d'insorgenza di IPF ed esposizione a fumo di sigaretta, metalli (Si, Al, Ni, Co) polveri del legno (pino e mogano), lavori in ambiente agricolo, esposizione a muffe, allevamento del bestiame (Taskar and Coultas 2006; Baumgartner *et al.*, 1997; Baumgartner *et al.*, 2000; Pinheiro *et al.*, 2008). L'esposizione a polveri organiche, insetticidi, ambienti con alta carica microbica, la fornitura di materiali da costruzione e giardinaggio sono fattori associati con un aumentato rischio di insorgenza di sarcoidosi mentre il fumo di sigaretta ed esposizioni a polveri inorganiche o legno, metalli sembrano essere fattori negativamente associati con la malattia (Newman *et al.*, 2004; Barnard *et al.*, 2005; Taskar and Coultas, 2008).

### **3.3.2 Patogenesi**

La patogenesi delle ILD è alquanto complessa; sono comuni infiammazione e fibrosi di grado variabile, con interessamento non solo della parete alveolare ma anche delle strutture acinari e bronchiolari.

La risposta polmonare ad un danno innescato da fattori di varia natura (microbiologica, autoimmune, tossico-irritativa), innesca una risposta infiammatoria che si esaurisce normalmente con la riparazione del danno. La regolazione e l'interazione tra l'infiammazione ed il processo riparativo, determinano l'esito finale della risposta al danno. La risposta infiammatoria, grazie alla produzione da parte delle cellule dell'immunità di citochine e chemochine, è capace di stimolare un meccanismo di riparazione che coinvolge fibroblasti e miofibroblasti che

proliferano e producono matrice extracellulare; la deposizione di materiale fibrotico conduce ad un rimodellamento del tessuto polmonare.

Per lungo tempo si è ritenuto che le ILD fossero il risultato di un cronico processo infiammatorio ad un iniziale danno dell'epitelio alveolare, la cui cronicizzazione coinvolge il tessuto interstiziale ed i vasi con la comparsa di fibrosi interstiziale. Crescenti evidenze suggeriscono invece che la fibrosi possa procedere anche in maniera indipendente dal processo infiammatorio, come conseguenza di un'abnorme risposta dell'epitelio alveolare al danno, la cui entità e grado probabilmente dipendono da multipli fattori quali la suscettibilità genetica, fattori ambientali e la natura del danno iniziale (Thannickal *et al.*, 2004; Corvol *et al.*, 2009). Sempre più importanza nel processo patogenetico che conduce alle ILD, sembra assumere l'epitelio alveolare, che sembra avere un ruolo attivo sia nel ripristino della normale architettura alveolare che nello sviluppo della fibrosi.

La fibrosi progressiva che causa il rimodellamento tissutale sembrerebbe legata ad una disregolazione del processo riparativo, indotta da alterazioni a carico del microambiente alveolare in seguito al rilascio di mediatori solubili (chemochine, citochine, fattori di crescita, eicosanoidi).

Anche lo stress ossidativo, un'incrementata neoangiogenesi, lo squilibrio fra deposizione e rimodellamento della matrice extracellulare, perdita di capacità rigenerativa, ed un aumento dell'apoptosi delle cellule epiteliali alveolari, contribuiscono alla disregolazione del processo riparativo.

Queste alterazioni favoriscono la perdita delle cellule epiteliali e l'accumulo dei fibroblasti e miofibroblasti portando ad un'inesorabile e progressiva fibrosi (Thannickal *et al.*, 2004).

### **3.3.3 Sintomatologia e Diagnosi**

Il quadro clinico appare spesso aspecifico e spesso sovrapponibile nelle diverse forme di ILD. La sintomatologia è caratterizzata da dispnea ingravescente, tosse secca ed astenia. Nelle fasi conclamate della malattia i test di funzionalità respiratoria evidenziano un quadro di tipo restrittivo, con una riduzione della capacità polmonare totale, della capacità vitale e del volume residuo; può essere presente però anche un quadro ostruttivo o misto. Particolarmente compromesso, anche nelle fasi precoci del processo morboso, è lo scambio dei gas respiratori,

con riduzione della diffusione al monossido di carbonio (DLCO) e ipossiemia. Obbiettivamente, con la progressione della malattia, è possibile apprezzare crepitazioni nelle porzioni medio-basali polmonari bilateralmente.

Tali alterazioni funzionali riflettono la distorsione architetturale e la perdita di elasticità del parenchima polmonare. Il coinvolgimento parenchimale è spesso grossolano, con aree di tessuto polmonare risparmiato. La radiografia del torace può essere negativa o aspecifica nel 10-20% dei casi, soprattutto nelle fasi iniziali. Particolarmente utile appare l'utilizzo della tomografia computerizzata ad alta definizione (HRCT), sia ai fini diagnostici che per la valutazione dell'evoluzione della malattia. Con tale metodica è possibile valutare sia il pattern che l'estensione delle alterazioni e la distribuzione anatomica delle lesioni.

È possibile visualizzare differenti quadri radiologici con infiltrati reticolo-nodulari o interstiziali bilaterali diffusi, che possono essere correlati a differenti alterazioni parenchimali: aree con aspetto a "vetro smerigliato" rappresentano zone di parenchima polmonare sede di intensa flogosi (alveolite); aree con aspetto a "nido d'ape" sono determinate da alterazioni cistiche o bronchiectasiche associate al processo fibrotico.

I sintomi aspecifici e l'esordio frequentemente subclinico rendono la diagnosi delleILD complessa e spesso è necessario escludere altre patologie polmonari prima di giungere ad una diagnosi definitiva.

Nel caso di sospetto diagnostico diILD, l'anamnesi risulta essere estremamente importante e deve andare ad indagare le possibili esposizioni ambientali ed occupazionali, l'uso di farmaci, la storia clinica del paziente. La diagnosi delleILD spesso richiede indagini invasive, come il lavaggio broncoalveolare ed in molti casi una conferma istologica su biopsie ottenute con metodiche endoscopiche o chirurgiche (Riu *et al.*, 2007; Reynolds, 1998).

Il trattamento delleILD si fonda sul concetto che la soppressione dell'infiammazione previene la progressione della fibrosi e si basa sull'utilizzo di farmaci cortocosteroidi e/o immunosoppressori, anche se la risposta terapeutica e la scelta farmacologica viene effettuata in base alla patologia specifica, allo stato di attività della malattia e alle condizioni cliniche del paziente (King, 2005).

### 3.3.4 Utilità di indicatori non invasivi nelle ILD

L'individuazione di biomarcatori non invasivi da adottare nella diagnosi e nel monitoraggio delle ILD è di grande interesse a causa delle difficoltà diagnostiche delle ILD dovute alla loro eterogeneità e alla scarsa specificità sintomatologia, che spesso richiede indagini invasive per la conferma definitiva e per il follow-up.

Recentemente sono stati valutati alcuni biomarcatori nel sangue periferico (citochine, chemochine, fattori angiogenetici e di crescita, metalloproteasi) di pazienti con IPF rispetto ad un gruppo di controllo e in confronto con pazienti con altre patologie polmonari, valutandone l'utilità nella diagnosi e monitoraggio della malattia (Rosas *et al.*, 2008). Gli autori hanno osservato come utilizzando un pattern di proteine tra cui alcune metalloproteasi, i pazienti con IPF venivano identificati correttamente rispetto ai controlli con una specificità e sensibilità di circa il 98% e rispetto a soggetti con polmonite da ipersensibilità. Inoltre le metalloproteasi MMP7 e MMP1 erano significativamente aumentate anche nel BAL e nel tessuto polmonare dei pazienti con IPF, suggerendo che gli incrementati livelli circolanti delle metalloproteasi riflettono i cambiamenti patologici del distretto alveolare che caratterizzano la patologia e appaiono riflettere la progressione della malattia, mentre non erano significativamente incrementati in pazienti con BPCO o sarcoidosi.

Lo stress ossidativo riveste un ruolo importante nella patogenesi delle ILD.

In pazienti con ILD si sono riscontrati nel BAL livelli incrementati di 8-isoprostano, rispetto ad un gruppo di controllo (Montuschi *et al.*, 1998). Analoghi risultati si sono osservati utilizzando una metodica meno invasiva, quale il CAE; livelli più elevati di 8-isoprostano e di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicatori di stress ossidativo, sono stati riscontrati in pazienti con IPF rispetto a soggetti sani (Psathakis *et al.*, 2006).

I livelli di etano, indicatore di perossidazione lipidica, determinati nell'aria espirata di pazienti con ILD sono risultati più elevati rispetto ai livelli riscontrati nei controlli; inoltre, nei pazienti, tale indicatore appariva essere in relazione con l'andamento clinico della malattia, suggerendo come tale indicatore potesse fornire utili informazioni sullo stress ossidativo e sul grado di severità delle patologie (Kano *et al.*, 2005).

## 4. SCOPO

Lo scopo di questo lavoro di tesi è la valutazione e l'applicazione di metodologie non invasive per la ricerca di indicatori biologici per lo studio e la diagnosi precoce di differenti patologie polmonari.

Verranno descritti i risultati relativi all'applicazione di metodiche non invasive quali il CAE e l'aria esalata, in pazienti affetti da tre patologie dell'apparato respiratorio: tumore del polmone, BPCO e ILD.

Tali lavori si riferiscono a progetti indipendenti, che hanno avuto come obiettivo quello di valutare l'effettiva utilità di alcuni biomarcatori, selezionati nelle matrici in esame, per la diagnosi delle specifiche patologie polmonari.

❖ *Studio I. Determinazione di aldeidi nell'aria esalata di pazienti con tumore polmonare mediante derivatizzazione su fibra SPME-GC/MS*

Valutazione nell'aria esalata i livelli di diverse aldeidi, quali prodotti di derivazione della perossidazione lipidica, in un gruppo di pazienti con NSCLC in stadio iniziale ed in un gruppo di soggetti sani. I livelli riscontrati nei diversi gruppi di soggetti saranno poi confrontati tra loro ed sarà valutata la capacità del pattern dei biomarcatori selezionati nel discriminare i pazienti malati da quelli sani.

❖ *Studio II. Elementi metallici nel condensato dell'aria esalata e nel siero di pazienti con broncopneumopatia cronico ostruttiva riacutizzata*

Determinazione dei livelli di alcuni elementi metallici nel CAE e nel siero di soggetti con BPCO, prima e dopo un episodio di riacutizzazione della malattia, in quanto alcuni elementi hanno un ruolo nel sistema di difesa del tratto respiratorio mentre altri, contenuti nel fumo di sigaretta e nell'aria di ambienti inquinati, potrebbero scatenare i meccanismi che portano alla riacutizzazione della malattia. La valutazione degli elementi metallici durante un episodio di BPCO riacutizzata potrebbe migliorare la conoscenza dei meccanismi fisiopatologici polmonari associati con questa condizione clinica.

❖ Studio III. *Elementi metallici nel condensato dell'aria esalata di pazienti con Pneumopatie Interstiziali*

Determinazione dei livelli di diversi elementi metallici nel CAE di soggetti con ILD ad eziopatogenesi sconosciuta (IPF, NSIP e sarcoidosi) e in un gruppo di soggetti sani. La valutazione di elementi metallici a livello dell'organo bersaglio, effettuata nel CAE quale stima indiretta della dose tissutale, potrebbe migliorare la comprensione del ruolo dei metalli nella patogenesi di alcune ILD. Inoltre sarà valutata la capacità di tali indicatori nel distinguere i pazienti con ILD da soggetti sani.

I risultati presentati in questo lavoro di tesi sono stati pubblicati o sottomessi per la pubblicazione, su riviste internazionali:

❖ Studio I.

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-derivatization SPME-GC/MS. *Journal of Chromatography B (Submitted)*

❖ Studio II.

Corradi M, Acampa O, Goldoni M, Andreoli R, Milton D, Sama SR, Rosiello R, De Palma G, Apostoli P, Mutti A. Metallic elements in exhaled breath condensate and serum of patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Metallomics* 2009; 1:339-345

❖ Studio III.

Corradi M, Acampa O, Goldoni M, Adami E, Apostoli P, de Palma G, Pesci A, Mutti A. Metallic elements in exhaled breath condensate of patients with interstitial lung diseases. *J Breath Res* 2009; 3 046003 (8pp)

[doi:10.1088/1752-7155/3/4/046003](https://doi.org/10.1088/1752-7155/3/4/046003)

## 5. PARTE SPERIMENTALE

### 5.1 STUDIO I.

#### **DETERMINAZIONE DI ALDEIDI NELL'ARIA ESALATA DI PAZIENTI CON TUMORE POLMONARE MEDIANTE DERIVATIZZAZIONE SU FIBRA SPME-GC/MS**

Vi è un considerevole interesse nello sviluppo di metodiche non invasive per la diagnosi precoce del tumore polmonare e tra queste l'analisi dell'aria espirata appare essere un approccio molto promettente (Chan *et al.*, 2009; Horvath *et al.*, 2009). Diversi gruppi di ricerca hanno focalizzato la loro attenzione verso la determinazione di composti che derivano dalla perossidazione lipidica, uno dei meccanismi alla base dei processi infiammatori e dello stress ossidativo implicati nella patogenesi di molte patologie polmonari, tra cui il tumore polmonare (Klaunig and Kamendulis, 2004; Zieba *et al.*, 2001). Varie classi di composti organici volatili (VOCs) possono essere misurati nell'aria esalata, compresi gli idrocarburi saturi e le aldeidi o altri prodotti di perossidazione lipidica a carico degli acidi grassi delle membrane cellulari (Mazzone, 2008; Kharitonov and Barnes, 2006; Kneepkens *et al.*, 1994) e dati pubblicati hanno mostrato come un pattern di VOCs nell'esalato sia in grado di distinguere pazienti con e senza tumore polmonare (Gordon *et al.*, 1985; O'Neill *et al.*, 1988; Preti *et al.*, 1988; Phillips *et al.*, 1999a; Phillips *et al.*, 2003a; Phillips *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 2008; Mazzone, 2008).

In un precedente studio pubblicato dal nostro gruppo di ricerca, avevamo osservato come un pattern di VOCs (idrocarburi alifatici ed aromatici) era in grado di distinguere un gruppo di pazienti con NSCLC rispetto a soggetti sani, fumatori asintomatici e pazienti con BPCO, con una sensibilità del 72.2% ed una specificità del 93.6% (Poli *et al.*, 2005).

Alla luce di questi promettenti risultati si è voluto ricercare altre sostanze presenti nell'aria espirata con lo scopo di identificare un pattern più sensibile e specifico di sostanze, da utilizzare per la diagnosi precoce del tumore polmonare. Una grande varietà di composti carbonilici sono generati come prodotti secondari di ossidazione e la nostra attenzione si è indirizzata verso aldeidi fortemente volatili da utilizzare come biomarcatori di danno tissutale (Kneepkens *et al.*, 1994; Corradi *et al.*, 2003a; Corradi *et al.*, 2003b). Il comportamento delle aldeidi nell'aria

espirata non è del tutto noto e solo alcuni di questi composti sono stati messi in relazione con il tumore polmonare (Phillips *et al.*, 1999a; Ligor *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2004a; Deng *et al.*, 2004b; Fuchs *et al.*, 2009). Promettenti risultati sono stati ottenuti in pazienti con tumore polmonare mediante la determinazione dei livelli di aldeidi in altre matrici biologiche come il sangue (Deng *et al.*, 2004a; Deng *et al.*, 2004b; Li *et al.*, 2005).

In questo studio sono stati determinati nell'aria esalata i livelli di aldeidi sature come l'esanale, l'eptanale e la nonanale, formate dalla perossidazione degli acidi grassi  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6, che rappresentano i costituenti fondamentali dei fosfolipidi delle membrane cellulari (Esterbauer *et al.*, 1991; Pryor *et al.*, 1991; Kinter, 1995). Analogamente, tutte le aldeidi lineari possono potenzialmente rappresentare i prodotti intermedi di perossidazione lipidica a carico di altri acidi grassi lineari. Pertanto sono anche state valutate tutte le aldeidi lineari volatili, dal propanale (C3) al nonanale (C9).

Dall'analisi sono state escluse la formaldeide e l'acetaldeide, sia a causa della loro presenza in ambienti *outdoor* che *indoor* (Gilbert *et al.*, 2005; Lovreglio *et al.*, 2009), che come prodotti di combustione del fumo di tabacco (Feng *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2000), anche in relazione al fatto che molti pazienti con tumore polmonare sono fumatori od ex-fumatori.

Le aldeidi sono composti volatili scarsamente solubili nel sangue e sono quindi escrete nell'aria espirata pochi minuti dopo la loro formazione nei tessuti (Mazzone, 2008). Poiché la maggior parte di queste sostanze è presente nell'esalato con concentrazioni dell'ordine di  $10^{-12}$  M (pM) e  $10^{-9}$  M (nM) (Phillips *et al.*, 1999a; Phillips *et al.*, 2003a; Gordon *et al.*, 1985; Poli *et al.*, 2005; Grote and Pawliszyn, 1997), una fase di pre-concentrazione appare necessaria.

La microestrazione in fase solida (SPME) è stata utilizzata con successo per estrarre una serie di composti volatili dal respiro umano, incluse sostanze come idrocarburi alifatici ed aromatici (Poli *et al.*, 2005; Poli *et al.*, 2008; Ligor *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009; Buszewski *et al.*, 2009; Gaspar *et al.*, 2009) ed anche composti carbonilici mediante derivatizzazione su fibra (Song *et al.*, 2009; Stashenko *et al.*, 2006; Svensson *et al.*, 2007). È stata utilizzata la tecnica di derivatizzazione su fibra SPME accoppiata all'analisi in gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) per la determinazione di aldeidi altamente volatili

nell'ultima porzione dell'espirsto (aria alveolare), in un gruppo di pazienti con NSCLC ed in un gruppo di controllo.

Prima di utilizzare tale metodica, sono stati condotti esperimenti preliminari per ottimizzare i parametri SPME e per validare il metodo. Inoltre, poiché i composti presenti nell'aria esalata possono derivare sia da fonti endogene che da fonti esogene, potendo quindi riflettere una pregressa esposizione o essere influenzati da inquinanti ambientali o presenti nel fumo di sigaretta, abbiamo valutato gli effetti di una possibile contaminazione ambientale analizzando e confrontando i livelli di alcuni composti presenti nell'aria esalata di dieci soggetti con i relativi campioni di aria ambientale, prelevati nella stanza in cui ciascun soggetto è rimasto per almeno due ore prima della raccolta campione.

## **5.1.1 MATERIALI E METODI**

### **5.1.1.1 Soggetti dello studio**

Quaranta pazienti con NSCLC in stadio clinico I o II sono stati reclutati presso l'U.O. di Chirurgia Toracica dell'Università degli studi di Parma, prima di essere sottoposti ad intervento chirurgico di resezione tumorale con intento curativo.

La stadiazione è stata effettuata tramite esame TC di torace e addome; la TC encefalo, l'ecografia addominale o la scintigrafia ossea erano effettuate se indicato. Nessun paziente era stato sottoposto a chemioterapia o radioterapia prima dell'intervento. Il gruppo di controllo era costituito da trentotto soggetti sani asintomatici con anamnesi negativa per neoplasie o malattie polmonari rilevanti. Ciascun soggetto ha firmato un consenso informato prima di partecipare allo studio. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Parma. Le caratteristiche dei soggetti sono riassunte in tabella 5.

L'esposizione a fumo di sigaretta è stata valutata sulla base di un questionario riguardante l'abitudine tabagica personale e prendendo in considerazione sia il numero di sigarette fumate al giorno che il numero di anni di fumo. I soggetti che avevano smesso di fumare da almeno un anno sono stati definiti come ex-fumatori.

Per valutare i livelli ambientali di aldeidi esogene ed il loro effetto sulla concentrazione delle stesse misurate nell'aria esalata, sono stati prelevati 10

campioni di aria ambientale e 10 campioni di aria esalata di soggetti asintomatici non fumatori, dopo una permanenza di almeno due ore nello stesso ambiente (ambulatorio).

#### **5.1.1.2 Raccolta dell'aria espirata**

I campioni di aria esalata sono stati raccolti da ciascun soggetto partecipante allo studio mediante un'espirazione lenta a capacità vitale, utilizzando il Bio-VOC® (Markers International Ltd, Rhondda Cynon Taff, UK), sistema di raccolta dell'aria espirata fornito di una valvola ad una sola via sia in entrata che in uscita, che permette di trattenere gli ultimi 150 ml dell'esalato, come descritto in precedenza (Poli *et al.*, 2005). Dopo aver aggiunto 1 µl di 10<sup>-5</sup> M di soluzione di metilpentanale come standard interno (IS), i Bio-VOC sono stati conservati a 4°C e analizzati entro due ore.

#### **5.1.1.3 Estrazione ed analisi delle aldeidi**

Le aldeidi sono state estratte tramite derivatizzazione utilizzando una fibra 65 µm PDMS/DVB (Supelco; Bellefonte, BA, USA). Come agente derivatizzante è stato usato l' O-2,2,4,5,6-(pentafluorobenzile)idrossilamina idroclorato (PFBHA) in grado di trasformare le aldeidi in composti stabili volatili in modo tale da permetterne l'analisi in GC-MS.

L'agente derivatizzato era caricato per 10 min tramite esposizione della fibra stessa ai vapori dello spazio di testa, dopo di che la fibra veniva esposta per 45 min a temperatura ambiente, direttamente nel Bio-VOC. La reazione di derivatizzazione chimica avveniva pertanto sulla fibra stessa, portando alla formazione di due isomeri (cis- e trans) per ciascun aldeide (Svensson *et al.*, 2007). La fibra veniva quindi desorbita termicamente a 280°C nell'iniettore del gas cromatografo (Hewlett Packard HP 6890) accoppiato con un spettrometro di massa selettivo HP 5973 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Per la determinazione quantitativa delle aldeidi nell'aria espirata sono state preparate delle soluzioni standard gassose direttamente nel Bio-VOC riempito con elio purificato, 1 µl di soluzione madre di aldeidi in cloroformio (0.5 x 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-6</sup> M, 0.5 x 10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-5</sup> M, 0.5 x 10<sup>-4</sup> M), 1 µl di IS 10<sup>-5</sup> M e 6 µl di acqua

deionizzata. Gli standard gassosi sono stati stabilizzati a temperatura ambiente per almeno un'ora prima delle analisi.

#### **5.1.1.4 Ottimizzazione dei parametri SPME e validazione del metodo**

In una fase preliminare sono stati ottimizzati i parametri di estrazione studiando il tempo di carico del PFHBA (2, 5, 10 e 15 min) ed il tempo di campionamento (5, 10, 30, 45 e 60 minuti). La stabilità delle aldeidi in fase gassosa nel Bio-VOC a 4°C è stata valutata per concentrazioni di aldeidi di  $66.6 \times 10^{-12}$  M (1  $\mu$ l di  $10^{-5}$  M di soluzione standard) analizzando il campione dopo 1, 3, 9, 17, 32 3 e 70 ore.

Dopo ottimizzazione dei parametri SPME, tutte le analisi sono state effettuate in condizioni di equilibrio utilizzando i tempi di carico e campionamento di 10 e 45 minuti rispettivamente.

Infine il metodo è stato validato studiando il suo intervallo di linearità ( $3.3\text{-}333.3 \times 10^{-12}$  M), il limite di rivelazione (LOD calcolato come 3 SD del segnale di bianco), il limite di quantificazione (LOQ), l'accuratezza e la precisione analitica.

La linearità è stata verificata in due ordini di grandezza della concentrazione. LOD e LOQ erano tra  $1 \times 10^{-12}$  M e  $3 \times 10^{-12}$  M; l'accuratezza era del 93% e la precisione nel range di 7.2-15.1% per la variabilità intra e inter-day delle determinazione degli standard.

#### **5.1.1.5 Analisi Statistica**

I soggetti reclutati nello studio sono stati suddivisi in tre gruppi: il gruppo 0, formato dai 38 controlli sani; il gruppo 1, costituito da 19 pazienti con NSCLC, ex-fumatori o non fumatori ed il gruppo 2, formato da 21 pazienti fumatori con NSCLC.

Data la distribuzione log-normale di tutte le variabili, i dati sono stati riportati come media geometrica (GM), deviazione geometrica standard ([GSD]) e mediana (25°-75° percentile).

Il test ANOVA seguito dal test post-hoc di Tukey è stato utilizzato sui logaritmi delle variabili per valutare le differenze tra gruppi; per valutare l'effetto dell'età, l'analisi è stata ripetuta usando l'età come covariata con il test ANCOVA.

È stata effettuata l'analisi discriminante sui logaritmi delle variabili (analisi multivariata), per testare la significatività della Lambda di Wilks dei due fattori risultanti. Sono state anche riportate la matrice di struttura (la matrice con il peso

delle singole variabili nei fattori) e la classificazione con validazione a croce dei soggetti con metodo *leave-one-out*, ossia escludendo un soggetto alla volta.

Lo score del fattore 2 è stato messo in un grafico in funzione dello score del fattore 1, identificando la posizione dei centroidi dei tre gruppi di soggetti.

I livelli delle aldeidi nell'aria esalata di un gruppo di 10 soggetti sani e di aria ambientale sono stati confrontati utilizzando il t test per dati appaiati, data la distribuzione normale delle differenze tra le variabili.

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate usando SPSS 16.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Un valore di  $p < 0.05$  è stato considerato come significativo.

## **5.1.2 RISULTATI**

### **5.1.2.1 Ottimizzazione del metodo**

In questo studio, la parte preliminare del lavoro ha riguardato l'ottimizzazione dei parametri di estrazione delle aldeidi, valutando il tempo di caricamento sulla fibra e il tempo di esposizione del campione, necessari per assicurare la completa derivatizzazione su fibra delle aldeidi. Il miglior tempo di caricamento, corrispondente alla massima quantità di PFHBA adsorbita alla fibra, era di 10 min. Dopo caricamento, la fibra SPME è stata direttamente inserita nel Bio-VOC e lo studio del tempo di esposizione della fibra ha mostrato che il tempo di equilibrio (estrazione e derivatizzazione su fibra), raggiunto quando un ulteriore incremento del tempo di estrazione non aumentava la quantità di aldeide estratta dalla fibra, era di circa 45 min per tutte le aldeidi (dati non mostrati). Lo studio della stabilità della aldeidi in fase di gas nel Bio-VOC ha mostrato che le aldeidi volatili da C3 a C6 erano stabili a +4°C fino a 17 ore ( $\pm 20\%$  SD confrontata con i valori medi), mentre C8 e C9 mostravano una riduzione dei livelli dopo 10 ore (figura 8).

### **5.1.2.2 Livelli di aldeidi misurate in campioni di aria esalata e ambientale**

I livelli di aldeidi misurate nell'aria esalata dei dieci volontari sani non fumatori e nei rispettivi campioni di aria ambientale, sono riassunti in figura 9.

Tutte le aldeide misurate hanno mostrato livelli più elevati nell'aria esalata rispetto ai campioni di aria ambientale.

### **5.1.2.3 Livelli di aldeidi misurate nell'aria esalata di soggetti con NSCLC e controlli**

Durante la fase di reclutamento dei soggetti, almeno una volta alla settimana sono stati raccolti campioni di aria ambientale dalla stanza dove i soggetti soggiornavano almeno due ore prima dell'esame; le analisi hanno confermato i livelli riscontrati nello studio preliminare ( $\pm 20\%$  SD rispetto ai valori mediani; dati non mostrati).

Nei pazienti con NSCLC, la diagnosi è stata confermata dall'esame istologico che ha identificato 23 adenocarcinomi (ADK), 13 carcinomi a cellule squamose (SCC) e un carcinoma a grandi cellule. Sebbene tutti i pazienti erano in stadio clinico I o II prima dell'intervento, in base alla stadiazione patologica TNM, 29 pazienti sono risultati essere allo stadio I (18 IA e 11 IB), 6 allo stadio II (IIB) e 5 allo stadio IIIA. Tra i pazienti vi erano 21 fumatori, 17 ex-fumatori e 11 non fumatori, mentre tra i controlli vi erano solo soggetti non fumatori (n=28) od ex-fumatori (n=10). Il periodo di tempo dalla sospensione dell'abitudine tabagica, era simile nei pazienti e nei controlli (valore medio di 16 vs 14.1 anni). Si è quindi deciso di suddividere i soggetti in tre gruppi: il gruppo dei controlli (gruppo 0), un gruppo di pazienti con NSCLC formato dai soggetti non fumatori od ex-fumatori (gruppo 1) ed un gruppo di pazienti costituito dai fumatori (gruppo 2).

I livelli di aldeidi misurate nell'aria esalata dei pazienti con NSCLC, in campioni raccolti prima dell'intervento chirurgico di resezione tumorale e nell'esalato del gruppo di controllo, sono riassunti in tabella 6.

Tutte le aldeidi misurate nel gruppo 2 erano significativamente più elevate rispetto ai livelli riscontrati nei controlli; in maniera analoga anche nel gruppo 1 le aldeidi erano più elevate, con l'unica eccezione del propanale.

Non vi erano però differenze nei livelli misurati nell'esalato dei pazienti del gruppo 1 rispetto al gruppo 2 (tabella 7).

I livelli di aldeidi sono stati inoltre confrontati considerando l'età come possibile fattore confondente, non evidenziando però nessuna differenza nei risultati ottenuti (tabella 7).

È stata inoltre effettuata l'analisi discriminante considerando tutte le aldeidi misurate ed i tre gruppi di soggetti. La maggior parte della variabilità era spiegata dal primo fattore dell'analisi discriminante (94.8%, con una significatività  $p < 0.01$

della lambda di Wilks) mentre il secondo fattore spiegava solo il 5.2% della varianza, con un valore di lambda di Wilks non significativo ( $p=0.44$ ).

La matrice delle correlazioni tra ciascuna variabile ed ogni funzione discriminante (tabella 8) mostrava che il peso delle variabili era nonanale> esanale> ottonale> eptanale> butanale per il primo fattore e di pentanale> propanale per il secondo fattore. I controlli venivano correttamente classificati nel 92.1% dei casi, mentre i due gruppi di pazienti non venivano distinti tra loro in maniera efficace, anche se rispetto ai controlli, 36/40 pazienti con NSCLC venivano separati correttamente (tabella 9).

Mettendo in un grafico lo score del fattore 1 in funzione del fattore 2, si osservava che il fattore 1 discriminava soprattutto i controlli e i due gruppi di pazienti con NSCLC, mentre il fattore 2, avente lambda di Wilks non significativa, non era in grado di distinguere tra loro i due gruppi di pazienti con NSCLC (figura 10).

## 5.2 STUDIO II.

### ELEMENTI METALLICI NEL CONDENSATO DELL'ARIA ESALATA E NEL SIERO DI PAZIENTI CON BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA RIACUTIZZATA

Il decorso clinico della BPCO è spesso aggravato da riacutizzazioni, episodi di acuto peggioramento dei sintomi respiratori (tosse, espettorazione e dispnea) e da un'incremento dell'ostruzione delle vie aeree, che usualmente richiedono terapie farmacologiche aggiuntive (Rabe *et al.*, 2007; Celli and Barnes, 2007).

Le riacutizzazioni della BPCO sono causate principalmente da infezioni del tratto respiratorio e anche cause non infettive, come l'esposizione ad inquinanti ambientali, rappresentano fattori scatenanti in grado di indurre una riacutizzazione, anche se in circa un terzo dei casi la causa non è identificabile (Rabe *et al.*, 2007; Celli and Barnes, 2007). L'eterogeneità delle riacutizzazioni della BPCO, dovuta alla variabilità della sintomatologia e all'ambiguità dei fattori scatenanti, rendono questi episodi difficili da definire, classificare e gestire (Franciosi *et al.*, 2006).

Biomarcatori con una potenziale utilità nella diagnosi e prognosi delle riacutizzazioni della malattia, avrebbero ruolo fondamentale per tali scopi (Hurst *et al.*, 2006; Bozinovski *et al.*, 2008; Gerritsen *et al.*, 2005; Weis and Almdal, 2006; Stolz *et al.*, 2007b; Cazzola *et al.*, 2008).

Il CAE è una matrice biologica rappresentativa della composizione del fluido di rivestimento delle vie aeree, utile per valutare la presenza di infiammazione (Kharitonov and Barnes, 2006; Antczak and Górski, 2002; Montuschi, 2005) e l'esposizione ad elementi metallici inquinanti gli ambienti di vita e di lavoro (Goldoni *et al.*, 2004; Goldoni *et al.*, 2006; Caglieri *et al.*, 2006). Recentemente abbiamo analizzato e utilizzato gli elementi metallici nel CAE per valutare la dose all'organo bersaglio di metalli pneumotossici e di elementi di transizione coinvolti nel sistema redox implicati nel controllo dello stress ossidativo. Questo approccio è stato inoltre proposto anche per sviluppare nuovi biomarcatori di dose e suscettibilità in pazienti con BPCO (Mutti *et al.*, 2006).

In questo studio è stata effettuata la determinazione di diversi elementi metallici nel CAE e nel siero di pazienti con BPCO, prima e dopo un episodio di riacutizzazione della malattia. La valutazione degli elementi metallici durante un

episodio riacutizzazione, potrebbe migliorare la conoscenza dei meccanismi fisiopatologici polmonari associati con questa condizione clinica. Diversi elementi metallici hanno un ruolo nel sistema di difesa del tratto respiratorio, stimolante o inibente (potendo forse promuovere la riacutizzazione), mentre metalli tossici contenuti nel fumo di sigaretta e nell'aria di ambienti inquinati potrebbero scatenare i meccanismi che portano ad una riacutizzazione della malattia.

Inoltre, sono stati anche valutati nel sangue alcuni marcatori come la proteina C reattiva (PCR) e la procalcitonina (PCT), già utilizzati come indicatori sistemici per la diagnosi ed il trattamento delle riacutizzazioni di BPCO (Hurst *et al.*, 2006; Weis and Almdal, 2006; Stolz *et al.*, 2007b; Stolz *et al.*, 2007a).

## **5.2.1 MATERIALI E METODI**

### **5.2.1.1 Soggetti dello studio**

Sono stati reclutati 28 pazienti con BPCO presso il *Fallon Clinic Research Department* (Worcester MA). Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte nella Tabella 10. La diagnosi di BPCO è stata stabilita in accordo con i criteri delle linee guida GOLD (Rabe *et al.*, 2007). L'esposizione a fumo di sigaretta è stata valutata sia raccogliendo le informazioni inerenti le abitudini tabagiche di ciascun soggetto, sia analizzando i livelli sierici di cotinina. I pazienti che avevano smesso di fumare da almeno un anno sono stati definiti ex-fumatori.

### **5.2.1.2 Disegno dello studio**

I pazienti con BPCO sono stati valutati due volte: all'inizio di un episodio di riacutizzazione della malattia, non appena giunti in ambulatorio per visita medica e dopo la sua conclusione, allo stabilizzarsi delle condizioni cliniche.

La riacutizzazione della BPCO era definita in base alla comparsa di una variazione acuta dei sintomi di base del paziente (dispnea, tosse, espettorazione) di entità superiore alla normale variabilità giornaliera, con eventuale cambiamento della terapia abituale (Rabe *et al.*, 2007). I pazienti venivano considerati guariti quando vi era un significativo miglioramento della sintomatologia con sospensione della terapia medica addizionale. La diagnosi di BPCO riacutizzata e la guarigione venivano confermate, in entrambi i casi, da un Pneumologo. Ad ogni tempo di

valutazione previsto dallo studio, i pazienti erano sottoposti a visita medica, questionario, spirometria, raccolta del CAE e prelievo venoso. La riacutizzazione era classificata secondo i criteri di Anthonisen, basati sulla presenza e differente combinazione di tre specifici sintomi: dispnea, aumento della quantità e purulenza dell'espettorato (Anthonisen *et al.*, 1987).

### **5.2.1.3 Raccolta ed analisi del CAE**

Il CAE è stato raccolto utilizzando un condensatore portatile (TURBO-DECCS; Medivac, Parma, Italia) ad una temperatura di -5°C come precedentemente descritto (Mutti *et al.*, 2006; Goldoni *et al.*, 2005). Ad ogni soggetto era chiesto di respirare a volume corrente per circa 15 minuti, attraverso un boccaglio monouso dotato di valvola unidirezionale. I campioni di CAE sono stati conservati a -80°C fino al trasporto in ghiaccio secco presso il Laboratorio di Igiene Industriale e Tossicologia dell'Università di Brescia dove sono stati effettuati i dosaggi degli elementi metallici nel CAE, tramite spettrometria di massa con sorgente al plasma ad accoppiamento induttivo (ICP-MS, Elan 5000, Perkin Elmer, Wellesley, MA), come precedentemente descritto (Mutti *et al.*, 2006).

I dispositivi di raccolta ed analisi sono stati testati e scelti escludendo il rilascio o l'assorbimento di elementi metallici. Il limite di rilevazione (LOD, calcolato come 3 SD del bianco) per i metalli valutati è stato precedentemente riportato (Mutti *et al.*, 2006). In particolare, nel caso del Mn, il limite di quantificazione (LOQ) calcolato come 3 LOD corrispondeva a 0.015 µg/L. I LOD e LOQ trovati nel CAE erano inferiori rispetto a quelli riportati in letteratura per gli stessi elementi metallici in campioni urinari di almeno uno-due fattori (Grulle *et al.*, 2005), probabilmente perché il CAE è praticamente acqua pura senza nessun effetto matrice. Il LOD per il Mg era di 0.5 µg/L.

### **5.2.1.4 Analisi nel siero**

Il siero ottenuto dopo centrifugazione di un campione di sangue venoso, è stato conservato a -20°C fino al trasporto in ghiaccio secco presso il laboratorio di analisi (Brescia per le analisi dei metalli, Parma per le analisi di PCR, PCT e cotinina). Gli elementi metallici nel siero sono stati valutati in ICP-MS con il metodo di Grulle (Grulle *et al.*, 2005), eccetto che per il Mg, determinato con

fotometria a fiamma presso il laboratorio certificato di Chimica Clinica dell'Università di Parma.

La PCR è stata misurata tramite nefelometria (BN 100, Dade Behring, Marburg) con un LOD di 0.175 mg/L. La PCT è stata determinata in immunofluorescenza con tecnologia TRACE (Time-Resolved Amplified Cryptate Emission) (PCT sensitive Kryptor; BRAHMS Hennigsdorf, Germany), con sensibilità analitica di 0.06 µg/L e LOD di 0.02 µg/L.

La cotinina libera è stata determinata tramite cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa come precedentemente descritto (Manini *et al.*, 2008).

### **5.2.1.5 Spirometria**

La spirometria è stata effettuata con spirometro EasyOne (ndd Medizintechnik, Zurich, Switzerland). Sono stati registrati i dati relativi a capacità vitale forzata (CVF), volume espiratorio massimo in un secondo (VEMS), rapporto VEMS/CVF e flusso espiratorio forzato tra il 25 e 75% della CVF (FEF<sub>25-75%</sub>). I valori del predetto sono stati assegnati seguendo i criteri NHANES III (Hankinson *et al.*, 1999).

### **5.2.1.6 Analisi statistica**

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando i software Prism 4 (GrahPad; San Diego, CA) e SPSS 14.0 (SPSS; Chicago IL). Poiché la maggior parte dei dati era distribuita in maniera non normale, sono stati utilizzati test non parametrici.

Il confronto tra riacutizzazione e guarigione è stato effettuato, per ciascuna variabile testata, tramite il test di Wilcoxon per dati appaiati. Il confronto tra gruppi è stato eseguito con il test di Kruskal-Wallis seguito dal test di Dunn per comparazioni multiple. Le correlazioni tra variabili sono state effettuate usando il test di Spearman. Un livello di significatività di 0.05 è stato scelto per tutti i test statistici.

## **5.2.2 RISULTATI**

### **5.2.2.1 Soggetti dello studio**

Tutti i pazienti reclutati hanno completato le indagini previste sia all'inizio della riacutizzazione che a guarigione avvenuta. Non si sono verificati effetti avversi

dovuti alle procedure utilizzate nello studio. Il periodo di tempo tra la prima e la seconda valutazione è risultato di 28 giorni (valore mediano).

La riacutizzazione della patologia ha reso necessario l'utilizzo di terapie aggiuntive in tutti i pazienti, principalmente broncodilatatori, corticosteroidi per os e antibiotici; la riacutizzazione è stata gestita a domicilio. Secondo i criteri di Anthonisen per la BPCO riacutizzata, il tipo I era presente in 12 pazienti, il tipo II in 5 soggetti ed il tipo III in 9 pazienti. In due casi non è stato possibile applicare la classificazione di Anthonisen, per mancanza di informazioni e per la presenza di sola dispnea come sintomo. Quattro pazienti avevano livelli di cotinina superiori a 15 µg/L, valore considerato come cut-off per differenziare i non fumatori dai fumatori (Seccareccia *et al.*, 2003; Binnie *et al.*, 2004) e sono stati considerati fumatori in accordo con le informazioni ottenute dal questionario. Gli ex-fumatori erano ventitre e il numero di anni da quando avevano smesso di fumare era di 15.8 anni (SD 11.8).

#### **5.2.2.2 Test di funzionalità polmonare**

I risultati della spirometria sono riportati in Tabella 10. Tra i parametri spirometrici, solo i valori di VEMS sono risultati statisticamente differenti tra i due tempi di valutazione ( $p=0.02$ ) e più bassi all'inizio della riacutizzazione. Anche i valori di CVF e  $FEF_{25-75\%}$  sono risultati più bassi alla riacutizzazione rispetto ai valori ottenuti dopo guarigione, anche se la differenza non era significativa.

#### **5.2.2.3 Elementi metallici nel CAE**

Gli elementi metallici dosati nel CAE sono riassunti in Tabella 11.

I livelli di Mn e Mg erano elevati all'inizio della riacutizzazione rispetto ai valori determinati dopo la guarigione, mentre non vi erano altre significative variazioni nelle concentrazioni degli elementi metallici dosati. I livelli di Mn e Mg determinati in fase di riacutizzazione erano positivamente correlati tra loro (figura 11) e il Mn correlava negativamente con il VEMS (figura 12).

Suddividendo i pazienti in base alla classificazione di Anthonisen od in base allo stadio della BPCO secondo le linee GOLD, non vi erano differenze significative nei livelli degli elementi metallici nel CAE, anche se il numero dei pazienti era assai limitato.

#### 5.2.2.4 Indicatori nel sangue

Non si sono osservate differenze significative tra i livelli degli elementi metallici misurati nel siero all'inizio della riacutizzazione e dopo guarigione, né si sono osservate variazioni suddividendo i pazienti in base alla classificazione di Anthonisen od in base allo stadio della malattia.

I valori di PCT e PCR misurati all'inizio della riacutizzazione erano significativamente più elevati rispetto a quelli determinati dopo guarigione ([mediana (25°-75° percentile) 0.09 (0.07-0.13) vs 0.08 (0.06-0.11)  $\mu\text{g/L}$  e 11.6 (3.5-29.5) vs 3.7 (1.6-8.8)  $\text{mg/L}$ , rispettivamente;  $p < 0.05$ ). Suddividendo i pazienti in base ai criteri di Anthonisen non vi erano variazioni significative sia per PCT che per PCR, mentre valutando i pazienti in base allo stadio di malattia, si sono osservati livelli maggiori nei pazienti con più bassi valori di VEMS all'inizio della riacutizzazione, anche se la significatività statistica era presente solo per PCT (figura 13).

I livelli sierici di PCT e PCR erano correlati positivamente ad entrambi i tempi di campionamento (figura 14).

### 5.3 STUDIO III.

#### ELEMENTI METALLICI NEL CONDENSATO DELL'ARIA ESALATA DI PAZIENTI CON PNEUMOPATIE INTERSTIZIALI

Le patologie interstiziali del polmone (ILD) sono un gruppo eterogeneo di patologie polmonari caratterizzate da infiammazione e fibrosi che coinvolgono l'interstizio ed il parenchima polmonare (King, 2005; ATS/ERS, 2002) e in cui le alterazioni strutturali portano a dispnea progressiva, crepitii polmonari e alterazioni diffuse della radiografia toracica (King, 2005; BTS, 1999). La patogenesi di queste malattie è complessa, ogni disordine presenta un differente pattern istopatologico con vario grado di infiammazione e fibrosi, tipiche alterazioni radiografiche alle scansioni con tomografia computerizzata ad alta risoluzione (HRCT) e decorso clinico variabile.

Le polmoniti interstiziali idiopatiche (IIPs) e la sarcoidosi sembrano essere le forme più frequenti tra leILD (Demedts *et al.*, 2001; Thomeer *et al.*, 2001). Le più comuni IIPs sono la fibrosi polmonare idiopatica (IPF) e la polmonite interstiziale non specifica (NSIP), che possono essere distinte dalle altre forme di patologie diffuse polmonari in base a criteri clinici, radiologici e istopatologici (ATS/ERS, 2002). La sarcoidosi è una malattia granulomatosa sistemica che coinvolge prevalentemente il polmone ed il sistema linfatico (Lynch *et al.*, 2007; Judson, 2008).

L'eziologia della maggior parte delleILD è ancora sconosciuta anche se fattori genetici, ambientali e l'interazione fra questi sembrano avere un ruolo importante nell'insorgenza di tali patologie (Verleden *et al.*, 2001; Steele and Brown, 2007). Dati epidemiologici supportano l'ipotesi che fattori ambientali ed occupazionali giochino un ruolo di rilievo nello sviluppo di IPF e sarcoidosi (Taskar and Coultas, 2008), le due patologie più frequenti tra leILD. È stata osservata una significativa associazione tra aumentato rischio d'insorgenza di IPF ed esposizione a fumo di sigaretta, metalli (Si, Al, Ni, Co) polveri del legno (pino e mogano), lavori in ambiente agricolo, esposizione a muffe, allevamento del bestiame (Taskar and Coultas, 2006; Baumgartner *et al.*, 1997; Baumgartner *et al.*, 2000; Miyake *et al.*, 2005; Pinheiro *et al.*, 2008). L'esposizione a polveri organiche, insetticidi, ambienti con alta carica microbica, la fornitura di materiali da costruzione e giardinaggio sono fattori associati con un aumentato rischio di insorgenza di sarcoidosi mentre

il fumo di sigaretta ed esposizioni a polveri inorganiche o di legno e metalli, sembrano essere fattori negativamente associati con la malattia (Newman *et al.*, 2004; Barnard *et al.*, 2005; Taskar and Coultas, 2008).

Ulteriori informazioni riguardo il ruolo degli elementi metallici nello sviluppo di queste malattie potrebbero essere ottenute valutando la dose dei metalli all'organo bersaglio, il polmone. Campioni biologici possono essere ottenuti mediante metodiche invasive come la biopsia polmonare (che non può essere proposta per scopi di ricerca), il lavaggio broncoalveolare (BAL), che permette il diretto campionamento di materiale dal tratto inferiore delle vie aeree o tramite metodiche non invasive come il CAE, ottenuto raffreddando l'esalato.

Il CAE è una matrice biologica che sembra essere rappresentativa della composizione del fluido di rivestimento delle vie aeree e può essere quindi utile per valutare biomarcatori di esposizione, effetto e suscettibilità in pazienti con patologie polmonari o soggetti esposti in ambienti inquinati (Kharitonov and Barnes, 2006; Antczak and Gorski, 2002; Mutti *et al.*, 2006; Maniscalco *et al.*, 2006; Goldoni *et al.*, 2004; Goldoni *et al.*, 2006; Caglieri *et al.*, 2006). Differentemente dal BAL, il CAE è una metodica semplice e non invasiva, caratteristiche che la rendono particolarmente adatta per scopi di ricerca. Recentemente il nostro gruppo di ricerca ha proposto l'utilizzo dell'analisi degli elementi metallici nel CAE come metodo per valutare i livelli polmonari di metalli pneumotossici od elementi di transizione, considerando i livelli degli elementi metallici esalati come stima quantitativa della dose a livello dell'organo bersaglio (Mutti *et al.*, 2006; Mutti and Corradi, 2006). Inoltre i livelli di elementi di transizione potrebbero essere utilizzati come biomarcatori di suscettibilità, dato il loro ruolo nell'equilibrio tra ossidanti ed antiossidanti e in quanto lo stress ossidativo sembra un meccanismo fisiopatologico coinvolto nell'insorgenza delle ILD (Mastruzzo *et al.*, 2002; Nemery *et al.*, 2001; Boots *et al.*, 2009).

### **5.3.1 MATERIALI E METODI**

#### **5.3.1.1 Soggetti dello studio**

Pazienti con IPF, NSIP e sarcoidosi sono stati reclutati presso l'Ambulatorio delle Pneumopatie Interstiziali dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma; il gruppo di controllo era formato da soggetti sani non fumatori non

professionalmente esposti a metalli. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Parma. Tutti i soggetti hanno dato il loro consenso informato alla partecipazione allo studio.

La diagnosi di IPF e NSIP è stata effettuata sulla base delle caratteristiche cliniche, radiologiche e istopatologiche utilizzando i criteri diagnostici proposti dall'ATS/ERS (ATS/ERS, 2002; Travis *et al.*, 2008); la sarcoidosi è stata diagnosticata sulla base di criteri clinici e radiologici supportati dall'evidenza istologica di granuloma epiteliode senza necrosi caseosa (ATS/ERS/WASOG Committee, 2001).

### **5.3.1.2 Disegno dello studio**

Tutti i soggetti dello studio (pazienti e controlli) sono stati sottoposti a questionario medico, test di funzionalità polmonare e raccolta del CAE.

L'esposizione a fumo di sigaretta è stata valutata in base alle informazioni raccolte con un questionario, riportando sia il numero di sigarette fumate al giorno, sia il periodo di tempo (numero di anni) in cui ciascun soggetto aveva fumato. I pazienti che avevano smesso di fumare da almeno un anno prima del reclutamento, sono stati considerati come ex-fumatori. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a spirometria, valutazione della capacità polmonare totale (TLC) e misurazione della capacità di diffusione del monossido di carbonio (DLCO) con respiro singolo, utilizzando uno spirometro ed un pletismografo corporeo (Vmax, Sensor Medics, USA) connessi ad un computer per l'analisi dei dati. La raccolta del CAE è stata effettuata mediante un condensatore portatile (TURBO DECCS, Medivac, Parma, Italia) alla temperatura di -5°C come descritto in precedenza (Mutti *et al.*, 2006), chiedendo ai soggetti di respirare a volume corrente per circa 15 minuti attraverso un boccaglio monouso connesso al sistema di condensazione. I campioni di CAE sono stati conservati a -80°C fino al trasporto in ghiaccio secco presso il laboratorio di Igiene Industriale e Tossicologia dell'Università di Brescia, dove i dosaggi degli elementi metallici nel CAE sono stati effettuati tramite ICP-MS (Elan 5000, Perkin Elmer, Wellesley, MA), come precedentemente descritto (Mutti *et al.*, 2006; Corradi *et al.*, 2009). Solo gli elementi metallici con livelli misurabili in almeno il 33% dei campioni di CAE sono stati considerati; il limite di rilevabilità

(LOD) in ICP-MS era di 0.005 µg/L. La variabilità interindividuale era del 20-30% per i metalli riportati in questo studio.

### **5.3.1.3 Analisi Statistica**

I dati sono stati analizzati utilizzando il software Prism 4 (GraphPad; San Diego, CA) e SPSS 16.0 (SPSS; Chicago, IL). Sono stati utilizzati test non parametrici in quanto i dati deviavano dalla normalità in maniera significativa.

I gruppi (IPF, NSIP, pazienti con sarcoidosi e controlli) sono stati confrontati usando il test di Kruskal-Wallis seguito dal test di Dunn per comparazioni multiple. La correlazione tra variabili è stata valutata tramite il test di Spearman.

La regressione logistica multinomiale e la regressione logistica binaria sono state utilizzate per valutare se i gruppi erano tra loro distinguibili, utilizzando come variabile dipendente il gruppo e come variabile predittiva la concentrazione degli elementi metallici nel CAE. Le probabilità di appartenenza ad un gruppo, ottenute dalla regressione logistica, sono state utilizzate per costruire una curva ROC, per valutare se le concentrazioni degli elementi metallici nel CAE fossero utilizzabili per distinguere i pazienti con ILD dai controlli.

Un livello di significatività di 0.05 è stato utilizzato per tutti i test statistici.

### **5.3.2 RISULTATI**

Sono stati reclutati 61 pazienti con ILD (IPF, NSIP e sarcoidosi) e 33 controlli sani non fumatori. Tra i pazienti, cinque sono risultati essere fumatori (2/17 con NSIP e 3/25 con sarcoidosi) e sono stati esclusi dalle analisi. Poiché non si sono osservate differenze tra i pazienti ex-fumatori e non fumatori con diverse ILD, la condizione di ex-fumatore non è stata ritenuta un fattore di confondimento.

Le caratteristiche dei soggetti sono riassunte in tabella 12.

La terapia farmacologica dei pazienti con ILD era costituita da soli corticosteroidi orali (20 pazienti: 5 IPF, 9 NSIP e 6 con sarcoidosi) od in associazione con trattamento immunosoppressivo (8 pazienti: 3 IPF, 4 NSIP e 1 sarcoidosi) o in combinazione con idrossiclorochina solfato (3 pazienti con sarcoidosi); due pazienti (IPF) erano in trattamento con pirfenidone e due (IPF) con N-acetilcisteina.

I risultati dei test di funzionalità polmonare hanno mostrato che i pazienti con IPF e NSIP avevano una ridotta TLC, compatibile con un deficit ventilatorio restrittivo (TLC<80%), mentre i pazienti con sarcoidosi avevano indici spirometrici e TLC nei limiti. In tutti i pazienti i livelli di DLCO% erano ridotti e sia il DLCO% che il TLC erano significativamente più bassi nei pazienti con IPF (mediana 46.4%, 3.8 L) rispetto ai pazienti con sarcoidosi (76.3%, 5.4 L;  $p<0.001$ ).

Il volume del CAE non differiva in maniera significativa tra pazienti e controlli e l'età non è risultata essere correlata con i livelli degli elementi metallici nel CAE.

I livelli degli elementi metallici e degli elementi di transizione misurati nel CAE sono riassunti in tabella 13.

I livelli di alcuni metalli sono risultati inferiori al LOD in oltre il 50% dei casi: il Cd in tutti i gruppi; il Co ed il Se in tutti i pazienti; il Mo nei pazienti con IPF. In questi casi è stato arbitrariamente assunto un livello pari alla metà del LOD.

I livelli di alcuni elementi metallici considerati come pneumotossici (Cr, Ni, Si) sono risultati più elevati in tutti i gruppi di pazienti rispetto ai controlli (figura 15), mentre i livelli di Co erano più elevati nei controlli rispetto ai pazienti con IPF e sarcoidosi (tabella 13). Gli elementi di transizione che rivestono un ruolo importante nel bilancio tra ossidanti ed antiossidanti e che sono co-fattori di vari enzimi, hanno mostrato andamenti differenti: nei controlli, i livelli di Cu e Se sono risultati più elevati rispetto ai pazienti con diverse ILD ed i livelli di Fe più alti rispetto ai pazienti con IPF e NSIP (figura 16).

I livelli di Zn erano più elevati nei controlli rispetto ai pazienti con sarcoidosi e i valori di Mo erano più alti nel gruppo di controllo rispetto ai pazienti con IPF (tabella 13). I restanti elementi metallici determinati nel CAE non hanno mostrato variazioni significative tra i gruppi di soggetti considerati.

Non si sono osservate differenze di rilievo nelle concentrazioni degli elementi metallici valutando i pazienti in base alla terapia farmacologica o in base allo stadio di severità delle malattie.

I livelli di Fe nel CAE sono risultati positivamente correlati con i valori di DLCO nei pazienti con sarcoidosi ( $r=0.46$ ,  $p<0.05$ ) (figura 17.A) e con i livelli di TLC nei pazienti con IPF ( $r=0.53$ ;  $p<0.05$ ) (figura 17.B). Non si sono osservate altre correlazioni tra i parametri di funzionalità respiratoria e i livelli degli elementi metallici misurati nel CAE.

La regressione logistica multinomiale è stata usata per classificare i pazienti con IPF/NSIP, con sarcoidosi ed i controlli sulla base del pattern degli elementi metallici determinati nel CAE. In questa analisi sono stati utilizzati i valori di Co, Mo, Ni, Cr, Si, Fe, Cu, Se e Zn poiché nel confronto tra gruppi sono risultati significativamente differenti, mentre gli altri elementi sono stati esclusi.

Lo Zn ( $p=0.035$ ), il Si ( $p=0.014$ ), il Ni ( $p=0.002$ ) ed il Se ( $p = 0.009$ ) distinguevano i controlli dai pazienti con IPF/NSIP ed il Co ( $p=0.015$ ), il Ni ( $p=0.002$ ) ed il Se ( $p=0.043$ ) distinguevano i controlli dai pazienti con sarcoidosi (tabella 14.A). Inoltre, la tabella di classificazione (tabella 14.B), mostrava che i controlli venivano classificati correttamente nel 87.9% dei casi (29/33), mentre vi era una sovrapposizione tra i pazienti con sarcoidosi e IPF/NSIP nel 63.6% dei casi (14/22). L'analisi è stata pertanto ripetuta considerando tutti i pazienti con le diverse ILD insieme e utilizzando la regressione logistica binaria.

Questo modello ha identificato il Co ( $p=0.015$ ), lo Zn ( $p=0.029$ ), il Si ( $p=0.026$ ), il Ni ( $p=0.002$ ) ed il Se ( $p=0.021$ ) come elementi metallici discriminanti, mentre il Cu è risultato vicino alla significatività ( $p=0.056$ ) (tabella 15 A). La tabella di classificazione ha mostrato che i pazienti con ILD erano correttamente classificati nel 96.4% dei casi (54/56) ed i controlli nel 87.9% (29/33) (tabella 15 B e figura 18). Considerando gli elementi metallici separatamente, il Ni (il più significativo nel distinguere i gruppi) mostrava buona sensibilità (87.5%), ma modesta specificità (63.6%).

La probabilità di appartenenza ad un gruppo calcolata con la regressione logistica è stata poi utilizzata come variabile discriminante per costruire una curva ROC, distinguendo i controlli da tutto il gruppo dei pazienti con ILD (figura 19). L'area sotto la curva era di 0.978 (95% CI 0.56-1), significativamente diverso da 0.5 ed un cut-off di 0.407 massimizzava la somma di sensibilità e specificità: la sensibilità era 0.964 (95% CI 0.876-0.995) e la specificità 0.909 (95% CI 0.756-0.980).

## 6. DISCUSSIONE

### 6.1 STUDIO I

La diagnosi di tumore ad uno stadio precoce può migliorare la sopravvivenza e l'aria esalata sembra rappresentare una matrice biologica in grado di fornire utili informazioni per la diagnosi del tumore polmonare (Chan *et al.*, 2009; Horvath *et al.*, 2009). Il crescente interesse suscitato dalla scoperta nell'aria esalata di biomarcatori di stress ossidativo associati con il tumore polmonare, ci ha indotti a valutare i livelli di aldeidi altamente volatili nell'aria esalata, quali prodotti secondari della perossidazione lipidica.

Il polmone è direttamente esposto ad alti livelli di ossigeno ed è particolarmente suscettibile allo stress ossidativo, implicato nella patogenesi di molte patologie respiratorie (Klaunig and Kamendulis, 2004; Moller *et al.*, 2008) e dati pubblicati suggeriscono che il tumore polmonare è anche caratterizzato da un'aumentato stress ossidativo (Zieba *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2009; Phillips 1999a; Phillips *et al.*, 2003a; Phillips *et al.*, 1999b).

Lo studio è stato effettuato per valutare i livelli di aldeidi nell'aria esalata come biomarcatori associati al tumore polmonare, ampliando così il pattern di VOC precedentemente selezionati (Poli *et al.*, 2005), in maniera da migliorare la sensibilità e specificità di quest'approccio molecolare per la diagnosi precoce della neoplasia. I livelli delle aldeidi nell'aria esalata dei controlli sono risultati significativamente inferiori rispetto ai valori riscontrati nell'esalato dei pazienti con NSCLC, sia nei fumatori sia che nei pazienti ex-fumatori o non fumatori ed in quest'ultimo gruppo solo il propanale non è risultato significativamente diverso. Confrontando però i livelli nei due gruppi di pazienti, fumatori (gruppo 2) rispetto a non fumatori ed ex-fumatori (gruppo 1) non si sono osservate differenze.

Questo risultato è particolarmente interessante in quanto il fumo può sia modificare le concentrazioni dei VOC che sono presenti nel fumo di sigaretta, che indurre un danno ossidativo (Miekisch *et al.*, 2004; Poli *et al.*, 2005; Poli *et al.*, 2008) ed è quindi importante valutare l'abitudine tabagica come fattore di confondimento.

I risultati ottenuti nello studio hanno mostrato che l'abitudine tabagica non influenzava i livelli delle aldeidi nell'esalato dei pazienti con NSCLC. Una possibile

spiegazione per tale riscontro potrebbe essere rappresentata dal fatto che le aldeidi prodotte come risultato di un processo flogistico cronico e di un cronico stress ossidativo, associati allo sviluppo della malattia, non sono significativamente differenti rispetto alla produzione acuta di aldeidi indotta dall'esposizione a fumo di sigaretta. Inoltre, i livelli di aldeidi nel fumo di sigaretta (Feng *et al.*, 2007) non sembrano tali da contaminare l'aria esalata ed ai pazienti con tumore polmonare, anche se fumatori, veniva chiesto di astenersi dal fumare almeno per due ore prima della raccolta del campione.

I più alti livelli di aldeidi nei pazienti con NSCLC rifletterebero probabilmente una condizione globale delle vie aeree, sebbene ulteriori studi condotti su fumatori asintomatici potranno meglio chiarire tale aspetto.

La valutazione dell'età come covariata ha mostrato solo un effetto marginale sui livelli delle aldeidi nell'esalato, con l'eccezione del propanale, per il quale la significatività veniva persa. Tali risultati indicano che la diversa età dei controlli rispetto ai pazienti ( $49.3 \pm 15.2$  vs  $67.9 \pm 9.9$ ) non appare sufficiente per spiegare la diversità nei profili delle aldeidi, nonostante sia noto l'aumento di stress ossidativo con l'età (Phillips *et al.*, 2003b; Phillips *et al.*, 2000a; Phillips *et al.*, 2000b; Wei *et al.*, 2001).

L'analisi discriminante ha mostrato inoltre che era possibile classificare correttamente i controlli nel 92.1% dei casi ed i pazienti con NSCLC nel 90% dei casi, anche se suddividendo i pazienti con NSCLC in base all'abitudine tabagica (ex-fumatori e non fumatori vs fumatori) vi era una certa sovrapposizione tra i due gruppi.

L'aria espirata può essere analizzata come fase gassosa (esalato) o come fase liquida (condensato dell'aria espirata). La scelta della matrice dipende dalle proprietà chimico-fisiche del composto che si vuole determinare, in particolar modo dalla sua solubilità e volatilità.

Le aldeidi a corta catena presentano una volatilità non trascurabile e tendono a ripartirsi tra esalato e CAE. In soluzione acquosa vengono favorite le reazioni di condensazione aldolica e di addizione nucleofila al carbonile, che possono determinare una degradazione delle aldeidi stesse a prodotti secondari, limitandone così la stabilità nel CAE. Pertanto, la scelta di determinare le aldeidi a corta catena nell'esalato risulta strettamente legata alla loro maggiore stabilità nella matrice gassosa. Inoltre, la fase di estrazione tramite derivatizzazione su

fibra, permette la trasformazione delle aldeidi in prodotti stabili non degradabili, garantendo quindi una maggiore affidabilità dei risultati.

L'aria esalata richiede strumentazioni sofisticate e ottima preparazione ed esperienza, in quanto i composti che derivano dalla perossidazione lipidica sono presenti in tracce ( $10^{-12}$  M ,  $10^{-9}$  M) e sembra quindi cruciale, nell'analisi di tali composti, effettuare una fase di pre-concentrazione del campione. L'introduzione della SPME ha semplificato l'analisi dell'esalato ed è già stata utilizzata per quantificare varie classi di VOC (Poli *et al.*, 2008; Ligor *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009; Buszewski *et al.*, 2009; Stashenko *et al.*, 2006; Svensson *et al.*, 2007). Inoltre, la SPME non è influenzata da campioni ad alto contenuto di acqua, rendendo tale metodica particolarmente adatta per l'analisi dell'aria esalata.

Il tasso di umidità dell'esalato può essere cruciale, in quanto alti livelli di umidità possono influenzare la fase di pre-concentrazione e l'analisi GC-MS di singoli composti.

L'SPME richiede una rigorosa ottimizzazione dei parametri e la validazione è necessaria soprattutto per la determinazione di composti in tracce. Inoltre, non tutti i composti nell'esalato possono essere facilmente estratti e la scelta della fibra SPME, che permetta un completo adsorbimento e desorbimento, è fondamentale ed in molti casi può essere necessaria la derivatizzazione.

La derivatizzazione su fibra SPME usando come reagente PFHBA è stata precedentemente usata per estrarre aldeidi da campioni biologici (Svensson *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2004a; Li *et al.*, 2005) e ambientali (Tsai *et al.*, 2003; Pieraccini *et al.*, 2002). Alla luce di questi interessanti risultati, soprattutto per la capacità di quantificare anche elementi in tracce, il metodo è stato modificato per permettere la determinazione delle aldeidi nell'aria esalata utilizzando un dispositivo disponibile in commercio, il Bio-VOC (Poli *et al.*, 2008; Poli *et al.*, 2005), che permette di campionare in maniera rapida e semplice l'aria alveolare escludendo l'aria dello spazio morto che può contaminare o diluire il campione.

Le aldeidi possono essere presenti nell'ambiente come contaminati esogene (prodotti di combustione) (Feng *et al.*, 2007) e il poter escludere la possibile contaminazione con l'aria ambientale nel sito di raccolta dell'esalato è molto importante. I livelli di pentanale ed esanale nell'aria *indoor* e in aree in costruzione nelle quali avvengono processi di combustione, sono di almeno un ordine di grandezza più elevati di quelli misurati nella stanza utilizzata per la raccolta dei

campioni nella quale non vi era nessun processo di combustione o esposizione a fumo di sigaretta (circa  $70 \times 10^{-12}$  M per pentanale e  $200-250 \times 10^{-12}$  M per esanale) (Clarisse *et al.*, 2003; Dassonville *et al.*, 2009). I livelli di diverse aldeidi nell'aria ambientale di campioni raccolti a Santiago (Cile), confermano l'ordine di grandezza dei nostri risultati con l'eccezione del butanale, i cui livelli variano in base al giorno ( $120 \pm 120$  pM) (Rubio *et al.*, 2006). Questi dati confermano che le aldeidi presenti nell'ambiente possono rappresentare una possibile fonte di contaminazione e sottolineano l'importanza di valutare l'ambiente in cui i campioni di aria esalata sono raccolti.

L'utilizzo del Bio-VOC permette la raccolta dell'ultima porzione dell'aria esalata (ultimi 150 ml), che dovrebbe essere solo minimamente influenzata da contaminazioni ambientali e maggiormente rappresentativa dei livelli polmonari.

La concentrazione di VOC endogeni nell'aria alveolare dovrebbe essere più alta rispetto ai campioni di aria espirata mista (aria alveolare più spazio morto) in quanto non è presente la diluizione del campione nell'aria dello spazio morto.

Il fatto che nell'aria esalata dei nostri controlli i livelli delle aldeidi fossero sempre più elevati rispetto ai campioni di aria ambientale, dimostrerebbe che i livelli di aldeidi nell'aria esalata non possono essere attribuiti a contaminazione ambientale. Un'altra maniera per limitare la contaminazione ambientale è quella di calcolare il gradiente alveolare dai livelli misurati nell'aria espirata mista sottraendo i valori misurati in campioni ambientali che possono influenzare i livelli dei VOC presenti nell'aria dello spazio morto (Phillips *et al.*, 2003a). Tuttavia questo metodo non tiene conto della complessità dell'assorbimento polmonare, dell'esalazione di composti volatili e dell'effetto della diluizione e/o concentrazione dello spazio morto che può variare e non essere accuratamente quantificato (Buszewski *et al.*, 2007).

## 6.2 STUDIO II

Si sono ottenuti in questo studio tre importanti risultati: (i) i livelli di Mn e Mg sono risultati essere influenzati dalla riacutizzazione della BPCO ed un incremento nelle loro concentrazioni è stato osservato alla riacutizzazione rispetto ai valori ottenuti dopo guarigione; (ii) i valori degli elementi metallici nel siero non sono stati modificati dalla riacutizzazione della malattia; (iii) i livelli sierici di PCT e PCR misurati alla riacutizzazione erano significativamente più elevati rispetto ai valori determinati dopo guarigione.

### 6.2.1 Elementi metallici nel CAE

La maggior parte dei metalli nel CAE non ha mostrato variazioni legate alla riacutizzazione, nonostante i livelli riscontrati deviassero rispetto a quelli osservati in precedenza in soggetti sani. Ad esempio, i livelli di Fe e Cu nel CAE di pazienti con BPCO, erano simili a quelli osservati precedentemente in un altro gruppo di pazienti con stessa patologia ed in fumatori e mostravano una importante riduzione rispetto ai controlli sani (Mutti *et al.*, 2006).

I livelli di Mn e Mg, quest'ultimo non valutato in precedenza, erano significativamente più elevati durante la riacutizzazione di BPCO rispetto ai valori riscontrati dopo guarigione. In particolare, i livelli di Mn mostravano una graduale riduzione in 16 pazienti, nessuna variazione in 9 soggetti e un piccolo incremento in 3 pazienti. Una progressiva riduzione nei livelli di Mg era presente in 16 pazienti mentre un andamento opposto era presente negli altri soggetti. È interessante notare come i pazienti con una riduzione nei livelli di Mn avevano anche una riduzione nei livelli di Mg e che questi elementi erano anche correlati tra loro alla riacutizzazione. La concordante variazione nei livelli di Mn e Mg potrebbe suggerire una simile azione biologica oppure un analogo carico corporeo dovuto ad una comune fonte di esposizione. In effetti, entrambi gli elementi sono stati riconosciuti essere coinvolti nell'omeostasi respiratoria: il Mn è un cofattore della superossido dismutasi (SOD) mitocondriale e quindi avrebbe un ruolo nella risposta detossificante verso il danno ossidativo polmonare (Rahman *et al.*, 2006). Nei pazienti con BPCO riacutizzata elevati livelli di Mn potrebbero riflettere un'aumentata attività della SOD mitocondriale. Ciò appare concorde con uno

studio di Sadowska *et al.* che mostra un incremento nelle difese antiossidanti durante la riacutizzazione della BPCO (Sadowska *et al.*, 2006).

Il Mg riveste un ruolo importante nel rilassamento e broncodilatazione delle vie aeree, stabilizzazione delle mast-cellule, rilascio di mediatori neuro-ormonali e nella clearance mucociliare (Gourgoulianis *et al.*, 2001; Britton *et al.*, 1994).

Gli elevati livelli di Mg osservati durante la riacutizzazione potrebbero riflettere un tentativo d'incremento della concentrazione polmonare di questo elemento, utile per controbilanciare i meccanismi di ostruzione associati con la riacutizzazione. Riguardo l'effetto del Mg sull'eccitabilità delle membrane delle cellule muscolari lisce, una supplementazione di tale elemento è stata proposta nel trattamento dei pazienti con BPCO riacutizzata con alcuni risultati positivi (Skorodin *et al.*, 1995; Abreu Gonzalez *et al.*, 2006).

Si è notato una discrepanza tra i livelli degli elementi metallici valutati nel CAE e nel siero, che tuttavia non appaiono inconsistenti con la letteratura; infatti la somministrazione sistemica di Mg, è risultata avere effetto nella BPCO, differentemente dalla somministrazione locale con aerosol, suggerendo che il fluido di rivestimento delle vie aeree e il siero possono non essere in equilibrio per certi componenti che sono metabolicamente attivi in un dato sito (Rowe and Camargo, 2008). Inoltre, l'incremento di Mg a livello polmonare potrebbe essere associato con altri significativi effetti fisiologici, come la riduzione dell'iperinflazione polmonare. Alcuni autori (do Amaral *et al.*, 2008) hanno osservato che il trattamento con Mg era associato con una significativa riduzione del volume residuo. Le concentrazioni di Mn e Mg potrebbero riflettere una risposta fisiologica alla fase acuta della malattia. È interessante notare che studi di risonanza paramagnetica elettronica hanno mostrato che spesso il  $Mn^{2+}$  può rimpiazzare il  $Mg^{2+}$  in funzioni biologiche, come nel sito attivo di enzimi che processano gli acidi nucleici (Sissi and Palombo, 2009).

Non possiamo infine escludere del tutto che i livelli di Mn e Mg potrebbero essere alterati da fonti ambientali (Tubek and Tubek, 2008), sebbene tale spiegazione sia inconsistente con l'andamento dei dati osservato. Infatti, le concentrazioni di altri elementi metallici tossici, contenuti nel fumo di tabacco e in ambienti inquinati, non si modificano nel corso della riacutizzazione.

I livelli di tutti gli elementi metallici nei campioni di CAE non erano influenzati dalla severità dello stadio di malattia classificata in base alle linee guida GOLD né in

base ai criteri di riacutizzazione della BPCO proposti da Anthonisen. L'incremento di Mn nel CAE dei pazienti riacutizzati è in linea con i risultati ottenuti precedentemente in pazienti con BPCO clinicamente stabile (Mutti *et al.*, 2006): infatti, tra diversi gruppi di pazienti abbiamo riscontrato il più alto range per i livelli di Mn, nei pazienti con BPCO.

Si potrebbe ritenere che quei pazienti con BPCO, con i più alti livelli di Mn nel CAE, siano maggiormente predisposti a sviluppare una riacutizzazione. Ulteriori studi longitudinali dovranno essere effettuati per chiarire e verificare tale ipotesi.

### **6.2.2 Elementi metallici nel sangue**

Non si sono osservate variazioni di rilievo degli elementi metallici durante la riacutizzazione della BPCO ed i livelli sono apparsi analoghi ai valori di riferimento (CDC 2005; Lyengar and Woittiez, 1998; Minoia *et al.*, 1990).

Un'ipotesi che potrebbe spiegare i livelli osservati nel siero, è il grado moderato della riacutizzazione occorsa nei pazienti di questo studio, trattati tutti a domicilio.

Mentre i livelli di Mn mostravano un andamento opposto rispetto ai livelli osservati nel CAE, compatibile con un diverso significato nelle due matrici, le variazioni di Mg nel siero seguivano lo stesso andamento riscontrato nel CAE, anche se di un ordine di grandezza superiore rispetto ai corrispondenti livelli nel CAE. In questo caso, è possibile ipotizzare che modificazioni a breve termine in un organo periferico non siano rispecchiate a livello sistemico.

Vi sono alcuni dati pubblicati sui livelli di alcuni elementi metallici nel siero di pazienti con BPCO riacutizzata. In uno studio retrospettivo (Aziz *et al.*, 2005) si sono osservati livelli di Mg più bassi in pazienti con BPCO riacutizzata rispetto ad un gruppo di pazienti in fase clinica stabile; comunque, in accordo con i nostri dati, i valori di Mg nel siero erano compresi nell'intervallo di riferimento.

### **6.2.3 Proteine nel siero**

PCT e PCR sono state valutate in quanto biomarcatori precedentemente validati come indicatori diagnostici e prognostici associati alla BPCO riacutizzata e quindi come un'utile base di confronto verso i livelli degli elementi metallici dosati nel CAE e nel siero. I valori di PCT osservati in questo studio, sebbene più alti alla riacutizzazione rispetto ai valori riscontrati alla guarigione (Stolz *et al.*, 2007a;

Stolz *et al.*, 2007b), erano all'interno dell'intervallo di riferimento del nostro laboratorio (0-0.5 µg/L); inoltre la maggior parte dei valori riscontrati (26 su 28) erano al di sotto di 0.25 µg/L, che è stato proposto come possibile cut-off di presenza d'infezione batterica (Stolz *et al.*, 2007a).

In accordo con precedenti studi (Weis and Almdal 2006; Stolz *et al.*, 2007b; Dev *et al.*, 1998), i livelli di PCR erano significativamente elevati alla riacutizzazione rispetto ai valori riscontrati dopo guarigione. In circa la metà dei pazienti i valori di PCR alla riacutizzazione erano all'interno dell'intervallo di riferimento (<10 mg/L) come riportato in altri studi (Weis and Almdal, 2006; Dev *et al.*, 1998); solo 4 pazienti avevano livelli di PCR superiori a 50 mg/L, cut-off predittivo di infezione batterica nel tratto inferiore delle vie respiratorie (Perera *et al.*, 2007).

Una limitazione del presente studio potrebbe essere rappresentata dallo scarso controllo di potenziali fattori di confondimento, come il tempo passato in ambienti outdoor e la dieta, che sono difficili da registrare per un periodo di tempo relativamente lungo. Inoltre, anche il limitato numero di pazienti con BPCO riacutizzata reclutati in questo studio può rappresentare un altro limite, sebbene si siano confrontati i dati relativi a misure ripetute negli stessi soggetti, con un incremento del potere statistico.

### 6.3 STUDIO III

I risultati dello studio hanno mostrato che vi sono solo alcune piccole differenze nei livelli di diversi elementi metallici determinati nel CAE in pazienti con IPF, NSIP e sarcoidosi e non vi è un pattern di elementi metallici in grado di distinguere le diverse malattie con alto livello di sensibilità e specificità. Tuttavia, un pattern di metalli pneumotossici (Ni, Si) ed elementi essenziali (Zn, Se e forse Cu) con l'aggiunta del Co, distinguevano i pazienti con ILD rispetto a controlli sani non fumatori con un alto grado di sensibilità (96.4%) e specificità (90.9%). I risultati apparivano più modesti se gli elementi metallici venivano considerati separatamente, nonostante le significative differenze riscontrate tra i gruppi.

I campioni di CAE dei pazienti con ILD contenevano livelli più elevati di Ni, Cr e Si rispetto ai controlli ed nei pazienti con IPF o sarcoidosi vi erano livelli più bassi di Co. Inoltre, rispetto ai controlli, tutti i pazienti con ILD mostravano livelli più bassi di Cu e Se e i pazienti con IPF o NSIP avevano livelli più bassi di Fe.

In precedenza il nostro gruppo di ricerca ha valutato i livelli di elementi metallici nel CAE di pazienti con BPCO o asma, come anche in controlli fumatori e non fumatori (Mutti *et al.*, 2006). I pazienti con BPCO avevano livelli più alti di Al, Pb e Cd rispetto ai non fumatori e più bassi livelli di Fe e Cu, mentre i pazienti con asma presentavano livelli più bassi di Fe rispetto ai non fumatori e più alti livelli di Ni dei fumatori sani. Vi erano anche differenze nel gruppo dei pazienti con BPCO, tra fumatori ed ex-fumatori/non fumatori: i primi avevano livelli maggiori di Pb e Cd ed in confronto ai controlli non fumatori, gli ultimi mostravano più alti livelli di Pb, Cd e Al. Avevamo ipotizzato che gli incrementati livelli di questi tre elementi metallici nel CAE dei pazienti con BPCO erano legati probabilmente all'esposizione cumulativa a lungo termine al fumo di sigaretta (88% dei pazienti con BPCO era costituita da fumatori o ex-fumatori) o ad esposizione ambientale a metalli pneumotossici, mentre i più bassi livelli di Cu e Fe erano dovuti a deplezione in seguito alla risposta antiossidante.

Poiché l'infiammazione e lo stress ossidativo sono processi comuni alle ILD e ad altre patologie polmonari, non è apparso sorprendente che, come osservato in precedenza in pazienti con BPCO ed asma, i pazienti con ILD avessero ridotti livelli di Cu e Fe. Si deve però osservare che le ILD hanno peculiari meccanismi

patologici e caratteristiche istopatologiche che potrebbero spiegare le differenze osservate nei livelli di alcuni metalli pneumotossici.

Inoltre i pazienti con ILD erano tutti ex-fumatori o non fumatori e non si sono osservati effetti di confondimento legati alla condizione di ex-fumatore nei livelli degli elementi metallici nel CAE. In effetti i livelli di Al, Pb e Cd erano simili ai livelli riscontrati nei controlli e non apparivano influenzati dallo stato di malattia (il Cd era in molti casi inferiori al LOD).

Invece i livelli di altri metalli pneumotossici (Ni, Cr e Si) nel CAE sono risultati maggiori nei pazienti con ILD rispetto ai controlli. Ciò indicherebbe che probabilmente erano presenti delle differenze peculiari rispetto ai soggetti affetti da BPCO ed asma ed è possibile che un'esposizione diversa da quella legata al fumo di sigaretta possa aver influito sui livelli di tali elementi metallici a livello dell'organo bersaglio.

Altri studi sono in corso per cercare di identificare differenti pattern di metalli pneumotossici in pazienti con differenti patologie polmonari.

Il fatto che i livelli di alcuni elementi (Ni, Cr e Si) siano risultati più elevati nei pazienti con ILD rispetto al gruppo di controllo potrebbe essere dovuto ad una maggiore persistenza a livello polmonare. Infatti, nonostante le differenze tra IPF, NSIP e sarcoidosi, la fibrosi è una caratteristica comune a tutte le ILD e potrebbe rendere difficoltosa la rimozione degli elementi metallici. Alterazioni strutturali dell'interstizio polmonare riducono gli scambi gassosi e ciò si riflette in una riduzione del DLCO, tipica delle ILD (riscontrata anche nei nostri pazienti).

Inoltre, questi metalli possono persistere a lungo nel polmone molti anni dopo che l'esposizione è terminata. Dati presenti in letteratura riguardo all'analisi minerale di tessuto polmonare o di linfonodi polmonari di pazienti con ILD, indicano che è possibile un'associazione tra IPF e polveri minerali come silice/silicati, Al e Ni (Monsó *et al.*, 1990; Kitamura *et al.*, 2007; Siegesmund *et al.*, 1974) e ciò è parzialmente in linea con i nostri risultati.

In un *case report* (Rizzato *et al.*, 1986), si descriveva che, in un giovane uomo affetto da ILD esposto per molti anni a polveri di metallo come molatore di utensili di acciaio con inserto di metalli duri, l'analisi di una biopsia polmonare effettuata quattro anni dopo il termine dell'esposizione lavorativa mostrava livelli più elevati di W, Ta, Co, Cr e Ni rispetto ai valori determinati analizzando diciassette biopsie di controlli.

Tuttavia, i dati sono difficili da interpretare in termini di causalità per la mancanza di una chiara e stabilita eziologia di queste malattie e per la difficoltà nell'ottenere, nel nostro studio, misure quantitative in merito alla dose e durata di esposizioni pregresse.

L'infiammazione cronica e lo stress ossidativo a questa associata, appaiono essere importanti meccanismi nella patogenesi delle ILD (Thannickal *et al.*, 2004). I pazienti con ILD rispetto ai controlli avevano livelli più bassi di alcuni elementi di transizione (Cu, Fe e Se) coinvolti nei sistemi redox implicati nel controllo dello stress ossidativo. È probabile che la riduzione di questi metalli in tracce sia dovuta ad una loro deplezione polmonare, come risultato di un cronico processo di stress ossidativo e flogosi (Mutti *et al.*, 2006).

Non vi sono altri studi che valutano elementi metallici nel CAE di pazienti con ILD anche se recentemente Bargagli *et al.* ha valutato la concentrazione di alcuni metalli in campioni di BAL di pazienti con sarcoidosi, IPF, istiocitosi a cellule di Langherans, confrontandoli con i livelli riscontrati in campioni di BAL di controlli sani (fumatori e non fumatori) (Bargagli *et al.*, 2008). I livelli ( $\mu\text{g/L}$ ) variavano largamente ma erano di uno-due ordini di grandezza più elevati rispetto ai risultati da noi osservati, come atteso per la maggior diluizione di sostanze non volatili nel CAE rispetto ai tessuti, fluido di rivestimento broncoalveolare e altri fluidi biologici; comunque, erano più bassi del fattore 1000-10000 considerato per la diluizione del CAE rispetto al sangue. Differentemente rispetto ai nostri risultati, gli autori hanno osservato livelli significativamente inferiori di Mn nei pazienti rispetto ai controlli e più bassi valori di Zn e Cr nei pazienti con IPF, che sono stati interpretati essere causati dallo stress ossidativo o da meccanismi di clearance.

Il CAE ed il BAL sono difficili da comparare e le correlazioni tra biomarcatori nelle due matrici sono in genere scarse (Corradi *et al.*, 2008).

Noi abbiamo osservato come un pattern di elementi metallici, i cui livelli erano significativamente differenti nei pazienti con ILD rispetto ai controlli, distingueva i due gruppi con grado relativamente alto di sensibilità (96.4%) e specificità (90.9%); sebbene gli elementi considerati singolarmente mostrassero differenze significative tra i due gruppi, erano molto meno efficaci nel distinguere pazienti e controlli.

Una limitazione di questo studio è rappresentata dal campione relativamente piccolo di pazienti considerati, spiegabile però dalla bassa prevalenza delle ILD

nella popolazione generale. In effetti sembrerebbe più appropriato, data la bassa prevalenza di tali patologie, utilizzare l'analisi degli elementi metallici nel CAE per escludere piuttosto che confermare la malattia in soggetti con sintomatologia sospetta per ILD. Comunque i nostri risultati dovranno essere validati in studi clinici più ampi. I risultati osservati in questo studio potrebbero inoltre essere migliorati valutando anche altre ILD, per verificare se vi sono differenze nei livelli di elementi metallici nel CAE, che possano riflettere differenze in condizioni patologiche diverse, utili per distinguere pazienti con patologie simili.

## 7. CONCLUSIONI

In questa tesi di dottorato sono stati applicati metodi non invasivi per lo studio di indicatori biologici da applicare nella diagnosi di alcune tra le principali patologie polmonari: il tumore polmonare non a piccole cellule, la broncopneumopatia cronica ostruttiva e le interstiziopatie polmonari.

La raccolta dell'aria esalata, sia nella sua componente gassosa che nella componente condensata (CAE), permette di valutare molecole derivanti dalle vie aeree e rappresenta una matrice ideale per l'individuazione di indicatori biologici nello studio delle patologie polmonari. Inoltre, la non invasività che caratterizza tali metodiche, permette di applicarle sia a soggetti con patologie respiratorie che a soggetti privi di malattia e di raccogliere campioni ripetuti nel tempo, senza alterare le mucose delle vie aeree o causare flogosi.

I risultati ottenuti hanno mostrato livelli di aldeidi nell'aria esalata significativamente maggiori nei pazienti con NSCLC rispetto ai controlli ed il pattern selezionato era in grado di classificare correttamente i controlli rispetto ai malati nel 92.1% dei casi, mentre, pur non distinguendo i pazienti fumatori da quelli ex-fumatori e non fumatori, i pazienti con tumore venivano separati dai controlli nel 90% dei casi (**Studio I**).

Daltra parte, l'analisi degli elementi metallici nel CAE effettuata in un gruppo di pazienti con BPCO prima e dopo un'episodio di riacutizzazione della malattia, ha messo in luce il potenziale ruolo di Mn e Mg nel CAE, i cui livelli erano significativamente più elevati alla riacutizzazione che dopo guarigione, come indicatori di effetto/suscettibilità. Nessun altro elemento metallico misurato nel CAE e nel siero ha mostrato significative variazioni durante la riacutizzazione, confermando indirettamente la validità e riproducibilità dell'analisi degli elementi metallici nel CAE (**Studio II**).

Infine, nei pazienti con ILD di origine sconosciuta, l'analisi degli elementi metallici nel CAE ha mostrato come un pattern di elementi metallici, alcuni pneumotossici (Ni, Si), altri essenziali (Zn, Se e forse Cu) con l'aggiunta del Co, distingueva i malati dai soggetti sani con un alto grado di sensibilità e specificità (96.4% e 90.9%, rispettivamente), pur non permettendo di distinguere i pazienti con IPF, NSIP e sarcoidosi tra loro. Inoltre, si sono osservati nei pazienti livelli incrementati di alcuni elementi metallici pneumotossici (Ni, Cr, Si) e ridotti livelli di alcuni

elementi di transizione (Fe, Se, Cu), rispetto al gruppo di controllo. Tali dati, in parte in accordo con quanto osservato in letteratura, potrebbero essere il risultato di pregresse esposizioni e della maggior persistenza a livello dell'organo bersaglio, facilitata dalle modificazioni strutturali a carico del parenchima polmonare caratteristiche di tali patologie. Tali dati indicherebbero inoltre un differente ruolo degli indicatori valutati nel CAE; in effetti se da un lato gli aumentati livelli di alcuni elementi metallici possono essere interpretati come indicatori della dose all'organo bersaglio, d'altra parte la riduzione dei livelli di alcuni elementi di transizione coinvolti in sistemi redox implicati nel controllo dello stress ossidativo, rappresenterebbero potenziali indicatori di effetto/suscettibilità **(Studio III)**.

Il fattore che accomuna tutti e tre gli studi, al di là dei diversi biomarcatori utilizzati nell'aria esalata e nel CAE, è l'estrema difficoltà nel definire un singolo biomarcatore sufficientemente sensibile e specifico per distinguere non solo i malati dai controlli, ma anche diverse patologie tra loro. Tuttavia, l'utilizzo di un pattern di biomarcatori in grado di monitorare in modo complessivo i molteplici meccanismi fisiopatologici alla base delle diverse patologie polmonari e l'utilizzo di tecniche di statistica multivariata per classificare i soggetti in base a tale pattern, potrebbe risultare promettente dal punto di vista diagnostico, se affiancato alle metodiche tradizionali in uso.

Un ampliamento della casistica che comprenda nello stesso tempo soggetti con diverse patologie caratterizzate da flogosi e stress ossidativo e soggetti sani che condividano con i malati determinati fattori di rischio, permetterebbe una validazione diagnostica. Inoltre, permetterebbe di valutare l'importanza e l'influenza di potenziali fattori confondenti, come la presenza di patologie respiratorie concomitanti, il fumo di sigaretta o altri agenti causali.

Sono in corso diversi studi volti ad approfondire questi aspetti. In particolare, il nostro gruppo di ricerca sta conducendo un progetto approvato nell'ambito del Programma di Ricerca Regione-Università 2007-2009, denominato "Early molecular diagnosis of lung cancer", che ha come obiettivo l'identificazione, mediante metodiche non invasive, di un pattern di indicatori per la diagnosi precoce di tumore polmonare.

Il progetto, tutt'ora in corso, prevede il reclutamento di soggetti fumatori e non fumatori di età  $\geq 45$  anni, che presentino sintomi (es tosse persistente, emottisi, ripetuti episodi bronchitici e/o polmoniti), o segni (riscontro radiologico di nodulo polmonare non calcifico) suggestivi di neoplasia polmonare. I soggetti sono sottoposti a questionario per la raccolta dei dati anamnestici, comprensivo della valutazione della condizione espositiva a fattori di rischio voluttuari, ambientali ed occupazionali e ad indagini non invasive quali la raccolta dell'aria esalata nelle due componenti di aria espirata e condensato e a prelievo venoso. In tali matrici vengono analizzati rispettivamente VOCs, fattori angiogenetici e dopo estrazione del DNA dal sangue, verranno stimati la metilazione del promotore dei geni p16, CDH13, DAPK e i livelli di DNA circolante.

In seguito all'approfondimento diagnostico, dovuto al manifestarsi di sintomatologia o al riscontro radiologico di immagine polmonare sospetta, i soggetti vengono poi distinti in casi, se vi è conferma istologica di tumore polmonare (NSCLC), o in controlli. Le indagini diagnostiche permettono inoltre di individuare le patologie respiratorie responsabili delle manifestazioni cliniche (ad es. BPCO, bronchiectasie, noduli polmonari benigni). I casi e i controlli verranno appaiati in base all'età ( $\pm 5$  anni), al sesso e all'abitudine tabagica, distinguendo i non fumatori, i fumatori distinti in base all'indice pacco anno ( $<20$  pacchi/anno o  $> 20$  pacchi/anno) e gli ex-fumatori, ovvero coloro che hanno smesso di fumare da almeno un anno.

Nel presente lavoro di tesi, sono riportati solo in parte alcuni risultati parziali, descritti nel primo studio relativo alla valutazione delle aldeidi nell'aria esalata.

Il reclutamento dei soggetti e le analisi sono tutt'ora in corso.

La reale utilità ed efficacia delle metodiche non invasive e degli indicatori selezionati potrà essere stabilita solo considerando nell'insieme tutti i dati ottenuti e le variabili confondenti.

## 8. BIBLIOGRAFIA:

Abba AA. Exhaled nitric oxide in diagnosis and management of respiratory diseases. *Ann Thorac Med* 2009; 4:173-181.

Abreu Gonzalez J, Hernandez Garcia C, Abreu Gonzalez P, Martin Garcia C, Jimenez A. Effect of intravenous magnesium sulfate on chronic obstructive pulmonary disease exacerbations requiring hospitalization: a randomized placebo-controlled trial. *Arch Bronconeumol* 2006; 42:384-387.

Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol* 2005; 23:3175-3185.

Alberg AJ, Nonemaker J. Who is at high risk for lung cancer? Population-level and individual-level perspectives. *Semin Respir Crit Care Med*, 2008; 29:223-232.

Alberts WM; American College of Chest Physicians. Diagnosis and management of lung cancer executive summary: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2<sup>nd</sup> Edition). *Chest* 2007; 132 (3Suppl):1S-19S.

Al-Kattan K, Sepas E, Fountain SW, Townsend ER. Disease recurrence after resection for stage I lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997;12:380-384.

Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovan A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18:3-10.

American Thoracic Society, European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:912-930.

American Thoracic Society/European Respiratory Society. International multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:277-304.

Andriani F, Conte D, Mastrangelo T, Leon M, Ratcliffe C, Roz L, Pelosi G, Goldstraw P, Sozzi G, Pastorino U. Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers. *Int J Cancer* 2004; 108:91-96.

Anglim PP, Alonzo TA, Laird-Offringa IA. DNA methylation-based biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer: an update. *Mol Cancer* 2008; 7:81.

Antczak A, Górski P. Markers of pulmonary diseases in exhaled breath condensate. *Int J Occup Med Environ Health* 2002; 15:317-323.

Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 1987; 106:196-204.

Anzueto A. Clinical course of chronic obstructive pulmonary disease: review of therapeutic interventions. *Am J Med* 2006; 119:(10 Suppl 1):S46-S53.

ATS/ERS/WASOG Committee. Statement on Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:736-755.

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.

Aziz HS, Blamoun AI, Shubair MK, Ismail MM, Debari VA, Khan MA. Serum magnesium levels and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a retrospective study. *Ann Clin Lab Sci* 2005; 35:423-427.

Bach PB, Jett JR, Pastorino U, Tockman MS, Swensen SJ, Begg CB. Computer tomography screening and lung cancer outcomes. *JAMA* 2007a; 297:953-961

Bach PB, Silvestri GA, , Morgan Hanger M, Jett JR. Screening for Lung Cancer. ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition). *Chest* 2007b; 132:69S-77S.

Balmes JR. Occupational contribution to the burden of chronic obstructive pulmonary disease. *J Occup Environ Med.* 2005; 47:154-160.

Bardin-Mikolajczak A, Lissowska J, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Navratilova M, Bencko V, Janout V, Fevotte J, Fletcher T, 't Mannetje A, Brennan P, Boffetta P. Occupation and risk of lung cancer in Central and Eastern Europe: the IARC multi-center case-control study. *Cancer Causes Control*. 2007; 18:645-654.

Bargagli E, Monaci F, Bianchi N, Bucci C, Rottoli P. Analysis of trace elements in bronchoalveolar lavage of patients with diffuse lung diseases. *Biol Trace Elem Res* 2008; 124:225-235.

Barnard J, Rose C, Newman L, Canner M, Martyny J, McCammon C, Bresnitz E, Rossman M, Thompson B, Rybicki B, Weinberger SE, Moller DR, McLennan G, Hunninghake G, DePalo L, Baughman RP, Iannuzzi MC, Judson MA, Knatterud GL, Teirstein AS, Yeager HJ, Johns CJ, Rabin DL, Cherniack R; ACCESS Research Group. Job and industry classifications associated with sarcoidosis in A Case-Control Etiologic Study of Sarcoidosis (ACCESS). *J Occup Environ Med* 2005; 47:226-234.

Bartal M. COPD and tobacco smoke. *Monaldi Arch Chest Dis* 2005; 63:213-225.

Baumgartner KB, Samet JM, Coultas DB, Stidley CA, Hunt WC, Colby TV, Waldron JA. Occupational and environmental risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: a multicenter case-control study. *Am J Epidemiol* 2000; 152:307-315.

Baumgartner KB, Samet JM, Stidley CA, Colby TV, Waldron JA. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:242-248.

Beadsmoore CJ, Sreaton NJ. Classification, staging and prognosis of lung cancer. *Europ J Rad* 2003; 45 :8-17

Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol* 2008;82: 493-512.

Bharti A, Ma PC, Salgia R. Biomarker discovery in lung cancer-promises and challenges of clinical proteomics. *Mass Spectrom Rev* 2007; 26:451-466.

Binnie V, McHugh S, Macpherson L, Borland B, Moir K, Malik K. The validation of self-reported smoking status by analysing cotinine levels in stimulated and unstimulated saliva, serum and urine. *Oral Dis* 2004; 10:287-293.

Black WC. Computed tomography screening for lung cancer: review of Screening Principles and Update on Current Status. *Cancer*. 2007;110:2370-2384.

Boffetta P, Agudo A, Ahrens W, benhamou E, Benhamou S, Darby SC, Ferro G, Fortes C, Gonzalez CA, Jockel KH, Krauss M, Kreienbrock L, Kreuzer M, Mendes A, Merletti F, Nyberg F, Pershagen G, Pohlabein H, Riboli E, Schmid G, Simonato L, Tredaniel J, Whitley E, Wichmann HE, Winck C, Zambon P, Saracci R. Multicenter case-control study of exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer. *J Nat Cancer Inst* 1998; 90:1440-1450.

Boots AW, Drent M, Swennen EL, Moonen HJ, Bast A, Haenen GR. Antioxidant status associated with inflammation in sarcoidosis: A potential role for antioxidants. *Respir Med* 2009; 103:364-372.

Borrill ZL, Roy K, Singh D. Exhaled breath condensate biomarkers in COPD. *Eur Respir J* 2008; 32: 472–486.

Bowman RV, Yang IA, Semmler ABT, Fong KM. Epigenetics of lung cancer. *Respirology* 2006; 11: 355-365.

Bozinovski S, Hutchinson A, Thompson M, Macgregor L, Black J, Giannakis E, Karlsson AS, Silvestrini R, Smallwood D, Vlahos R, Irving LB, Anderson GP. Serum amyloid A is a biomarker of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:269-278.

Brambilla C, Fievet F, Jeanmart M, de Fraipont F, Lantuejoul S, Frappat V, Ferretti G, Brichon PY, Moro-Sibilot D. Early detection of lung cancer: role of biomarkers. *Eur Respir J* 2003; 21(suppl 39):36S-44S.

Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathway: roadmap for therapies. *Eur Respir J* 2009; 33:1485-1497.

Breuer RHJ, Postmus PE, Smit EF. Molecular pathology of non small cell lung cancer. *Respiration* 2005; 72:313-330.

Brightling CE, Green RH, Pavord ID. Biomarkers predicting response to corticosteroid therapy in asthma. *Treat Respir Med* 2005; 4:309-316.

British Thoracic Society and Standards of Care Committee. The diagnosis, assessment and treatment of diffuse parenchymal lung disease in adults. *Thorax* 1999; 54(Suppl 1):S1-S30.

Britton J, Pavord I, Richeards K, Wisniewski A, Knox A, Lewis S, Tattersfield A, Weiss S. Dietary magnesium, lung function, wheezing and airway hyper-reactivity in a random adult population sample. *Lancet* 1994; 34:357-362.

Broeckaert F, Clippe A, Knoop B, Hermans C, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16): features as a peripheral lung biomarker. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 923:68-77.

Brownson RC, Alavanja MC, Caporaso N, Simoes EJ, Chang JC. Epidemiology and prevention of lung cancer in nonsmokers. *Epidemiol Rev* 1998; 20:218-236.

Buszewski B, Keszy M, Ligor T, Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed Chromatogr* 2007;21:553-566.

Buszewski B, Ulanowska A, Ligor T, Denderz N, Amann A. Analysis of exhaled breath from smokers, passive smokers and non-smokers by solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2009; 23: 551-556.

Caglieri A, Goldoni M, Acampa O, Andreoli R, Vettori MV, Corradi M, Apostoli P, and Mutti A. The Effect of Inhaled Chromium on Different Exhaled Breath Condensate Biomarkers among Chrome-plating Workers. *Environ Health Perspect* 2006; 114:542-546

Castell JV, Donato MT, Gomez-Lechon MJ. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp Toxicol Pathol* 2005; 57(Suppl 1):189-204.

Cazzola M, MacNee W, Martinez FJ, Rabe KF, Franciosi LG, Barnes PJ, Brusasco V, Burge PS, Calverley PM, Celli BR, Jones PW, Mahler DA, Make B, Miravittles M, Page CP, Palange P, Parr D, Pistolesi M, Rennard SI, Rutten-van Mülken MP, Stockley R, Sullivan SD, Wedzicha JA, Wouters EF; American Thoracic Society; European Respiratory Society Task Force on outcomes of COPD. Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers. *Eur Respir J* 2008; 31:416-469.

Celli BR, Barnes PJ. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2007; 29:1224-1238

Centers for Disease Control and Prevention 2005. Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. US Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Environmental Health. Division of Laboratory Sciences. Atlanta, GA. NCEH Pub. No. 05-0570. <http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/thirdreport.pdf>.

Cepelak I, Dodig S. Exhaled breath condensate: a new method for lung disease diagnosis. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45:945-952.

Chan HP, Lewis C, Thomas PS. Exhaled breath analysis: novel approach for early detection of lung cancer *Lung Cancer* 2009; 63:164-168.

Chen TM, Gould M. Evaluation of patients with small, subcentimeter nodules. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; 29:241-247.

Ciencewicki J, Trivedi S, Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:456-468.

Ciombor KK, Rocha Lima CM. Management of small cell lung cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2006; 7:59-68.

Clarisse B, Laurent AM, Seta N, Le Moullec Y, El Hasnaoui A, Momas I. Indoor aldehydes: measurement of contamination levels and identification of their determinants in Paris dwellings. *Environ Res* 2003; 92:245-253.

Clerkin JS, Naughton R, Quiney C, Cotter TG. Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. *Cancer Letters* 2008; 266:30-36.

Comhair SAA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283:L246–L255.

Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Provincie Autonome di Trento e Bolzano. Accordo tra il Ministero della Salute, le Regioni e le Provincie Autonome sul documento concernente: “Linee Guida per la tutela e la promozione della salute negli ambienti confinati”. *Gazzetta Ufficiale* n.276 del 27 Novembre 2001, Supplemento Ordinario n. 252.

Corradi M, Acampa O, Goldoni M, Andreoli R, Milton D, Sama S R, Rosiello R, de Palma G, Apostoli P and Mutti A. Metallic elements in exhaled breath condensate and serum of patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Metallomics* 2009; 1:339-345.

Corradi M, Folesani G, Andreoli R, Manini P, Bodini A, Piacentini G, Carraro S, Zanconato S, Baraldi E. Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:395-399.

Corradi M, Mutti A. Exhaled breath analysis: from occupational to respiratory medicine. *Acta Biomed Ateneo Parmense* 2005 ; 76(Suppl 2):20-29.

Corradi M, Pignatti P, Brunetti G, Goldoni M, Caglieri A, Nava S, Moscato G, Balbi B. Comparison between exhaled and bronchoalveolar lavage levels of hydrogen peroxide in patients with diffuse interstitial lung diseases. *Acta Biomed* 2008; 79(Suppl 1):73-78.

Corradi M, Rubinstein I, Andreoli R, Manini P, Caglieri A, Poli D, Alinovi R, Mutti A. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1380-1386.

Corvol H, Flamein F, Epadu R, Clement A, Guillot L. Lung alveolar epithelium and interstitial lung disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(8-9):1643-51.

Costabel U. Sarcoidosis: clinical update *Eur Respir J* 2001; 32:56s–68s.

Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:967-972.

Dalaveris E, Kerenidi T, Katsabeki-Katsafli A, Kiropoulos T, Tanou K, Gourgoulis KI, Kostikas K. VEGF, TNF-alpha and 8-isoprostane levels in exhaled breath condensate and serum of patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2009; 64:219-225.

Dassonville C, Demattei C, Laurent AM, Le Moullec Y, Seta N, Momas I. Assessment and predictor determination of indoor aldehyde levels in Paris newborn babies' homes. *Indoor Air* 2009;19:314-323.

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(Suppl1):34-42.

Demedts M, Wells AU, Antò JM, Costabel U, Hubbard R, Cullinan P, Slabbynck H, Rizzato G, Poletti V, Verbeken EK, Thomeer MJ, Kokkarinen J, Dalphin JC, Newman Taylor A. Interstitial lung diseases: an epidemiological overview. *Eur Respir J* 2001; 32:2s-16s.

Deng C, Li N, Zhang X. Development of headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for determination of hexanal and heptanal in human blood. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004a; 813:47-52.

Deng C, Zhang X, Li N. Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004b; 808: 269-277.

Dev D, Wallace E, Sankaran R, Cunniffe J, Govan JRW, Wathen CG, Emmanuel XS. Value of C-reactive protein measurements in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 1998; 92:664-667.

Diederich S, Wormanns D. Impact of low-dose CT on lung cancer screening. *Lung Cancer* 2004; 45:S13-S19.

Direttiva 2004/107/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 15/12/2004 concernente l'arsenico, il cadmio, il mercurio, il nickel e gli idrocarburi policiclici aromatici nell'aria ambiente. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L23/3 del 26/1/2005.

do Amaral AF, Rodrigues AJ, Filho JT, Vannucchi H, Martinez JA. Effects of acute magnesium loading on pulmonary function of stable COPD patients. *Med Sci Monit* 2008; 14(10): CR524-529

Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002; 57:847-852.

Eisner, MD, Balmes J, Katz BP, Trupin L, Yelin E, Blanc P. Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Environ Health Perspect* 2005; 4:7-15.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11:81-128.

Feng S, Plunkett SE, Lam K, Kapur S, Muhammad R, Jin Y, Zimmermann M, Mendes P, Kinser R, Roethig HJ. A new method for estimating the retention of selected smoke constituents in the respiratory tract of smokers during cigarette smoking. *Inhal Toxicol* 2007;19:169-179.

Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* 2003; 58:892-900.

Franciosi LG, Page CP, Celli BR, Cazzola M, Walzer MJ, Danhof M, Rabe KF, Della Pasqua OE. Markers of exacerbation severity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2006, 7:74.

Franco R, Schoneveld, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters* 2008; 266: 6-11.

Fuchs P, Loesecken C, Schubert JK, Miekisch W. Breath gas aldehydes as a biomarkers of lung cancer. *Int J Cancer* 2009; Oct 16. [Epub ahead of print]).

Gabrielson E. Worldwide trends in lung cancer pathology. *Respirology* 2006; 11:533-538.

Gaspar EM, Lucena AF, Duro da Costa J, Chaves das Neves H. Organic metabolites in exhaled human breath--a multivariate approach for identification of biomarkers in lung disorders. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 2749-2756.

Gerritsen WB, Asin J, Zanen P, van den Bosch JM, Haas FJ. Markers of inflammation and oxidative stress in exacerbated chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respir Med* 2005; 99:84-90.

Gilbert NL, Guay M, David Miller J, Judek S, Chan CC, Dales RE. Levels and determinants of formaldehyde, acetaldehyde, and acrolein in residential indoor air in Prince Edward Island, Canada. *Environ Res* 2005; 99:11-17.

Goldoni M, Caglieri A, Andreoli R, Poli D, Manini P, Vettori MV, Corradi M, Mutti A. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. *BMC Pulm Med* 2005; 5:10

Goldoni M, Caglieri A, Poli D, Vettori MV, Corradi M, Apostoli P, Mutti A. Determination of hexavalent chromium in exhaled breath condensate and environmental air among chrome plating workers. *Anal Chim Acta* 2006; 562:229-235.

Goldoni M, Catalani S, De Palma G, Manini P, Acampa O, Corradi M, Bergonzi R, Apostoli P, Mutti A. Exhaled Breath Condensate as a Suitable Matrix to Assess Lung Dose and Effects in Workers Exposed to Cobalt and Tungsten. *Environ Health Perspect* 2004; 112:1293-1298.

Gomez M, Silvestri GA. Lung cancer screening. *Am J Med Sci* 2008; 335:46-50.

Gordon SM, Szidon JP, Krotoszynski BK, Gibbons RD, O'Neill HJ. Volatile organic compounds in exhaled air from patients with lung cancer. *Clin Chem* 1985; 31:1278-1282.

Gould MK, Fletcher J, Iannettoni MD, Lynch WR, Midthun DE, Naidich DP, Ost DE. Evaluation of patients with pulmonary nodules: when is it lung cancer?: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; 132 (3 Suppl):108S-130S.

Gourgoulis KI, Chatziparasidis G, Chatziefthimiou A, Molyvdas PA. Magnesium as a relaxing factor of airway smooth muscles. *J Aerosol Med* 2001; 14:301-307.

Greenberg AK, Lee MS. Biomarkers for lung cancer: clinical uses. *Curr Opin Pulm Med* 2007;13: 249-255.

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

Grote C, Pawliszyn J. Solid-phase microextraction for the analysis of human breath. *Anal Chem* 1997; 69:587-596.

Grolle JP, Mahieu L, Casterman J, Neveu N, Bonneau L, Lainè G, Bouige D, Lacroix C. Metal and metalloids multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values. *Forensic Sci Int* 2005; 153:39-44.

Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wilklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181:852-857.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.

Hankinson JL, Odencrantz JR, Fedan KB. Spirometric reference values from a sample of the general U.S. population. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:179-187.

Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF, Naidich DP, Mc Guinness G, Miettinen OS, Libby DM, Pasmantier MW, Koizumi J, Altorki NK, Smith JP. Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening. *Lancet* 1999; 354:99-105.

Henschke CI, Yankelevitz DF, Libby DM, Pasmantier MW, Smith JP, Miettinen OS. Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. *N Engl J Med* 2006; 355:1763-1771.

Hermans C, Bernard A. Lung epithelium specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:646-678.

Hermans C, Bernard A. Pneumoproteinaemia: a new perspective in the assessment of lung disorder. *Eur Respir J* 1998; 11:801-803.

Hnizdo E, Sullivan PA, Bang KM, Wagner G. Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the US population: a study of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 738-46.

Hoffmann D, Hoffmann I, El Bayoumy K., The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L Wynder. *Chem Res Toxicol* 2001; 14:767-790.

Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004; 364:709-721.

Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, Becher G, van Beurden WJ, Corradi M, Dekhuijzen R, Dweik RA, Dwyer T, Effros R, Erzurum S, Gaston B, Gessner C, Greening A, Ho LP, Hohlfeld J, Jöbsis Q, Laskowski D, Loukides S, Marlin D, Montuschi P, Olin AC, Redington AE, Reinhold P, van Rensen EL, Rubinstein I, Silkoff P, Toren K, Vass G, Vogelberg C, Wirtz H; ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26: 523-548.

Horvath I, Lazar Z, Gyulai N, Kollai M, Losonczy G. Exhaled biomarkers in lung cancer. *Eur Respir J* 2009; 34: 261-275.

Hoyt JC, Robbins RA, Habib M, Springall DR, BATTERY LD, Polak JM, Barnes PJ. Cigarette smoke decreases inducible nitric oxide synthase in lung epithelial cells. *Exp Lung Res* 2003; 29:17-28.

Hukkanen J, Pelkonen O, Hakkola J, Raunio H. Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit rev Toxicol* 2002; 32:391-411.

Humphrey LL, Teutsch S, Johnson M; U.S. Preventive Services Task Force. Lung cancer screening with sputum cytologic examination, chest radiography, and computed tomography: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2004;140:740-753.

Hunt JD. Exhaled breath condensate: An evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:28-34.

Hurst JR, Donaldson GC, Perera WR, Wilkinson TM, Bilello JA, Hagan GW, Vessey RS, Wedzicha JA. Use of Plasma Biomarkers at Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:867-874.

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.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistic 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59:225-249.

Johnson BE, Cortazar P, Chute JP. Second lung cancers in patients successfully treated for lung cancer. *Semin Oncol* 1997; 24:492-499.

Judson MA. Sarcoidosis: Clinical Presentation, Diagnosis, and Approach to Treatment. *Am J Med Sci* 2008; 335:26-33.

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.

Kaminska J, Kowalska m, Kotowicz B, Fucsiewicz M, Glogowski M, Wojcik E, Chechlinska M, Steffen J. Pretreatment Serum Levels of Cytokines and Cytokine

Receptors in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer, and Correlations with Clinicopathological Features and Prognosis. *Oncology* 2006; 70:115-125.

Kampa M, Castanas E. Human health effects of air pollution. *Environ Pollut* 2008; 151:362-7.

Kanoh S, Kobayashi H, Motoyoshi K. Exhaled ethane: an in vivo biomarker of lipid peroxidation in interstitial lung diseases. *Chest* 2005; 128:2387-2392.

Karadag F, Kirdar S, Karul AB, Ceylan E. The value of C-reactive protein as a marker of systemic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Intern Med* 2008; 19:104-108.

Kato A, Schleimer RP. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19:711-720.

Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled Biomarkers. *Chest* 2006; 130:1541-1546.

Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001a;163:1693–1722.

Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001b; 1:217-224.

Kharitonov SA, Robbins RA, Yates D, Keatings V, Barnes PJ. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *Am Respir Crit Care Med* 1995; 152:609-612.

Kharitonov SA. Exhaled markers of inflammatory lung diseases: ready for routine monitoring? *Swiss Med Wkly* 2004; 134:175-192.

King TE. Clinical Advances in the Diagnosis and Therapy of the Interstitial Lung Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:268-279.

Kinter M. Analytical technologies for lipid oxidation products analysis. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995; 671:223-236.

Kitamura H, Ichinose S, Hosoya T, Ando T, Ikushima S, Oritsu M, Takemura T. Inhalation of inorganic particles as a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis -

elemental microanalysis of pulmonary lymph nodes obtained at autopsy cases. *Pathol Res Pract* 2007; 203:575-585.

Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 239-267.

Knaapen AM, Borm PJA, Albrecht C, Schins RPF. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer* 2004; 109:799-809.

Kneepkens CM, Ferreira C, Lepage G, et al. The hydrocarbon breath test in the study of lipid peroxidation: principles and practice. *Clin Invest Med* 1992; 15:163-186.

Kneepkens CM, Lepage G, Roy CC. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1994; 17:127-160

Knight DA, Volgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology*, 2003; 8:432-446.

Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1364-1370.

Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat res* 2008; 659:15-30.

Künzli N, Tager IB. Air pollution: from lung to heart. *Swiss Med WKLY* 2005;135:697-702.

Lee G, Walzer TC, Dubinett SM. Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Curr Opin Pulm Med* 2009;15:303-307.

Li N, Deng C, Yin X, Yao N, Shen X, Zhang X. Gas chromatography-mass spectrometric analysis of hexanal and heptanal in human blood by headspace single-drop microextraction with droplet derivatization. *Anal Biochem* 2005; 342: 318-326.

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.

Lopes Pegna A, Picozzi G. Lung cancer screening update. *Curr Opin Pulm Med* 2009; 15:327-333.

Lovreglio P, Carrus A, Iavicoli S, Drago I, Persechino B, Soleo L. Indoor formaldehyde and acetaldehyde levels in the province of Bari, South Italy, and estimated health risk. *J Environ Monit* 2009; 11:955-961.

Lubin JH, Caporaso N, Wichmann HE, Schaffrath-Rosario A, Alavanja MC. Cigarette smoking and lung cancer: modelling effect modification of total exposure and intensity. *Epidemiology* 2007;18:639-648.

Lubin JH, Caporaso NE. Cigarette smoking and lung cancer: modeling total exposure and intensity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:517-523.

Lucrai W, Skrzydlewska E. DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell Mol Biol Lett* 2003; 8:391-413.

Lundback B, Lindberg A, Lindstrom M, Ronmark E, Jonsson E, Larsson LG, Andersson S, Sandstrom T, Larsson K; Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. Not 15 but 50% of smokers develop COPD? Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. *Respir Med* 2003; 97:115-122.

Lyengar V, Woittiez J. Trace elements in human clinical specimens: evaluation of literature data to identify reference values. *Clin Chem* 1998; 34:474-481.

Lynch JP, Ma YL, Koss MN, White ES. Pulmonary sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28:53-74.

Manini P, De Palma G, Andreoli R, Poli D, Petyx M, Corradi M, Mutti A, Apostoli P. Biological monitoring of low benzene exposure in Italian traffic policemen. *Toxicol Lett* 2008; 181:25-30.

Maniscalco M, De Laurentis G, Pentella C, Mormile M, Sanduzzi A, Carratù P, Sofia M. Exhaled breath condensate as matrix for toluene detection: a preliminary study. *Biomarkers* 2006; 11:233-240.

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.

Mannino DM, Gagnon RC, Petty TL, Lydick E. Obstructive lung disease and low lung function in adults in the United States. Data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Arch Intern Med* 2000; 160:1683-1989.

Manser RL, Irving LB, Byrnes G, Abramson MJ, Stone CA, Campbell DA. Screening for lung cancer: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *Thorax* 2003; 58:784-789.

Marsh S, Aldington S, Shirtcliffe P, Weatherall M, Beasley R. Smoking and COPD: what really are the risks? *Eur Respir J* 2006; 28:883-886.

Martin LD, Rochelle LG, Fischer BM, Krunkosky TM, Adler KB. Airway epithelium as an effector of inflammation: molecular regulation of secondary mediators. *Eur Respir J* 1997; 10: 2139-2146.

Martini N, Bains MS, Burt ME, et al. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;109:120-129.

Mastruzzo C, Crimi N, Vancheri C. Role of oxidative stress in pulmonary fibrosis. *Monaldi Arch Chest Dis* 2002;57:173-176.

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.

Mayne ST, Buenconsejo J, Dwight T, Janerich DT. Previous Lung Disease and Risk of Lung Cancer among Men and Women Nonsmokers. *Am J Epidemiol* 1999; 149:13-20.

Mazzone PJ, Analysis of volatile organic compounds in the exhaled breath for the diagnosis of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008; 3:774-780.

Meagher EA, FitzGerald GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1745-1750.

Miekisch W, Schubert JK, Noeldge-Schomburg GF. Diagnostic potential of breath analysis: focus on volatile organic compounds. *Clin Chim Acta* 2004;347:25-39

Minoia C, Sabbioni E, Apostoli P, Pietra R, Pozzoli L, Gallorini M, Nicoalu G, Alessio L, Capodoglio E. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the european community I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. *Sci Total Environ* 1990; 95:89-105.

Mitsuuchi Y, Testa JR. Cytogenetics and Molecular Genetics of Lung Cancer. *Am J Med Genet* 2002; 115:183-188.

Miyake Y, Sasaki S, Yokoyama T, Chida K, Azuma A, Suda T, Kudoh S, Sakamoto N, Okamoto K, Kobashi G, Washio M, Inaba Y, Tanaka H. Occupational and environmental factors and idiopathic pulmonary fibrosis in Japan. *Ann Occup Hyg* 2005; 49:259-265. Pinheiro GA, Antao VC, Wood JM, Wassel JT. Occupational risk for idiopathic fibrosis mortality in the United States. *Int J Occup Environ Health* 2008; 14:117-123.

Mizuguchi S, Nishiyama N, Iwata T, Nishida T, Izumi N, Tsukioka T, Inoue K, Uenishi T, Wakasa K, Suehiro S. Serum sialyl LewisX and cytokeratin 19 fragment as predictive factors for recurrence in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007; 58:369-375.

Moller P, Folkmann JK, Forchhammer L, Brauner EV, Danielsen PH, Risom L, Loft S. Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008; 266:84-97.

Monsó E, Tura JM, Marsal M, Morell F, Pujadas J, Morera J. Mineralogical microanalysis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Arch Environ Health* 1990;45:185-188.

Montuschi P, Ciabattoni G, Paredi P, Pantelidis P, duBois RM, Kharitonov SA, Barnes PJ. 8-isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1524-1527.

Montuschi P. Analysis of exhaled breath condensate in respiratory medicine: methodological aspects and potential clinical applications. *Ther Adv Respir Dis* 2007; 1:5-23.

Montuschi P. Exhaled breath condensate analysis in patients with COPD. *Clin Chim Acta* 2005; 356:22-34.

Mountain CF. Revision in the international system for staging lung cancer. *Chest* 1997; 111:1710-1717.

Mountain CF. The international system for staging lung cancer. *Semin Surg Oncol*. 2000; 18:106-115.

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.

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.

Mutti A. Molecular diagnosis of lung cancer: an overview of recent developments. *Acta Biomed* 2008; 79(Suppl 1):11-23.

Nemery B, Bast A, Behr J, Borm PJA, Bourke SJ, Camus P, De Vuyst P, Jansen HM, Kinnula VL, Lison D, Pelkonen O, Saltini C. Interstitial lung disease induced by exogenous agents: factors governing susceptibility. *Eur Respir J* 2001; 18(Suppl 32):30s-42s.

Newman LS, Rose CS, Bresnitz EA, Rossman MD, Barnard J, Frederick M, Terrin ML, Weinberg SE, Moller DR, McLennan G, Hunninghake G, DePalo L, Baughman RP, Iannuzzi MC, Judson MA, Knatterud GL, Thompson BW, Teirstein AS, Yeager HJ, Johns CJ, Rabin DL, Rybicki BA, Cherniack R; ACCESS Research Group. A case control etiologic study of sarcoidosis: environmental and occupational risk factors. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1324-1330.

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;130:968-75.

O'Neill HJ, Gordon SM, O'Neill MH, Gibbons RD, Szidon JP. A computerized classification technique for screening for the presence of breath biomarkers in lung cancer. *Clin Chem* 1988; 34:1613-1618.

Ocak S, Sos ML, Thomas RK, Massion PP. High-throughput molecular analysis in lung cancer: insights into biology and potential clinical applications. *Eur Respir J* 2009; 34:489-506.

O'Neill HJ, Gordon SM, O'Neill MH, Gibbons RD, Szidon JP. A computerized classification technique for screening for the presence of breath biomarkers in lung cancer. *Clin Chem* 1988; 34 :1613-1618.

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.

Paci M, Marmotti S, Bellesia E, Formisano D, Albertazzi A, Ricchetti T, Ferrari G, Annessi V, Lasagni D, Carbonella C, De Franco S, Brini M, Sgarbi G, Lodi R. Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009; 64(1):92-97.

Panani AD, Roussos C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Letters* 2006; 239:1-9.

Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Analysis of expired air for oxidation products. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: S31–S37.

Paredi P, Kharitonov SA, Leak D, Ward S, Cramer D, Barnes PJ. Exhaled ethane, a marker of lipid peroxidation, is elevated in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000a; 162:369-373.

Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Elevation of exhaled ethane concentration in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000b;162:1450-1454.

Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology* 2009; 14:27-38.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55;74-108.

Pathak AK, Bhutani M, Kumar S, Mohan A, Guleria R. Circulating Cell-Free DNA in Plasma/Serum of Lung Cancer Patients as a Potential Screening and Prognostic Tool. *Clinical Chemistry* 2006; 52:1833-1842.

Patz E, Goodman P, Bepler G. Screening for lung cancer. *N Engl J Med* 2000a; 343:1627-1633.

Patz EF, Campa MJ, Gottlin EB, Kusmartseva I, Guan XR, Herndon JE. Panel of Serum Biomarkers for the Diagnosis of Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5578-5583.

Patz EF, Rossi S, Harpole DH, Herndon JE, Goodman PC. Correlation of tumor size and survival in patients with stage Ia non-small cell lung cancer. *Chest* 2000b; 117:1568-1571.

Patz EF. Integration of biomarkers and imaging. *J Thorac Oncol* 2006; 1:78-80.

Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004; 7:97-110.

Perera WR, Hurst JR, Wilkinson TMA, Sapsford RJ, Mullerova H, Donaldson GC, Wedzicha JA. Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *Eur Respir J* 2007; 29:527-534.

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.

Phillips M, Altorki N, Austin JH, Cameron RB, Cataneo RN, Greenberg J, Kloss R, Maxfield RA, Munawar MI, Pass HI, Rashid A, Rom WN, Schmitt P. Prediction of lung cancer using volatile biomarkers in breath. *Cancer Biomark* 2007; 3:95-109.

Phillips M, Altorki N, Austin JH, Cameron RB, Cataneo RN, Kloss R, Maxfield RA, Munawar MI, Pass HI, Rashid A, Rom WN, Schmitt P, Wai J. Detection of lung cancer using weighted digital analysis of breath biomarkers. *Clin Chim Acta* 2008; 393:76-84.

Phillips M, Cataneo RN, Cummin AR, Gagliardi AJ, K. Gleeson K, Greenberg J, Maxfield RA, Rom WN. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. *Chest* 2003a; 123:2115-2123.

Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, Gunawardena R, Naidu A, Rahbari-Oskoui F. Effect of age on the breath methylated alkane contour, a display of apparent new markers of oxidative stress. *J Lab Clin Med* 2000a; 136:243-249.

Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, Gunawardena R, Rahbari-Oskoui F. Increased oxidative stress in younger as well as in older humans. *Clin Chim Acta* 2003b; 328:83-86.

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* 1999a; 353:1930-1933

Phillips M, Greenberg J, Cataneo RN. Effect of age on the profile of alkanes in normal human breath. *Free Radic Res* 2000b; 33:57-63.

Phillips M, Herrera J, Krishnan S, Zain M, Greenberg J, Cataneo RN. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999b; 729:75-88.

Pieraccini G, Bartolucci G, Pacenti M, Sugheri S, Boccalon P, Focardi L. Gas chromatographic determination of glutaraldehyde in the workplace atmosphere after derivatization with 0-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine on a solid-phase microextraction fibre. *J Chromatogr A* 2002; 955:117-124.

Pinheiro GA, Antao VC, Wood JM, Wassel JT. Occupational risk for idiopathic fibrosis mortality in the United States. *Int J Occup Environ Health* 2008; 14:117-123.

Pleil JD, Lindstrom AB. Exhaled human breath measurement method for assessing exposure to halogenated volatile organic compounds. *Clin Chem* 1997;43:723-30.

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. *Resp Res* 2005; 6:71

Poli D, Goldoni M, Caglieri A, Ceresa G, Acampa O, Carbognani P, Rusca M, Corradi M. Breath analysis in non small cell lung cancer patients after surgical tumour resection. *Acta Biomed* 2008; 79(Suppl 1):64-72.

Preti G, Labows JN, Kostelc JG, Aldinger S, Daniele R. Analysis of lung air from patients with bronchogenic carcinoma and controls using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1988; 432:1-11.

Pryor WA, Das B, Church DF. The ozonation of unsaturated fatty acids: aldehydes and hydrogen peroxide as products and possible mediators of ozone toxicity. *Chem Res Toxicol* 1991; 4: 341-348.

Psathakis K, Mermigkis D, Papatheodorou G, Loukides S, Panagou P, Polychronopoulos V, Siafakas NM, Kouros D. Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Clin Invest* 2006; 36:362-367.

Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:532-555.

Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 2006; 533:222-239.

Rami-Porta R, Ball D, Crowley J, Giroux DJ, Jett J, Travis WD, Tsuboi M, Vallières E, Goldstraw P; International Staging Committee; Cancer Research and Biostatistics; Observers to the Committee; Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the T Descriptors in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2007; 2:593-602.

Rami-Porta R, Crowley JJ, Goldstraw P. The revised TNM staging system for lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 15:4-9.

Reich JM. A critical appraisal of overdiagnosis: estimates of its magnitude and implications for lung cancer screening. *Thorax* 2008; 63:377-383.

Rennard SI, Vestbo J. COPD: the dangerous underestimate of 15%. *Lancet* 2006; 367: 1216-1219.

Repine JE, Bast A, Lankhorst I Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:341-357.

Reynolds HR. Diagnostic and Management Strategies for Diffuse Interstitial Lung Disease. *Chest* 1998;113;192-202.

Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004; 8:731-765.

Risch A, Plass C. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer* 2008 Jul 1;123:1-7.

Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* 2005; 592:119-137.

Riu JH, Daniels CE, Hartman TE, Yi E. Diagnosis of Interstitial Lung Diseases. *Mayo Clin Proc.* 2007;82:976-986.

Rivera MP, Mehta AC. Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; 132(3Suppl):131S-148S.

Rizzato G, Lo Cicero S, Barberis M, Torre M, Pietra R, Sabbioni E. Trace of metal exposure in hard metal lung disease. *Chest* 1986; 90:101-106.

Rosas IO, Richards TJ, Konishi K, Zhang Y, Gibson K, Lokshin AE, Lindell KO, Cisneros J, MacDonald SD, Pardo A, Sciupa F, Dauben J, Selman M, Gochuico BR, Kaminski N. MMP1 and MMP7 as Potential Peripheral Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS Med* 2008; 5(4):e93.

Rosell R, Cuello M, Cecere F, Santarpia M, Reguart N, Felip E, Taron M. Usefulness of predictive tests for cancer treatment. *Bull Cancer* 2006 ;93(8):E101-110.

Rowe BH, Camargo CA. The role of magnesium sulfate in the acute and chronic management of asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14:70-76.

Rubio MA, Zamorano N, Lissi E, Rojas A, Gutierrez L, von Baer D. Volatile carbonylic compounds in downtown Santiago, Chile. *Chemosphere* 2006; 62:1011-1020.

Russi EW. Alpha-1 antitrypsin: now available, but do we need it? *Swiss Med Wkly* 2008; 138:191-196.

Sadowska AM, Luyten C, Vints AM, Verbraecken J, Ranst DV, de Backer WA. Systemic antioxidant defences during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir* 2006; 11:741-747.

Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet* 2009; 374:733-743.

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.

Scott A, Salgia R. Biomarkers in lung cancer: from early detection to novel therapeutics and decision making. *Biomark Med* 2008; 2:577-586.

Scott WJ, Howington J, Feigenberg S, Movsas B, Pisters K. Treatment of nonsmall cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132(Suppl 3):234S-242S.

Seccareccia F, Zuccaro P, Pacifici R, Meli P, Pannoizzo F, Freeman KM, Santaquilani A, Giampaoli S; Research Group of the MATISS Project. Serum cotinine as a marker of environmental tobacco smoke exposure in epidemiological studies: The experience of the MATISS project. *Eur J Epidemiol* 2003; 18:487-492.

Seemungal TA, Donaldson GC, Bhowmik A, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Time course and recovery of exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1608-1613.

Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med* 2003; 54:73-87.

Shafey O, Dolwick S. Guindon GE (eds). *Tobacco Control Country Profiles 2003*, American Cancer Society, Atlanta, GA, 2003.

Siegesmund KA, Funahashi A, Pinter K. Identification of metals in lung from a patient with interstitial pneumonia. *Arch Environ Health* 1974; 28:345-349.

Sigurdsson MI, Isaksson HJ, Gunnar Gudmundsson G, Gudbjartsson T. Diagnostic Surgical Lung Biopsies for Suspected Interstitial Lung Diseases: A Retrospective Study. *Ann Thorac Surg* 2009; 88:227-232.

Sin DD, Vesto J. Biomarkers in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2009 6:543-545.

Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR, Albelda SM. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin Cancer Res* 2005; 11:3974-3986.

Sissi C, Palombo M. Effects of magnesium and related divalent metal ions in topoisomerase structure and function. *Nucleid Acid Res* 2009; 37:702-711.

Skorodin MS, Tenholder MF, Setter B, Owen KA, Waller RF, Khandelwahl S, Maki K, Rohail T, D'Alfonso N. Magnesium sul fate in exacerbation of chronic obstructive pulmoanry disease. *Arch Intern Med* 1995; 155:496-500.

Smith CJ, Perfetti TA, Rumble MA, Rodgam A, Doolittle DJ. "IARC Group 2A Carcinogens" Reported in Cigarette Mainstream Smoke. *Food Chem Toxicol* 2000; 38:371-383.

Snell N, Newbold P. The clinical utility of biomarkers in asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8:222-235.

Song G, Qin T, Liu H, Xu GB, Pan YY, Xiong FX, Gu KS, Sun GP, Chen ZD. Quantitative breath analysis of volatile organic compounds of lung cancer patients. *Lung Cancer* 2009; Apr 29 [Epub ahead of print].

Sorensen GL, Husby S, Holmskov U. Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease. *Immunobiology* 2007; 212:381-416.

Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, Roz E, Cirenei N, Bellomi M, Pelosi G, Pierotti MA, Pastorino U. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(21):3902-3908.

Spitz MG, Wei Q, Dong Q, Amos CI, Wu X. Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA Damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12:689-698.

Spurzem JR, Rennard SI. Pathogenesis of COPD. *Semin Respir Crit Care Med* 2005; 26(2):142-53.

Stashenko EE, Mora AL, Cervantes ME, Martinez JR. HS-SPME Determination of Volatile Carbonyl and Carboxylic Compounds in Different Matrices. *J Chromatogr Sci* 2006; 44:347-353.

Stavrides JC. Lung carcinogenesis: pivotal role of metals in tobacco smoke. *Free Radic Biol Med* 2006; 41:1017-1030.

Steele MP, Brown KK. Genetic predisposition to respiratory diseases: infiltrative lung diseases. *Respiration* 2007; 74:601-608.

Stolz D, Christ-Crain M, Bingisser R, Leuppi J, Miedinger D, Muller C, Huber P, Muller B, Tamm M. Antibiotic Treatment of exacerbations of COPD. a randomized, controlled trial comparing procalcitonin-guidance with standard therapy. *Chest* 2007a; 131:9-19.

Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Leuppi J, Miedinger D, Bingisser R, Müller C, Struck J, Müller B, Tamm M. Copeptin, C-reactive protein, and procalcitonin as prognostic biomarkers in acute exacerbation of COPD. *Chest* 2007b; 131:1058-1067.

Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol* 2007; 25:561-570.

Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers - a different disease. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:778-790.

Sung HJ, Cho JY. Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics. *BMB reports* 2008; 41:615-625.

Sunyer J. Urban air pollution and chronic obstructive pulmonary disease: a review. *Eur Respir J* 2001; 17:1024-1033

Svensson S, Larstad M, Broo K, Olin AC. Determination of aldehydes in human breath by on-fibre derivatization, solid-phase microextraction and GC-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 860:86-91.

Swensen SJ, Jett JR, Hartman TE, Midthun DE, Mandrekar SJ, Hillman SL Sykes AM, Aughenbaugh GL, Bungum AO, Allen KL. CT Screening for Lung Cancer: Five-year Prospective Experience. *Radiology* 2005; 235:259-265.

Taskar V, Coultas D. Exposures and idiopathic lung disease. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; 29:670-679.

Taskar VS, Coultas DB. Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:293-298.

Taylor DR, Pijnenburg MW, Smith AD, Jongste JCD. Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation. *Thorax* 2006; 61:817-827

Taylor DR. Risk assessment in asthma and COPD: a potential role for biomarkers? *Thorax* 2009; 64:261-264.

Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch JP, Martinez FJ. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med* 2004; 55:395-417.

Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch JP, Martinez FJ. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med* 2004; 55:395-417

Thomeer MJ, Costabel U, Rizzato G, Poletti V, Demedts M. Comparison of registries of interstitial lung diseases in three European countries. *Eur Respir J* 2001; 18(Suppl. 32):114s–118s.

Tinkelman DG, Price DB, Nordyke RJ, Halbert RJ. COPD screening efforts in primary care: what is the yield? *Prim Care Respir J* 2007; 16:41-48.

Tinkelman DG, Price DB, Nordyke RJ, Halbert RJ. Misdiagnosis of COPD and Asthma in Primary Care Patients 40 Years of Age and Over. *J Asthma* 2006; 43:75-80.

Travis W.D., Brambilla E., Muller-Hermelink H.K., Harris C.C. (Eds.): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. IARC Press: Lyon 2004. <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb10/BB10.pdf>.

Travis WD, Hunninghake G, King TE, Lynch DA, Colby TV, Galvin JR, brown KK, Chung MP, Cordier JF, Du Bois RM, Flaherty KR, Franks TJ, Hansell DM, Hartman TE, Kazerooni EA, Kim DS, Kitaichi M, Koyama T, Martinez FJ, Nagai S, Midthun DE, Muller NL, Nicholson AG, Raghu G, Selman M, Wells A. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: report of an American Thoracic Society project. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:1338-1347.

Trupin L, Earnest G, San Pedro M, Balmes JR, Eisner MD, Yelin E, Katz PP, Blanc PD. The occupational burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 22:462-69.

Tsai SW, Chang CM. Analysis of aldehydes in water by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *J Chromatogr A* 2003; 1015:143-150.

Tubek S, Tubek S. The Content of Elements in Rainwater and its Relation to the Frequency of Hospitalization for Arterial Hypertension, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, and Psoriasis in Opole Voivodship, Poland During 2000–2002. *Biol Trace Element Res* 2008; 123:270-276.

Tzortzaki EG, Tsoumakidou M, Makris D, Siafakas NM. Laboratory markers for COPD in “susceptible” smokers. *Clin Chim Acta* 2006; 364:124-138.

Ushio-Fukay M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Letters* 2008; 266:37-52.

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.

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):1-40.

Veglia F, Vineis P, Overvad K, Boeing H, Bergmann MM, Trichopoulou A, trichopoulos D, Palli D, Krogh V, Tumino R, Linseisen J, Steindorf K, Gonzalez CA, Martinez C, Dorrosoro M, Barricarte A, Cirerea L, Quiros JR, Day NE, Saracci R, Riboli E. Occupational Exposures, Environmental Tobacco Smoke and Lung Cancer. *Epidemiology* 2007; 18: 769-775.

Verleden GM, du Bois RM, Kouros D, Drent M, Millar A, Muller-Quernheim J, Semenzato G, Johnson S, Sourvinos G, Olivieri D, Pietinalho A, Xaubet A. Genetic predisposition and pathogenetic mechanisms of interstitial lung diseases of unknown origin. *Eur Respir J* 2001; 18:(Suppl. 32)17s-29s.

Veronesi G, Bellomi M, Scanagatta P, Preda L, Rampinelli C, Guarize J, Pelosi G, Maisonneuve P, Leo F, Solli P, Masullo M, Spaggiari L. Difficulties encountered managing nodules detected during a computed tomography lung cancer screening program. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;136:611-617.

Viegi G, Pistelli F, Sherril DL, Maio S, Baldacci S, Carrozzi L. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *Eur Respir J* 2007; 30:993-1013.

Vineis P, Hoeck G, Krzyzanowski M, Vigna-Taglianti F, Veglia F, Airoidi L, Overvad K, Raaschou-Nielsen O, Clavel-Chapelon F, Linseisen J, Boeing H, Trichopoulou A, Palli A, Krogh V, Tumino R, Panico S, H Bueno-De-Mesquita B, Peeters PH, Lund EE, Agudo A, Carmen 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.

Viviano G, Settimo G. Normativa sulla qualità dell'aria e recepimento delle direttive della Unione Europea. *Ann Ist Super Sanità* 2003; 39:343-350.

Wahidi MM, Govert JA, Goudar RK, Gould MK, McCrory DC. 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 (3 Suppl):94S-107S.

Wedzicha JA. Exacerbations: etiology and pathophysiologic mechanisms. *Chest* 2002; 12:136S-141S.

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

Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol* 2001; 44:1-11.

Weis N, Almdal T. C-reactive protein can it be used as a marker of infection in patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease? *Eur J Intern Med* 2006; 17:88-91.

Westeel V, Choma D, Clement F, Woronoff-Lemsi MC, Pugin JF, Dubiez A, Depierre A. Relevance of an intensive postoperative follow-up after surgery for non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2000; 70:1185-1190.

WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008. The MPOWER package. Geneva, World Health Organization, 2008.

WHO, International Agency for Research on Cancer (IARC), Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, vol. 38, Tobacco Smoking, Lyon, France, 1986

World Health Organization 2008. In WORLD HEALTH STATISTICS 2008. Future trends in global mortality: major shifts in cause of death patterns; pp:29-31. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 112 pp. [http://www.who.int/whosis/whostat/EN\\_WHS08\\_Full.pdf](http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Full.pdf)).

Wouters EFM. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2:26-33.

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.

Yao H, Rahman I. Current concepts on the role of inflammation in COPD and lung cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9:375-383.

Zeidler M, Kleeerup E, Tashkin D. Exhaled nitric oxide in the assessment of asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2003, 10:31-36.

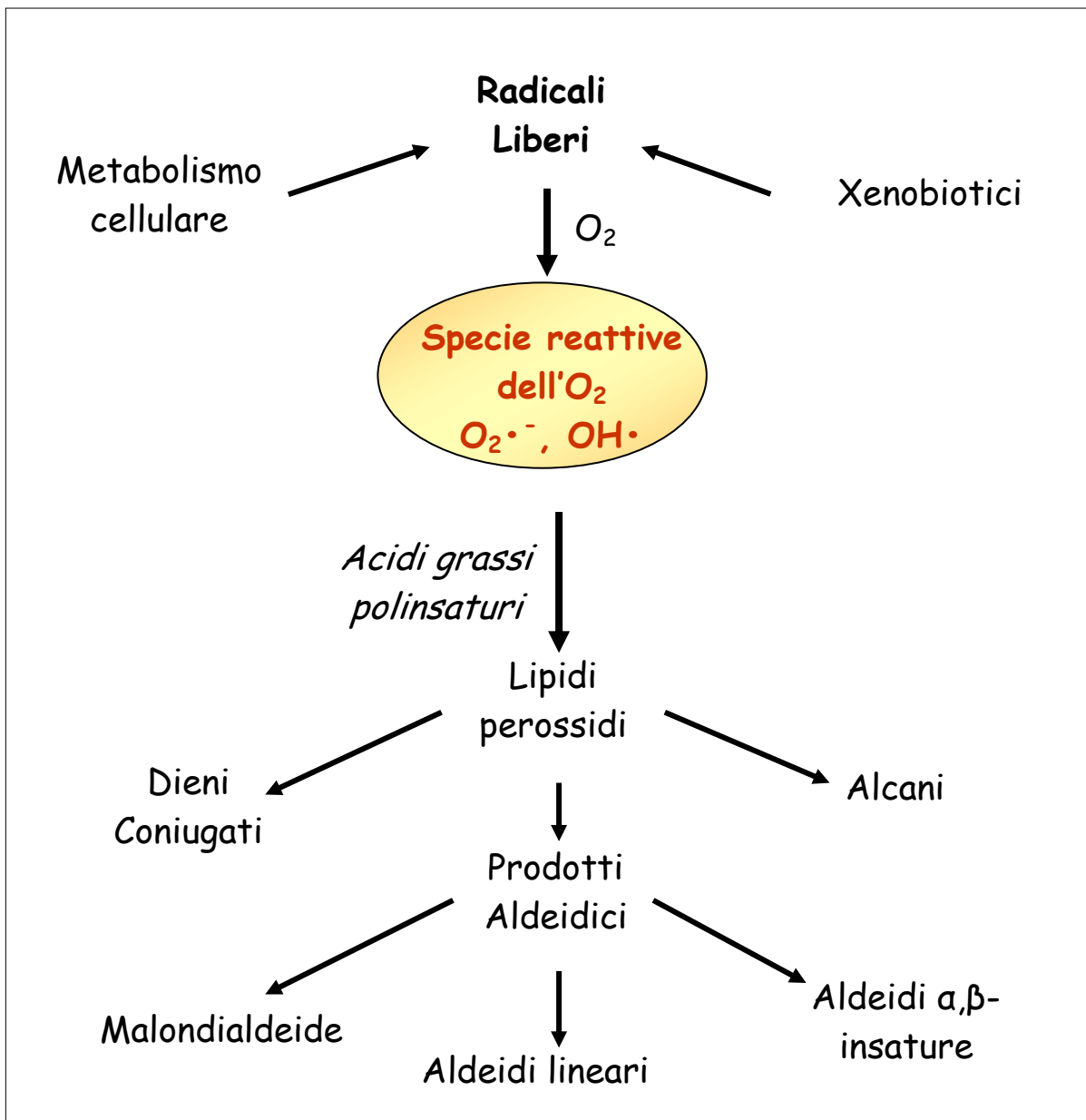
Zhang JY, Wang Y, Prakash C. Xenobiotic-metabolizing enzymes in human lung. *Curr Drug Metab* 2006;7:939-948.

Zieba M, Nowak D, Suwalski M, Piasecka G, Grzelewska-Rzymowska I, Tymińska K, Kroczyńska-Bednarek J, Kwiatkowska S. Enhanced lipid peroxidation in cancer tissue homogenates in non-small cell lung cancer. *Monadi Arch Chest Dis* 2001; 56:110-114.

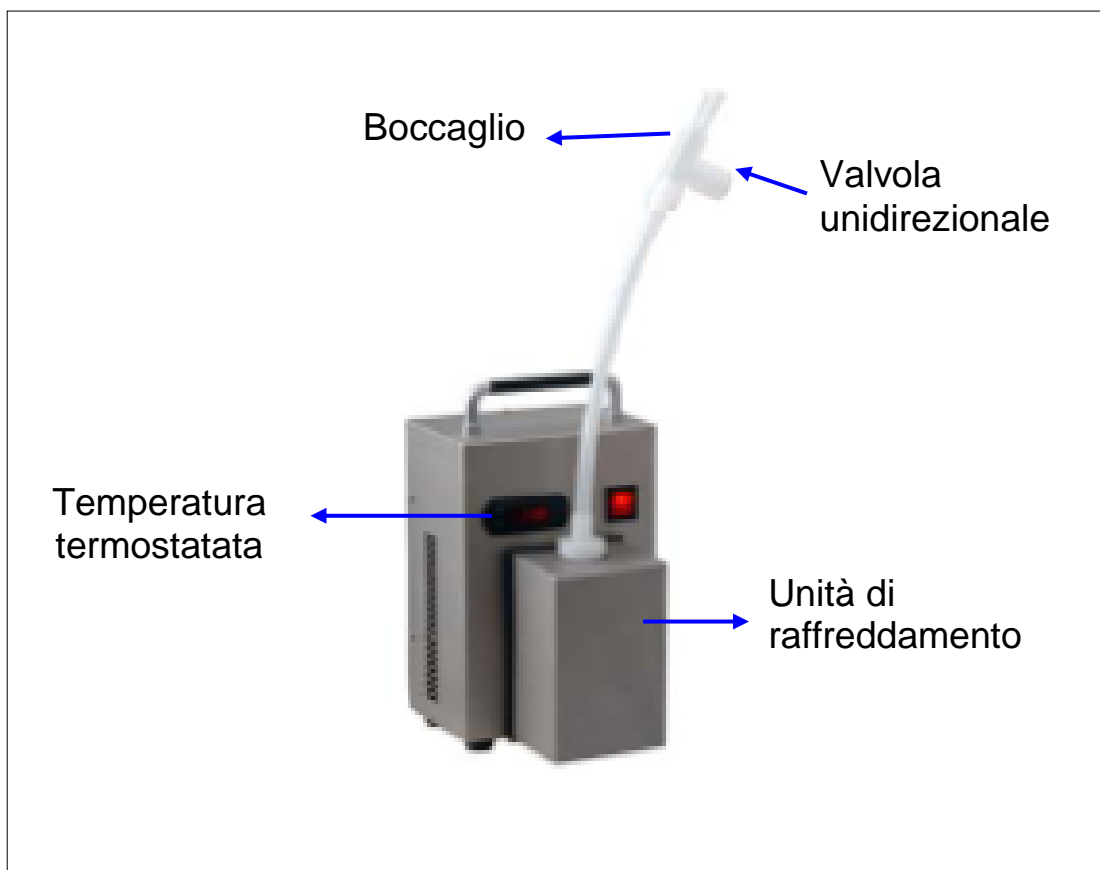
Zieba M, Suwalski M, Kwiatkowska S, Piasecka G, Grzelewsa I, Rzymowska R, Stolarek R, Nowak D. Comparison of hydrogen peroxide generation and the content of lipid peroxidation products in lung cancer tissue and pulmonary parenchima. *Respir Med* 2000; 94:800-805.

## 9. FIGURE E TABELLE

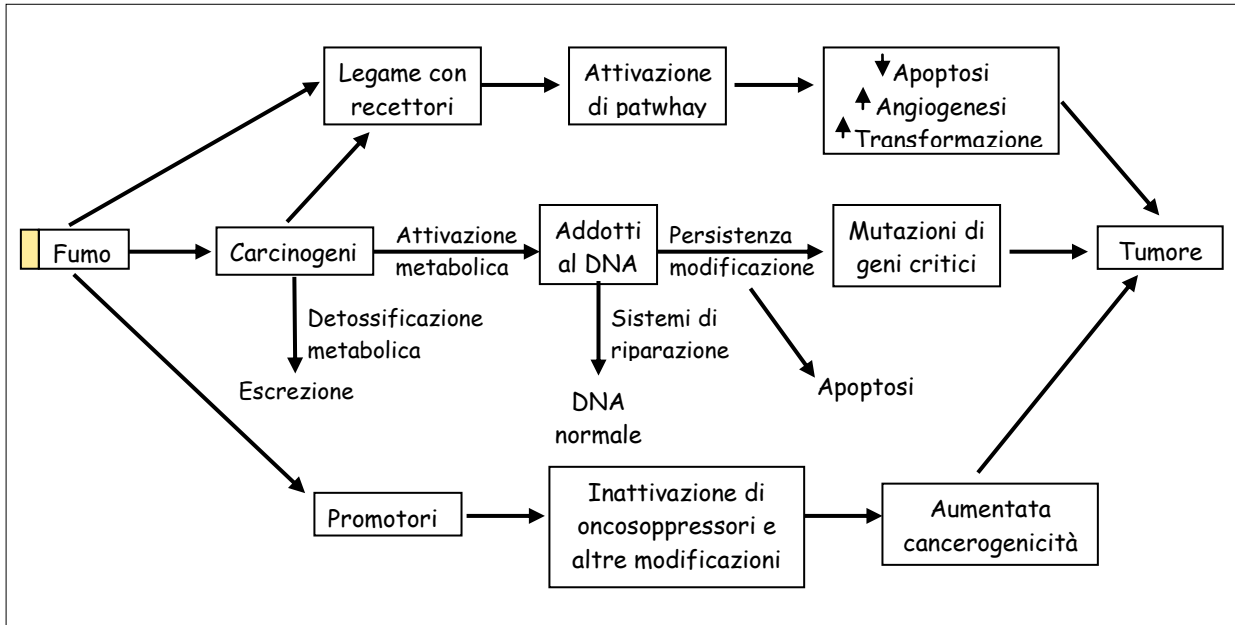
**Figura 1.** Perossidazione lipidica mediata da radicali liberi, a carico di acidi grassi polinsaturi.



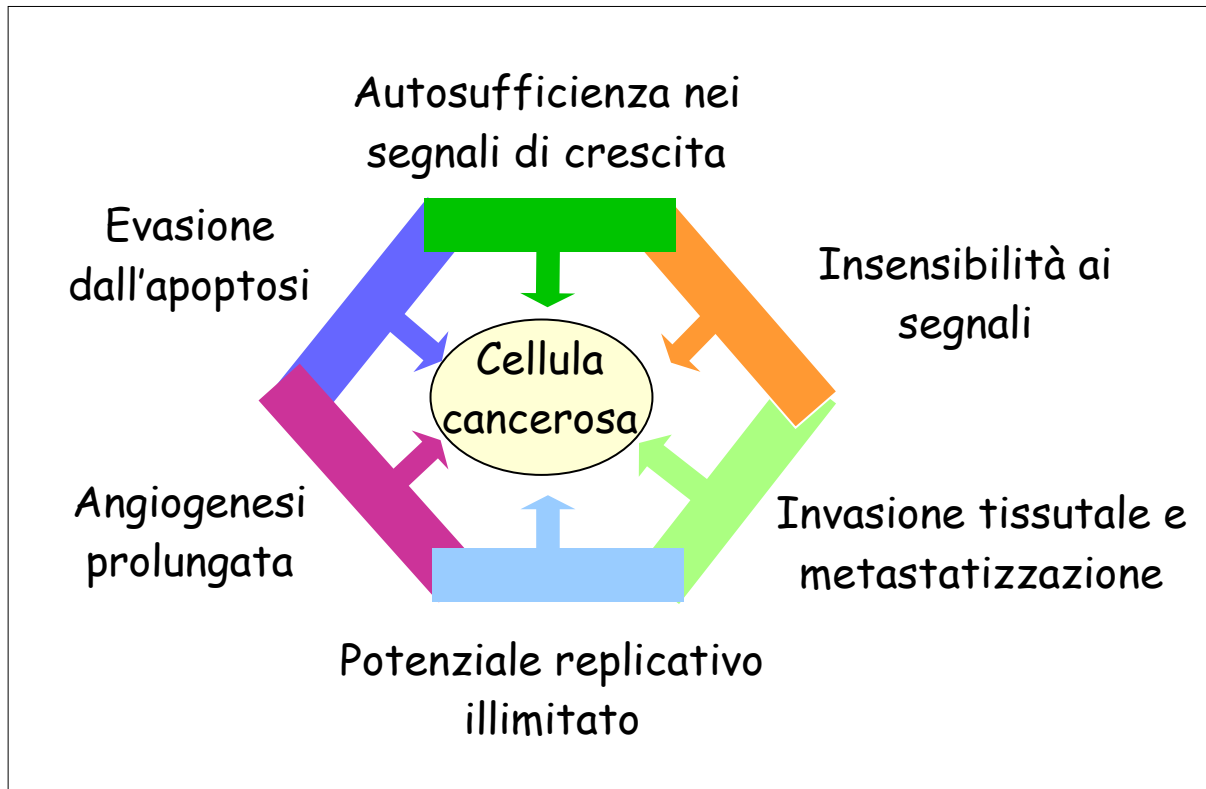
**Figura 2.** Dispositivo per la raccolta del condensato dell'aria esalata, TURBO-DECCS.



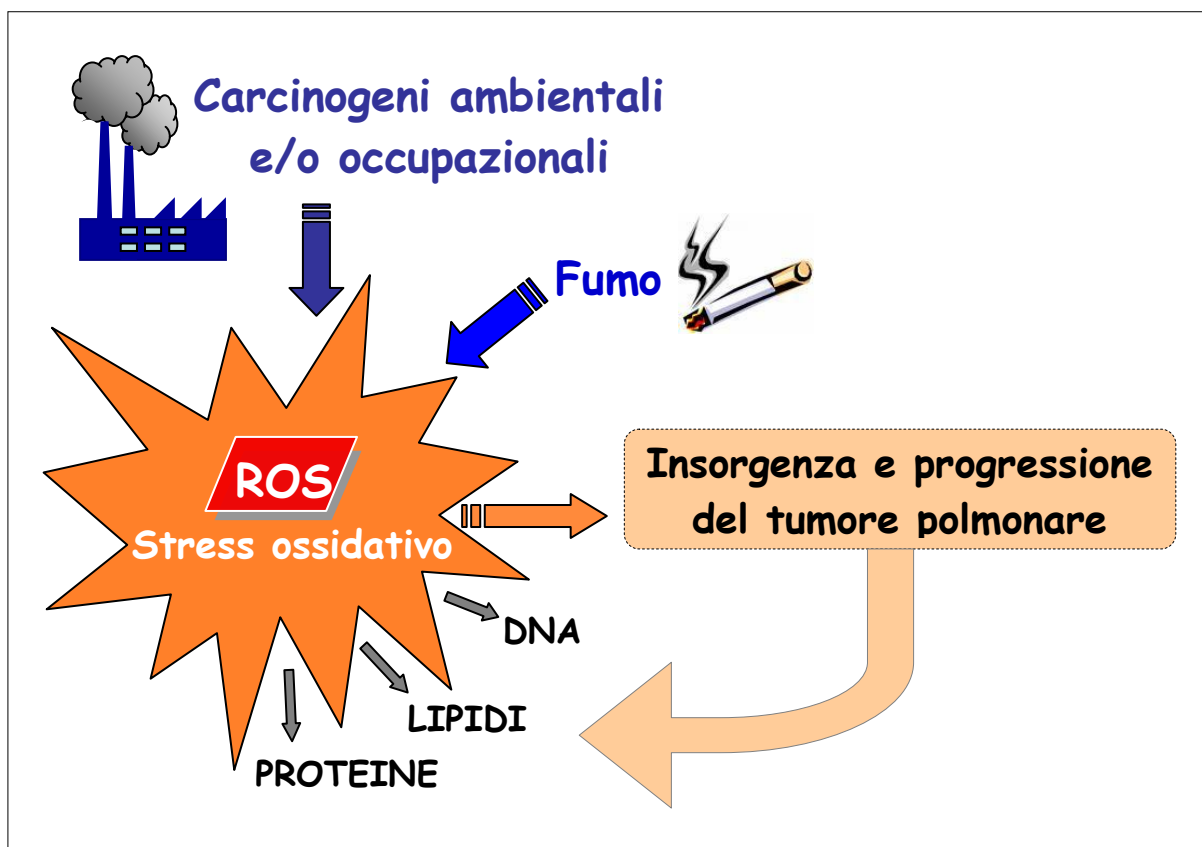
**Figura 3.** Fumo di sigaretta e cancerogenesi polmonare.



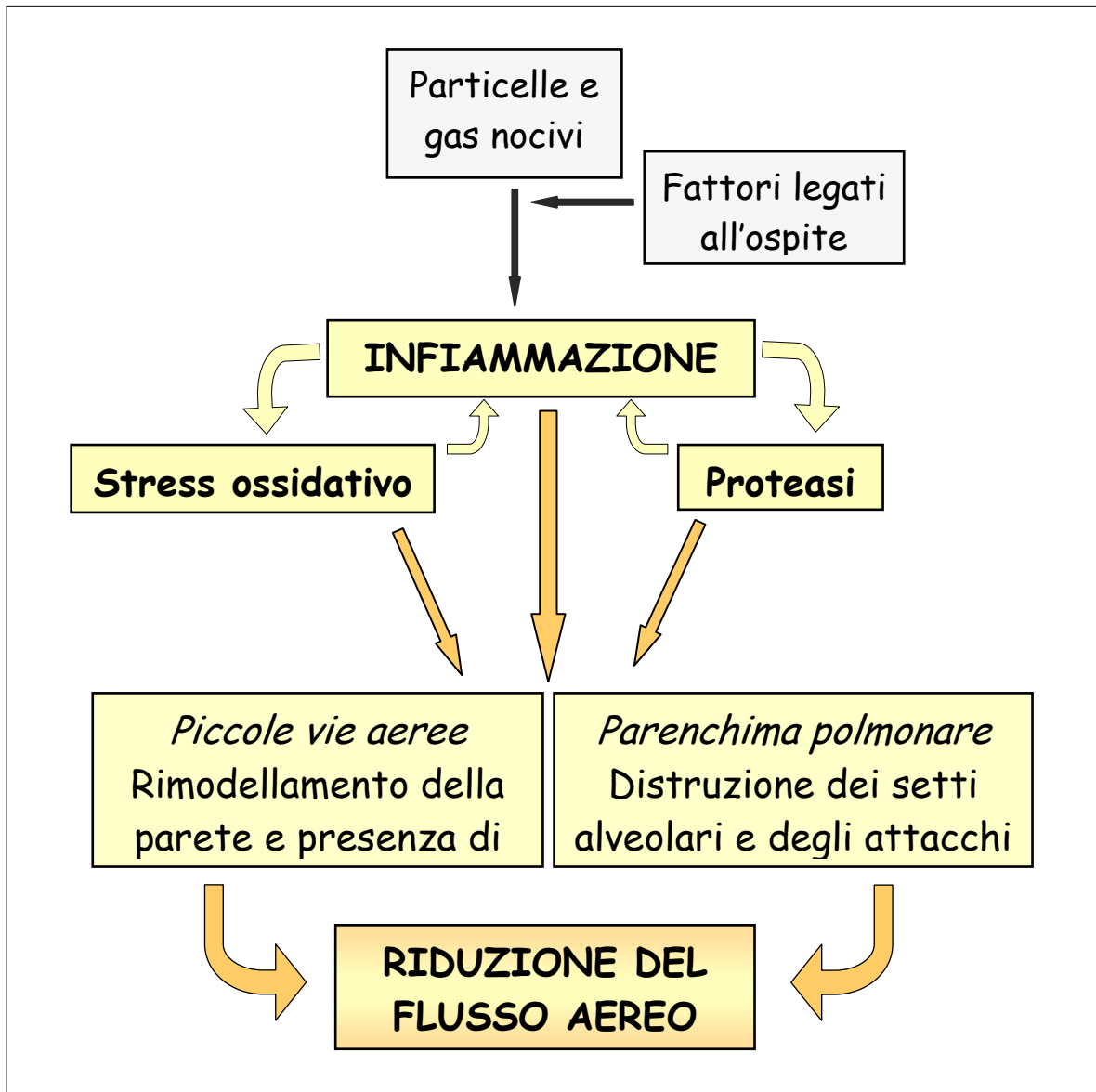
**Figura 4.** Momenti critici della cancerogenesi polmonare con l'acquisizione delle caratteristiche peculiari della cellula neoplastica (modificato da Hanahan and Weinberg, 2000).



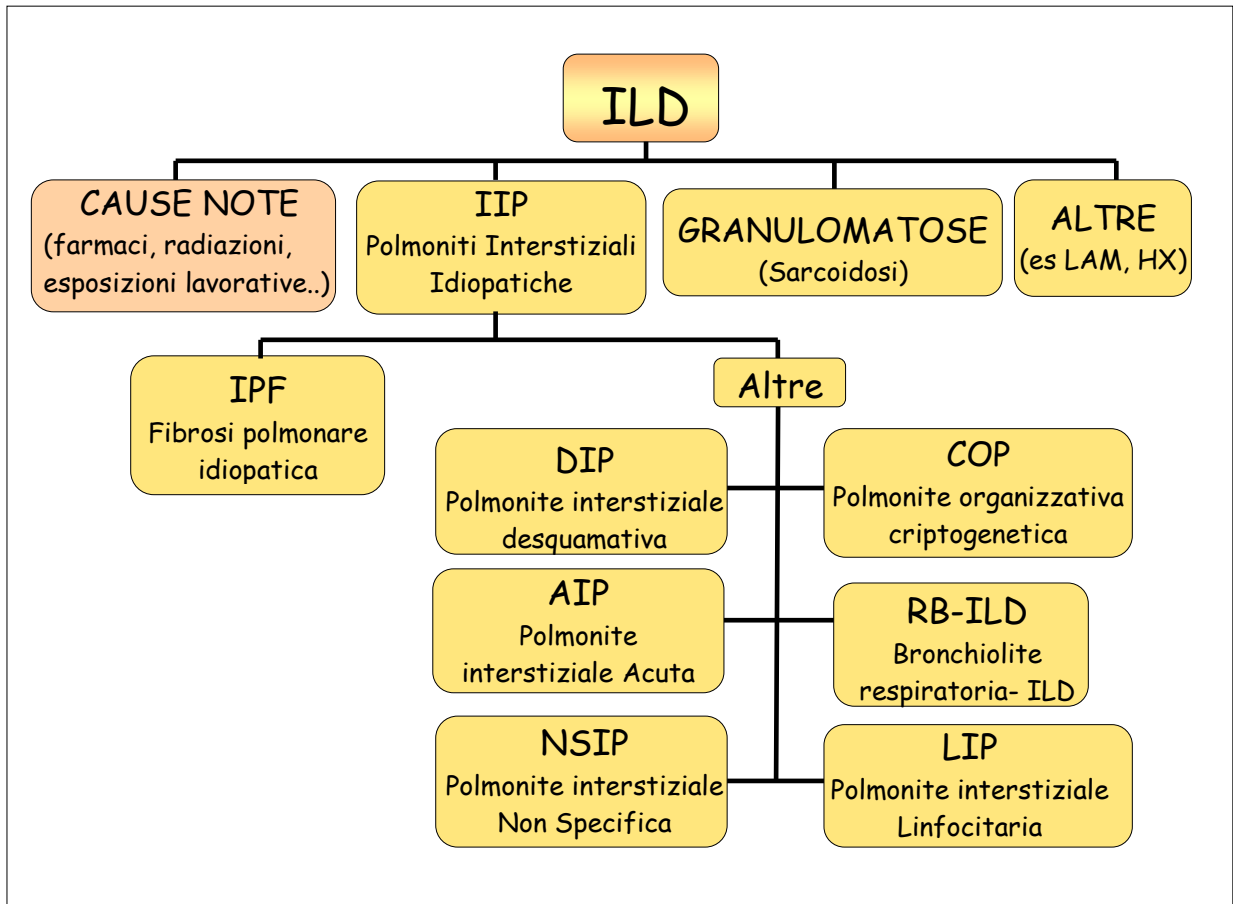
**Figura 5.** Ruolo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dello stress ossidativo nell'insorgenza e progressione del tumore polmonare e fattori di rischio.



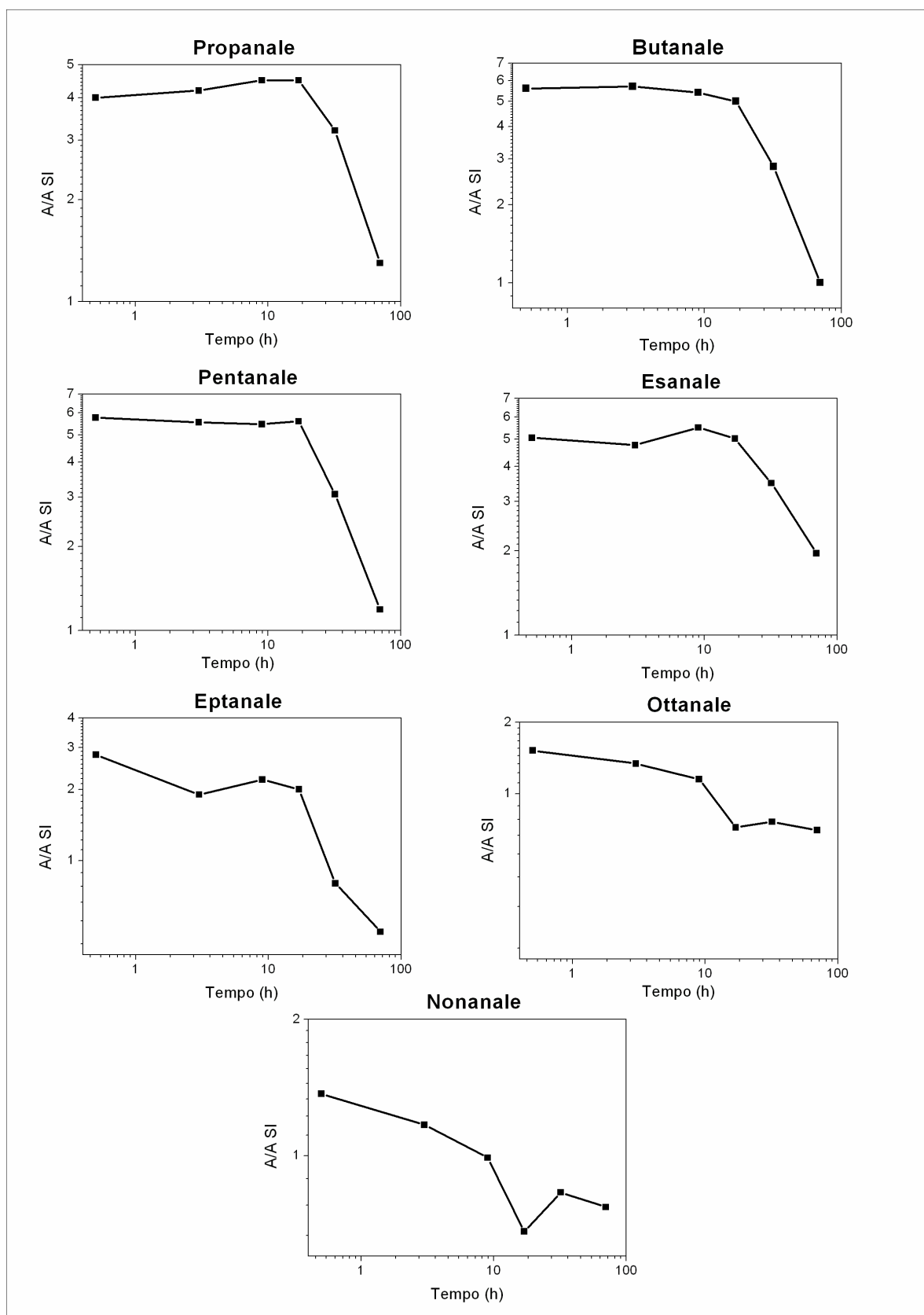
**Figura 6.** Schema rappresentativo della patogenesi della BPCO.



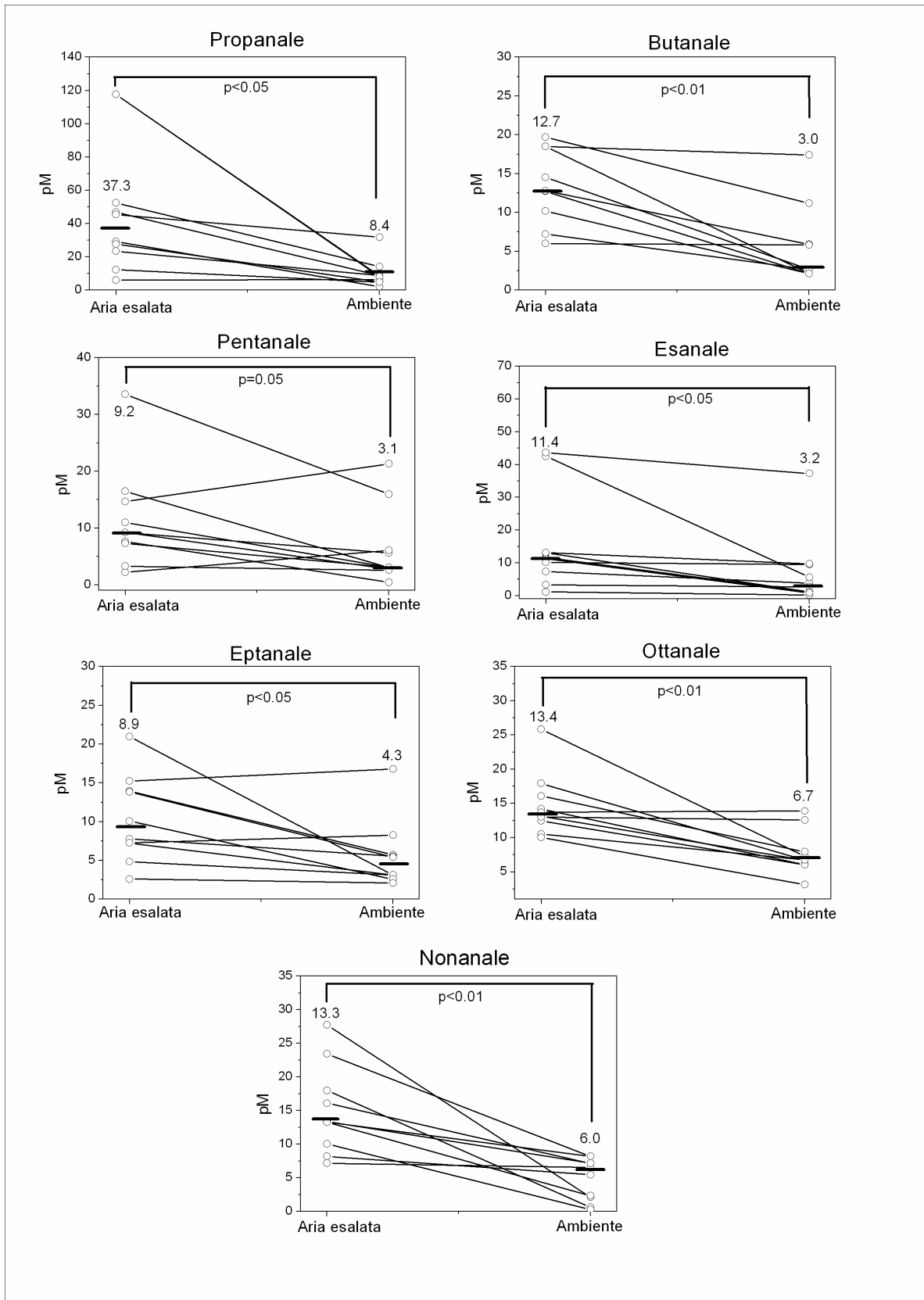
**Figura 7.** Schema classificativo delle ILD.



**Figura 8.** Stabilità delle aldeidi nei campionatori Bio-VOC conservati a -4°C.



**Figura 9.** Livelli di aldeidi misurate in campioni di aria ambientale prelevati dopo due ore di permanenza in ambulatorio.



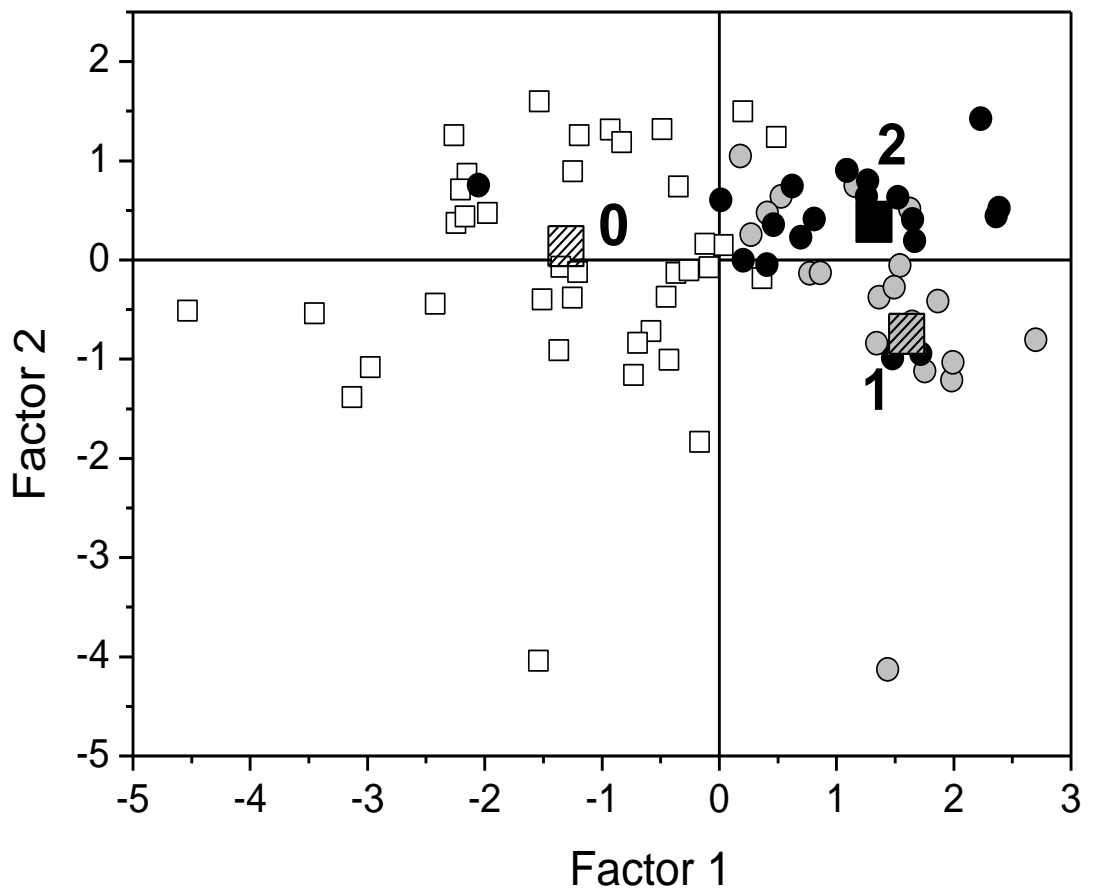
**Figura 10.** Score del fattore 2 in funzione dello score del fattore 1, per tutti i soggetti dello studio.

□= gruppo 0 (controlli);

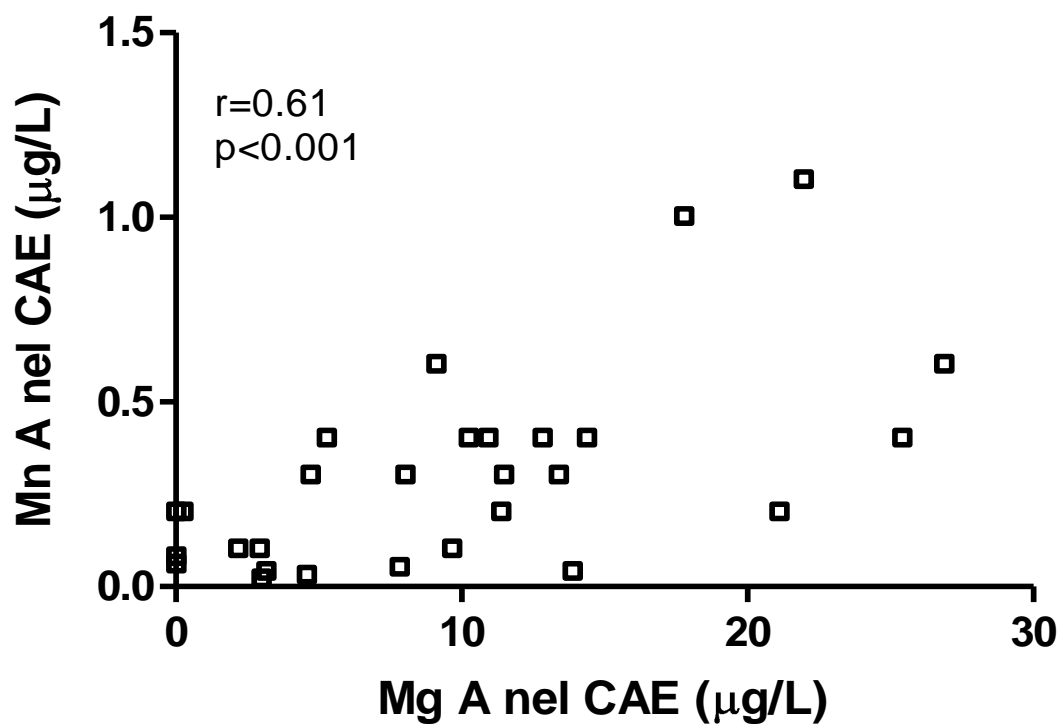
●= gruppo 1 (pazienti NSCLC non fumatori ed ex-fumatori);

●= gruppo 2 (pazienti con NSCLC fumatori).

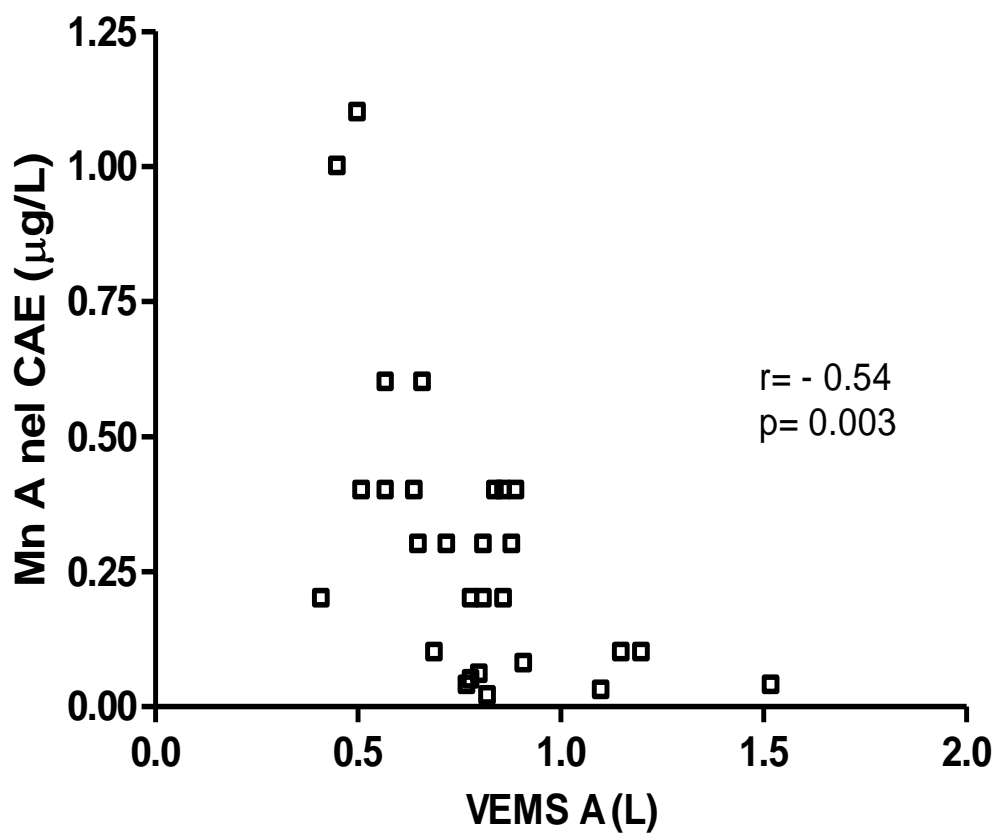
I centroidi stimati per i tre gruppi (0, 1, 2) sono mostrati con i simboli ▨ ▩ ■



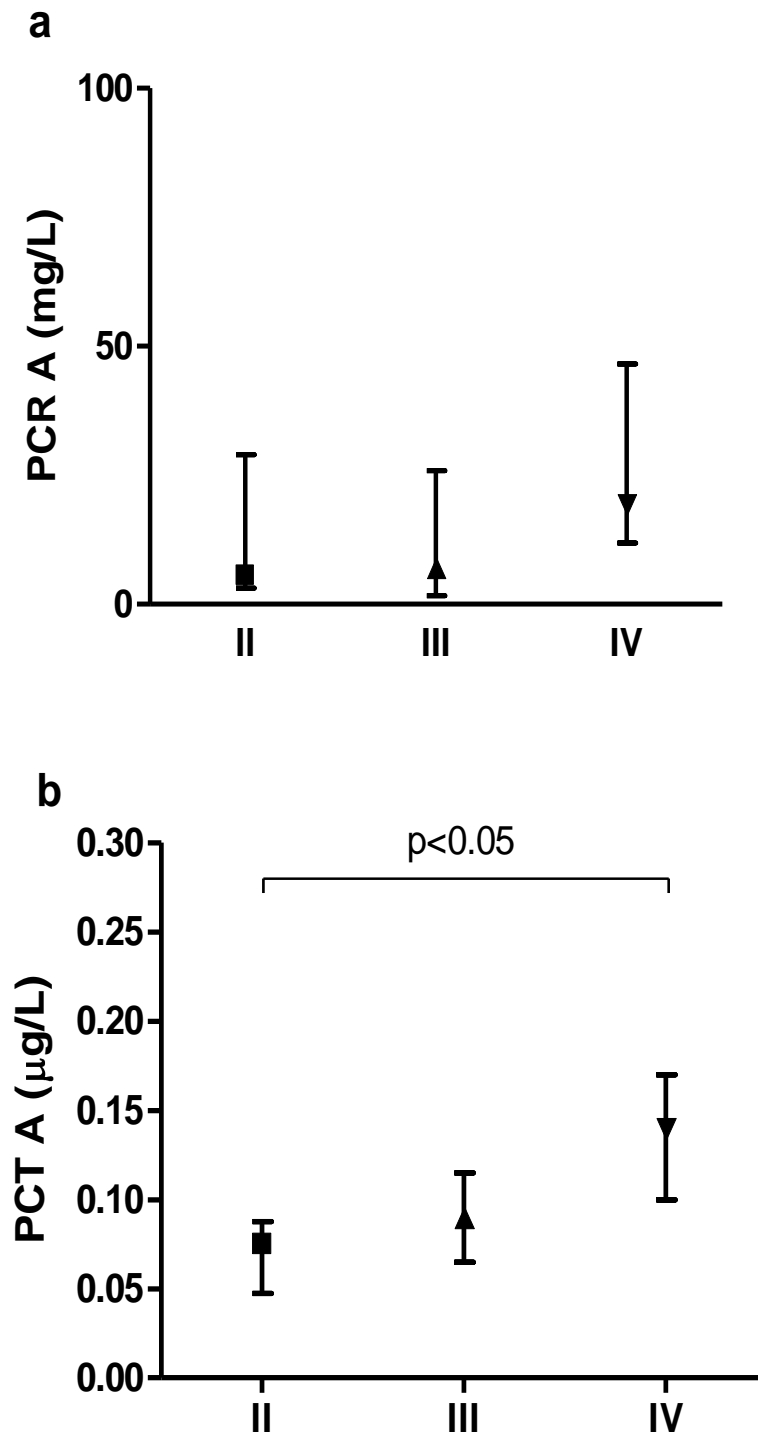
**Figura 11.** Correlazioni tra i livelli di Mn e Mg nei campioni di CAE raccolti alla riacutizzazione della BPCO.



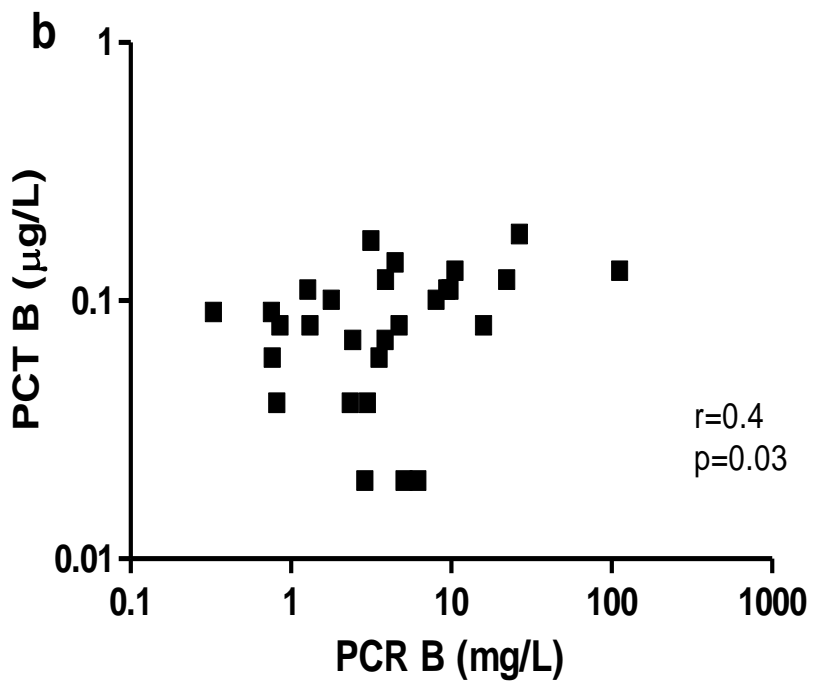
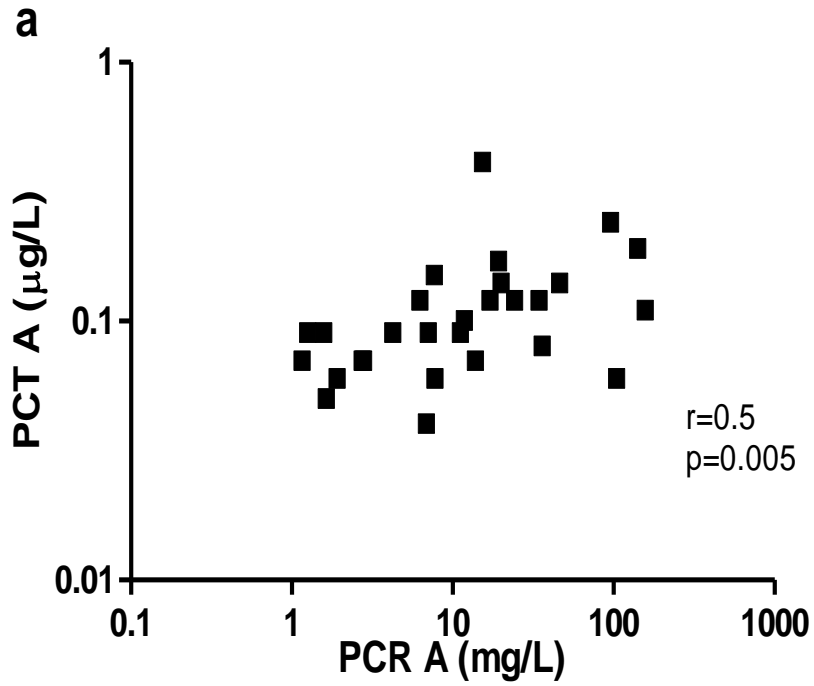
**Figura 12.** Correlazione tra i valori di VEMS e i livelli di Mn nel CAE raccolto alla riacutizzazione della BPCO (A).



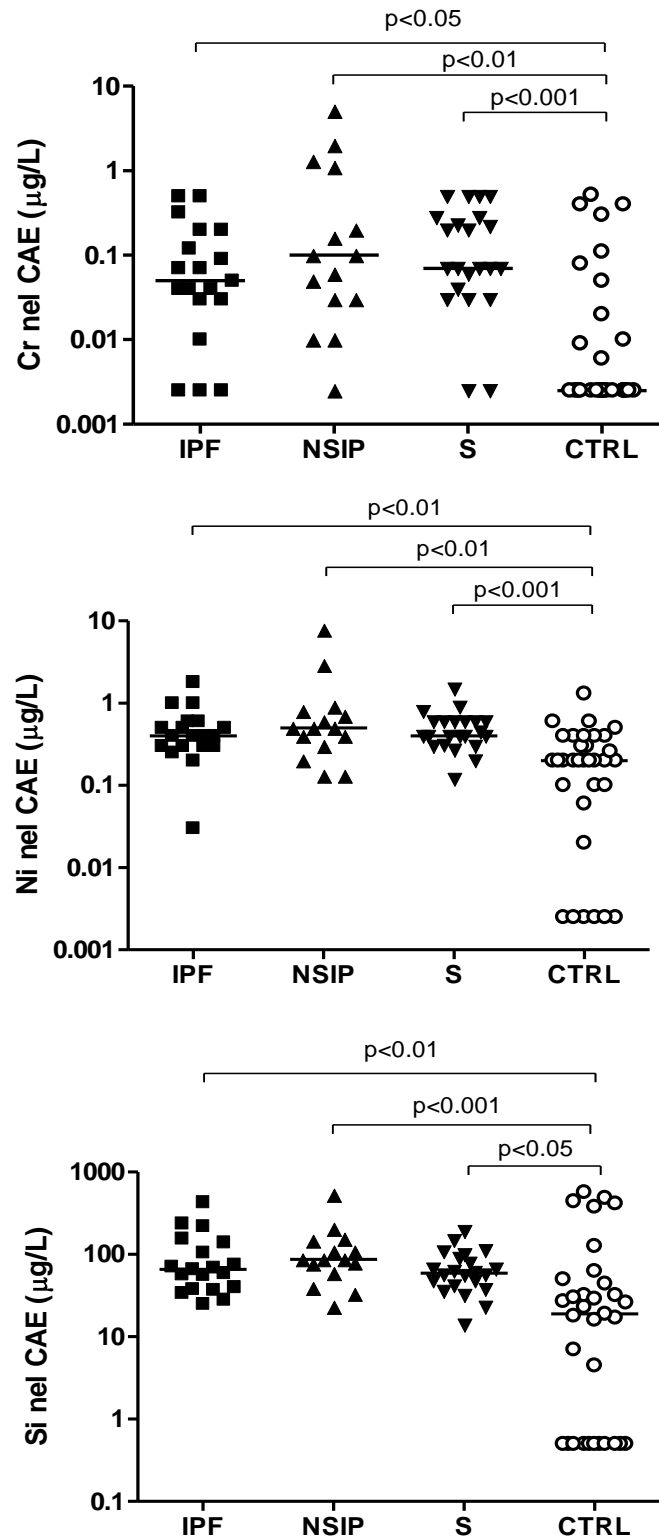
**Figura 13.** Livelli sierici di PCR (a) e PCT (b) all'inizio della riacutizzazione della BPCO. I pazienti con BPCO sono stati classificati in base alla stadio della malattia; stadio II (n=4), stadio III (n=13), stadio IV (n=11). I simboli e le barre rappresentano i valori della mediana e del range interquartile.



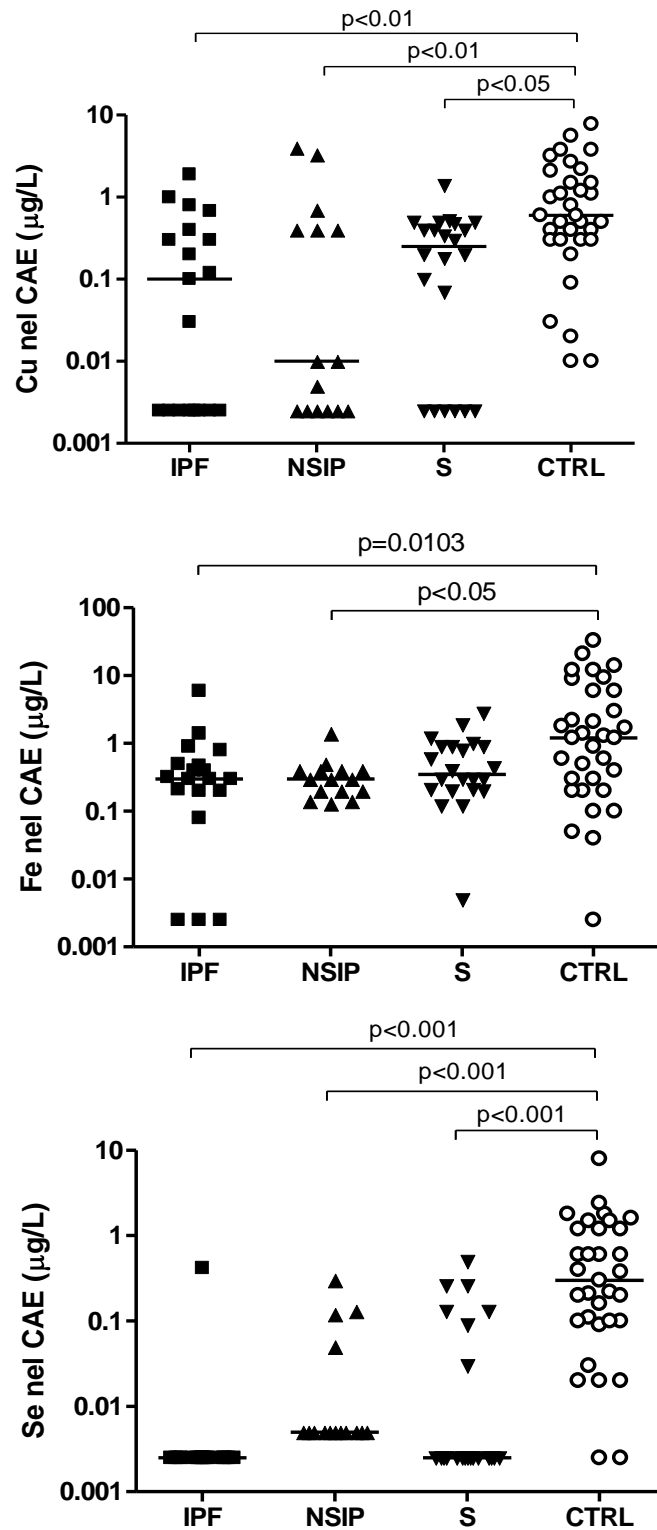
**Figura 14.** Correlazione tra i livelli sierici di PCR e PCT misurati all'inizio della riacutizzazione della BPCO (a) e dopo guarigione (b).



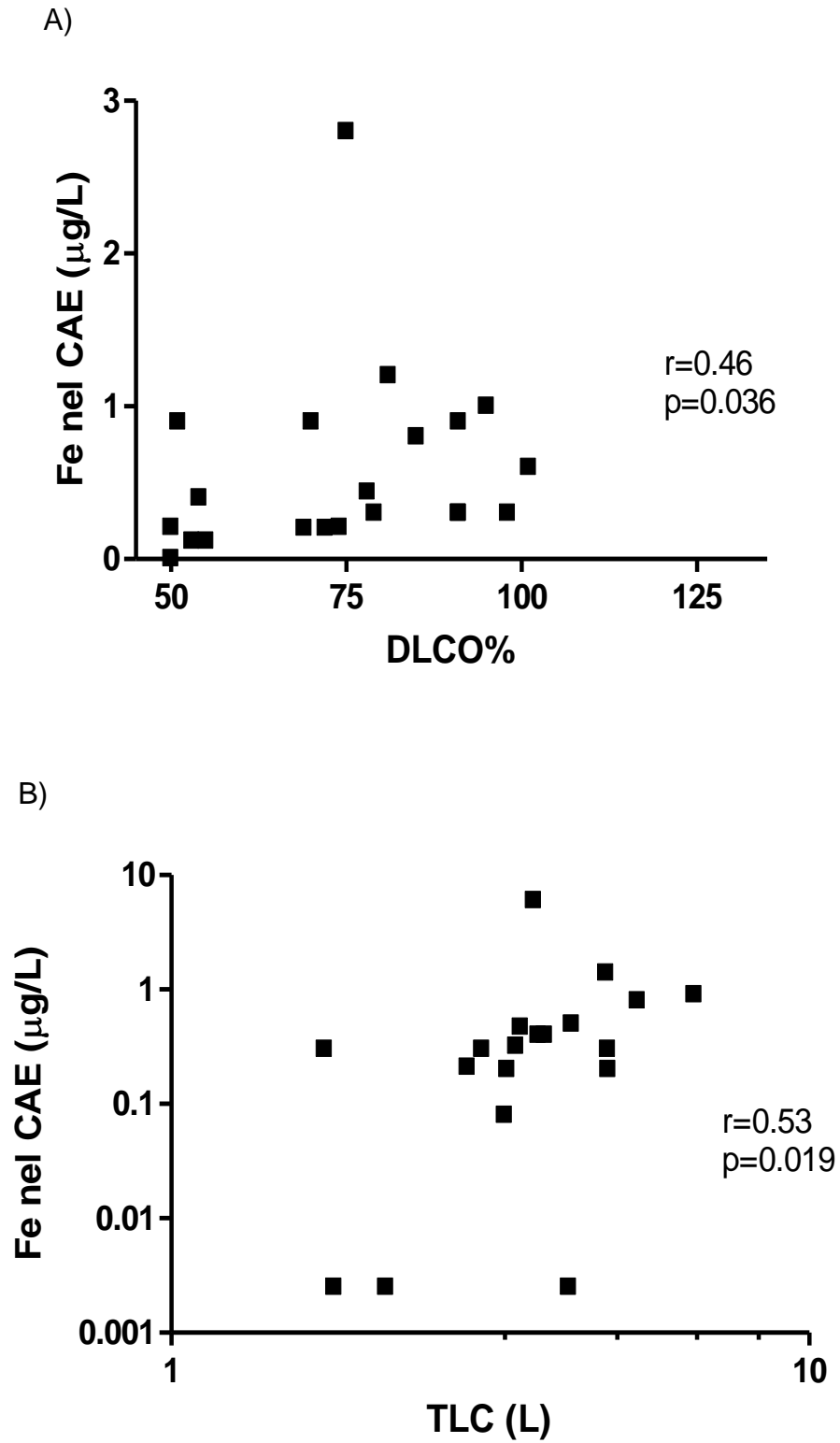
**Figura 15.** Livelli di Cr, Ni e Si nel condensato dell'aria esalata (CAE) di pazienti con fibrosi polmonare idiopatica (IPF), polmonite interstiziale non specifica (NSIP), sarcoidosi (S) e controlli (CTR).



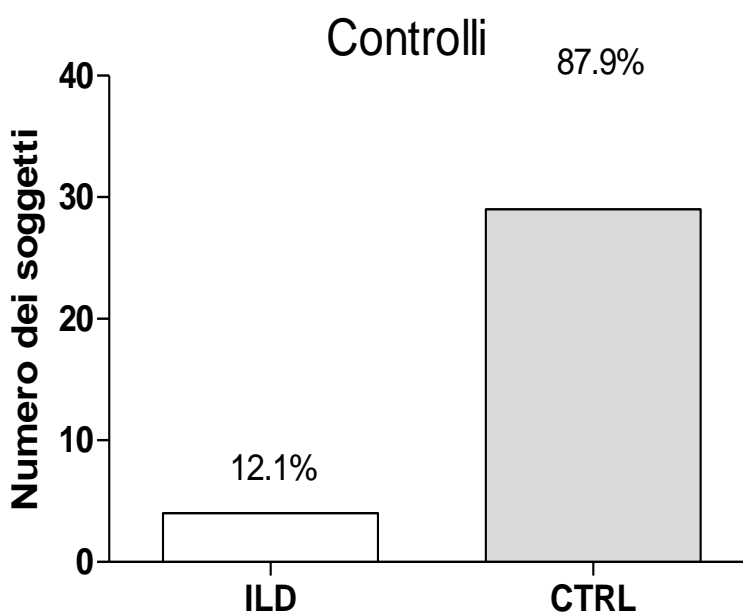
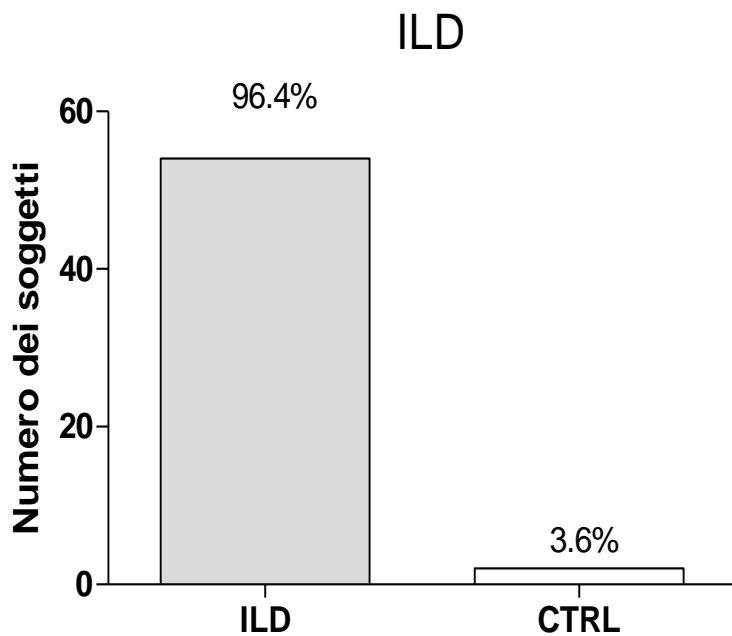
**Figura 16.** Livelli di Cu, Fe e Se nel condensato dell'aria esalata (CAE) di pazienti con fibrosi polmonare idiopatica (IPF), polmonite interstiziale non specifica (NSIP), sarcoidosi (S) e controlli (CTRL).



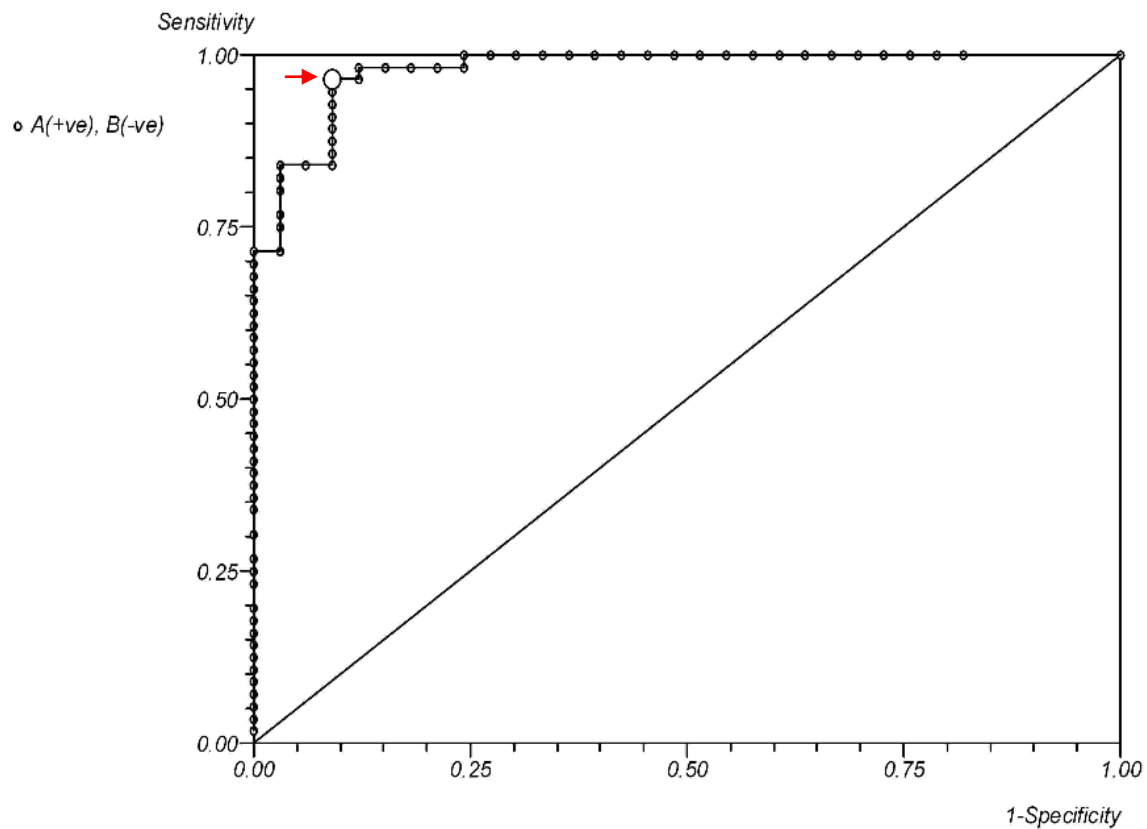
**Figura 17.** (A) Correlazione tra DLCO% e i livelli di Fe nel condensato dell'aria esalata (CAE) di pazienti con sarcoidosi. (B) Correlazioni tra i valori di TLC ed i livelli di Fe nel CAE di pazienti con fibrosi polmonare idiopatica.



**Figura 18.** Classificazione dei casi ottenuta con l'analisi della regressione logistica binaria.



**Figura 19.** Curva ROC. La probabilità di appartenenza ad un dato gruppo (Pneumopatie interstiziali o controlli) calcolata con la regressione logistica binaria è stata utilizzata come variabile discriminante nella curva ROC. La freccia rossa rappresenta il punto cut-off in cui sensibilità e specificità sono massime.



**Tabella 1.** Classificazione istologica dei tumori maligni epiteliali del polmone (da Travis *et al.*, 2004 modificata).

<p><b>Lesioni pre-invasive</b>  Carcinoma squamoso <i>in situ</i>  Iperplasia adenomatosa atipica  Iperplasia idiopatica diffusa polmonare delle cellule neuroendocrine</p>
<p><b>Carcinoma a cellule squamose</b>  Papillare  A cellule chiare  A piccole cellule  Basaloide</p>
<p><b>Carcinoma a piccole cellule</b>  Carcinoma a piccole cellule combinato</p>
<p><b>Adenocarcinoma</b>  Subtipo misto  Acinare  Papillare  Bronchiolo-alveolare  (mucinoso, non mucinoso, misto o indeterminato)  Adenocarcinoma solido con produzione di mucina  (fetale, mucinoso, cistoadenocarcinoma, a cellule chiare, a cellule ad anello con castone)</p>
<p><b>Carcinoma a grandi cellule</b>  Neuroendocrino  Basaloide  Linfoepitelioma-simile  A Cellule chiare  A fenotipo rabdoide</p>
<p><b>Carcinoma adenosquamoso</b></p>
<p><b>Carcinoma sarcomatoide</b>  Pleomorfo  A cellule fusate  A cellule giganti  Carcinosarcoma  Blastoma polmonare</p>
<p><b>Tumore Carcinoide</b>  Carcinoide tipico  Carcinoide atipico</p>
<p><b>Tumore tipo ghiandola salivare</b>  Mucoepidermoide  Carcinoma adenoideo-cistico  Carcinoma epiteliale-mioepiteliale</p>

**Tabella 2.** Definizione dei parametri utilizzati nel sistema TNM.

<b>T</b>	Tx	tumore non visualizzabile radiograficamente o broncoscopicamente ma dimostrato dalla presenza di cellule maligne nel secreto broncopolmonare
	T0	nessuna evidenza di tumore primitivo
	Tis	carcinoma in situ
	T1	tumore di dimensioni inferiori ai 3 cm, senza coinvolgimento del parenchima circostante, della pleura viscerale o del bronco lobare
	T2	tumore di dimensioni superiori ai 3 cm, o interessamento della pleura viscerale o presenza di atelettasia o polmonite da ostruzione, ad una distanza di almeno 2 cm dalla carena
	T3	tumore di qualsiasi dimensione con invasione del mediastino, del pericardio, della pleura parietale, del diaframma, della parete toracica, del nervo frenico, della catena del simpatico o localizzato in un bronco principale a meno di 2 cm dalla carena o atelettasia di un intero polmone
	T4	tumore di qualsiasi dimensione che invade il cuore, i grossi vasi, la trachea, l'esofago, i corpi vertebrali, la carena o rilevamento di cellule neoplastiche nel versamento pleurico o presenza di altri noduli nello stesso lobo
<b>N</b>	Nx	linfonodi regionali non valutabili
	N0	non evidenziabili metastasi ai linfonodi regionali
	N1	metastasi ai linfonodi peribronchiali o ilari omolaterali
	N2	metastasi ai linfonodi mediastinici omolaterali e sottocarenali
	N3	metastasi ai linfonodi mediastinici o ilari controlaterali o ai linfonodi scalenici o sovraclaveari omolaterali o controlaterali
<b>M</b>	Mx	interessamento metastatico a distanza non valutabile
	M0	non evidenziabili metastasi a distanza
	M1	presenza di metastasi a distanza

Legenda: T= dimensioni del tumore; N= interessamento linfonodale; M= presenza di metastasi a distanza.

**Tabella 3.** Stadiazione del tumore polmonare in base ai parametri del sistema TNM.

<b>Stadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T2	N0	M0
<b>IIA</b>	T1	N1	M0
<b>IIB</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>IIIA</b>	T1-3	N2	M0
	T3	N1	M0
<b>IIIB</b>	T1-4	N3	M0
	T4	N0-3	M0
<b>IV</b>	T0-4	N0-3	M1

**Tabella 4.** Stadi di severità della BPCO secondo linee guida GOLD.

<b>Stadio I</b> (Lieve)	VEMS/CVF<0.7 VEMS $\geq$ 80% del predetto
<b>Stadio II</b> (Moderata)	VEMS/CVF<0.7 50% $\leq$ VEMS<80% del predetto
<b>Stadio III</b> (Grave)	VEMS/CVF<0.7 30% $\leq$ VEMS<50% del predetto
<b>Stadio IV</b> (Severa)	VEMS/CVF<0.7 VEMS<30% o VEMS <50% del predetto con IRC

Legenda. VEMS: Volume Espiratorio Massimo in un Secondo; CVF: Capacità Vitale Forzata; IRC: insufficienza respiratoria cronica definita da pressione parziale arteriosa di ossigeno inferiore a 60 con o senza pressione parziale arteriosa di anidride carbonica maggiore di 50 mmHg.

**Tabella 5.** Caratteristiche dei soggetti.

	NSCLC (n=40)	CONTROLLI (n=38)
Età (anni)	67.9 ± 9.9	49.3 ± 15.2
Sesso (M/F)	(28/12)	(17/21)
Fumatori/Ex-fumatori/Non-fumatori	21/12/7	0/10/28
Anni di sospensione dal fumo	14.1 ± 13.6	16 ± 11.8
Pacchi/anno		
Fumatori	57.0 ± 28.9	3.6 ± 3.4
Ex-fumatori	46.6 ± 28.02	31.8 ± 20.13

Dati espressi come media ± SD.

**Tabella 6.** Livelli delle aldeidi nell'esalato di pazienti con NSCLC e nei controlli. Dati espressi come GM [GSD] e mediana (25°-75° percentile).

	NSCLC	NSCLC		CONTROLLI
		Non/Ex-fumatori	Fumatori	
Propanale (pM)	53.6 [1.5] 52.4 (42.4-72.6)	47.9 [1.4] 49.8 (40.7-61.3)	59.3 [1.6] 66.3 (47.8-81.7)	30.6 [2.8] 24.4 (17.1-46.9)
Butanale (pM)	26.2 [1.8] 26.2 (18.7-41.0)	24.5 [1.7] 23.6 (17.9-33.8)	27.9 [2.0] 28.6 (19.1-46.1)	10.9 [2.4] 10.8 (6.9-18.6)
Pentanale (pM)	19.1 [2.4] 17.7 (12.7-42.6)	16.1 [2.4] 17.1 (12.8-22.3)	22.2 [2.5] 20.3 (12.1-49)	7.6 [2.7] 8.2 (4.4-14.7)
Esanale (pM)	37.3 [1.9] 38.1 (26.6-57.7)	37.1 [1.6] 38.2 (26.7-54.6)	37.5 [2.2] 35.9 (20.9-66.7)	8.5 [2.7] 10.3 (7.0-13.8)
Eptanale (pM)	13.9 [1.8] 16.1 (9.3-21.3)	15.2 [1.6] 15.4 (10.4-21.3)	12.9 [2.1] 17.0 (8.4-24.0)	6.1 [2.0] 6.9 (3.8-10.1)
Ottanale (pM)	23.0 [1.7] 23.6 (17.7-33.2)	25.7 [1.5] 26.9 (19.1-33.5)	20.8 [1.9] 22.4 (16.9-34.2)	10.0 [1.8] 11.6 (7.2-16.2)
Nonanale (pM)	44.0 [1.8] 48.2 (31.6-62.5)	50.9 [1.7] 51.7 (32.4-72.1)	38.5 [1.9] 36.5 (31.1-60.1)	12.7 [1.8] 13.3 (7.2-22.7)

**Tabella 7.** Significatività del confronto tra gruppi.

Gruppo 0: controlli;

Gruppo 1: pazienti con NSCLC non fumatori ed ex-fumatori;

Gruppo 2: pazienti NSCLC fumatori.

L'ultima colonna rappresenta la significatività del confronto tra gruppi usando l'età come variata nel test ANCOVA.

ALDEIDI	Test ANOVA	Test post hoc di Tukey	Test ANCOVA
Propanale	p=0.006	Gruppo 0 vs 2, p<0.01	p=0.08
Butanale	p<0.001	Gruppo 0 vs 1, p<0.01 Gruppo 0 vs 2, p<0.01	p<0.001
Pentanale	p<0.001	Gruppo 0 vs 1, p<0.05 Gruppo 0 vs 2, p<0.01	p=0.001
Esanale	p<0.001	Gruppo 0 vs 1, p<0.01 Gruppo 0 vs 2, p<0.01	p<0.001
Eptanale	p<0.001	Gruppo 0 vs 1, p<0.01 Gruppo 0 vs 2, p<0.01	p<0.001
Ottanale	p<0.001	Gruppo 0 vs 1, p<0.01 Gruppo 0 vs 2, p<0.01	p=0.002
Nonanale	p<0.001	Gruppo 0 vs 1, p<0.01 Gruppo 0 vs 2, p<0.01	p<0.001

**Tabella 8.** Matrice dell'analisi discriminante

	Funzione	
	1	2
<b>Nonanale</b>	.866*	-.310
<b>Esanale</b>	.725*	.252
<b>Ottanale</b>	.598*	-.269
<b>Eptanale</b>	.538*	-.146
<b>Butanale</b>	.476*	.378
<b>Pentanale</b>	.394	.552*
<b>Propanale</b>	.289	.443*

\*=classifica le variabili in base al peso di ognuna nei due fattori.

**Tabella 9.** Classificazione dei soggetti; ogni caso è classificato in base alla funzione derivata da tutti gli altri casi.

Gruppi 0: controlli;

Gruppo 1: pazienti NSCLC non fumatori ed ex-fumatori;

Gruppo 2: pazienti NSCLC fumatori.

		Appartenenza predetta ai gruppi			
		Gruppo 0	Gruppo 1	Gruppo 2	Totale
Cross- validation	Gruppo 0	35	0	3	38
	(N°) Gruppo 1	0	10	9	19
	Gruppo 2	4	5	12	21
	Gruppo 0	92.1	.0	7.9	100.0
	(%) Gruppo 1	.0	52.6	47.4	100.0
	Gruppo 2	19.0	23.8	57.1	100.0

**Tabella 10.** Caratteristiche dei pazienti con BPCO.

I dati sono espressi come n°, media  $\pm$  SD, mediana (25°-75° percentile).

Maschi/femmine		14/14
Età (anni)		70.4 $\pm$ 8.4
Fumatori/Ex-Fumatori/Non Fumatori		4/23/1
Pacchi/anno (fumatori ed ex-fumatori)		63.6 $\pm$ 43.5
Stadio GOLD <sup>(a)</sup>	I (VEMS $\geq$ 80% del predetto)	0
	II (80% $\leq$ VEMS<50% del predetto)	4
	III (50% $\leq$ VEMS<30% del predetto)	13
	IV (VEMS $\leq$ 30% del predetto)	11
Criteri di Anthonisen <sup>(b)</sup>	Tipo I	12
	Tipo II	5
	Tipo III	9
	Riacutizzazione (A)	Remissione (B)
CVF, L	1.84 $\pm$ 0.64	1.91 $\pm$ 0.43
CVF % del predetto	53.81 $\pm$ 17.24	55.82 $\pm$ 4.88
VEMS, L	0.79 $\pm$ 0.24	0.89 $\pm$ 0.23*
VEMS % del predetto	32.11 $\pm$ 11.97	35.25 $\pm$ 12.73
VEMS/CVF	0.44 $\pm$ 0.10	0.47 $\pm$ 0.12
FEF <sub>25-75%</sub> L/s	0.29 $\pm$ 0.12	0.38 $\pm$ 0.23
FEF <sub>25-75%</sub> % del predetto	15.42 $\pm$ 7.79	19.11 $\pm$ 13.76

<sup>a</sup>Spirometria effettuata dopo la riacutizzazione di BPCO, in una fase clinica stabile.

<sup>b</sup>BPCO riacutizzata in base ai criteri di Anthonisen (Tipo I: aumento di dispnea, incremento di volume e purulenza dell'espettorato; Tipo II: presenza di due delle manifestazioni; Tipo III: presenza di una delle manifestazioni ed almeno uno tra i seguenti reperti: infezioni delle alte vie respiratorie negli ultimi 5 giorni, febbre senza altra causa apparente, aumento di sibili o tosse, aumento > 20% della frequenza respiratoria o della frequenza cardiaca rispetto al basale).

\* p<0.05 A vs B

**Tabella 11.** Livelli dei metalli misurati nel CAE e siero di pazienti con BPCO riacutizzata all'inizio della esacerbazione (A) e dopo guarigione (B).

Metalli (µg/L)	CAE		SIERO	
	A	B	A	B
<b>Al</b>	1.45 (0.68-2.58)	1.00 (0.63-2.28)	NM	NM
<b>Pb</b>	0.10 (0.07-0.20)	0.17 (0.04-0.20)	0.41 (0.11-1.03)	0.40 (0.19-0.82)
<b>Cd</b>	ND (ND-0.048)	ND (ND-0.014)	0.37 (0.05-0.98)	0.28 (0.09-0.65)
<b>Ni</b>	0.20 (0.10-0.40)	0.20 (0.05-0.47)	0.70 (0.32-1.19)	0.70 (0.30-0.94)
<b>Mn</b>	0.25 (0.09-0.40)	0.20 (0.073-0.28)*	1.39 (0.90-1.80)	1.50 (0.99-2.08)
<b>Se</b>	0.85 (0.40-1.95)	1.15 (0.55-1.95)	129 (122-139)	137 (115.5-149)
<b>Cu</b>	0.37 (ND-0.78)	0.30 (ND-0.79)	NM	NM
<b>Fe</b>	0.85 (0.50-1.40)	0.70 (0.40-1.92)	NM	NM
<b>Mg</b>	9.44 (3.08-13.81)	5.06 (2.59-8.90)*	220 (190-240) <sup>a</sup>	200 (180-250) <sup>b</sup>

Dati espressi come mediana (25°-75°percentile). ND: non determinabile; NM: non misurato.

<sup>a</sup> Livelli misurati in 18 dei 28 pazienti; <sup>b</sup> livelli misurati in 22 dei 28 pazienti.

\*p<0.05 A vs B

**Tabella 12.** Caratteristiche dei soggetti dello studio.

	IPF	NSIP	Sarcoidosi	Controlli
N° dei soggetti (M/F)	19 (14/5)	15 (9/6)	22 (14/8)	33 (25/8)
Età	68±0.78	65.3±9.7	53.5±13.9	55±10.80
Ex-fumatori/non fumatori	13/6	10/5	16/6	0/33
Pacchi/anno	24.5 (16.5-38.5)	26.4 (15.0-42.5)	16.5 (5.3-20.0)	0
Anni dalla sospensione dell'abitudine tabagica	31.7±18.3	23.1±10.7	15.5±7.2	0
CVF, L	2.3±0.9	2.6±0.9	3.5±0.9	4.8±0.9
CVF % del predetto	67.8± 19.2	80.8±18.1	94±12.5	108±10.5
TLC, L	3.8±1.2	4.4±1.4	5.4±1.1	5.6±1.3
TLC % del predetto	62.0±13.5	75.2±16.4	89.6±11.4	85±2.3
VEMS/CVF %	84.1±7.4	78.8±8.6	79.7±7.8	79±7.4
DLCO % del predetto	46.4±17.6	59.7±19.5	76.3±18.8	81±17.1

Dati espressi come media±SD, mediana (25°-75° percentile).

IPF: fibrosi polmonare idiopatica; NSIP: polmonite interstiziale non specifica; CVF: capacità vitale forzata; TLC: capacità polmonare totale; DLCO%: capacità di diffusione del monossido di carbonio.

**Tabella 13.** Livelli degli elementi metallici determinati nel condensato dell'aria esalata (CAE) di pazienti con fibrosi polmonare idiopatica (IPF), polmonite interstiziale non specifica (NSIP), sarcoidosi e controlli.

Metalli (µg/L)	IPF (n=19)	NSIP (n=15)	Sarcoidosi (n=22)	Controlli (n=33)
<b>Al</b>	1.8 (0.72-2.50)	1.6 (1.2-3.3)	1.6 (1.2-2.08)	1.2 (0.60-2.35)
<b>Pb</b>	0.04 (ND-0.13)	0.03 (ND-0.09)	0.04 (ND-0.1)	0.02 (0.008-0.055)
<b>Ni</b>	0.40 (0.3-0.6)*	0.5 (0.3-0.8)*	0.40 (0.31-0.6)*	0.20 (0.08-0.40)
<b>Cr</b>	0.05 (0.03-0.20)*	0.1 (0.03-1.1)*	0.07 (0.04-0.28)*	ND (ND-0.015)
<b>Si</b>	66 (38-140)*	87 (59- 146)*	59 (41-92.5)*	19 (0.5-47)
<b>Co</b>	ND (ND-0.008)*	0.01 (ND-0.01)	ND (ND-0.01)*	0.01 (ND-0.025)
<b>Ca</b>	41 (29-49)	23 (16-82)	47 (25-75.7)	63 (38-243)
<b>Zn</b>	2.1 (ND-6.6)	0.6 (ND-3.5)	0.22 (ND-2.1)*	1.6 (0.50-22)
<b>Fe</b>	0.30 (0.20-0.50)*	0.30 (0.20-0.40)*	0.35 (0.21-0.9)	1.20 (0.25-6.00)
<b>Cu</b>	0.10 (ND.-0.4)*	0.01 (ND.-0.40)*	0.25 (ND.-0.48)*	0.60 (0.30-1.80)
<b>Se</b>	ND*	ND (ND.-0.05)*	ND (ND.-0.1)*	0.30 (0.10-1.20)
<b>Mn</b>	0.17 (0.10-0.30)	0.20 (0.12-0.28)	0.23 (0.09-0.3)	0.10 (0.04-0.25)
<b>Mo</b>	ND (ND-0.02)*	0.02 (ND-0.05)	0.01 (ND-0.03)	0.03 (0.01-0.08)

Dati mostrati come mediana (25°-75° percentile). ND: non determinabile

\*p<0.05 vs controlli

**Tabella 14.** Risultati dell'analisi della regressione logistica multinomiale. I pazienti con fibrosi polmonare idiopatica (IPF) e polmonite interstiziale non specifica (NSIP) sono stati considerati come un unico gruppo.

(A) Significatività di ciascun elemento metallico.

(B) Classificazione dei gruppi.

(A)

0= IPF E NSIP 1=SARCOIDOSI 2= CONTROLLI <sup>§</sup>		Sig.	0= IPF E NSIP 1=SARCOIDOSI 2= CONTROLLI <sup>§</sup>		Sig.
0.00	Intercept	.303	1.00	Intercept	.246
	Co	.044		Co	.015
	Mo	.626		Mo	.171
	Zn	.035		Zn	.055
	Cu	.065		Cu	.061
	Si	.014		Si	.102
	Fe	.418		Fe	.653
	Cr	.765		Cr	.908
	Ni	.002		Ni	.002
	Se	.009		Se	.043

<sup>§</sup> 2.00 categoria di riferimento

(B)

OSSERVATO	PREDETTO			% CORRETTA
	IPF/NSIP	SARC	CONTROLLI	
IPF/NSIP	28	3	3	82.4%
SARCOIDOSI	14	8	0	36.4%
CONTROLLI	2	2	29	87.9%

**Tabella 15.** Risultati dell'analisi della regressione logistica binaria. I pazienti con fibrosi polmonare idiopatica (IPF), polmonite interstiziale non specifica (NSIP) e sarcoidosi sono stati considerati come un unico gruppo.

(A) Classificazione dei casi.

(B) Significatività di ciascun elemento metallico stimato.

(A)

0= IPF, NSIP E SARCOIDOSI; 1= CONTROLLI		Sig.
	Co	.015
	Mo	.381
	Zn	.029
	Cu	.056
	Si	.026
	Fe	.474
	Cr	.999
	Ni	.002
	Se	.021

(B)

OSSERVATO	PREDETTO		
	ILD	CONTROLLI	PERCENTUALE CORRETTA
ILD	54	2	96.4%
CONTROLLI	4	29	87.9%

## 10. APPENDICE

Durante lo svolgimento del dottorato di ricerca in Scienze della Prevenzione, mi sono occupata principalmente di metodologie non invasive per lo sviluppo di nuovi indicatori da utilizzare sia nella diagnosi di patologie respiratorie che nel monitoraggio dell'esposizione a tossici industriali ed ambientali. In particolare, la mia attività si è indirizzata verso lo studio di indicatori biologici di dose ed effetto in nuove matrici, quali il condensato dell'aria esalata e l'aria espirata e dello studio di indicatori biologici in grado di riflettere ed evidenziare processi implicati nell'insorgenza e progressione del tumore polmonare, come lo stress ossidativo ed alcune caratteristiche proprie della cellula neoplastica quali la neo-angiogenesi e la perdita del differenziamento, sia in tali matrici che nel sangue.

Inoltre mi sono occupata del reclutamento dei soggetti, dell'ottenimento del consenso informato per la partecipazione agli studi, della stesura di un questionario strutturato per la raccolta dei dati clinici e anamnestici, della raccolta dei campioni biologici e della gestione ed analisi dei dati.

Ho poi collaborato allo sviluppo e alla validazione di un sistema per lo studio della cinetica di esalazione e di deposizione nelle vie aeree del particolato aerodisperso e alla sua applicazione in ambito lavorativo, su di un gruppo di lavoratori esposti a cristobalite e in addetti di un'industria metalmeccanica.

Di seguito riporto le mie pubblicazioni e presentazioni a congressi.

### **Pubblicazioni (gennaio 2007-dicembre 2009):**

- Corradi M, Jordana Sanchez MM, **Acampa O**, Caglieri A, Goldoni M, Andreoli R, Manini P, Mutti A. Valutazione non invasiva della patobiologia polmonare in una coorte di lavoratori del settore acconciatura. Med Lav 2008; 99(1):49-57.
- De Palma G, Goldoni M, Catalani S, Carbognani P, Poli D, Mozzoni P, **Acampa O**, Internullo E, Rusca M, Apostoli P. Metallic elements in pulmonary biopsies from lung cancer and control subjects. Acta BioMedica 2008; 79 (suppl 1):43-51.

- Poli D, Goldoni M, Caglieri A, Ceresa G, **Acampa O**, Carbognani P, Rusca M, Corradi M. Breath analysis in non small cell lung cancer patients after surgical tumour resection. *Acta BioMedica* 2008; 79 (suppl 1):64-72.
- Folesani G, Corradi M, Goldoni M, Manini P, **Acampa O**, Andreoli R, Bertorelli G, David S, Franchini I. Urea in exhaled breath condensate of uraemics and patients with chronic airway disease. *Acta BioMedica* 2008; 79 (suppl 1):79-86.
- Gergelova P, Corradi M, **Acampa O**, Goldoni M, Mutti A, Franchini I, Marcinkova D, Rusnak M. New techniques for assessemnt of occupational respiratory diseases. *Bratisl Lek Listy* 2008; 109(10): 445-452.
- Goldoni M, Caglieri A, De Palma G, Longo S, **Acampa O**, Poli D, Manini P, Apostoli P, Franchini I, Corradi M, Mutti A. Development and set-up of a portable device to monitor airway exhalation and deposition of particulate matter. *Biomarkers* 2009; 14(5):326-339.
- Corradi M, **Acampa O**, Goldoni M, Andreoli R, Milton D, Sama SR, Rosiello R, de Palma G, Apostoli P, Mutti A. Metallic elements in exhaled breath condensate and serum of patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Metallomics* 2009; 1:339-345.
- Corradi M, **Acampa O**, Goldoni M, Adami E, Apostoli P, de Palma G, Pesci A, Mutti A. Metallic elements in exhaled breath condensate o patients with interstitial lung disease. *J Breath Res* 2009 3 046003 (8pp).
- Goldoni M, Caglieri A, de Palma G, **Acampa O**, Gergelova P, Corradi M, Apostoli P, Mutti A. Chromium in exhaled breath condensate (EBC), erythrocytes, plasma and urine in the biomonitoring of chrome-plating workers exposed to soluble Cr(VI). *J Environ Monit* 2010; DOI: 10.1039/b914673c.
- Poli D, Goldoni M, Corradi M, **Acampa O**, Carbognani P, Internullo E, Casalini A, Mutti A. Determiantion of aldehydes in exhaled breath of patients with lung cancer by means of on-fiber-derivatization SPME-GC/MS. *Journal of Chromatography B (Submitted)*.

- De Palma G, Mozzoni P, **Acampa O**, Internullo E, Carbognani P, Rusca M, Goldoni M, Corradi M, Tiseo M, Apostoli P, Mutti A. Expression levels of antioxidant genes and proto-oncogenes in patients with early stage non small cell lung cancer. *Journal of Nucleic Acids (Submitted)*.

**Presentazioni a congressi (gennaio 2007-dicembre 2009):**

- De Palma G, Mozzoni P, Internullo E, **Acampa O**, Corradi M, Mutti A, Carbognani P, Rusca M. Expression levels of antioxidant and receptors genes in patients with early stage non small cell lung cancer. 16th European Conference on General Thoracic Surgery, Bologna, June 8-11, 2008. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery* 2008; 7 Suppl. 2, S163 (Abstract).
- Poli D, Goldoni M, Caglieri A, Corradi M, Carbognani P, Rusca M, **Acampa O**, Mutti A. Determination of aldehydes in exhaled breath of patients with lung cancer by SPME-GC/MS. 1<sup>st</sup> French Italian Conference on Mass Spectrometry. MASSA 2008. Fundamentals and Applications of mass spectrometry. Siena, June 30-July 4 2008. Abstract Book, pp 111-112 (Abstract).
- Goldoni M, Caglieri A, Longo S, Corradi M, **Acampa O**, Mutti A. On-line measurement of exhalation kinetic and airway depositino of inhaled particles. 29<sup>th</sup> ICOH, International Congress on Occupational Health, Cape Town, South Africa, March 22-27, 2009. Topic session T1-33; pp 10.
- Corradi M, **Acampa O**, Tiseo M, Goldoni M, Costa L, Alinovi R, Carbognani P, Casalini A, Mutti A. Serum markers of malignant mesothelioma. 29<sup>th</sup> ICOH, International Congress on Occupational Health, Cape Town, South Africa, March 22-27, 2009.

## ***Ringraziamenti***

Alla fine di questo lungo percorso, che comprende il Dottorato di ricerca ma anche gli anni della Specializzazione in Medicina del Lavoro e di preparazione della tesi di Laurea, desidero ringraziare:

- Il Prof. Antonio Mutti, per la disponibilità, i preziosi consigli e gli insegnamenti che generosamente mi ha elargito oltre che per l'opportunità di far parte di un gruppo di ricerca motivato e preparato;
- Il Prof. Innocente Franchini, per la disponibilità, i consigli e la stima che mi ha dimostrato;
- Il Dottor Massimo Corradi, per gli insegnamenti e la disponibilità che mi ha dimostrato in questi anni;
- Il Prof. Enrico Bergamaschi e la Prof.ssa Luisella Selis per consigli e la disponibilità mostratami fin dal mio ingresso in Istituto come laureanda;
- I colleghi del Laboratorio di Tossicologia Industriale, con cui ho condiviso lavoro, soddisfazioni e speranze;
- La Dott.ssa Diana Poli per la generosità e la disponibilità dimostratami e per la passione e l'amore per la ricerca ed il lavoro, che ci hanno accomunate;
- La Dott.ssa Eveline Internullo e la Dott.ssa Valeria Balestra per la passione, la preparazione che mostrano quotidianamente nel loro lavoro e la collaborazione nel reclutamento dei pazienti;
- Il Dottor Matteo Goldoni, per la pazienza, la disponibilità, i preziosi consigli, i continui confronti, che mi hanno arricchito ed aiutato ad intraprendere le scelte più appropriate.
- Infine un sentito ringraziamento a tutti coloro che generosamente e pazientemente hanno partecipato come "soggetti dei miei studi", in particolare a tutti i malati di tumore polmonare che mi hanno insegnato come affrontare con dignità momenti così difficili.