

**Università degli Studi di Milano**  
**Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare**  
**Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche**

Curriculum: Genomica, Proteomica e Tecnologie Correlate

Ciclo XXIII

Anno Accademico 2009/2010

**Dottorando:** Elena VAGHI

**IDENTIFICAZIONE DI BIOMARCATORI PER LA  
DIAGNOSI PRECOCE DEL TUMORE  
POLMONARE**

Settore MED/04

**Direttore della Scuola:** Ch.ma Prof.ssa Maria Luisa VILLA

**Tutore:** Ch.ma Prof.ssa Maria Luisa VILLA

**Correlatore:** Dott.ssa Italia BONGARZONE

***Ai miei NONNI...per la FORZA e la tenacia  
con cui VIVONO ogni istante della loro vita!***

*“Nella vita quello che conta non è essere forti ma sentirsi forti...  
e se vuoi qualcosa veramente datti da fare e prendila...”  
(Chris McCandless, “Into The Wild”)*

## SOMMARIO

*Il tumore al polmone costituisce la più comune causa di morte per cancro, e l'identificazione precoce del tumore è essenziale per giungere ad interventi terapeutici tempestivi e ridurre in maniera significativa la mortalità. In questo progetto di ricerca ci siamo proposti l'obiettivo di individuare nuovi biomarcatori proteici nel plasma, in soggetti ad alto rischio di tumore polmonare in una popolazione di forti fumatori, arruolati nel programma MILD (Multicentric Italian Lung Detection). Abbiamo effettuato la misurazione multiparametrica di proteine e metaboliti dell'infiammazione e dello stress ossidativo sistemici (Serum Amyloid A, SAA; Paraoxonasi 1, PON1 e 50 citochine nel plasma) e locali (proteine e metaboliti nel condensato dell'esalato respiratorio) e la funzionalità respiratoria misurando il volume di espirazione forzata in un secondo (FEV1) mediante spirometria. In studi recenti, abbiamo dimostrato che, in soggetti dello studio MILD, elevati livelli plasmatici della proteina di fase acuta SAA e bassi livelli di FEV1 si associano ad un aumentato rischio per il tumore al polmone. Abbiamo ora evidenziato come i livelli di SAA correlano inversamente con i valori di funzionalità respiratoria misurata come FEV1, supportando il concetto che infiammazione e danno respiratorio sono legati ad un aumentato rischio tumorale e ponendo delle basi importanti per il disegno di ulteriori studi. L'analisi di un gruppo di 50 citochine con la piattaforma "Bio-Plex Suspension Array System", effettuata su 142 campioni di plasma, ha evidenziato una correlazione diretta tra le concentrazioni di SAA e delle citochine IL-12(p40), GRO- $\alpha$ , HGF, MCP-3, M-CSF, SCGF, SDF-1 $\alpha$ , IL-6 e IP-10, ed una correlazione inversa tra i valori di FEV1 ed i livelli delle citochine GRO- $\alpha$ , HGF, MCP-3,  $\beta$ -NGF, SCGF and MIG. L'analisi multivariata ha evidenziato un'associazione significativa tra le citochine SCGF, CTACK, MIF, MIG, IL-16 ed Eotaxin. In particolare, la citochina MIG risulta avere la migliore associazione con la FEV1. L'espressione della PON1 è stata valutata con Western Blot e saggio ELISA e ha riguardato gli stessi 142 campioni di plasma riportati sopra. In studi precedenti, è stato dimostrato che i livelli di questa glicoproteina, con attività antiossidante, sono minori nei forti fumatori ed in soggetti con cancro al polmone. Le nostre analisi preliminari riscontrano una correlazione inversa tra PON1 e PCR, tra PON1 ed SAA ed una correlazione diretta tra PON1 e FEV1, supportando l'ipotesi che al diminuire della funzione antiossidante corrisponda un aumento sistemico delle proteine di fase acuta dell'infiammazione e una diminuzione della capacità funzionale respiratoria. Per quanto riguarda le proteine ed i metaboliti locali, abbiamo infine dosato alcuni parametri infiammatori e dello stress ossidativo nel condensato dell'esalato respiratorio (di 18 soggetti forti fumatori e di 18 pazienti). Utilizzando la spettrometria di massa e tecniche immunoenzimatiche (ELISA, EIA, BIO-PLEX), abbiamo generato profili proteici del condensato e analizzato in modo specifico la Proteina Surfattante C, il Leucotriene B4, l'8-Isoprostano e 14 citochine. I dati più interessanti ottenuti sono quelli relativi all'8-Isoprostano, in quanto riescono a discriminare pazienti e controlli. Attraverso la misurazione multiparametrica di proteine e metaboliti dell'infiammazione, dello stress ossidativo sistemico e polmonare e della compromissione della funzionalità respiratoria, abbiamo individuato dei potenziali biomarcatori per la misurazione del rischio per il tumore polmonare. La loro effettiva utilità clinica dovrà essere stabilita in studi futuri su un numero più rilevante di soggetti.*

## ABSTRACT

Lung cancer remains the leading cause of cancer-mortality worldwide, mainly due to late diagnosis. Thus, the identification of biomarkers for an early detection would bring great benefit not only for patients but also for high risk subjects. This project was aimed to discover plasma biomarkers potentially useful to enhance our capabilities to identify those individuals at higher risk of lung cancer in heavy smokers population, enrolled in the Multicentric Italian Lung Detection (MILD) program. To this end, we performed multiparametric analysis of proteins and metabolites linked to systemic (Serum Amyloid A, SAA; Paraoxinase 1, PON1; and 50 plasmatic cytokines) and local (proteins and metabolites in exhaled breath condensate, EBC) inflammation and oxidative stress. We also studied the relationships between these parameters and the pulmonary function measured as FEV1 (forced expiratory volume in 1 s). Very recently we have demonstrated that increased plasma levels of the acute phase protein SAA and decreased FEV1 levels are associated with an increased risk of lung cancer incidence in heavy smokers. On this basis, for an efficacious detection of the high risk subgroup among the heavy smoking population, we explored the relationship between SAA plasma levels and FEV1. Importantly, we found a significant inverse correlation between these parameters, suggesting that increased levels of SAA are associated to decreased pulmonary function. We then evaluated a group of cytokines by Bio-Plex Suspension Array System, allowing the simultaneous detection of 50 cytokines. According to assessed SAA levels, we evaluated 142 plasma samples by Bio-Plex. By univariate analysis of obtained results we found that SAA levels correlated directly with cytokine levels of IL-12(p40), GRO- $\alpha$ , HGF, MCP-3, M-CSF, SCGF, SDF-1 $\alpha$ , IL-6 and IP-10 and that FEV1 values correlated inversely with GRO- $\alpha$ , HGF, MCP-3,  $\beta$ -NGF, SCGF and MIG concentrations. MIG showed the best association with FEV1. Multivariate analysis highlighted an association between SCGF, CTACK, MIF, MIG, IL-16 and Eotaxin. Additionally, we assessed PON1 levels by Western blot and ELISA in the 142 samples. Our data showed an inverse correlation between PON1 and the major acute phase protein CRP (C reactive protein) as well as between PON1 and SAA together with a direct correlation between PON1 and FEV1. This supported our hypothesis that the decrease of the anti-oxidant function corresponds to a systemic increase of acute phase inflammatory proteins and a decrease of pulmonary function. Regarding the locally produced proteins and metabolites we evaluated inflammatory and oxidative stress parameters in 18 EBC samples derived from heavy smokers and 18 obtained from lung cancer patients. By mass spectrometry analysis and immunoenzymatic assays (ELISA, EIA, BIO-PLEX) we generated protein profiles and assessed the levels of Surfactant Protein C, Leucotrien B4, 8-Isoprostane and a group of 14 cytokines. Noteworthy, we could detect an interesting increased level of 8-Isoprostane in EBC samples of lung cancer patients with respect to those derived from heavy smokers.

Taken together our multiparametric analyses highlighted the existence of interesting relationships between specific plasma or EBC components and the impairment of lung function. This supports the interesting possibility we have identified potential biomarkers useful for the evaluation of lung cancer risk. However, their effective clinical applicability will be investigated in future studies using a higher number of subjects.

# INDICE

## 1. INTRODUZIONE

<b>1.1 Il cancro al polmone</b> .....	1
<b>1.2 I fattori di rischio del cancro al polmone</b> .....	1
<b>1.3 La diagnosi precoce del cancro al polmone ed i programmi di “screening”</b> .....	3
<b>1.3.1 Gli studi randomizzati controllati sui soggetti ad alto rischio</b> .....	5
<b>1.4 I marcatori biologici tumorali</b> .....	7
<b>1.4.1 I marcatori biologici del cancro al polmone</b> .....	9
<b>1.4.1.1 Marcatori proteici</b> .....	9
<b>1.4.1.2 Marcatori genetici: DNA ed RNA</b> .....	11
<b>1.4.1.3 Autoanticorpi</b> .....	13
<b>1.4.1.4 Marcatori del respiro</b> .....	13
<b>1.5 Gli approcci proteomici per la scoperta di nuovi biomarcatori</b> .....	14
<b>1.6 La proteomica del plasma</b> .....	17
<b>1.6.1 La complessità delle citochine plasmatiche</b> .....	18
<b>1.7 L’infiammazione ed il cancro al polmone</b> .....	19
<b>1.7.1 Il fumo di sigaretta e lo stress ossidativo</b> .....	20
<b>1.7.2 La Broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)</b> .....	21
<b>1.8 La relazione tra infiammazione, stress ossidativo e funzionalità polmonare nei forti fumatori</b> .....	23
<b>1.8.1 Lo studio della proteina di fase acuta SAA (Serum Amyloid A)</b> .....	23
<b>1.8.2 Lo studio delle citochine</b> .....	24
<b>1.8.2.1 La tecnologia “Bio-Plex Suspension Array System” per la misurazione simultanea delle citochine</b> .....	25
<b>1.8.2.2 I vantaggi della tecnologia Bio-Plex</b> .....	27
<b>1.8.3 Lo studio della Paraossinasi 1 (PON1)</b> .....	27
<b>1.8.4 L’indicatore della funzionalità polmonare FEV1</b> .....	28
<b>1.9 L’analisi del condensato dell’esalato respiratorio</b> .....	29

## 2. MATERIALI E METODI

<b>2.1 I pazienti arruolati nello studio</b> .....	32
<b>2.1.1 I campioni di plasma</b> .....	32
<b>2.1.2 I campioni di condensato dell’esalato respiratorio</b> .....	33
<b>2.2 Il processamento del plasma dai prelievi ematici</b> .....	33
<b>2.3 La raccolta e la preparazione del condensato dell’esalato respiratorio</b> .....	33
<b>2.4 La misurazione delle citochine plasmatiche</b> .....	33
<b>2.4.1 L’analisi statistica multivariata dei dati: la PCA</b> .....	36
<b>2.5 La misurazione dei livelli plasmatici della SAA</b> .....	36

<b>2.6 La misurazione dei livelli plasmatici della PON1 .....</b>	<b>37</b>
2.6.1 Gel monodimensionale e trasferimento.....	37
2.6.2 Western blot con anticorpo specifico.....	38
2.6.3 Sviluppo del filtro tramite ChemiDoc e quantificazione delle bande .....	39
2.6.4 Il dosaggio della PON1 con saggio ELISA .....	39
<b>2.7 L'analisi del condensato dell'esalato respiratorio.....</b>	<b>40</b>
2.7.1 L'applicazione della piattaforma SELDI-TOF.....	40
2.7.2 L'applicazione della tecnologia n-LC-MS/MS.....	41
2.7.3 La misurazione delle citochine tramite la tecnologia Bio-Plex .....	42
2.7.4 La misurazione della proteina SP-C.....	43
2.7.5 La misurazione dei metaboliti 8-Isoprostano ed LTB4 .....	43
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	
<b>3.1 La relazione tra le concentrazioni plasmatiche di SAA, delle citochine, della PON1 e FEV1.....</b>	<b>46</b>
3.1.1 La relazione tra le concentrazioni plasmatiche di SAA e FEV1.....	46
3.1.2 L'extrapolazione del pannello di citochine .....	47
3.1.2.1 L'analisi statistica univariata.....	52
3.1.2.1.1 La relazione tra le concentrazioni plasmatiche delle citochine e di SAA.....	52
3.1.2.1.2 La relazione tra le concentrazioni plasmatiche delle citochine ed i parametri clinici FEV1% e Tiffenau%.....	52
3.1.2.2 L'analisi statistica multivariata.....	54
3.1.2.3 La rivalutazione delle concentrazioni di SCGF, MIG, MIF, CTACK, IL-16 ed Eotaxin .....	56
3.1.2.4 La valutazione della concentrazione di SCGF in 378 campioni .....	68
3.1.3 La quantificazione della PON1.....	70
3.1.3.1 Il dosaggio della PON1 mediante Western blot su 72 campioni di plasma.....	70
3.1.3.2 Il dosaggio della PON1 mediante ELISA su 63 campioni di plasma.....	72
3.1.3.3 Il dosaggio della PON1 mediante ELISA su 397 campioni si plasma .....	73
<b>3.2 Il dosaggio di molecole dell'infiammazione e dello stress ossidativo nel condensato dell'esalato respiratorio .....</b>	<b>75</b>
<b>4. CONCLUSIONI.....</b>	<b>77</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>79</b>

# 1. INTRODUZIONE

## ***1.1 Il cancro al polmone***

Il carcinoma del polmone e' la neoplasia con il maggior tasso di incidenza e di mortalità nel mondo, sia negli uomini che nelle donne, con la massima frequenza negli Stati Uniti d'America ed in Europa. In media, solo il 13% dei pazienti ha un'aspettativa di sopravvivenza superiore ai cinque anni. Nell'anno 2007, solo per quanto riguarda gli Stati Uniti, le stime sono state di 213380 nuovi casi di tumori polmonari (circa il 15% del totale dei nuovi casi di tumore) e di 160390 casi di morte (circa il 29% di tutti i morti per cancro) [1]. In Italia, le stime del 2008 sono state di 25147 nuovi casi di neoplasie polmonari (circa il 19% di tutti i nuovi casi di tumore) e di 20599 casi di morte (circa il 28% di tutti i morti per cancro) (<http://www.tumori.net/it>).

Nonostante l'epidemiologia del tumore al polmone sia stata studiata per piu' di 50 anni, i punti oscuri sono ancora molti ed alcune caratteristiche della patologia sono in continuo mutamento. Vengono colpiti prevalentemente soggetti di eta' superiore ai 50 anni che abbiano fatto uso di tabacco. Le misure di prevenzione per il fumo di sigaretta prese dal 1960 in poi hanno portato ad una lenta ma costante diminuzione del tasso di mortalità negli individui di sesso maschile nella prima parte di questo secolo, benché non sia ancora osservata una diminuzione significativa nelle donne [2]. Altri studi epidemiologici si sono concentrati sulla valutazione di altri fattori di rischio per lo sviluppo di tumori polmonari, rivelando un maggiore tasso d'incidenza nelle popolazioni esposte all'inquinamento proveniente dalle emissioni di automobili, industrie e centrali termoelettriche [3-5].

Il tumore polmonare puo' essere suddiviso in due gruppi: il tumore a piccole cellule (SCLC) ed il tumore non a piccole cellule (NSCLC). Circa il 75% delle neoplasie polmonari sono NSCLCs ed includono: il carcinoma a cellule squamose, l'adenocarcinoma ed il carcinoma a grandi cellule. In questi ultimi anni si sta osservando un aumento dell'incidenza della variante adenocarcinoma, tumore che interessa soprattutto le regioni periferiche del polmone [1].

## ***1.2 I fattori di rischio del cancro al polmone***

Il piu' importante fattore di rischio nel tumore del polmone e' rappresentato dal fumo di sigaretta [6]: esiste infatti un chiaro rapporto dose-effetto tra questa abitudine e la neoplasia, sia per quanto riguarda il fumo attivo che passivo. Il rischio di sviluppo di cancro mortale aumenta con l'aumentare del tempo di esposizione e del numero di sigarette fumate, con graduale diminuzione del rischio in seguito a cessazione totale dell'esposizione [7]. Secondo uno studio basato su proiezioni statistiche, il fumo e' responsabile di circa il 90% dei tumori polmonari mortali nei paesi sviluppati [8]. In particolare, uno studio recente indica che il fumo di sigaretta e' responsabile dello sviluppo dell'87% dei casi di neoplasia polmonare (90% negli individui di sesso maschile e 85% nelle donne), con un'incidenza che aumenta considerevolmente se le prime esposizioni avvengono tra i 18 e i 25 anni di eta' [9]. Il fumo di sigaretta contiene circa 60 cancerogeni certi [10], che agiscono direttamente (cioè con lesioni immediate) o indirettamente (cioè con lente modificazioni nel corso del tempo) a livello dei bronchi; in particolare, sono cancerogeni diretti gli idrocarburi aromatici policiclici (cioè i prodotti della

combustione, tra cui il benzopirene) e le nitrosamine (derivati dell'ammoniaca usati nella lavorazione delle sigarette), invece i fenoli e le aldeidi (contenuti per esempio nella carta) si sono dimostrati fattori indiretti, cioè sono in grado, con il tempo, di promuovere la trasformazione neoplastica delle cellule. Inoltre la nicotina presente e' in grado di deprimere la risposta immunitaria, diminuendo la capacità di sorveglianza e di eliminazione delle cellule neoplastiche da parte dei linfociti T e dei linfociti NK [11]. Il fumo di sigaretta non rappresenta solo un fattore di rischio ma anche un importante elemento in grado di influenzare la prognosi, dimostrato dal fatto che soggetti non fumatori ma con carcinoma polmonare hanno una maggiore percentuale di sopravvivenza a 5 anni rispetto ai fumatori [12].

Esistono poi altri cancerogeni chimici come il radon, l'amianto (o asbesto), i metalli pesanti, il catrame e gli oli minerali, che provocano tumore soprattutto in quella parte di popolazione che viene a contatto con queste sostanze per motivi di lavoro: si parla in questo caso di esposizione professionale.

Il radon e' un gas inodore ed incolore, generato dai processi di decadimento del radio, a sua volta prodotto del decadimento dell'uranio, presente diffusamente nella crosta terrestre (granito e minerali usati per la costruzione delle abitazioni). E' un elemento volatile e radioattivo, in grado di indurre mutazioni a carico del DNA e recenti ricerche hanno indicato il radon come secondo fattore di rischio per lo sviluppo del tumore al polmone [13]. Gli effetti sulla salute sono stati studiati in particolare sui minatori esposti ad alte concentrazioni di radon presente nell'aria delle miniere. Tali indagini hanno evidenziato che il radon e' la causa principale del tumore del polmone tra i minatori [14]. La maggior parte dell'esposizione al radon avviene in ambienti chiusi, specialmente all'interno delle case, dove la fonte principale delle radiazioni e' rappresentata dal sottosuolo [15] ed e', inoltre, stato osservato che i tumori del polmone indotti dal radon insorgono piu' facilmente, ma non esclusivamente, nei soggetti fumatori o ex-fumatori [16].

L'amianto, un minerale naturale a struttura fibrosa appartenente alla classe chimica dei silicati, mostra un ruolo sinergico con il fumo di tabacco per lo sviluppo del carcinoma del polmone [17]. In Gran Bretagna e' stato stimato che il 2-3% dei casi di carcinoma mortale e' causato dall'amianto [18]. In Italia, la relazione tra esposizione all'asbesto ed il tumore polmonare e' stata documentata per la prima volta nel 1955-56 [19]. Lo studio ha dimostrato che, mentre la sola esposizione all'amianto e' in grado di aumentare il rischio di 5 volte, l'esposizione combinata di asbesto e fumo di tabacco e' in grado di aumentare il rischio di 95 volte.

Anche l'esposizione allo smog e all'inquinamento atmosferico (cancerogeni derivati dalla combustione dei derivati del petrolio e prodotti delle lavorazioni che comportano l'uso di metalli particolari come nickel e cromo) e' considerata causa di neoplasia polmonare, soprattutto nei centri urbani [20]. Inoltre, in alcuni paesi in via di sviluppo, l'esposizione ai fumi delle stufe utilizzate per cucinare e' stata associata al rischio di tumore polmonare [21].

Dei nuovi casi di tumore al polmone che si registrano ogni anno, circa l'85% e' causato dal consumo di sigarette, mentre solo il 15% circa sembra essere causato da un insieme di fattori ambientali. Tuttavia, negli ultimi anni, e' stato dimostrato che solo una piccola parte dei forti fumatori sviluppa un tumore polmonare; cio' ha portato a pensare che possano esistere dei fattori genetici che giocano un ruolo di co-fattori determinanti per lo sviluppo e la progressione della neoplasia causata dal fumo di sigaretta [22, 23]. Le piu' importanti alterazioni genetiche che predispongono alla neoplasia polmonare sono quelle che avvengono a carico del



gene p53 e del gene FHIT (*Fragile Histidine Triad*), che comunque sono causa di un numero molto ridotto di casi [24].

Inoltre, anche soggetti già affetti da enfisema o bronchite cronica, patologie che testimoniano la massiva esposizione al fumo di sigaretta, hanno una probabilità maggiore di sviluppare cancro mortale ai polmoni [6].

Risulta, quindi, molto importante individuare tra i fumatori quelli a maggior rischio di sviluppare il cancro ai polmoni. Tenendo in considerazione che molti composti cancerogeni richiedono un'attivazione metabolica per poter reagire con le macromolecole cellulari, e' logico supporre che le differenze individuali del metabolismo possano influenzare i processi di carcinogenesi che giocano un ruolo essenziale nelle prime fasi dello sviluppo della neoplasia.

L'individuazione di queste differenze metaboliche e del loro ruolo nel promuovere o facilitare l'insorgenza del cancro polmonare renderebbe possibile una diagnosi precoce dei soggetti a maggior rischio nella popolazione, migliorando notevolmente la possibilità di sopravvivenza.

### ***1.3 La diagnosi precoce del cancro al polmone ed i programmi di "screening".***

Il tumore al polmone e' una patologia difficilmente curabile ed una diagnosi precoce potrebbe risultare molto importante nella lotta contro questa malattia, in quanto la prognosi dipende largamente dalla tempestività della diagnosi e da un trattamento immediato prima dell'insorgenza di metastasi. Infatti, quando il tumore e' confinato al polmone (stadio I) o si e' diffuso ai linfonodi vicini o alla sola parete toracica (stadio II), senza evidenze cliniche di presenza di metastasi, il tasso di sopravvivenza a 5 anni e' del 60-50% dopo intervento chirurgico [25] e, se il tumore e' inferiore ai 3 mm, il tasso oscilla tra l'80% ed il 90% [26].

Purtroppo, il cancro al polmone allo stadio precoce non presenta un quadro sintomatico e solo raramente e' stata osservata emottisi, cioè la fuoriuscita di sangue dalla bocca a seguito di lesioni polmonari. Più comunemente, i sintomi sopraggiungono a seguito dell'infiltrazione del tumore negli organi adiacenti (esofago, cuore, colonna vertebrale, plesso brachiale, etc.) (stadio III) o a seguito di metastasi ematogene, ossia che interessano il cervello, le ossa ed il fegato (stadio IV). A causa della mancanza di sintomatologia negli stadi precoci, il tumore al polmone, nella quasi totalità dei casi, e' diagnosticato in stadi avanzati.

Quindi, data la rara presenza di sintomi agli stadi precoci della neoplasia polmonare, risulta di estrema importanza lo sviluppo di un sistema diagnostico che possa rilevare il cancro asintomatico.

Nel tentativo di individuare una possibile strategia che permettesse di segnalare i soggetti con maggiore probabilità di sviluppare tumore ai polmoni, negli anni '70 vennero condotti tre importanti studi per valutare la capacità di ottenere una diagnosi precoce di questa patologia, sia mediante l'analisi della citologia del muco, sia con la radiografia al torace su una popolazione di forti fumatori [27-29]. I risultati di questi studi furono deludenti e, nella pratica medica odierna, nessuno dei due sistemi diagnostici sopraccitati e' raccomandato per lo *screening* dei soggetti forti fumatori. La spiegazione più accreditata e' che vi sia un'insufficiente sensibilità di entrambe le metodiche nell'individuazione del tumore. Inoltre la citologia del muco può risultare negativa, nonostante la presenza di neoplasia, per la semplice mancanza di distacco, dalla massa neoplastica, delle cellule tumorali,

che quindi non vengono individuate nell'analisi. Per quanto riguarda le lastre del torace, invece, l'esame rileva con bassa efficienza i piccoli noduli polmonari, che sono la più comune manifestazione di un tumore al polmone a stadi precoci.

Studi successivi hanno dimostrato che solo il 50% dei noduli polmonari che misurano dai 6 ai 10 mm vengono rilevati con una lastra al torace durante uno *screening* di massa sulla popolazione e che tale indagine diagnostica, in singoli casi, può fallire nel rilevare un tumore al polmone anche superiore ai 3 cm [30]. La scarsa visibilità sulle lastre radiografiche nelle neoplasie polmonari agli stadi precoci è dovuta al fatto che molte di queste sono caratterizzate da un piccolo nodulo circondato da parenchima ed hanno poca interazione con i raggi X.

I risultati negativi ottenuti da questi imponenti e costosi studi hanno bloccato qualsiasi altro tentativo di sviluppare programmi di diagnosi precoce per la neoplasia polmonare per più di un decennio.

Soltanto negli anni '80, l'introduzione della Tomografia Assiale Computerizzata (TAC spirale) ha acceso nuovamente l'interesse della comunità scientifica sulla possibilità di una diagnosi precoce del cancro polmonare.

Negli ultimi decenni, numerosi lavori hanno documentato l'alta sensibilità della TAC spirale ed i possibili vantaggi che si potrebbero ottenere con un utilizzo sistematico dell'analisi del torace per individuare soggetti ad elevato rischio di sviluppo neoplastico al polmone. In particolare, nel 1999, lo studio promosso dalla Cornell University di New York ha dimostrato che la TAC spirale ha una sensibilità e specificità, nell'identificare tumori molto piccoli, superiore rispetto alla radiografia toracica, con una percentuale di pazienti operabili del 96% ed una frequenza dello stadio I dell'80% [31].

Per confermare questi eccellenti risultati, la TAC spirale ad alta risoluzione è stata utilizzata successivamente in diversi studi, su un ampio numero di pazienti e su un lungo periodo di tempo con esami a 3, 6, 12 e 24 mesi. I dati raccolti sia in Europa che negli Stati Uniti sono risultati essere simili a quelli ottenuti alla Cornell University [32, 33].

I miglioramenti apportati in questi anni alla tecnologia hanno, inoltre, reso possibile l'individuazione sistematica di noduli con dimensioni di circa 1 mm; tuttavia, con un così elevato grado di sensibilità, noduli di queste dimensioni possono essere facilmente confusi con strutture, soprattutto vasi, presenti normalmente nel tessuto. Per ovviare a questo problema, facilitare e velocizzare le procedure di analisi, negli ultimi anni, sono stati introdotti *software* di elaborazione di immagine che permettono di evidenziare automaticamente i noduli con ottima precisione.

Non tutti i noduli evidenziati sono però riconducibili a tumori polmonari ad uno stadio precoce. Al contrario, molti studi hanno evidenziato che la maggior parte dei noduli presenti in una popolazione ad elevato rischio di metastasi sono benigni. Infatti, più del 95% dei noduli individuati con la TAC spirale non hanno origine neoplastica e la percentuale globale di falsi positivi è dell'11.5% [34].

Questi risultati hanno sollevato molti dubbi di ordine etico sull'uso della TAC spirale nello *screening* di massa. Infatti, valutare se un nodulo individuato sia benigno comporta una serie di TAC spirali ad intervalli regolari, per studiare la crescita del nodulo, o un'indagine secondaria diversa, come la PET (tomografia ad emissione di positroni) o, più raramente, una biopsia o una toracotomia. Nessuno di questi sistemi diagnostici, però, ha una specificità del 100% e, di conseguenza, su almeno il 20% dei soggetti sottoposti allo *screening* verrebbero eseguite toracotomie non necessarie [35].

Inoltre, una diagnosi precoce del tumore polmonare dovrebbe poter tenere in considerazione i diversi tipi di neoplasie nelle quali può essere classificato; infatti, le differenze che caratterizzano ogni sottogruppo di cancro polmonare influenzano pesantemente la prognosi. Tuttavia, i metodi diagnostici al momento disponibili non rendono possibile questa caratterizzazione, anzi sembrerebbero favorire l'individuazione delle neoplasie più indolenti, come il carcinoma broncoalveolare e l'adenocarcinoma ben differenziato. Questa tendenza è stata documentata da studi che hanno analizzato i risultati ottenuti nelle campagne di diagnosi precoce al polmone condotte negli ultimi decenni. È stato evidenziato che la percentuale di tumori polmonari rilevati con i metodi di diagnosi precoce, con tempi di raddoppiamento (metodo di valutazione dell'aggressività delle forme neoplastiche) superiori a 400 giorni, sia maggiore rispetto a quella attesa sulla base degli studi epidemiologici sull'intera popolazione [36].

Negli ultimi anni, è stata anche messa in discussione l'ipotesi, finora comunemente accettata, che la diagnosi precoce aumenti la sopravvivenza, in quanto non si è mai trovato riscontro nei dati clinici. Infatti, in uno studio condotto su 510 soggetti con tumore al polmone a grandi cellule, tutti classificati allo stadio I, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative nel tasso di sopravvivenza dei vari pazienti, raggruppati in base alle dimensioni delle neoplasie rilevate [26]. È quindi in corso un dibattito non solo sull'efficacia o meno dei sistemi attuali di diagnosi precoce del tumore al polmone ma anche sulla correttezza degli assunti sui quali si basano [37, 38].

### **1.3.1 Gli studi randomizzati controllati sui soggetti ad alto rischio**

Gli studi pilota sul monitoraggio sistematico di soggetti ad alto rischio con TAC spirale hanno raggiunto l'obiettivo di messa a punto della metodica, indicando un potenziale effetto favorevole sulla guarigione del tumore polmonare ma l'effetto sulla mortalità globale appare molto limitato, perché questi studi non comprendono alcun intervento di prevenzione primaria. La fase degli studi pilota non controllati è terminata ed in tutto il mondo si sta passando alla fase degli studi prospettici randomizzati su grandi numeri, che hanno lo scopo di mostrare se esista un beneficio reale, in termini di riduzione della mortalità, nei soggetti che si sottopongono al controllo periodico.

Sono, infatti, in corso numerose sperimentazioni randomizzate su larga scala che coinvolgono, con diversi disegni di studio, oltre 90000 individui forti fumatori ad alto rischio di tumore al polmone. I primi risultati dovrebbero essere disponibili nei prossimi 2 anni.

Negli Stati Uniti è stata effettuato lo studio randomizzato con il maggior numero di forti fumatori arruolati, il "National Lung Screening Trial", che ha ottenuto una potenza statistica del 90% nell'individuare una riduzione della mortalità del 20% nel gruppo sottoposto a TAC spirale a bassi dosaggi [39].

Il programma di *screening* Europeo attualmente include sei studi randomizzati: "NELSON" in Olanda, "Danish Lung Cancer Screening Trial", in Danimarca, "LUSI" in Germania e tre studi italiani, "ITALUNG" a Firenze, "DANTE" e "MILD" a Milano.

Lo studio NELSON è stato avviato con la prospettiva di rilevare una riduzione del 25% della mortalità per cancro al polmone in una popolazione di 20000 soggetti forti fumatori di età compresa tra i 50 e i 74 anni, suddivisi nel gruppo TAC e controllo [40]. I primi risultati ottenuti dal NELSON hanno mostrato che la percentuale di individuazione della neoplasia alla *baseline* è dello 0.9%, con il

99.9% del valore predittivo negativo degli algoritmi diagnostici, basati sulla valutazione automatica del volume e del tempo di raddoppiamento [41].

Il “Danish Lung Cancer Screening Trial” ha arruolato una popolazione di soggetti ad elevato rischio simile a quella del NELSON ed i risultati ottenuti, anch’essi paragonabili, sono inseriti nel medesimo *database* [42].

Anche il “LUSI” e’ uno studio di sperimentazione simile ai precedenti, e’ stato avviato in Germania nel 2007 ed e’ attualmente nella fase di randomizzazione [43].

Lo studio italiano DANTE e’ stato il primo ad entrare nel programma europeo, nato nel 2001, ha arruolato 2472 soggetti, di eta’ compresa tra i 60 e i 70 anni, sottoposti a TAC annuale o in osservazione per 4 anni [44]. I soggetti partecipanti allo studio in entrambi i gruppi, hanno effettuato sia esame RX torace che esame citologico dello sputo, con conseguente individuazione di cancro al polmone in otto individui nel braccio di controllo.

Il progetto ITALUNG, di Firenze, ha randomizzato 3206 volontari (55-69 anni), con lo stesso criterio del DANTE. Gli esami effettuati con la TAC spirale hanno rilevato 21 tumori polmonari in 1400 soggetti (1.5%) [45].

Lo studio MILD (“Multicentric Italian Lung Detection”) e’ cominciato nel 2005 ed e’ ancora in fase di sperimentazione. Il periodo di screening e’ stato fissato a 10 anni e, fino ad ora, piu’ di 4400 volontari sono stati arruolati nel gruppo TAC spirale o in quello di controllo. All’interno del gruppo TAC spirale e’ stata programmata una seconda randomizzazione per il confronto tra soggetti sottoposti a TAC annualmente e quelli sottoposti a TAC ogni 2 anni. Tutti i partecipanti al progetto saranno beneficiari di un programma di consulenza anti-tabacco, di esami clinici per la valutazione della funzionalità polmonare e di un procedimento di campionamento tissutale per una valutazione piu’ estesa dei marcatori biologici [<http://www.capolmone.org/>]. Il progetto MILD si differenzia dagli altri studi randomizzati in corso nel mondo perche’, per la prima volta, unisce la prevenzione primaria con la diagnosi precoce e la quantificazione del rischio individuale, utilizzando le tecniche piu’ avanzate di diagnosi strumentale, biologia molecolare, genomica e proteomica. Infatti, il MILD prevede: i) un’attività di prevenzione primaria, atta a ridurre il numero di fumatori e, quindi, diminuire il rischio di morte per fumo, anche per le patologie non polmonari; ii) la prevenzione secondaria, attraverso il monitoraggio periodico con TAC spirale annuale o biennale; iii) un’attività di ricerca sui marcatori biologici. Questi sono aspetti molto importanti: grazie al monitoraggio dei volontari arruolati nel programma si potranno individuare gli strumenti diagnostici realmente efficaci (non e’ confermato che la TAC spirale sia piu’ utile rispetto ad altri strumenti meno sofisticati) e valutare, attraverso il gruppo di controllo non sottoposto alla TAC periodica, la concreta efficacia di un programma diagnostico su larga scala. La ricerca svolta sui campioni biologici (quali sangue e respiro), rivolta alla caratterizzazione biologica individuale, potrà consentire sia di riconoscere precocemente forme pretumorali sia di individuare soggetti predisposti geneticamente all’insorgenza di tumore, quindi di diminuire la mortalità e mirare l’intervento diagnostico adeguandolo alle caratteristiche individuali con minor sofferenza per il paziente e riduzione della spesa sanitaria. Grazie alla sinergia di questi tre aspetti, il progetto MILD si propone di raggiungere l’obiettivo di dimezzare la mortalità secondaria al fumo, mirando all’adesione di almeno 10000 soggetti a rischio che, oltre a difendere se stessi, partecipando al progetto, daranno un serio e concreto contributo alla ricerca, aiutando cosi’ anche tutta quella popolazione sofferente per neoplasia polmonare.

Lo studio DANTE e' l'unico, a livello europeo, ad aver pubblicato i risultati sull'efficacia dello *screening* [46]. In sintesi, questi primi risultati non hanno confermato l'efficacia di uno screening mediante TAC spirale, in termini di diminuzione della mortalità del tumore al polmone. Cio' nonostante, la risposta definitiva riguardante la concreta possibilità di prevenire la mortalità nei forti fumatori, attraverso l'indagine annuale con TAC spirale, potrà essere determinata da *follow-up* a lungo termine considerando tutti gli studi sperimentali in corso.

Per gli anni a venire, la ricerca sara' finalizzata a garantire che gli studi europei, nei quali il gruppo di controllo e' sottoposto a studio osservazionale per oltre 3 anni, potranno essere raggruppati in un unico studio di meta-analisi, al fine di raggiungere un'adeguata potenza statistica.

### **1.4 I marcatori biologici tumorali**

E' di fondamentale importanza riuscire a comprendere gli specifici meccanismi molecolari alla base della formazione e della progressione delle neoplasie polmonari. Questo permetterebbe, da una parte, di comprendere meglio l'evoluzione del tumore nell'organismo e, dall'altra, di definire una nuova classificazione dei pazienti sulla base di parametri molecolari quantitativi, oltre quelli clinici.

I marcatori biologici sono indicatori, misurabili e valutabili oggettivamente, sia dei normali processi biologici che della presenza e progressione del tumore in uno specifico momento e rappresentano, inoltre, uno strumento potente per monitorare l'andamento del tumore e valutare l'efficacia di un intervento terapeutico [47].

I marcatori biologici tumorali sono sostanze prodotte direttamente dalla massa neoplastica (antigeni tumorali), come ormoni, enzimi o altre proteine, frammenti proteici o metabolici, correlati o meno con la crescita numerica delle cellule tumorali, oppure sono sostanze prodotte dall'organismo in risposta al tumore, come le proteine della fase acuta dell'infiammazione. Bisogna tenere in considerazione che queste molecole non sempre sono un prodotto esclusivo del tessuto neoplastico ma possono essere prodotte anche dal corrispondente tessuto normale. In questo caso, viene cercata una variazione nelle concentrazioni rilevate. Queste variazioni, pero', possono essere dovute anche a malattie non oncologiche o ad eventi fisiologici. Risulta quindi importante conoscere questi fattori di incremento non specifici per ogni singolo marcatore ed, inoltre, il valore di concentrazione rilevato va sempre interpretato e rapportato alla situazione clinica del paziente.

Nonostante queste limitazioni, i marcatori molecolari possono giocare un ruolo essenziale nella clinica oncologica e per questo si necessita urgentemente di promuovere il loro sviluppo ed uso nella diagnosi e nel trattamento del cancro. I marcatori biologici, infatti, vengono utilizzati per sviluppare dei semplici saggi non invasivi che indichino il rischio di sviluppare tumore (biomarcatori diagnostici), per individuare la dose di agente farmacologico piu' opportuna da utilizzare per una terapia personalizzata (biomarcatori farmacodinamici), per classificare i tumori affinché il paziente possa ricevere le cure piu' appropriate (biomarcatori predittivi) e per monitorare la progressione della neoplasia, la regressione e le recidive (biomarcatori prognostici).

I marcatori biologici tumorali che sono entrati nella routine clinica sono proteine tumorali circolanti, in quanto sono facilmente accessibili con un semplice prelievo

di sangue, sono dosabili in ogni laboratorio ed i saggi si possono ripetere nel tempo; esempi di biomarcatori sono il PSA (antigene prostatico specifico) che e' in grado di segnalare la presenza di tumore alla prostata, il CEA (antigene carcinoembrionale) che e' utilizzato per il carcinoma del colon e del retto ed il CA 125 (glicoproteina: mucina) per il carcinoma ovarico (Tab. 1).

<b>Marcatore</b>	<b>Indice di affidabilità</b>	<b>Neoplasia di riferimento</b>
<b>AFP: alfafetoproteina</b> <b>Glicoproteina: alfaglobulina</b>	< 7 unità / litro	Carcinoma epatico, carcinoma ovarico carcinoma del testicolo
<b>CA 15.3</b> <b>Glicoproteina mucino simile</b>	< 51 Unità/ litro	Carcinoma della mammella
<b>CA 19.9</b> <b>Antigene gastro intestinale: glicoproteina</b>	< 37 Unità/ litro	Carcinoma dello stomaco del pancreas delle vie biliari
<b>CA 125</b> <b>Glicoproteina: mucina</b>	< 51 Unità/ litro	Carcinoma ovarico
<b>CEA</b> <b>Antigene carcino-embrionario della famiglia delle globuline</b>	< 5.5 nanogrammi/l	Carcinoma del colon e del retto
<b>NSE</b> <b>Enzima: endolasi neurospecifica</b>	< 12.5 Unità/litro	Carcinoma polmonare a piccole cellule
<b>PSA</b> <b>Enzima</b> <b>Antigene prostatico specifico</b>	< 4 nanogrammi/l	Carcinoma della prostata
<b>Rapporto PSA totale e PSA libero</b>	> 15%	Carcinoma della prostata
<b>SCC</b> <b>Antigene associato a Carcinoma squamoso</b>		Carcinoma del collo dell'utero

*Tabella 1: I marcatori biologici utilizzati nella routine clinica*

Comunque, nessuno dei marcatori tumorali ad oggi conosciuti e' una prerogativa specifica del tumore, in quanto sono tutte sostanze presenti anche in assenza del tumore. Il marcatore tumorale qualitativo, cioè quello presente solo nel soggetto con tumore, attualmente non esiste e la discriminazione effettuata dal biomarcatore tra soggetto neoplastico e non neoplastico e' basata sulla definizione di un valore soglia. Questo valore dipende dalle valutazioni statistiche effettuate sulle misurazioni riferite ad un largo numero di soggetti controllo e con tumore che devono garantire una elevata sensibilità e specificità diagnostica.

Al momento, nessun marcatore tumorale ha caratteristiche di sensibilità e specificità tale da essere usato nella diagnosi precoce e/o *screening* di massa di una neoplasia. E' interessante notare che, in associazione ad altre indagini strumentali, i marcatori tumorali possono aiutare il clinico nella diagnosi differenziale tra patologia benigna e maligna. La fase nella quale i marcatori

tumorali trovano migliore applicazione e' l'identificazione precoce di recidive o metastasi nel paziente neoplastico libero da malattia.

### **1.4.1 I marcatori biologici del cancro al polmone**

Pur con le dovute cautele necessarie in un campo cosi' complesso e relativamente nuovo come quello della ricerca di marcatori biologici applicata all'oncologia, gli studi condotti in questi ultimi anni hanno individuato molti biomarcatori che risultano essere associati alle neoplasie polmonari. Purtroppo, anche se i vantaggi che si potrebbero trarre dall'uso di marcatori sensibili e specifici, non invasivi e a basso costo sono enormi, il loro utilizzo per la diagnosi del tumore al polmone o il monitoraggio della risposta ai trattamenti non e' incoraggiato dalle linee guida ufficiali a causa della mancanza di validazioni ampie e convincenti [48].

Ad oggi, non sono clinicamente disponibili biomarcatori per la diagnosi precoce della neoplasia polmonare. Sono parecchi i marcatori biologici tumorali candidati, tuttora in fase precoce di validazione clinica [49], quali ad esempio pannelli di proteine seriche o plasmatiche [50], una "signature" genica associata alle cellule epiteliali esfoliate delle vie respiratorie [51], autoanticorpi associati alla neoplasia polmonare [52], o analisi di metilazione del DNA nello sputo [53].

Risulta, quindi, interessante analizzare piu' dettagliatamente i marcatori piu' importanti relativi alle neoplasie polmonari ad oggi conosciuti.

#### **1.4.1.1 Marcatori proteici**

1) Il CEA (antigene carcino-embrionale) e' una proteina oncofetale che non e' normalmente espressa negli individui adulti. Un aumento della produzione di questa proteina nelle cellule tumorali e' stata segnalata in seguito ad una repressione del gene codificante CEA. In particolare, nel tumore del polmone la concentrazione dei livelli di CEA sembra correlare con la risposta alla terapia. Tuttavia la proteina non e' ne' specifica, ne' ha un'alta sensibilita', tanto che spesso si trovano valori di concentrazione elevati anche nei forti fumatori senza neoplasia in atto. Il CEA potrebbe essere utilizzato insieme ad altri parametri per monitorare le recidive del tumore al polmone e, se presente ad alti livelli, potrebbe essere anche predittivo di una scarsa probabilita' di sopravvivenza [54].

2) Il CYFRA 21-1 e' il frammento 21-1 della citocheratina 19, presente nelle cellule epiteliali. E' stato associato al tumore dei tessuti epiteliali, inclusi i NSCLCs a cellule squamose. La sensibilita' di questo marcatore per i NSCLCs varia tra il 23% ed il 70% [55] sebbene risulti essere elevato anche in pazienti con malattia benigna del polmone. Inoltre, CYFRA 21-1 potrebbe essere usato insieme ad altri indicatori per pronosticare e monitorare eventuali recidive [56].

3) L'SCCA (antigene del carcinoma a cellule squamose) e' una proteina citoplasmatica, la cui concentrazione puo' essere elevata non solo nel carcinoma a cellule squamose ma anche nelle malattie della pelle e nelle malattie infiammatorie del polmone. La sensibilita' per i NSCLCs varia tra il 15% ed il 55%, con sensibilita' maggiore per il carcinoma a cellule squamose. Alcune evidenze suggeriscono anche che il suo livello potrebbe essere correlato al potenziale metastatico [55].

4) L'NSE (enolasi neurone specifica) e' un enzima glicolitico prodotto dai neuroni del sistema nervoso centrale e periferico e la sua concentrazione puo' essere elevata nei tumori maligni di origine neuroendocrina, nei tumori midollari della tiroide e nel tumore del polmone a piccole cellule. Gli studi condotti hanno, pero', rilevato che puo' essere presente in molte cellule circolanti e che puo' aumentare in seguito a malattie infiammatorie. Nonostante cio', alcuni autori hanno riportato che

la sua sensibilità può superare il 74% e che elevati livelli potrebbero correlare con una ridotta sopravvivenza [57].

5) Il Pro-GRP (pro-peptide che rilascia la gastrina) è il precursore biochimico stabile e circolante nel sangue di GRP. È prodotto dai tessuti neuroendocrini del tratto gastrointestinale e respiratorio con lo scopo di stimolare il rilascio di ormoni. Un livello anomalo del Pro-GRP è stato utilizzato, anche se raramente, come possibile marcatore per il tumore al polmone a piccole cellule. Infatti, la sua sensibilità per questa neoplasia polmonare varia dal 47% all'86% [55]. Tuttavia, la sua concentrazione può aumentare anche in presenza di problemi renali o di alcune patologie benigne dei polmoni. Altri studi hanno analizzato assieme i livelli di Pro-GRP e di NSE per seguire la risposta alle terapie del tumore SCLC [58].

6) La proteina tumorale M2-PK (M2-piruvato chinasi) è una forma dimerica della piruvato chinasi sovra-espressa nelle cellule tumorali. I suoi livelli sono, però, alterati in molte malattie maligne ed anche in alcuni casi di infiammazione. La sensibilità per il cancro polmonare varia tra il 50% ed il 71% con percentuali più alte per l'adenocarcinoma [55]. Alcuni autori indicano questo marcatore come potenzialmente utile per valutare le ricadute dopo il trattamento con farmaci antitumorali.

7) La PCR (proteina C-reattiva) è aumentata in moltissime condizioni infiammatorie, incluso il cancro. Anche se non specifica per il cancro al polmone, i livelli di PCR potrebbero essere utili per una prognosi. Infatti è stato dimostrato che, misurando la concentrazione di PCR in 7017 soggetti, che sono stati poi seguiti per almeno 10 anni, alti livelli della proteina sono associati fortemente con il tumore al polmone [59]. Inoltre, mutazioni nel gene della PCR, che portano ad una diminuzione della concentrazione della proteina, sono risultate associate ad un aumentato rischio di neoplasia. Anche in un recentissimo studio [60], elevati livelli della proteina di fase acuta PCR sono risultati associati ad un aumento significativo del rischio per il tumore al polmone.

8) Il VEGF (fattore di crescita dell'endotelio vascolare) è il membro principale di una famiglia di citochine funzionalmente e strutturalmente correlate, che rivestono ruoli essenziali nell'angiogenesi, nella linfoangiogenesi e nella vasculogenesi. Il VEGF ed i suoi recettori tirosino-chinasici sono iperespressi sia nell'angiogenesi patologica (come tumori, guarigione delle ferite, infiammazione cronica) che in quella fisiologica e sono coinvolti nello sviluppo vascolare. I risultati preliminari di un recente studio hanno mostrato che le concentrazioni di VEGF sono aumentate significativamente in pazienti con NSCLC, rispetto a soggetti fumatori sani e soggetti controllo [61].

9) L'EGFR (recettore del fattore di crescita epidermico) è una proteina transmembrana glicosilata, membro della famiglia dei recettori tirosin-chinasici ErbB, coinvolta nei processi di crescita e sviluppo delle cellule tumorali e di varie neoplasie [62]. Nel NSCLC è stata osservata una sovra-espressione del recettore nel 60% dei casi, associata ad un elevato tasso metastatico, ad un aumento della progressione tumorale e ad una bassa percentuale di differenziazione [63].

10) Il livello dell'LDH (lattato deidrogenasi) può essere correlato con la progressione dei NSCLCs [55].

11) Il CA125 (antigene del cancro 125) è una glicoproteina che compare nel tessuto fetale ed è usato principalmente come marcatore del carcinoma ovarico ma può essere anche rilevato nell'adenocarcinoma e nel tumore polmonare a grandi cellule [55].



12) Le molecole di adesione delle cellule neurali sono implicate nel processo d'adesione e di aggregazione durante la metastatizzazione. Elevati livelli di queste proteine sono stati trovati nel tumore al polmone a grandi cellule [55].

13) Pannelli di marcatori proteici, che includono combinazioni di CEA, CYFRA 21-1, SCCA ed NSE, sono stati utilizzati per migliorare la sensibilità nella diagnosi del tumore al polmone rispetto ai marcatori singoli. Purtroppo, i risultati sono stati deludenti in quanto, pur guadagnando leggermente in sensibilità, si è perso drasticamente in specificità. Sono risultati, quindi, inappropriati per un efficiente *screening* su larga scala del tumore al polmone, dato l'eccessivo numero di falsi positivi che verrebbero evidenziati nella popolazione.

14) In alcuni studi vengono menzionati, come potenziali biomarcatori per il cancro al polmone, anche la Amiloide Sierica A (SAA) [64], l'aptoglobina- $\alpha$ 2 [65], un frammento dell'apolipoproteina A-1 [66] e la callicreina B1 [67].

#### **1.4.1.2 Marcatori genetici: DNA ed RNA**

1) **DNA circolante.** Le cellule apoptotiche e necrotiche sono una fonte di DNA circolante che viene rilasciato nel torrente circolatorio a seguito della rottura della membrana plasmatica. Per questo i livelli di DNA circolante nel plasma e nel siero sono generalmente più elevati nei pazienti con tumore rispetto ai controlli sani [68]. Comunque, indagini di questo tipo non sono risultate essere molto utili nell'individuazione di soggetti con elevato rischio di sviluppare tumori polmonari. Infatti si è notata un'estrema variabilità nei valori misurati nei diversi studi, non solo riguardo al tipo e la progressione della neoplasia ma specialmente alle diverse tecniche utilizzate per la misurazione del DNA [69, 70]. Risulta, quindi, difficile definire valori di concentrazione del DNA circolante che possano essere utilizzati come parametri di *routine* da utilizzare nei laboratori di diagnostica.

2) **Alterazioni genetiche.** È noto in letteratura che uno dei primi cambiamenti che avvengono nel genoma umano durante la carcinogenesi bronchiale è la perdita di materiale genetico da parte del cromosoma 3p. Dato l'interesse suscitato dal possibile utilizzo di questi cambiamenti nel genoma come marcatori diagnostici, molti lavori si sono concentrati sullo studio delle alterazioni genomiche, come l'instabilità dei microsatelliti e la perdita di eterozigotità, che possono essere individuate nel DNA circolante [71]. Ulteriori studi hanno, infatti, evidenziato che alterazioni di questo tipo possono essere individuate nel DNA circolante di circa l'88% dei pazienti con tumore al polmone [68]. Per quanto riguarda invece le mutazioni genetiche, le più comunemente studiate nel DNA circolante di soggetti con neoplasie polmonari sono quelle che coinvolgono i geni K-ras e p53. Infatti, queste mutazioni risultano essere molto comuni e sono state ben caratterizzate sia nel cancro polmonare umano che nelle pre-neoplasie. In particolare, mutazioni di K-ras sono state individuate nel 20%-30% del DNA circolante dei pazienti, mentre quelle di p53 nel 27% dei casi [72]. Inoltre, un altro studio ha rivelato mutazioni di p53 nel 41% di tumori al polmone, con la medesima mutazione identificata nel plasma del 73% dei pazienti [73]. Al momento, in letteratura, ci sono evidenze, anche se molto controverse, sul fatto che la presenza di queste mutazioni correli con una maggiore resistenza del tumore alla chemioterapia.

Inoltre, l'analisi del micronucleo è utilizzata per indicare instabilità genomica e può essere effettuata per predire il rischio di tumore sulla base del numero di errori (durante l'interfase della meiosi) che sono visibili al microscopio dopo colorazione del materiale genetico. Questo esame ha un'elevata sensibilità per le alterazioni

genetiche indotte dall'NKK (un agente cancerogeno del tabacco) e può servire per predire il rischio di tumore polmonare [74].

Infine, molti agenti cancerogeni agiscono con la formazione di addotti sul DNA mediante l'attivazione di intermedi metabolici. La determinazione della presenza di questi addotti nei tessuti potrebbe costituire un approccio per studiare e valutare il rischio di neoplasia [75].

3) **Ipermetilazione dei geni.** Il silenziamento per ipermetilazione è un sistema di regolazione comune nei geni che sono implicati nel normale funzionamento cellulare, oltre ad essere un fattore scatenante la progressione tumorale [53]. La metilazione di molti promotori di differenti geni oncosoppressori avviene in fasi precoci dello sviluppo del tumore polmonare. L'ipermetilazione di queste regioni è associata al silenziamento della trascrizione. La metilazione dei promotori è diventata un'area di ricerca molto attiva, in quanto metilazioni aberranti sia dei geni oncosoppressori APC e RASSF1 sia dei geni proapoptotici TMS1 e DAPK sono state individuate nel tumore al polmone [68]. Più recentemente, è stata individuata una metilazione aberrante nel promotore del gene oncosoppressore PRSS3 [76]. In altri studi, l'ipermetilazione dei geni oncosoppressori p16 e FHIT sembra essere associata all'aumento della probabilità di recidiva del tumore al polmone alla fine del ciclo di cura [77].

4) **Variazione dell'espressione genica.** I telomeri umani fungono da strutture protettive che stabilizzano le estremità dei cromosomi. Disfunzioni a questo livello giocano un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione tumorale. Infatti, in alcuni lavori, la componente catalitica della telomerasi umana (hTERT) è stata misurata in elevate concentrazione nel cancro polmonare [78]. Il numero delle copie di mRNA di hTERT nel siero sembra essere correlato con la fase del tumore, la metastasi e la tendenza alla recidiva e diminuisce durante la cura. La sensibilità e la specificità sono, rispettivamente, del 89% e del 73%. Inoltre, l'espressione di RAP1, un gene che aiuta a regolare la stabilità dei telomeri, è associata ad una sopravvivenza maggiore in pazienti con tumori al polmone [79].

5) **MicroRNA (miRNA).** Buona parte delle sequenze genomiche portano alla sintesi di RNA che non codificano per proteine (RNA non codificanti). Di questa classe di molecole fanno parte anche i microRNA (miRNA), piccoli RNA lunghi circa 19-25 nucleotidi. I miRNA sono coinvolti nella regolazione di molti processi biologici di fondamentale importanza e si stima che più di un terzo dei geni umani sia soggetto a questo tipo di regolazione. È oggi ormai evidente come i miRNA giochino un ruolo fondamentale anche nello sviluppo e nella progressione delle più comuni neoplasie maligne umane [80]. Specifici profili d'espressione dei miRNA sono associati ai diversi tipi di tumori, dove possono fornire indicazioni sulla loro classificazione, diagnosi, stadiazione e progressione, così come nella prognosi e nella risposta ai trattamenti. Attualmente, ogni tipo di tumore studiato mostra un profilo di espressione di miRNA caratteristico per il tumore stesso, in confronto al tessuto normale [81]. Uno studio del 2006 ha evidenziato che un'elevata espressione del mir-155 ed una bassa espressione del let-7a-2 correlano con una scarsa sopravvivenza [82]. Parecchi altri miRNA sono risultati avere un possibile valore diagnostico o prognostico. È stato dimostrato che let-7 e miR-22, con ruolo protettivo, e miR-137, miR-372, miR182, associati ad elevato rischio, possono predire la probabilità di sopravvivenza in pazienti con cancro al polmone [83] e che l'espressione del pannello miR-17-92 è fortemente aumentata nella neoplasia polmonare [84]. I risultati ottenuti da questi studi suggeriscono che, generalmente, i

miRNA con ruolo protettivo sono sotto-regolati nel tumore polmonare, mentre che quelli associati ad alto rischio sono sovra-regolati [85] e che l'espressione differenziale dei miRNA potrebbe avere un significato diagnostico e un valore prognostico. E' stata, inoltre, studiata l'utilità dei miRNA circolanti, come potenziali strumenti diagnostici non invasivi per il NSCLC [86]. Recentemente, alcuni autori hanno sviluppato e validato un protocollo diagnostico che potrebbe essere potenzialmente efficace e conveniente per la classificazione dei sottotipi istologici di neoplasia polmonare [87].

#### **1.4.1.3 Autoanticorpi**

La presenza di cellule neoplastiche può attivare il sistema immunitario ed il cancro può possedere la capacità di indurre autoimmunità su antigeni di cellule autologhe [88]. Con il termine "autoimmunità" si intende tutta quella serie di processi che un organismo compie riconoscendo come estranee proteine e/o cellule che invece sono proprie, con la successiva produzione di auto-anticorpi che causano danni a tessuti ed organi. Normalmente, le risposte autoimmuni portano a malattie anche molto gravi come, ad esempio, l'artrite reumatoide o il Lupus. Nel tumore la risposta autoimmune ha, invece, una connotazione positiva, in quanto la maggior parte degli antigeni bersaglio sono proteine cellulari la cui perdita di regolazione può avviare la tumorigenesi. Questa risposta dell'organismo al tumore offre un'opportunità di rilevare le neoplasie ai loro stadi iniziali. Numerosi antigeni autoimmuni associati al tumore sono stati identificati *in vitro* usando l'analisi di librerie d'espressione di cDNA ricombinanti di tumori umani su sieri autologhi; anticorpi per alcuni di questi antigeni sono stati individuati in pazienti affetti da tumore polmonare [89]. In particolare, uno studio prospettico in atto sta vagliando la possibilità di utilizzare l'anticorpo dell'anticiclina B1 come potenziale marcatore diagnostico e prognostico del tumore polmonare [90]. A causa, però, dell'enorme variabilità sia del sistema immunitario dei vari soggetti sia del tumore polmonare, è improbabile che un singolo antigene associato al tumore possa portare ad una diagnosi precoce efficace. In un recentissimo studio [91], sono stati utilizzati *microarray* di proteine, che hanno permesso di analizzare contemporaneamente diversi antigeni associati al tumore, allo scopo di identificare un profilo proteico distintivo dei pazienti rispetto a controlli sani.

#### **1.4.1.4 Marcatori del respiro**

1) L'esalato del respiro può rappresentare un'interessante fonte di marcatori per l'identificazione precoce di neoplasie polmonari. Infatti, alcuni composti organici volatili (COV o VOC), soprattutto molecole aromatiche ed alcani, sono prodotti ed esalati in modo preferenziale da pazienti con cancro ai polmoni.

Con la dicitura "VOC", si intendono tutta quella serie di composti organici, prodotti dalle attività umane o naturali, che si trovano allo stato di gas nelle condizioni di temperatura e pressione esistenti a livello troposferico. Possono essere semplici idrocarburi saturi o insaturi a molecola lineare e non, composte esclusivamente da carbonio e idrogeno, o molecole più complesse contenenti atomi di azoto, cloro e ossigeno, come chetoni, aldeidi, alcoli, acidi ed esteri.

Diverse ricerche hanno identificato alcuni VOC come nuovi potenziali marcatori per il cancro al polmone. In uno studio, si è dimostrato che un pannello di 22 VOC è in grado di discriminare individui con tumore polmonare, indipendentemente dallo stadio, con una sensibilità del 100% ed una specificità dell'81% [92]. In un altro, la misura combinata di 13 di questi VOC sembrerebbe permettere la corretta

classificazione dell'80% di casi di tumore al polmone [93]. In uno studio simile più recente, un profilo costituito da 9 VOC è stato in grado di identificare soggetti con tumore al polmone con una sensibilità dell'85% ed una specificità dell'80% [94].

In questi studi, l'analisi dell'esalato del respiro è stata condotta utilizzando tecniche principalmente basate sulla gas-cromatografia (GC) e sulla spettrometria di massa (MS). Nonostante queste metodologie generino l'informazione analitica più dettagliata, sono però molto dispendiose, difficili da utilizzare e producono dei risultati, complicati da interpretare. Per questi motivi, non possono essere utilizzate nelle applicazioni diagnostiche o di *screening*. Una tecnologia emergente per l'analisi del respiro è rappresentata dal naso elettronico, che si avvale di sensori elettro-chimici, in grado di reagire con particolari strutture stereochimiche di molecole, come i VOC, per fornire un pannello multidimensionale dei complessi analiti presenti nel campione biologico analizzato. Recentemente, un gruppo di ricerca israeliano, ha dimostrato la possibilità di distinguere il respiro di soggetti con tumore al polmone da quello di soggetti sani, con l'utilizzo di una particolare tecnologia basata su nanosensori dorati [95].

2) Gli studi sul condensato dell'esalato del respiro (EBC) stanno aumentando esponenzialmente ma solo pochi lavori sono incentrati sulla ricerca di potenziali biomarcatori in campioni provenienti da pazienti con neoplasia polmonare. L'EBC è un fluido che si ottiene raffreddando l'esalato a basse temperature, costituito prevalentemente da acqua ma anche da sostanze non volatili o poco volatili, espirate in forma di aerosol. Si ritiene che, durante la ventilazione, piccole gocce di fluido si stacchino dallo strato di liquido che riveste le vie respiratorie rimanendo in sospensione e venendo quindi veicolate e trasportate all'esterno dalla corrente di vapore espirata [96]. L'EBC contiene composti che riflettono il movimento biochimico polmonare in condizioni di normalità e di patologia.

Alcuni biomarcatori proteici di interesse, quali l'endotelina-1 [97], l'interleuchina-6 [98], l'interleuchina-2, la leptina ed il TNF- $\alpha$  [99], sono risultati avere livelli aumentati nell'EBC di pazienti con NSCLC rispetto ai controlli e correlazione significativa con lo stadio tumorale.

Anche nel condensato dell'esalato del respiro di individui con NSCLC sono state identificate mutazioni del gene p53 [100] e del gene K-ras [101], così come l'instabilità dei microsatelliti [102].

Tuttavia, al momento, nonostante le evidenze sperimentali dimostrino la validità dell'EBC per lo studio non-invasivo di svariate sostanze o mediatori nelle vie aeree in varie patologie polmonari o condizioni patologiche, questo approccio non ha ancora trovato spazio nella pratica clinica oncologica. Il suo futuro sembra essere riservato a nuovi campi di studio quali la proteomica, la metabolomica e la genomica.

### ***1.5 Gli approcci proteomici per la scoperta di nuovi biomarcatori***

Come si è detto, in letteratura sono già stati individuati un numero rilevante di potenziali marcatori per il tumore polmonare. Questi, però, non sono stati studiati a sufficienza o non hanno dimostrato una adeguata sensibilità e specificità diagnostica per un loro utilizzo clinico.

La proteomica è un'area emergente dell'era post-genomica e potrebbe risolvere la necessità di identificare nuovi marcatori che permettano una diagnosi realmente efficace e quindi un intervento clinico in fasi precoci dello sviluppo tumorale. La

proteomica può essere definita come la caratterizzazione su larga scala delle proteine espresse dal genoma [103] in quanto, a differenza dello studio di una singola proteina, gli approcci di studi proteomici permettono un'analisi sistematica del profilo d'espressione proteica dell'intera cellula o tessuto. La proteomica ha, infatti, portato rilevanti contributi alla comprensione della fisiopatologia delle neoplasie, alla diagnosi del cancro e alle terapie anti-tumorali [104]. Dunque, lo studio dei profili proteici delle cellule/tessuti tumorali offre la possibilità di ottenere delle informazioni sui meccanismi molecolari in atto.

Cambiamenti nelle quantità di proteina o modificazioni specifiche possono essere individuati paragonando le proteine espresse in condizioni patologiche con quelle proteine presenti in condizioni normali.

L'importanza della proteomica per la scoperta di biomarcatori delle neoplasie sta nel fatto che le proteine rappresentano lo stadio finale dell'espressione del gene e che la funzione o la disfunzione di una proteina e le vie a cui partecipa dipendono spesso dalle modificazioni post-traduzionali che non si riflettono in cambiamenti nell'espressione dell'mRNA. Inoltre, la proteomica fa uso di numerose tecniche per risolvere, quantificare, identificare, definire e caratterizzare le proteine presenti in diversi campioni biologici o clinici. Essa combina metodiche di separazione ed isolamento della proteina (elettroforesi monodimensionale e bidimensionale) con metodiche di identificazione (spettrometria di massa) ad alta risoluzione e sensibilità ed anche l'utilizzo di tecnologie che permettono la determinazione di più proteine contemporaneamente (*microarray* di proteine) [105].

I *microarray* di proteine usano sia differenti tipi di anticorpi legati individualmente ad una superficie (*microarray* diretti), sia diversi campioni di proteine/tessuti, anche in questo caso fissati ad una superficie (*microarray* inversi). I limiti di queste tecniche sono principalmente rappresentati dalla scarsa disponibilità di anticorpi in grado di riconoscere le proteine in maniera assolutamente specifica, nel caso di *microarray* inversi, o di operare il riconoscimento e legame se utilizzati in miscele, nel caso di *microarray* diretti. Tuttavia, il continuo aumento nel numero di anticorpi oggi in commercio rende via via più realizzabili le applicazioni cliniche dei *microarray* di proteine sebbene l'individuazione di proteine a bassa concentrazione continui a rimanere un problema soprattutto perché metodi di amplificazione di tutte le proteine, analoghi alla PCR (*polymerase chain reaction*) per il DNA, non sono ancora disponibili [106].

Uno dei più importanti sistemi per la separazione delle proteine è l'elettroforesi su gel, che separa le proteine in accordo al loro peso molecolare. I gel bidimensionali sono un'evoluzione delle tecniche elettroforetiche classiche che aggiungono una dimensione di separazione o risoluzione delle proteine in base al loro punto isoelettrico; questo approccio offre notevoli vantaggi nel caso di proteine con lo stesso peso molecolare. Alla fine della separazione, le singole bande o *spot* (nel caso dell'elettroforesi bidimensionale) di proteine possono essere tagliate dal gel e digerite, con uno specifico enzima, in peptidi che vengono poi analizzati tramite la spettrometria di massa. La massa di tutti i peptidi ottenuti è quindi comparata con i dati contenuti in database di proteine per la loro identificazione.

La spettrometria di massa (MS - *Mass Spectrometry*) è uno degli strumenti più importanti in proteomica. Questa tecnica analizza le proteine dopo la loro conversione in ioni gassosi, che possono quindi essere identificati in base al loro rapporto massa/carica. Le sorgenti di ionizzazione maggiormente impiegate nell'analisi proteomica sono il MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*)

e l'ESI (*ElectroSpray Ionization*). La sorgente MALDI e' utilizzata per ionizzare proteine dalla fase solida a quella gassosa, mentre l'ESI vaporizza proteine in fase liquida. Gli analizzatori di massa piu' utilizzati sono il TOF (*Time-Of-Flight*) (analizzatore a tempo di volo), la trappola ionica quadripolare, la trappola ionica lineare, l'orbitrap, l'FT-ICR (*Fourier-Transform ion cyclotron resonance*) (analizzatore a risonanza ionica ciclotronica a trasformata di Fourier). L'utilizzo combinato di medesimi o differenti analizzatori di massa consente di selezionare e frammentare gli ioni di interesse per determinarne la sequenza peptidica. Questo approccio analitico viene indicato come "spettrometria di massa tandem" o MS/MS. Le tecniche di deassorbimento e ionizzazione come il MALDI-TOF MS offrono un elevato livello di sensibilità e accuratezza nel rilevamento della massa per l'individuazione e l'identificazione delle proteine. La sensibilità e la facilità di preparazione del campione rendono questa tecnologia molto utilizzata ma non è, comunque, priva di limitazioni. Tra queste, deve essere segnalata la difficoltà di rilevare proteine più grandi di 50 kDa e di analizzare campioni molto complessi come il siero ed il plasma. Inoltre, i tipi di tecnologia MS utilizzata possono influenzare l'interpretazione dei dati ottenuti, che devono essere analizzati da operatori esperti introducendo, così, un piccolo fattore di soggettività.

Alcune di queste limitazioni sono state, in parte, superate da una evoluzione abbastanza recente degli spettrometri di massa, la SELDI (*Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization*) - TOF. Essa combina un arricchimento cromatografico su una superficie solida di un campione biologico complesso con la TOF - MS. La separazione delle proteine e l'analisi delle stesse viene eseguita con la stessa piattaforma tecnologica con l'obiettivo di permettere una rilevazione in parallelo di un elevato numero di proteine in un campione biologico.

Sono state, inoltre, sviluppate e applicate nuove tecniche che combinano la cromatografia liquida LC (*Liquid Chromatography*) con l'ESI - MS, per la separazione ed identificazione di peptici e proteine in miscele complesse. Anche la tecnologia ESI MS presenta delle limitazioni; poiché' ogni molecola all'interno del campione genera una distribuzione di ioni propria, risulta poi difficile analizzare e distinguere i segnali sovrapposti prodotti dalla miscela complessa. Tuttavia, la ionizzazione *electrospray* viene eseguita partendo da un campione in fase liquida ed un sistema di separazione in cromatografia liquida, come la cromatografia liquida ad alta prestazione HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) a fase inversa, può essere direttamente associata ad uno spettrometro di massa per la determinazione della massa proteica (LC-MS) e per l'analisi della sequenza peptidica (LC-MS/MS).

Utilizzando sistemi per il processamento automatico di campioni ed analisi bioinformatiche, queste nuove tecnologie forniscono elevate capacità analitiche con una maggiore sensibilità e potere di risoluzione ed una capacità di processamento dei campioni più veloce e sicura con una maggiore affidabilità nei risultati che si possono ottenere. L'applicazione della proteomica allo studio del tumore (oncoproteomica) offre, quindi, la capacità di accelerare il passaggio dalle scoperte di base alla pratica clinica quotidiana ed i continui miglioramenti nelle tecnologie e nelle tecniche per rilevare la quantità ed eventuali modificazioni delle proteine offrono una grande speranza per il futuro dello studio del cancro e per lo sviluppo di terapie.

## **1.6 La proteomica del plasma**

Sebbene gli studi si siano concentrati su svariati tipi di campioni biologici [107], in letteratura vige un consenso generale sul fatto che il sangue rappresenti il più importante proteoma dal punto di vista clinico. Infatti, la natura dinamica del sistema circolatorio e dei suoi costituenti, che riflettono le diverse patologie e stati fisiologici, unita alla facilità con la quale il sangue può essere prelevato anche in tempi diversi e alla possibilità di avere informazioni sul maggior numero di proteine umane [108], rendono tale campione biologico la scelta più conveniente per la ricerca di marcatori biologici. Per tali motivi, un numero crescente di lavori si è concentrato sulla ricerca di biomarcatori in derivati del sangue come il siero ed in particolare il plasma [109].

Nonostante il plasma venga considerato il campione biologico preferenziale per la ricerca di marcatori, vi sono delle importanti limitazioni associate alla sua analisi. Infatti, il plasma contiene proteine che hanno concentrazioni molto diverse; inoltre, poche proteine, come l'albumina e le immunoglobuline, costituiscono generalmente più del 90% delle proteine totali [108]. I marcatori biologici, che costituiscono meno del 1% delle proteine totali, sono normalmente a basse concentrazioni (dai ng/ml ai pg/ml). Negli ultimi anni, molti studi si sono focalizzati sulla capacità delle tecnologie proteomiche odierne di indagare in un intervallo di concentrazioni così basso.

La HUPO (*HUMAN Proteome Organization*) ha recentemente completato uno studio, condotto in collaborazione con molti laboratori, per caratterizzare il proteoma del plasma e del siero [110]. Utilizzando diverse metodologie e strumenti, sono stati analizzati campioni di un pool di plasma e siero di alcuni soggetti sani. Da una prima analisi dei dati ottenuti con le varie metodologie, sono state identificate, con un basso livello di confidenza, 3020 proteine. Per confermare le identificazioni è stato applicato un rigoroso approccio che tenesse conto della lunghezza delle regioni codificanti dei geni e dei risultati di diverse tecniche statistiche di validazione dei dati. È stato, quindi, possibile identificare, con un livello di confidenza del 95%, solo un gruppo più ristretto di 889 proteine. La concentrazione della maggior parte delle proteine identificate in questo secondo gruppo ricade nell'intervallo di concentrazione dei putativi biomarcatori selezionati in studi precedenti e, cosa fondamentale, include proteine già validate come biomarcatori (ad esempio, il CA-125 per il carcinoma all'ovaio). Questo chiaramente evidenzia la possibilità delle piattaforme tecnologiche applicate di identificare proteine a bassa concentrazione nel plasma umano.

Altri studi hanno confermato la possibilità di rilevare nel plasma proteine che derivano da vari tipi di tessuti [111] con le tecnologie attuali.

Come già detto in precedenza, la proteomica è un campo in forte espansione; ciononostante, molti problemi pratici e teorici sono ancora da risolvere, ad esempio, quelli riconducibili alla scarsa conoscenza della variabilità proteica nella popolazione umana [112]. Infatti, sono stati identificati e catalogati svariati tipi di modificazioni che possono portare ad una variazione del peso molecolare della proteina nativa, fra cui le più comuni sono le variazioni nella lunghezza della sequenza, le modificazioni delle catene laterali (fosforilazioni, sulfonazioni, ossidazioni) e le variazioni post-trascrizionali (come le glicosilazioni). Molte di queste modificazioni sono già state individuate per numerose proteine comprese

alcune delle proteine plasmatiche, fra cui l'apolipoproteina A-I [113], la proteina C reattiva [114], il fattore di crescita tipo insulina I [115] e l'amiloide serica P [114].

Uno dei primi studi per cercare di valutare la variabilità proteica nella popolazione umana è stato condotto analizzando 25 proteine del plasma in un gruppo di 96 soggetti sani [116]. I risultati dello studio hanno mostrato che 18 delle 25 proteine analizzate sono soggette a modificazioni. La modificazione più comune individuata in questo studio è stata la variazione di lunghezza della proteina a seguito d'interruzione all'ammino o al carbossi-terminale. Anche le deglicosilazioni e le ossidazioni sono risultate essere molto comuni, mentre sono state individuate solo quattro mutazioni puntiformi. Va inoltre posto l'accento sul fatto che centinaia, se non migliaia [117], di individui dovranno essere analizzati prima di poter definire un profilo proteico "normale".

### **1.6.1 La complessità delle citochine plasmatiche**

Da molti anni, parecchi studi si sono focalizzati anche sulla comprensione della complessa rete di interazioni delle citochine ma, a causa della loro estrema variabilità ed instabilità plasmatica, ad oggi, non è ancora stato possibile ottenere un'analisi completa che descriva i loro valori fisiologici.

Le citochine sono molecole proteiche prodotte da vari tipi di cellule (come macrofagi e linfociti) e secrete nel mezzo circostante, di solito in risposta ad uno stimolo, ed in grado di modificare il comportamento di altre cellule inducendone la crescita, la differenziazione e la morte. La loro azione di solito è locale ma, talvolta, hanno un effetto sistemico su tutto l'organismo. Le citochine secrete svolgono la loro attività sulla cellula che le ha prodotte (azione autocrina), su cellule adiacenti (azione paracrina) o anche su cellule che sono localizzate in distretti del corpo molto lontani (azione endocrina).

Una caratteristica di queste proteine è di avere una vita media molto breve, infatti, una volta secrete rimangono attive solo per alcuni minuti. La loro attività è bloccata da inibitori presenti nel siero/plasma mentre la loro eliminazione avviene ad opera dei reni. La rapida inattivazione delle citochine è molto importante, perché la loro presenza in eccessiva quantità all'interno dell'organismo può provocare gravi danni.

Ogni citochina agisce su cellule differenti e citochine diverse possono invece avere gli stessi effetti; in alcuni casi, l'effetto combinato di più citochine può essere maggiore dell'effetto della singola citochina ed, inoltre, una citochina può anche contrastare gli effetti di un'altra citochina.

Si può capire, quindi, come le citochine agiscano in un sistema complesso di segnali.

Sotto la denominazione "citochina" sono raggruppate sia le molecole secrete dai linfociti, sia quelle prodotte dai monociti-macrofagi, quali le *interleuchine* (IL), gli *interferoni* (IFN), i *fattori di necrosi tumorale* (TNF) e i *fattori di crescita* (GF). Alcune di queste proteine regolano la produzione di leucociti e linfociti da parte delle cellule staminali del midollo osseo e sono chiamate *fattori stimolanti le colonie midollari* (CSF). Vi è poi un gruppo di citochine che ha prevalentemente un'attività chemotattica e che per questo vengono denominate *chemochine*.

Tra le cellule dell'immunità innata, i macrofagi attivati sono grandi produttori di citochine, mentre i linfociti T helper sono i principali produttori di citochine tra le cellule dell'immunità adattativa, dove regolano l'intensità e la durata della risposta infiammatoria. Molte citochine esercitano sia effetti positivi che negativi, in base al



tipo di cellula con cui interagiscono ed in base al contesto dell'interazione. Infatti, mentre le citochine pro-infiammatorie (come IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) principalmente hanno un'azione sovra-regolatoria sulla risposta infiammatoria di fase acuta, le citochine anti-infiammatorie (come IL-4 e IL-10), in generale, hanno azione contraria, inibendo l'ulteriore produzione delle citochine pro-infiammatorie o inducendo la produzione di altri specifici inibitori [118].

La comprensione della funzione e dell'interazione tra le varie citochine e' di fondamentale importanza per chiarire la complessa rete di comunicazione cellulare. Inoltre, le citochine sono regolatori cruciali del processo infiammatorio, date le loro funzioni pro- ed anti-infiammatorie, e, per di piu', possono stimolare o inibire la crescita e la progressione tumorale (come verra' specificato in seguito) [119-121].

Per questi motivi, negli ultimi quarant'anni la ricerca e' stata fortemente interessata allo studio della rilevazione di questi mediatori solubili.

### **1.7 L'infiammazione ed il cancro al polmone**

Molte evidenze sperimentali fanno supporre che il processo infiammatorio sia in qualche modo correlato allo sviluppo neoplastico; questo concetto pu' essere fatto risalire a Virchow, che nel 1863, osservò come molte sostanze chimiche irritanti fossero associate ad un aumento della proliferazione cellulare [122]. L'infiammazione è una complessa risposta dell'ospite ad un ampio spettro di insulti o ferite, incluse le infezioni microbiche, esposizione a sostanze chimiche o particolati (come quelli presenti nel fumo del tabacco) e ferite fisiche. Una risposta di fase acuta pu' facilitare la corretta eliminazione degli agenti scatenanti e facilitare la successiva riparazione del tessuto. Al contrario, una risposta di fase acuta non controllata, scatenata dalla continua presenza degli agenti irritanti, potrebbe portare ad un'infiammazione cronica ed ad un progressivo danno ai tessuti. La scoperta che alcune infezioni croniche possono causare il cancro nel punto dell'infezione e che l'uso di antinfiammatori non steroidei pu' ridurre il rischio di alcuni tumori, ha rinnovato l'interesse nel contributo delle vie infiammatorie nelle neoplasie, in particolare quelle polmonari [123].

Secondo le conoscenze attuali, la risposta infiammatoria inizia quando i leucociti (in particolare macrofagi e neutrofili) incontrano danni ai tessuti dell'ospite o un'infezione di microorganismi. Il riconoscimento di questi agenti scatenanti da parte di una famiglia di specifici recettori dei leucociti (recettori *toll-like*), presenti sui macrofagi ed altre cellule del sistema immunitario, porta alla secrezione di molecole segnale, incluse citochine come IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e molecole più piccole come le prostaglandine. L'effetto della secrezione di queste molecole è il reclutamento e l'attivazione di altri leucociti; questi eventi iniziali formano la risposta immunitaria innata [119, 124]. L'afflusso di macrofagi e neutrofili attivati serve a limitare il danno mediante la fagocitosi delle molecole rilasciate dal tessuto danneggiato o, nel caso di infezioni, dei microorganismi. Inoltre, pu' essere anche attivata una risposta più mirata, con l'intervento di linfociti B e T (immunità cellulare). La reazione dell'organismo pu' eliminare lo stimolo infiammatorio originale, permettendo il passaggio alla fase successiva di riparazione del tessuto. Una delle ipotesi per cui il processo infiammatorio e' ritenuto facilitare lo sviluppo delle neoplasie è che specie reattive dell'ossigeno o dell'azoto, prodotte dai neutrofili attivati, possano legarsi al DNA danneggiandolo [125]; in particolare, nelle

cellule epiteliali del polmone, questo processo potrebbe essere rafforzato dai danni al DNA prodotti dai cancerogeni presenti nel fumo del tabacco. In questo scenario, l'infiammazione può essere considerata o come un fattore scatenante il cancro (inducendo il primo danno genetico nella via al cancro) o come un promotore (causando delle mutazioni successive che possano aumentare o facilitare l'effetto della prima lesione). In aggiunta, alla riparazione dei tessuti è associata una fase di proliferazione cellulare, durante la quale errori nella replicazione dei cromosomi possono portare ad una mutazione del DNA. Anche alcune citochine proinfiammatorie, come TNF- $\alpha$  e IL-6, potrebbero agire direttamente sulle cellule epiteliali aumentando l'espressione dei geni antiapoptotici attraverso la via dell'NF- $\kappa$ B [79]. Infine l'angiogenesi, il processo che porta alla formazione di nuovi vasi sanguigni, è sia un processo comune nella riparazione dei tessuti sia un aspetto cruciale della crescita tumorale. Con la creazione di situazioni che favoriscano mutazioni del DNA, proliferazione cellulare ed angiogenesi, l'infiammazione potrebbe iniziare o promuovere lo sviluppo delle neoplasie.

Quindi, questo modello teorico riesce a collegare in modo plausibile l'infiammazione polmonare con lo sviluppo del cancro [123]. Infatti il polmone è soggetto a ripetuti e spesso cronici attacchi infiammatori di cui, un esempio ovvio, è lo stimolo infiammatorio indotto dal fumo del tabacco che contiene numerose sostanze tossiche e particelle irritanti.

### **1.7.1 Il fumo di sigaretta e lo *stress* ossidativo**

Lo "*stress* ossidativo" e' l'insieme delle alterazioni che si producono nei tessuti, nelle cellule e nelle macromolecole biologiche allorché queste rimangono esposte ad un eccesso di agenti ossidanti, sia endogeni (come quelli prodotti dalle cellule infiammatorie) che esogeni (tra i quali, numerose sostanze tossiche ambientali). Un corretto bilanciamento tra sostanze ossidanti ed antiossidanti e' essenziale per tutta una serie di funzioni fisiologiche, in quanto numerose proteine coinvolte nelle catene di trasduzione intracellulare del segnale sono sensibili ad alterazioni anche lievi di tale equilibrio. Alterazioni di minore entità hanno solitamente un significato fisiologico di modulazione, mentre gli squilibri maggiori possono provocare disfunzioni, danno cellulare, apoptosi o necrosi.

Uno *stress* ossidativo, solitamente, consegue all'azione di sostanze chimiche, innanzitutto radicali liberi ma anche agenti non radicalici (come l'acqua ossigenata) e radiazioni ionizzanti. Se le difese antiossidanti della cellula non bastano per tamponare l'azione pro-ossidante, la cellula puo' allora rimanere danneggiata a vari livelli: i) sui fosfolipidi di membrana, fino alla distruzione della stessa con perdita della compartimentazione e dei trasporti selettivi; ii) sugli acidi nucleici, con accumulo di mutazioni ed alterazione dell'espressione genica; iii) sulle proteine, dove l'ossidazione dei residui di cisteina e di altri aminoacidi puo' causare alterazioni della struttura e perdita di funzione.

Lo *stress* ossidativo, causando l'ossidazione di queste macromolecole cellulari, sembra avere un importante ruolo nell'insorgenza e nella progressione del tumore polmonare, essendo in grado di determinare sia alterazioni genetiche, che epigenetiche [126, 127].

Il fumo di sigaretta esercita la sua azione cancerogena attraverso un'aumentata formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS – *Reactive Oxygen Species*) e radicali liberi [128-131]. 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 ed instabilità genomica, tutti meccanismi implicati nella cancerogenesi [132]. 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 degli acidi grassi polinsaturi, componenti delle membrane cellulari, e genera reazioni a catena [133, 134] durante le quali possono formarsi composti intermedi altamente reattivi, che possono interagire con il DNA con azione genotossica e mutagena [135].

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-KB, che regolano la trascrizione di geni coinvolti nella regolazione della proliferazione e differenziazione cellulare, nell'apoptosi e nella neoangiogenesi [126, 130, 136, 137].

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 [136, 138] 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 [138-140].

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 [141-143].

E' stato osservato che la BPCO (broncopneumopatia cronica ostruttiva), una delle più diffuse malattie infiammatorie croniche delle vie aeree, aumenta il rischio di insorgenza di tumore polmonare [144]. 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 [145].

L'infiammazione cronica porta alla creazione di un microambiente che si caratterizza per l'aumentata presenza di cellule infiammatorie, una sovrapproduzione di ROS/RNS (*Reactive Nitrogen Species* – specie reattive all'azoto), la presenza di diversi fattori di crescita, citochine, chemochine. Quindi, anche nel microambiente tumorale vi è uno stato di persistente infiammazione.

I possibili meccanismi tramite cui l'infiammazione cronica sembra contribuire alla cancerogenesi includono l'induzione di instabilità genomica, modificazioni epigenetiche, 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 dalla sovra-espressione e liberazione di chemochine, citochine, fattori di crescita, ossido nitrico e fattori di trascrizione come l'NF-kB [145-147].

### **1.7.2 La Broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)**

La broncopneumopatia cronica ostruttiva 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 del flusso aereo non completamente reversibile ed in genere progressiva, associata ad un'abnorme

risposta infiammatoria da parte dell'organismo [148]. Nell'insorgenza della BPCO è fondamentale la risposta infiammatoria ad agenti irritanti come il fumo di sigaretta (come sopraccitato) od altri inquinanti aerodispersi, con la conseguente attivazione ed il richiamo di cellule infiammatorie (macrofagi, neutrofili e linfociti T) a livello delle vie aeree e del parenchima polmonare [149]. Infatti, circa il 20% dei soggetti fumatori sviluppa la BPCO e circa il 30% dei fumatori oltre i 40 anni presenta una limitazione del flusso aereo. Anche le cellule epiteliali alveolari sono implicate nell'attivazione del processo infiammatorio, con produzione di mediatori e molecole di adesione per i neutrofili. La risposta infiammatoria iniziata in seguito all'inalazione di composti esogeni ossidanti od irritanti, viene perpetuata dal rilascio di mediatori pro-infiammatori, ossidanti endogeni ed enzimi proteolitici da parte delle cellule infiammatorie stesse, in grado di danneggiare il parenchima polmonare e di amplificare il processo infiammatorio.

Altri due processi, strettamente associati all'infiammazione, sono ritenuti importanti nella patogenesi della BPCO: lo stress ossidativo e lo squilibrio del sistema proteinasi/antiproteinasi [150, 151]. Il rilascio di ROS e di radicali liberi di origine endogena può associarsi a ossidanti esogeni nel causare un danno ossidativo a carico delle molecole biologiche 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 persistente danno infiammatorio ed 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 [152]. L'ostruzione cronica delle vie aeree, caratteristica della BPCO, è dovuta a più fattori, alcuni dei quali sono 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 [148].

Lo stato di pervietà delle vie aeree, il processo di broncocostrizione a carico dei bronchi di medio calibro, il deficit ostruttivo/restrittivo vengono monitorati attraverso l'esame spirometrico. I parametri che vengono misurati sono il CVF (capacità vitale forzata), il FEV1 (volume espiratorio forzato in 1 secondo), il FEV 25-75 (Flusso Massimo Espiratorio tra il 25%-75% della CVF). I pazienti affetti da BPCO presentano tipicamente una riduzione degli indicatori di funzionalità polmonare FEV1 e CVF e del rapporto FEV1/CVF% (indice di Tiffenau%); l'entità dell'alterazione spirometrica, in genere, correla con la gravità della BPCO. Inoltre, abbastanza recentemente, uno studio di meta-analisi ha dimostrato che una riduzione del FEV1 è strettamente associata anche al rischio di cancro al polmone [153].

## **1.8 La relazione tra infiammazione, stress ossidativo e funzionalità polmonare nei forti fumatori**

Il fumo di sigaretta, come precedentemente affermato, è uno dei più potenti agenti ossidanti e rappresenta la causa più importante nello sviluppo della BPCO. La sua azione è diretta, attraverso gli ossidanti in esso contenuti, ed indiretta, attraverso l'attivazione delle cellule epiteliali e dei macrofagi resistenti nei bronchi, nonché delle cellule immunitarie reclutate (neutrofili, monociti, linfociti ed eosinofili). I danni provocati dal fumo sono molteplici: danno epiteliale, danni a livello del DNA, riduzione della capacità antiossidante del plasma.

Oltre la BPCO, anche la bronchite cronica e l'enfisema sono tipiche manifestazioni infiammatorie patologiche polmonari dei fumatori. La BPCO consegue alla bronchite cronica e/o all'enfisema, entrambe in grado di determinare una diminuzione di calibro delle vie aeree. Tutti i componenti del sistema respiratorio subiscono, a causa del fumo, un'accelerazione del declino naturale delle loro funzioni con riduzione della FEV1 (10-20 ml/anno in meno rispetto ai non fumatori) con una netta relazione alla quantità di sigarette consumate ed alla età di inizio del fumo [154].

Risulta, quindi, interessante effettuare un'indagine più approfondita tra proteine coinvolte nel processo infiammatorio e nello stress ossidativo, che possano essere messe in relazione con la funzionalità polmonare nei forti fumatori.

### **1.8.1 Lo studio della proteina di fase acuta SAA (*Serum Amyloid A*)**

È stato recentemente dimostrato che livelli plasmatici elevati della proteina di fase acuta SAA (*Serum Amyloid A*) sono associati ad un aumentato rischio per il tumore al polmone in soggetti pre-sintomatici considerati ad alto rischio per l'elevato consumo di tabacco [155]. Negli stessi soggetti con SAA aumentata sono stati anche evidenziati livelli elevati di Proteina C Reattiva (PCR), una delle principali proteine coinvolte nella risposta infiammatoria sistemica, che in numerosi studi retrospettivi e prospettici è già stata dimostrata associata ad un aumentato rischio di neoplasia polmonare. Questi dati corroborano quanto precedentemente dimostrato in numerosi studi epidemiologici che evidenziano come l'infiammazione, associata al consumo di tabacco, sia implicata nello sviluppo del tumore polmonare [156].

La sintesi di SAA è principalmente indotta dalle citochine pro-infiammatorie IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  [157] ed essa stessa, a sua volta, ha un ruolo nella regolazione di alcune citochine. Più di un decennio fa, è stato evidenziato che l'SAA può indurre la sintesi e la secrezione da parte dei leucociti di alcune citochine ed attrarre, quindi, i leucociti nel focolaio di infiammazione [158]. Uno studio più recente ha identificato l'SAA come ligando endogeno per la stimolazione della sintesi e secrezione dell'IL-12(p40) ed ha, inoltre, dimostrato che l'SAA regola differentemente l'espressione dell'IL-12 e dell'IL-23, portando allo sviluppo di un processo di infiammazione cronica e di una malattia autoimmune [159].

La proteina SAA, in quanto proteina regolata dalla risposta infiammatoria, non può essere considerata un marcatore efficace per l'individuazione dei soggetti a rischio per la neoplasia polmonare in attività di *screening*. Numerose evidenze sperimentali suggeriscono però che la SAA può essere inclusa in un gruppo di

biomarcatori per la rivelazione di un modello di eventi fisiopatologici che possono associarsi con lo sviluppo tumorale e la risposta immune.

Riteniamo quindi che, per migliorare le potenzialità di stima del rischio individuale in processi di *screening* non invasivi mirati all'individuazione del tumore polmonare in soggetti forti fumatori, l'analisi delle proteine infiammatorie come l'SAA e la PCR debba essere affiancata all'analisi di altre proteine o altri parametri clinico-biologici. Comunque, proprio in base alle relazioni esistenti tra infiammazione, stress ossidativo e tumore polmonare, si ritiene sia ancora estremamente utile esplorare le potenzialità diagnostiche di proteine coinvolte in *pathway* che regolano i processi infiammatori o in grado di segnalare il livello di stress ossidativo.

### **1.8.2 Lo studio delle citochine**

Un ampio numero di citochine polmonari e sistemiche e' coinvolto nel processo di infiammazione cronica dei fumatori, in particolare, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-1 $\beta$  ed il TNF- $\alpha$ , sia a livello locale (nel tratto respiratorio), che a livello sistemico. Le chemochine esercitano il loro effetto sulle cellule bersaglio legandosi a specifici recettori presenti sulla superficie cellulare, nella fattispecie hanno un ruolo nel reclutamento selettivo di diversi sottotipi di cellule immunitarie. Ad esempio, l'IL-8, una citochina pro-infiammatoria attiva nei fumatori, promuove l'attività dei neutrofili attraverso i recettori CXCR1 e CXCR2. Un importante fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione dei geni infiammatori nei fumatori e' l'NF-KB, che regola i geni che codificano per l'IL-6, l'IL-8, l'MCP-1, il TNF- $\alpha$ , l'endotelina-1 e l'ICAM-1 [160]. In un ulteriore studio [161], e' stato dimostrato un aumento significativo della proporzione delle cellule T e delle cellule epiteliali esprimenti p65 (la subunita' principale di NF-KB) nei fumatori. Gli autori hanno concluso che il fumo di sigaretta e' responsabile dell'attivazione delle cellule dell'epitelio bronchiale e che tali cellule producono NF-KB [161]. Anche altri lavori [162, 163] hanno evidenziato l'attivazione di NF-KB, nei linfociti umani, indotta dal fumo di sigaretta. E' stato, inoltre, riportato che lo stress ossidativo ed il TNF- $\alpha$  promuovono il rilascio di IL-6 ed IL-8, causando un'incrementata attivazione di NF-KB [164]. La conseguente modulazione del processo di trascrizione induce un cambiamento epigenetico, quale l'acetilazione degli istoni. Tale alterazione di frammenti di DNA sembra essere associata alla regolazione della trascrizione genica nelle cellule epiteliali e alla trascrizione di geni proinfiammatori. L'acetilazione istonica e' un processo reversibile, regolato dalla istone-acetiltransferasi (HATs) e dalla istone-deacetilasi (HDAC), la presenza della quale e' stata riscontrata nei fumatori [165].

Come precedentemente accennato, l'attivazione della risposta immunitaria e del processo infiammatorio porta alla produzione di citochine in grado di stimolare o inibire la crescita e la progressione tumorale e diversi studi hanno dimostrato la loro importanza nell'influenzare il comportamento delle cellule neoplastiche, grazie alla natura pleiotropica delle loro molteplici funzioni. Le citochine principalmente implicate nella carcinogenesi sono IL-1, IL-16, IL-5, CSF, TNF- $\alpha$  e MIF (inibitore della migrazione macrofagitaria) [120, 121].

Alcuni precedenti studi hanno valutato l'associazione tra la concentrazione sistemica delle citochine ed il cancro al polmone. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 sono risultati fattori prognostici negativi per NSCLC, in quanto presenti in maggiori concentrazioni nei pazienti [166]; elevati livelli sistemici di IL-6 sono inoltre stati associati con aumentate concentrazioni di fibrinogeno in individui con stadio avanzato di carcinoma a grandi cellule e squamoso [167]; l'IL-6 e' stata anche

messa in relazione, assieme all'IL-1Ra, con le concentrazioni di PCR in pazienti con NSCLC [168]; i livelli L'IL-18 e l'sIL-2R sono stati dimostrati potenzialmente utili nella pratica clinica, in quanto i valori circolanti sono risultati piu' elevati in pazienti con NSCLC [169]; i livelli dei fattori angiogenetici IL-8 e VEGF (fattore di crescita dell'endotelio vascolare) sono risultati aumentati in pazienti con SCLC e quindi utili marcatori diagnostici, ma non predittivi o prognostici, per la sopravvivenza al tumore [170]; uno studio effettuato su una popolazione di afro-americani e caucasici con NSCLC, ha evidenziato che elevate concentrazioni di IL-6, IL-12, IL-10 e TNF- $\alpha$  sono associate a prognosi infausta [171]; aumentate concentrazioni sistemiche di IL-6 e diminuite concentrazioni di IL-2R sono risultate correlare con una risposta chemoterapica in pazienti con NSCLC avanzato, mentre aumentati livelli di TNF- $\alpha$  e diminuiti livelli di IL-1 sono risultati fattori predittivi di sopravvivenza [172].

Molti ricercatori si sono interessati a studiare le citochine come potenziali biomarcatori per uno stato patologico e come indicatori per l'intervento terapeutico ma non e' ancora stata studiata la possibilità che un pannello di citochine plasmatiche possa identificare soggetti ad elevato rischio di tumore al polmone.

Bisogna precisare che, l'analisi delle singole citochine non rappresenta bene la complessità delle loro interazioni a livello cellulare. E' necessaria la contestualizzazione del dosaggio della citochina all'interno della sua rete di interazioni con le altre citochine, per poter interpretare correttamente il dato dal punto di vista biologico.

Per questo, risulta piu' opportuno effettuare una valutazione simultanea della concentrazione delle citochine, ad esempio attraverso sistemi di analisi multipla. Parecchie tecnologie sono state sviluppate ed utilizzate per la misurazione delle citochine secrete e circolanti. La tecnica piu' comunemente impiegata e' il saggio immunologico ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), caratterizzato da elevata sensibilità e specificità analitica [173]. Sono stati poi sviluppati altri metodi 'high throughput', basati sul medesimo principio ma piu' rapidi ed automatizzati [174]. Piu' recentemente sono stati utilizzati dei sistemi a saggi immunologici multipli (come il MIA – *bead-based multiplex immunoassay* e la *xMAP™ technology* della Luminex Corporation), per la rilevazione simultanea di citochine in un singolo campione biologico [175].

### **1.8.2.1 La tecnologia "Bio-Plex Suspension Array System" per la misurazione simultanea delle citochine**

Il Bio-Plex Suspension Array System e' un sistema integrato per analisi quantitative di analiti composto da un lettore a doppio *laser* per micropiastre da 96 pozzetti e da un programma informatico di controllo ed analisi dei dati. Sfrutta la tecnologia del saggio multiplo sviluppato dalla "Luminex Corporation" (Luminex xMAP), secondo il principio della citometria a flusso, che consente di analizzare contemporaneamente decine di analiti in centinaia di campioni biologici (quali, sovranatanti di colture cellulari, siero e plasma - umano, murino o di ratto - urina, lisati di tessuti e colture tissutali, lavaggi di fluido bronco-alveolare, fluidi sinoviali e condensato dell'esalato del respiro). Questa tecnologia ad alta sensibilità puo' impiegare fino a 100 insiemi di diverse microsfere di polistirene (del diametro di 5,6  $\mu$ m). Ogni *set* di microsfere e' marcato all'interno dalla combinazione di due fluorofori, a spettro di emissione distinto, in rapporti variabili e ciascun fluoroforo puo' avere uno dei 10 possibili livelli di fluorescenza, generando così una famiglia di 100 combinazioni di microsfere. Questo permette, grazie alla separazione delle singole microsfere e alla loro

attivazione da parte di un *laser* di “locazione”, di distinguere le diverse microsfere dopo che queste siano state miscelate assieme e aggiunte ad un singolo campione. Le microsfere diversamente marcate sono previamente coniugate, grazie a semplici reazioni chimiche covalenti stabili, a proteine, peptici, anticorpi, DNA, aptameri o anche interi microrganismi virali o microbici. Per l’analisi delle citochine le microsfere sono coniugate ad anticorpi monoclonali specifici per una determinata citochina bersaglio. Il saggio multiplo consente di creare gruppi di microsfere accoppiate a diversi anticorpi consentendo così di analizzare contemporaneamente diverse proteine in un singolo campione; esistono, infatti, sia gruppi di microsfere associate ad anticorpi preordinati (*plex* preconfezionati), oppure assemblati sulla base di specifiche esigenze (*custom plex*). Le microsfere coniugate vengono fatte reagire in micropiastra con il campione ed un anticorpo secondario (*detection antibody*), secondo le dinamiche di un saggio immunologico. Questi anticorpi secondari sono opportunamente marcati con un terzo fluoroforo (solitamente, ficoeritrina, PE), dalle proprietà spettrali differenti rispetto a quelle dei due utilizzati per l’identificazione della biglia, eccitato da un secondo *laser* del sistema.

Il saggio viene condotto in un lettore che eccita e legge le biglie, che passano in singola fila attraverso un sistema di rilevazione ottico-elettronico, costituito da un capillare di quarzo, per la lettura delle microsfere, e da due canali *laser*. Quando il diodo nella lunghezza d’onda del rosso (635nm) eccita una biglia (“*Classify channel*”), questa viene identificata dal software di analisi relativamente al bersaglio verso il quale è diretto l’anticorpo che vi è coniugato (definita “regione” della biglia). In questo modo è possibile distinguere i diversi saggi combinati all’interno di un singolo campione. In simultanea, la biglia viene eccitata da un laser nella lunghezza d’onda del verde (532nm) (“*Reporter channel*”) idonea alla rilevazione del segnale della ficoeritrina coniugata all’anticorpo secondario. La quantità di segnale nel verde è proporzionale alla quantità di antigene catturata dall’anticorpo secondario.

Lo strumento è interfacciato con un computer ed i risultati quantitativi forniti dai saggi vengono interpretati dal programma *Bio-Plex Manager*. È, inoltre, fornito di un’esclusiva micropiastra (*MCV plate*), completamente gestita dal *software*, in grado di automatizzare completamente tutte le funzioni di manutenzione, calibrazione e validazione dello strumento stesso, nonché di tutte le funzioni di accensione e di spegnimento. I sistemi per la calibrazione (*Calibration kit*) e per la validazione (*Validation kit*), utilizzabili con l’*MCV plate*, sono in grado di effettuare analisi di controllo approfondito per tutti i parametri strumentali. Sono permesse due modalità operative di calibrazione e validazione: alta sensibilità (*high sensitivity*), per la rilevazione di molecole a basso peso molecolare, e bassa sensibilità (*low sensitivity*), per le molecole ad elevato peso molecolare. Il *Bio-Plex Manager software* è in grado di gestire tutte le operazioni strumentali, di allestire la disposizione grafica dei pozzetti sulla micropiastra (*standard*, campioni, eventuali controlli,...) e di effettuare l’analisi dei dati calcolando le curve di taratura con differenti tipi di regressioni logistiche (a 5 parametri lineare – 5PL, a 4 parametri lineare – 4PL, lineare, *Cubic Spline* e *Point to Point*), escludendo dal calcolo della curva eventuali punti/valori anomali, definiti “*outliers*”. Il programma consente l’analisi completa dei dati, indicando per ogni pozzetto la deviazione standard, il coefficiente di variazione (%CV), il valore di *recovery* sugli standard (ed eventualmente sui controlli positivi), il numero totale di microsfere lette, la



percentuale di aggregati presenti ed il numero di microsfere singole correttamente riconosciute.

### **1.8.2.2 I vantaggi della tecnologia Bio-Plex**

Il saggio immunologico in sospensione presenta vantaggi notevoli, anche rispetto a quelli classici basati sul legame di proteine su un supporto solido (*array* bidimensionali, come i *microarray* di proteine).

1) Il saggio Bio-Plex si sviluppa in una piccola quantità di volume (generalmente 50  $\mu$ l totali) che permette di analizzare decine di analiti in quantità minime di campione. Ad esempio, un saggio confezionato da 15 analiti diversi costituiti da 500 microsfere ciascuno occupa un volume di circa 10  $\mu$ l, implicando che il campione da analizzare avrà un volume originario dell'ordine delle poche decine di  $\mu$ l, dopo diluizione. Questo è un aspetto molto significativo per analisi di campioni particolarmente preziosi, difficili da reperire o utilizzabili per più metodologie sperimentali.

2) L'analisi della fluorescenza intrinseca della singola biglia di fatto rende la determinazione della fluorescenza media in un singolo campione equivalente a centinaia di determinazioni effettuate mediante saggi alternativi, ad esempio l'ELISA. Questo conferisce un'accuratezza elevata alla misura, che è estremamente quantitativa se comparata agli *array* bidimensionali – generalmente, semiquantitativi e in grado di evidenziare differenze minime in diverse campioni.

3) L'alta capacità legante delle microsfere, accoppiata all'alta sensibilità del parametro di quantificazione (fluorescenza), garantisce un vasto *range* dinamico (da 2 a 200000 pg/ml di antigene). Questo fa sì che raramente la diluizione del campione ignoto si accompagna a valori localizzati al di fuori della curva di calibrazione. Inoltre permette di quantificare in parallelo, nello stesso campione, analiti presenti in concentrazioni molto elevate e molto basse, pur effettuando una medesima diluizione.

### **1.8.3 Lo studio della Paraossidasi 1 (PON1)**

Abbiamo spiegato sopra che lo stress ossidativo, causando l'ossidazione di alcune macromolecole cellulari, sembra avere un importante ruolo nell'insorgenza e nella progressione del tumore polmonare.

La Paraossidasi1 (PON1) è una glicoproteina  $Ca^{2+}$ -dipendente con attività antiossidante; circola nel plasma associata alle lipoproteine ad alta densità (HDL) ed è in grado di prevenire la perossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL), contrastando il processo aterosclerotico.

È un enzima polimorfico, inizialmente caratterizzato come organofosfato idrolisi, il cui nome deriva da uno dei suoi substrati più comunemente utilizzati, il *paraoxon*.

Il gene PON1, codificante per questa proteina, appartiene ad una famiglia multigenica che comprende altri due geni, PON2 e PON3, localizzati sul braccio lungo del cromosoma 7. Questi geni presentano il 70% di omologia e sembra derivino da processi di duplicazione genica a partire da un unico precursore. Tuttavia, mentre PON1 e PON3 sono espressi prevalentemente nel fegato, PON2 è invece espresso ubiquitariamente ed il suo prodotto proteico non si trova in associazione alle HDL ma è legato alle membrane cellulari. Inoltre, mentre PON1 e PON3 esercitano un'attività antiossidante nel siero, l'attività di PON2 sembra essere quella di proteggere i tessuti dallo stress ossidativo intracellulare.

Come spiegato in precedenza, lo stress ossidativo e' generalmente determinato dal rapporto fra le specie reattive dell'ossigeno (o ROS); l'attività enzimatica della PON1 sembra partecipare all'eliminazione dei ROS.

Diversi studi hanno messo in relazione variazioni della concentrazione e dell'attività di PON1 con malattie cardiovascolari ed aterosclerosi; bassi livelli della proteina sembrano, infatti, essere associati ad un grado piu' avanzato di malattia coronaria. Inoltre, una diminuzione dell'attività enzimatica e' stata osservata in soggetti affetti da diabete mellito ed ipercolesterolemia familiare, patologie predisponenti all'aterosclerosi ed in soggetti affetti da malattie epatiche croniche ed artrite reumatoide.

In un recente studio su pazienti con diabete mellito, e' stato dimostrato che ad una bassa attività della PON1 corrisponde una PCR piu' elevata, indipendentemente dallo stato diabetico. La bassa attività della proteina puo' contribuire ad un incremento del rischio cardiovascolare attraverso un incremento dell'infiammazione sistemica, in quanto normalmente la PON1 inibisce la risposta pro-infiammatoria verso i lipidi ossidati, limitando l'interazione macrofago-endotelio [176].

Per quanto riguarda una possibile associazione tra alterazioni di PON1 e cancro, i dati sono ancora scarsi, sebbene, come precedentemente affermato, lo stress ossidativo abbia un ruolo importante nella patogenesi tumorale.

Sono stati effettuati parecchi studi sui polimorfismi del gene PON1 (Glu192Arg, Met55Leu, Ile102Val), che sono stati posti in relazione ad aumentato rischio per alcune neoplasie, quali linfoma non-Hodgkin [177, 178], cancro alla prostata [179] e alla mammella [180].

In pazienti con tumore gastrico e' stata osservata una diminuzione dei livelli sistemici di HDL e di PON1, rispetto ai soggetti sani di controllo, suggerendo un possibile ruolo di PON1 come fattore predittivo di rischio [181]. Uno studio analogo e' stato condotto su pazienti con tumore pancreatico portando alle medesime conclusioni [182].

In considerazione del ruolo che lo stress ossidativo ha nella patogenesi del cancro al polmone e del ruolo che ha il fumo di sigaretta sia nel promuovere lo stress ossidativo che nell'incrementare il rischio di neoplasia, risulta comprensibile che, studiando gli effetti del fumo in una popolazione di forti fumatori e non fumatori, si sia rilevata una diminuzione significativa dell'attività della PON1 [183]. L'attività della PON1 sembra essere significativamente ridotta in pazienti con carcinoma polmonare rispetto ai controlli sani, anche se tale riduzione, in questo studio, non sembrerebbe attribuibile al fumo di sigaretta [184]. Anche in un altro lavoro non si osservano variazioni significative tra fumatori moderati e non fumatori [185].

Data la conflittualità dei dati disponibili, risulta quindi auspicabile effettuare un'analisi delle concentrazioni plasmatiche della PON1 in una popolazione di forti fumatori e analizzarne l'associazione con le proteine dell'infiammazione, ovviamente nell'eventualità di utilizzare questa proteina come un altro marcatore di rischio per la neoplasia polmonare.

#### **1.8.4 L'indicatore della funzionalità polmonare FEV1**

La relazione tra fumo di sigaretta, cancro al polmone e ostruzione delle vie aeree e' stata ben caratterizzata [186]. Tuttavia, rimane da chiarire se il grado di ostruzione possa costituire un fattore di rischio per lo sviluppo della neoplasia polmonare, indipendentemente dal tabagismo [187].

Diversi studi hanno dimostrato che l'ostruzione delle vie aeree, identificate da una riduzione della FEV1, incrementa il rischio di tumore al polmone [188-190]. In particolare, l'ostruzione del flusso aereo può essere considerata come marcatore surrogato dell'esposizione carcinogenica delle vie respiratorie al fumo di sigaretta. E' quindi ragionevole indagare sulla possibilità che la predisposizione individuale al cancro polmonare, così come le caratteristiche patologiche e cliniche che insorgono nei fumatori, differiscano conformemente al grado di insufficienza respiratoria [191-193].

In un recentissimo studio, delineato con l'obiettivo di individuare uno specifico gruppo di soggetti ad elevato rischio di tumore al polmone sulla base della loro compromissione funzionale polmonare, è stato dimostrato che anche una riduzione relativamente scarsa della FEV1 è un fattore predittivo significativo dell'aumento del rischio per la neoplasia [194].

Nonostante l'esposizione al fumo sia un fondamentale prerequisito per il cancro al polmone, il suo contributo alla variazione della FEV1 è modesto [195]. Sembra quindi accettabile considerare la FEV1 come un marcatore di "susceptibilità" potenzialmente utile, piuttosto che l'intensità dell'esposizione al fumo di sigaretta. Infatti, i danni polmonari apportati dal fumo sono dovuti a effetti combinati tra una risposta infiammatoria molto prolungata e/o riparazione aberrante del danno ed il coinvolgimento del processo infiammatorio è ben supportato in diversi studi prospettici e dimostrato dalla stretta correlazione tra l'innalzamento dei marcatori d'infiammazione (PCR e IL-6) e la diminuzione della FEV1 [196].

Risulta quindi di fondamentale interesse mettere in relazione la FEV1 con i livelli delle proteine coinvolte in processi infiammatori od ossidativi.

### **1.9 L'analisi del condensato dell'esalato respiratorio**

Il condensato dell'esalato respiratorio (EBC – *exhaled breath condensate*), come accennato in precedenza, è un fluido costituito dalla condensazione del liquido di rivestimento epiteliale dei polmoni, caratterizzato dalle sostanze volatili presenti nel vapore acqueo di cui è saturata l'aria espirata.

L'analisi dell'EBC risulta particolarmente adatta per lo studio dei fenomeni fisiopatologici a livello polmonare, in quanto riflette in composizione quella del fluido di rivestimento extracellulare del polmone. Valutando la sua composizione, è possibile, quindi, monitorare lo stato infiammatorio/ossidativo polmonare [197, 198].

La raccolta dell'EBC 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'aria espirata (o esalato respiratorio) in condensato. La quantità di materiale ottenuto 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 EBC ottenibile e di conseguenza avere un effetto anche sui livelli dei mediatori [199]. Di recente, sono state pubblicate Linee Guida e raccomandazioni [200] che rendono più standardizzata la raccolta e, quindi, più facile la comparazione fra campioni di centri diversi.

La procedura di raccolta 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.

Esistono vari tipi di strumentazioni per la raccolta dell'EBC [201], inclusi il TURBO-DECCS (*Transportable Unit for Research on Biomarkers Obtained from Disposable Exhaled Condensate Collection*) e l'R-TUBE, che, avendo dimensioni contenute, sono facilmente trasportabili e permettono di effettuare la raccolta dei campioni biologici direttamente al letto dei pazienti o addirittura a domicilio.

Il condensato dell'esalato respiratorio 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 si instaurano nel corso di patologie dell'apparato respiratorio; iii) utilizzare gli indicatori valutati nell'EBC come biomarcatori esalati di patologie respiratorie, quali il cancro al polmone [200]. Nell'EBC sono determinabili vari tipi di molecole e biomarcatori [197, 198, 200, 201], tra cui:

1) Perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ): è il prodotto della dismutazione spontanea o enzimatica (ad opera della superossido dismutasi) dell'anione superossido  $O_2^-$  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'  $H_2O_2$  avviene principalmente per azione dell'enzima catalasi che a livello delle vie aeree è presente a basse concentrazioni; l' $H_2O_2$  esalata può essere interpretata come indice biologico di stress ossidativo nei polmoni.

2) Eicosanoidi: derivano dall'acido arachidonico rilasciato dai fosfolipidi di membrana ad opera di fosfolipasi: la ciclo-ossigenasi porta alla produzione di 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  $PGF_2$  e  $TXA_2$  hanno azione broncocostrittiva,  $PGE_2$  è un vasodilatatore,  $LTC_4$  e  $LTD_4$  aumentano la permeabilità vascolare, la produzione di muco e inducono broncospasmo. In particolare,  $LTB_4$  è un fattore chemiotattico per i neutrofili polimorfonucleati e li attiva intensificando il rilascio di enzimi lisosomiali e metaboliti reattivi dell'ossigeno.

3) 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 nell'uomo è l'8-isoprostano e rappresenta un indicatore di stress ossidativo.

4) 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). 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'espirsto.

5) Proteine e citochine: diverse citochine sono state determinate nell'EBC, anche se i livelli sono generalmente molto bassi e di poco superiori al limite di rilevanza, il che richiede metodologie molto sensibili per le analisi. Fra le citochine più

studiate ritroviamo IL-4 e IFN- $\gamma$ , ed in più sono state misurate anche IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-10.

6) Nitrati, nitriti, nitrosotioili e nitrotirosine: l'ossido nitrico (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 glutatione per formare S-nitrosotioili. La valutazione nell'EBC 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.

7) 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 [202].

L'EBC 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 [197, 203-205].

Sono stati effettuati degli studi sull'esposizione, sia cronica che acuta, al fumo di sigaretta, che risulta avere degli effetti considerevoli sulla misurazione dei livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, isoprostani, nitriti, nitrotirosine nell'EBC. In soggetti sani, il fumo di sigaretta causa l'innalzamento dei valori delle concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 8-isoprostano e nitrotirosine e dell'attività chemotattica dei neutrofili, mentre rimangono invariate le concentrazioni di IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ . Sono necessari comunque ulteriori studi riguardo ad altri mediatori nell'EBC dei soggetti forti fumatori, quali analisi multiple di citochine, metaboliti (come LTB-4), proteine polmone-specifiche (come la proteina del surfactante, SP-C). L'unica attuale limitazione nella misurazione degli analiti nell'EBC è la bassa concentrazione di alcune molecole, per questo è molto importante utilizzare delle tecnologie ad elevata sensibilità, incluse quelle di proteomica.

L'analisi del condensato dell'esalato respiratorio non è limitata solamente al monitoraggio del paziente o alla comprensione dei meccanismi fisiopatologici delle malattie polmonari, può essere anche un approccio utile per lo *screening* di individui sani per una potenziale diagnosi precoce di danni al tessuto polmonare e/o alle vie aeree.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 I pazienti arruolati nello studio

La maggior parte dei i campioni biologici utilizzati in questo progetto (422 campioni di plasma e 24 campioni di condensato dell'esalato respiratorio) sono stati raccolti presso l'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano e afferiscono al progetto MILD e 18 campioni di EBC sono stati raccolti da pazienti con neoplasia polmonare ricoverati in Istituto.

Il comitato etico interno all'Istituto ha approvato il protocollo di raccolta ed ognuno dei soggetti in esame ha firmato un consenso informato.

#### 2.1.1 I campioni di plasma

Il nostro gruppo ha recentemente pubblicato un lavoro che ha dimostrato, tramite l'utilizzo della piattaforma proteomica SELDI-TOF, che elevate concentrazioni plasmatiche della proteina SAA, in una popolazione di soggetti forti fumatori, sono associate ad aumentato rischio di tumore al polmone. Dei 422 plasmi analizzati, infatti, 76 (18%) hanno mostrato avere spettri ad elevata intensità di SAA (SAA alta: > 0.5  $\mu$ A), mentre i rimanenti 346 erano caratterizzati da intensità di SAA normali (SAA bassa: < 0.5  $\mu$ A) [155].

In una prima fase del progetto, e' stato effettuato uno studio su 142 campioni di plasma, di cui 74 provenienti da soggetti con SAA alta e 68 con SAA normale (Tab. 2). In 11 soggetti, 8 con SAA alte e 3 con SAA normale, si e' riscontrata la presenza di un tumore polmonare durante il primo *screening* effettuato con TAC spirale.

GRUPPI	n° soggetti	SESSO		ETA'	FUMO			
		femmine	maschi		fumatori	ex fumatori	sigarette/ die	anni di fumo
SAA normale (< 0.5 intensita' SELDI)	68	29	39	(range) 49-59	51	17	(range) 8-50	(range) 15-50
				(media) 57			(media) 23.6	(media) 37
				(moda) 57			(moda) 20	(moda) 40
SAA alta (≥ 0.5 intensita' SELDI)	74	18	56	(range) 49-75	50	24	(range) 10-60	(range) 20-60
				(media) 59			(media) 24.1	(media) 35.2
				(moda) 57			(moda) 20	(moda) 40

Tabella 2: Schema delle caratteristiche dei 142 soggetti classificati in accordo alla assenza o presenza di un livello elevato della proteina SAA

In una seconda fase, la casistica e' stata ampliata a circa 400 plasmi, di cui 16 corrispondenti a soggetti con tumore al polmone.

### **2.1.2 I campioni di condensato dell'esalato del respiro**

Lo studio proteomico sul condensato dell'esalato respiratorio e' stato condotto su 24 soggetti forti fumatori arruolati nel progetto MILD e 18 pazienti con tumore al polmone ricoverati in Istituto.

### **2.2 Il processamento del plasma dai prelievi ematici**

- Sono stati prelevati 30 mL di sangue periferico in presenza di 300 µL di anticoagulante (EDTA 0.5 M in soluzione acquosa a pH 8) e trasferiti in un provettone da 50 mL (Falcon).
- Il sangue e' stato centrifugato a 2500 rpm per 10 minuti.
- Il surnatante, contenente il plasma (almeno 10 mL), e' stato prelevato e trasferito in una provetta Falcon da 15 mL.
- Il plasma e' stato ulteriormente centrifugato a 2500 rpm per 10 minuti.
- Il surnatante (almeno 9 mL) e' stato aliquotato in 9 provette per la crioconservazione (Nalgene).
- Le aliquote sono state subito trasferite in scatole da congelamento (CryoBox-Nalgene) e poste a -80°C (congelatori Agelantoni Polar 340 V) in apposite colonne per stoccaggio scatole (Vertical CryoBox Rack-Nalgene).

### **2.3 La raccolta e la preparazione del condensato dell'esalato respiratorio**

L'EBC e' stato raccolto utilizzando il condensatore TURBO-DECCS (TD) (ItalChill, Italia), di piccole dimensioni e di facile trasporto.

L'apparato e' equipaggiato con un sistema interno di refrigerazione, che controlla termostaticamente la temperatura, con un dispositivo di respirazione monouso, costituito da un boccaglio collegato ad una valvola di aspirazione a senso unico, e con un provettone all'estremità per la raccolta dell'EBC.

Ai soggetti reclutati nello studio e' stato richiesto di respirare normalmente per 10 minuti attraverso il boccaglio e l'EBC raccolto per condensazione (in media 1,5/2 mL per individuo) e' stato centrifugato per 1 minuto a 1500 rpm. Sono state quindi preparate delle aliquote, che sono state congelate immediatamente a -80°C.

La raccolta dell'EBC e' stata effettuata anche con il TURBO-DECCS con tubo modificato, in particolare portato da 14 cm a 7 cm (TD<sup>1/2</sup>).

### **2.4 La misurazione delle citochine plasmatiche**

Per la quantificazione delle citochine plasmatiche abbiamo applicato una strategia multiparametrica, la tecnologia ultra sensibile "*Bio-Plex Suspension Array System*" (Bio-Rad, US).

Sono stati utilizzati i kit della Bio-Rad "*Bio-Plex cytokine multiplex assay panel or single-plex assay*" (che includono le microsferi coniugate, il *detection antibody* e gli *standard* liofilizzati per la quantificazione delle specifiche citochine di interesse), con associati i relativi "*Bio-Plex Cytokine Reagent kit*" (che include l'*assay buffer*, il *wash buffer*, il diluente per il *detection antibody*, la streptavidina-PE, la piastra da 96 pozzetti) e "*Bio-Plex Diluent kit*" (che contiene il diluente per il campione di plasma ed il diluente per gli *standard*).

In una prima fase di analisi sono stati utilizzati due kit che ci hanno permesso di misurare in simultanea 27 e 23 citochine, rispettivamente (Tab. 3):

- *Bio-Plex Premixed Human Group I Cytokine 27-plex Panel*: IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, Basic FGF (bFGF), Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES, TNF- $\alpha$ , VEGF.
- *Bio-Plex Premixed Human Group II Cytokine 23-plex Panel*: IL-1 $\alpha$ , IL-2R $\alpha$ , IL-3, IL-12(p40), IL-16, IL-18, CTACK, GRO- $\alpha$ , HGF, ICAM-1, IFN- $\alpha$ 2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG,  $\beta$ -NGF, SCF, SCGF- $\beta$ , SDF-1 $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TRAIL, VCAM-1.

<b>INTERLEUCHINE</b>	<b>CHEMOCHINE</b>	<b>FATTORI PRO/ANTIANGIOGENICI</b>
IL-1 $\alpha$	MCP-1	VEGF
IL-1 $\beta$	MCP-3	FGF-basic
IL-1 $\alpha$	MIP-1 $\alpha$	HGF
IL-2	MIP-1 $\beta$	PDGF-bb
IL-2R $\alpha$	RANTES	<b>ADESIONE/INFIAMMAZIONE</b>
IL-3	MIG	IFN- $\gamma$
IL-4	Eotaxin	IFN- $\alpha$ 2
IL-5	IP-10	TNF- $\alpha$
IL-6	SDF-1 $\alpha$	TNF- $\beta$
IL-7	GRO- $\alpha$	TRAIL
IL-8	CTACK	MIF
IL-9	<b>FATTORI DI CRESCITA</b>	LIF
IL-10	GM-CSF	ICAM-1
IL-12(p40)	G-CSF	<b>FUNZIONE/DANNO ENDOTELIALE</b>
IL-12(p70)	M-CSF	VCAM-1
IL-13	SCGF	
IL-15	SCF	
IL-16	$\beta$ -NGF	
IL-17		
IL-18		

*Tabella 3: Classificazione funzionale delle 50 citochine in analisi*

In una seconda fase dello studio, sono stati utilizzati altri due kit (*custom plex*) che ci hanno consentito di dosare simultaneamente 5 citochine (5-plex) e una singola citochina (*single-plex*), rispettivamente:



- *Bio-Plex Pro Assay 5-plex custom*: SCGF- $\beta$ , CTACK, MIF, MIG, IL-6.
- *Bio-Plex Pro Assay single-plex*: Eotaxin

In una terza fase dello studio, e' stato utilizzato un kit *Bio-Plex Pro Assay single-plex* per la misurazione della citochina SCGF- $\beta$ .

I kit commerciali *Bio-Plex Cytokine Assay* e *Bio-Plex Pro Assays* sono stati utilizzati in accordo con il protocollo del produttore, e' stata pero' modificata la diluizione seriale dello standard:

- I campioni di plasma sono stati diluiti 1:4 con apposito *sample diluent*.
- I *premixed standard* liofilizzati sono stati ricostituiti con 500  $\mu$ L di *sample diluent*, agitati per 2-3 secondi su vortex ed incubati a 4°C per 30 minuti.
- Sono state effettuate le diluizioni seriali dello standard secondo la lettura laser a bassa sensibilità creando una curva di calibrazione a più ampio spettro per i bassi pesi molecolari e aggiungendo 2 punti bassi alla curva (da S1 - più concentrato - a S10), ad eccezione del *single-plex* per SCGF- $\beta$ , per cui sono stati utilizzati 8 punti di standard (sa S1 a S8).
- Sono state preparate le microsfere coniugate, per diluizione con *assay buffer* ed in assenza di luce.
- La piastra e' stata prelavata con 100  $\mu$ L di *assay buffer* per pozzetto ed il liquido e' stato rimosso tramite filtrazione a vuoto.
- Sono stati aggiunti 50  $\mu$ L di microsfere coniugate per pozzetto.
- La piastra e' stata lavata per 2 volte con 100  $\mu$ L di *wash buffer* per pozzetto (il liquido e' stato sempre rimosso per filtrazione a vuoto).
- Sono stati aggiunti 50  $\mu$ L di standard (da S1 a S8/S10) e di campione di plasma in ciascun pozzetto e la piastra e' stata incubata a temperatura ambiente (TA) per 30 minuti in agitazione.
- Durante l'incubazione e' stato preparato il *detection antibody* con il diluente apposito.
- Sono stati effettuati 3 lavaggi con 100  $\mu$ L di *wash buffer* per pozzetto.
- Sono stati aggiunti 25  $\mu$ L di *detection antibody* per pozzetto e la piastra e' stata incubata a TA per 30 minuti con agitazione.
- Durante l'incubazione e' stata preparata la *streptavidin-PE*, diluendola con *assay buffer*.
- Sono stati effettuati 3 lavaggi con 100  $\mu$ L di *wash buffer* per pozzetto.
- Sono stati aggiunti 50  $\mu$ L di *streptavidin-PE* per pozzetto e la piastra e' stata incubata a TA per 10 minuti in agitazione.
- Sono stati effettuati 3 lavaggi con 100  $\mu$ L di *wash buffer* per pozzetto.
- Sono stati infine aggiunti 125  $\mu$ L di *assay buffer* per pozzetto, la piastra e' stata agitata vigorosamente per 30 secondi (per far risospendere le biglie) ed e' stata inserita nello strumento per la lettura laser.
- E' stata effettuata sia la lettura ad alta che a bassa sensibilità. Le impostazioni del *Bio-Plex Manager software 4.1* (Bio-Rad, U) sono state le seguenti:
  - *Data acquisition*: 50 microsfere per regione.
  - *Bead map*: 100 regioni.
  - *Sample size*: 50  $\mu$ L.
  - *DD gate values*: 5000 (low) e 25000 (high).
- Alla fine della lettura da parte dello strumento, sono state ottimizzate le curve di calibrazione per ogni citochina in analisi, andando ad eliminare manualmente i

punti degli *standard out of range* (*OOR*< o *OOR*>), quelli stimati, e quelli al di fuori del range di accettabilità 70-130%, (calcolato secondo la formula: (Obs/Exp) \* 100).

- Le concentrazioni delle citochine sono state automaticamente calcolate dal programma *Bio-Plex Manager software 4.1* (Bio-Rad, U).

#### **2.4.1 L'analisi statistica multivariata dei dati: la PCA**

La struttura di correlazione tra le 50 citochine e' stata inizialmente valutata utilizzando l'analisi delle componenti principali (PCA, *Principal Component Analysis*) [206].

La PCA e' stata utilizzata per ridurre il numero delle variabili, ovvero per creare un gruppo piu' piccolo di citochine, rispetto alle 50 analizzate), con la minima perdita di informazione. Il nuovo gruppo di variabili, chiamato componente, e' caratterizzato dalle stesse informazioni contenute nelle misurazioni originali. Maggiore e' il livello di correlazione tra le citochine, tanto minore e' il numero delle componenti necessarie per spiegare la struttura di correlazione. Ogni componente puo' correlare sia positivamente che negativamente con ognuna delle citochine, consentendo in tal modo la sua interpretazione.

Le prime componenti principali sono state utilizzate per generare una rappresentazione bi-dimensionale del profilo di correlazione. In particolare, ogni citochina e' rappresentata da una linea che parte da un punto di origine; gli angoli formati dalle varie linee (o frecce) sono proporzionali alla correlazione tra le citochine stesse. Le citochine che correlano negativamente sono caratterizzate da frecce che puntano in direzione opposta, mentre quelle che correlano positivamente da frecce tracciate nella stessa direzione.

La varianza espressa dalle prime due componenti principali e' stata utilizzata per valutare la quantità di informazione mantenuta nell'analisi. Nella rappresentazione grafica sono stati anche inseriti i campioni/soggetti in base al loro profilo di citochine, producendo in tal modo il cosiddetto grafico Biplot. Infatti, il Biplot consente di visualizzare simultaneamente sia le citochine che i soggetti in studio.

L'analisi *unsupervised* effettuata attraverso il Biplot e' stata utilizzata per selezionare le citochine maggiormente informative.

### **2.5 La misurazione dei livelli plasmatici della SAA**

Le concentrazioni della SAA nei campioni di plasma sono state misurate (in doppio) utilizzando un kit ELISA commerciale ("*Human SAA CytoSet™*", 10 plate format, Invitrogen, US) in accordo con il protocollo suggerito dal produttore:

- Sono state preparate le soluzioni di *wash buffer* e *assay buffer* 1M con acqua ultrapura (Milli-Q, Millipore, US).
- Lo standard liofilizzato e' stato ricostituito con 1.9 mL di *assay buffer* ed e' stato aliquotato in provette e conservato a -80°C, per il progressivo utilizzo delle 10 piastre contenute nel kit.
- Il *Coating Antibody* e' stato diluito 1:1000 con *Coating Buffer B* e ne sono stati aggiunti 100 µL per pozzetto.
- La piastra da 96 pozzetti e' stata incubata a 4°C O/N (overnight).
- Il liquido e' stato aspirato dalla piastra e sono stati effettuati 2 lavaggi con 200 µL di *wash buffer* per pozzetto, utilizzando un processo automatizzato (Biomek

2000 Robot, Beckman, US), facendo attenzione a rimuovere completamente tutto il liquido dalla piastra.

- Sono stati aggiunti 200  $\mu\text{L}$  di *assay buffer* per pozzetto per effettuare la saturazione dei siti di legame aspecifici (*blocking*) e la piastra e' stata incubata a TA per 1 ora.
- Durante l'incubazione, sono state effettuate le diluizioni seriali dello standard ricostituito (da S1: 300 ng/mL a S6: 9.4 ng/mL) ed i campioni sono stati diluiti 1:300 con *assay buffer*.
- Il liquido e' stato aspirato dalla piastra ma non sono stati effettuati i lavaggi.
- Sono stati aggiunti 100  $\mu\text{L}$  di campione/pozzetto e lo standard e la piastra e' stata incubata a TA per 2 ore in agitazione.
- Il liquido e' stato aspirato dalla piastra e sono stati effettuati 7 lavaggi con 200  $\mu\text{L}$  di *wash buffer* per pozzetto.
- Il *detection antibody* e' stato diluito 1:1000 con *assay buffer* e ne sono stati aggiunti 100  $\mu\text{L}$  per pozzetto.
- La piastra e' stata incubata a TA per 1 ora.
- Il liquido e' stato aspirato dalla piastra e sono stati effettuati 7 lavaggi con 200  $\mu\text{L}$  di *wash buffer* per pozzetto.
- La *streptavidin-HRP* e' stata diluita 1:4000 con *assay buffer* e ne sono stati aggiunti 100  $\mu\text{L}$  per pozzetto.
- La piastra e' stata incubata a TA per 30 minuti.
- Il liquido e' stato aspirato dalla piastra e sono stati effettuati 7 lavaggi con 200  $\mu\text{L}$  di *wash buffer* per pozzetto.
- Sono stati aggiunti 100  $\mu\text{L}$  per pozzetto di *TMB substrate* e la piastra e' stata incubata a TA per 20 minuti, al buio, fino al termine dello sviluppo della reazione colorimetrica.
- Sono stati aggiunti 100  $\mu\text{L}$  di *stop solution* per pozzetto.
- L'assorbanza e' stata misurata alla lunghezza d'onda di 450 nm con lo spettrofotometro *iMark Microplate reader* (BIORAD, US).
- Le concentrazioni dei campioni sono state estrapolate dai valori delle assorbanze utilizzando una scala log-log o una curva a 4 parametri logistici (4PL).

## **2.6 La misurazione dei livelli plasmatici della PON1**

### **2.6.1 Gel monodimensionale e trasferimento**

I campioni sono stati preparati con il seguente protocollo:

- per ogni campione di plasma in analisi sono state effettuate diluizioni 1:10 e ne sono stati poi utilizzati due volumi differenti: 2.5  $\mu\text{L}$  e 5  $\mu\text{L}$ .
- la PON1 ricombinante (*Recombinant Human Paraoxonase-1*, PROSPEC, US), utilizzata come standard per la quantificazione della proteina nei campioni, e' stata preparata per ottenere le quantita' di 50 ng (PON1 50 ng) e 100 ng (PON1 100 ng).
- In provette da 1.5 mL sono stati aggiunti:
  - 2.5  $\mu\text{L}$  di plasma diluito 1:10, 5  $\mu\text{L}$  di *NuPAGE LDS Sample Buffer* (4X) (Invitrogen), 2  $\mu\text{L}$  di *NuPAGE Reducing Agent* (10X) (Invitrogen, US) e 10.5  $\mu\text{L}$  di SDS bollente (5% SDS -125 mM Tris-HCL pH 6.8);

- 5 µL di plasma diluito 1:10, 5 µl di *NuPAGE LDS Sample Buffer* (4X) (Invitrogen, US), 2 µl di *NuPAGE Reducing Agent* (10X) (Invitrogen, US) e 8 µl di SDS bollente (5% SDS -125 mM Tris-HCL pH 6.8);
  - 2 µL di PON1 50 ng, 5 µl di *NuPAGE LDS Sample Buffer* (4X) (Invitrogen, US), 2 µl di *NuPAGE Reducing Agent* (10X) (Invitrogen, US) e 11 µl di SDS bollente (5% SDS-125 mM Tris-HCL pH 6.8);
  - 4 µL di PON1 100 ng, 5 µl di *NuPAGE LDS Sample Buffer* (4X) (Invitrogen, US), 2 µl di *NuPAGE Reducing Agent* (10X) (Invitrogen, US) e 9 µl di SDS bollente (5% SDS-125 mM Tris-HCL pH 6.8);
  - i campioni sono stati incubati a 70 °C per 10 minuti;
- Il marker è stato preparato con il seguente protocollo: in una microprovetta da 1.5 ml sono stati aggiunti 8 µl di *SeeBlue Plus2 Prestained Standard* (1X) (Invitrogen, US) e 12 µl di SDS bollente.

La corsa nella cella elettroforetica del gel è stata eseguita in accordo con il protocollo suggerito dal produttore:

- sono state assemblate le varie componenti della cella elettroforetica (Invitrogen, US);
- e' stato inserito il *gel pre-casted NuPAGE 4-12% Bis-Tris 1mmx10 well* (Invitrogen, US) nell'opportuna ubicazione all'interno della cella elettroforetica;
- la camera interna e' stata riempita con *NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 1X* (Invitrogen, US) fino all'orlo superiore e sono stati aggiunti 500 µl di *NuPAGE Antioxidant* (Invitrogen, US);
- sono stati caricati 20 µl di campione e di marker nei pozzetti;
- alla camera esterna e' stato aggiunto del *NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 1X* fino ad arrivare ad un livello di un paio di centimetri;
- sulla camera di corsa e' stato applicato l'apposito coperchio ed e' stato effettuato il collegamento degli elettrodi nelle apposite connessioni dell'*Electrophoresis Power Supply EPS601* (GE Healthcare, UK);
- le condizioni di corsa del gel sono state impostate ad un voltaggio fisso di 100 V.

Il trasferimento del gel è stato eseguito utilizzando il sistema di *trasferimento XCell II* (Invitrogen, US), specifico per i *gel precasted NuPAGE*, senza nessuna variazione al protocollo consigliato dal produttore. E' stata utilizzata una membrana di nitrocellulosa (GE Healthcare, UK) ed il trasferimento è stato operato a 30 V costanti per 1 ora e 30 minuti.

## 2.6.2 Western blot con anticorpo specifico

- La membrana e' stata saturata con latte al 5% in soluzione di TBS (tris 20 mM, NaCl 0,13 M pH 7.6) - Tween 0.1% per 1 ora a TA in agitazione.
- E' stato aggiunto l'anticorpo primario *Mouse monoclonal [17A12] to PON1* (Abcam, UK) diluito 1:500 in latte al 5% ed il filtro e' stato incubato O/N a 4 °C.
- Il filtro e' stato lavato con la soluzione di TBS – Tween 0.1% per 5 minuti in agitazione a TA. L'operazione e' stata eseguita per altre due volte.
- E' stato aggiunto l'anticorpo secondario diluito 1:4000 in soluzione in latte al 5% per 1ora in agitazione a TA.
- Il filtro e' stato lavato con la soluzione di TBS – Tween 0.1% per 10 minuti in agitazione a TA. L'operazione e' stata eseguita per altre due volte.

### 2.6.3 Sviluppo del filtro tramite ChemiDoc e quantificazione delle bande

Lo sviluppo del filtro è stato eseguito utilizzando il sistema *ECL Immuno-Star HRP Peroxide Buffer* e *Immun-Star HRP Luminol/Enhancer* (BIORAD, US) in accordo con il protocollo suggerito dal produttore.

Il segnale è stato ottenuto utilizzando lo strumento *ChemiDoc XRS* (BIORAD, US) in accordo con il protocollo suggerito dal produttore, con le seguenti specifiche per l'acquisizione di un'immagine ottimizzata:

- *Chemi Hi Sensitivity*;
- *Live Acquire* (15 minuti di esposizione con l'acquisizione di 5 immagini consecutive);

La quantificazione delle bande è stata effettuata mediante il programma *Quantity one* (BIORAD, US). In breve, per ogni filtro (contenete PON1 50 ng, PON1 100 ng e 3 campioni di plasma, per ciascuno dei quali sono stati caricati su gel 0.25 µL e 0.5 µL) sono state visualizzate e selezionate le bande relative alla PON1 50 ng, alla PON1 100 ng ed alla PON1 presente nei campioni di plasma. Il software, tramite il confronto volumetrico delle bande, ha attribuito la quantità di PON1 presente in ogni campione, avendo PON1 50 ng e PON1 100 ng come standard di riferimento.

### 2.6.4 Il dosaggio della PON1 con saggio ELISA

- Le concentrazioni della PON1 nei campioni di plasma sono state misurate (in doppio) utilizzando un protocollo tradizionale per ELISA, ottimizzato e standardizzato secondo le nostre procedure sperimentali:
- Anticorpi utilizzati:
  - *Capture antibody*:PON-5-10D (BML, Giappone) (2.5 µg/mL).
  - *Detection antibody*:PON-4C-1 Biotinylated (BML, Giappone) (0.5 µg/mL).
- Standard utilizzato: Paraoxonase-1 ricombinante (Prospec, US), diluizioni seriali da S1, 600 ng/mL, a S6, 18.75 ng/mL.
- *Buffer* utilizzati:
  - *Coating buffer*: PBS 1X (Lonza, Svizzera)
  - *Blocking buffer*: latte (Sigma Aldrich, US) al 5% in PBS 1X e 0.05% Tween20 (Sigma Aldrich, US).
  - *Diluent buffer* per i campioni e lo standard: PBS 1X + 0.1% Chaps (Bio-Rad, US).
  - *Diluent buffer* per il *detection antibody*: latte al 2% in PBS 1X + 0.02% Tween20)
  - *Wash buffer*: PBS 1X + 0.1% Tween20
- Reagenti utilizzati:
  - *Streptavidin-HRP* (Biolegend, US): diluita 1:2500 in *wash buffer*.
  - *TMB Substrate Reagent Set* (Biolegend, US): Reagente A + Reagente B (diluizione 1:1).
  - *Stop solution*: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, US).
- Protocollo:
  - Sono stati aggiunti 100 µL, per pozzetto, di *capture antibody* diluito in *coating buffer* e la piastra è stata incubata a 4°C O/N.
  - Sono stati effettuati 2 lavaggi con 200 µL di *wash buffer* per pozzetto.
  - Sono stati aggiunti 200 µL di *blocking buffer* per pozzetto e la piastra è stata

incubata a TA per 2 ore.

- Il *blocking buffer* e' stato rimosso e sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di campione, diluito 1:2500, e di standard nei rispettivi pozzetti e la piastra e' stata incubata a TA per 2 ore.
- Sono stati effettuati 5 lavaggi con 200  $\mu$ L di *wash buffer* per pozzetto.
- Sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di *detection antibody* per pozzetto e la piastra e' stata incubata a TA per 2 ore.
- Sono stati effettuati 5 lavaggi con 200  $\mu$ L di *wash buffer* per pozzetto.
- Sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di *streptavidin-HRP* per pozzetto e la piastra e' stata incubata a TA per 1 ora.
- Sono stati effettuati 5 lavaggi con 200  $\mu$ L di *wash buffer* per pozzetto.
- Sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di *TMB substrate* per pozzetto e la piastra e' stata incubata a TA per 15 minuti, al buio.
- Sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di *stop solution* per pozzetto.
- L'assorbanza e' stata misurata a alla lunghezza d'onda di 450 nm con lo spettrofotometro *iMark Microplate reader* (BIORAD, US).

## **2.7 L'analisi del condensato dell'esalato respiratorio**

Per delineare un profilo di proteine e metaboliti presenti all'interno dei campioni di EBC, sono state utilizzate la piattaforma SELDI-TOF, la piattaforma n-LC-MS/MS (*nanoflow liquid chromatography tandem mass spectrometry*) (descrizione ed identificazione proteica), la tecnologia BIO-PLEX (Milliplex MAP, per il profilo citochinico), le tecniche immunoenzimatiche ELISA (per la misurazione della proteina surfattante C - SP-C) ed EIA (per la quantificazione dei metaboliti leucotriene B4 - LTB-4 ed 8-Isoprostano).

### **2.7.1 L'applicazione della piattaforma SELDI-TOF**

Per ogni campione di EBC, 200  $\mu$ L sono stati concentrati con una *SPD1010 SpeedVac System* (ThermoSavant, US), al fine di ottenere un volume finale di 10  $\mu$ L.

I campioni sono stati quindi processati con *NP20 Proteinchip Array* (Bio-Rad, US) (*biochip*), in accordo con il protocollo suggerito dal produttore:

- Le superfici cromatografiche (*spot*) del biochip sono state attivate con 5  $\mu$ L di acqua ultrapura e sono state lasciate ad asciugare a TA.
- Sono stati caricati 5  $\mu$ L di campione e sono stati lasciati ad asciugare a TA; quindi e' stata ripetuta l'operazione con i rimanenti 5  $\mu$ L.
- Ad ogni spot sono stati applicati 0.5  $\mu$ L di una soluzione satura d'acido sinapinico (Bio-Rad, US) in una miscela composta dal 50% di acetonitrile in acqua contenente lo 0.5% di acido trifluoroacetico in soluzione acquosa. Il biochip e' stato fatto asciugare a TA. L'operazione e' stata ripetuta.

I biochip sono stati analizzati utilizzando il *Proteinchip Reader PCS 4000 Enterprise* (Bio-Rad, US), con il software *Proteinchip version 3.2* (Bio-Rad, US), in accordo con i suggerimenti del produttore. Lo strumento e' stato calibrato esternamente utilizzando uno standard di riferimento per i bassi pesi molecolari e gli spettri sono stati generati nell'intervallo di 1000-20000 m/z (massa/carica).

## 2.7.2 L'applicazione della tecnologia n-LC-MS/MS

Per ogni campione di EBC, 200  $\mu\text{L}$  sono stati concentrati con una *SPD1010 SpeedVac System* (ThermoSavant, US), al fine di ottenere un volume finale di 10  $\mu\text{L}$ , e successivamente desalinizzati utilizzando delle *Stage Tips C18* (Proxeon Biosystem, Danimarca), secondo il protocollo suggerito dal produttore.

- Digestione proteica: i campioni desalinizzati sono stati digeriti in soluzione per successive analisi in spettrometria di massa con Orbitrap. Ai campioni sono stati aggiunti 2,5  $\mu\text{L}$  di DTT 10 mM diluito in una soluzione contenente Tris HCl 50 mM pH 8, SDS 0.1% e sono stati incubati per 30 minuti a 56°C in un termociclatore. In seguito i campioni sono stati incubati per 20 minuti al buio a TA con Iodoacetamide 100 mM diluita in una soluzione di Ammonio bicarbonato 100 mM. Infine i campioni sono stati incubati per 60 minuti a 37°C con 2  $\mu\text{L}$  di una soluzione 1:20 w/w di tripsina porcina modificata (Promega) diluita in Ammonio Bicarbonato 20 mM. Al termine della digestione, i campioni sono stati conservati a -80°C.

I campioni digeriti sono stati analizzati con la piattaforma *n-LC-Orbitrap* presso il servizio di spettrometria di massa dell'Ospedale S. Raffaele (Segrate):

- 5  $\mu\text{L}$  di ciascun campione di digerito triptico sono stati caricati su un sistema di cromatografia capillare (*EasyLC* - Proxeon Biosystem, Danimarca).
- La separazione dei peptidi in fase inversa è stata ottenuta utilizzando una colonnina di silicio di 12 cm (75  $\mu\text{m}$  i.d. x 15cm) impaccata con la resina 3- $\mu\text{m}$  ReproSil 100° C18 (Dr. Maisch GmbH, Germania). La separazione è stata ottenuta utilizzando un gradiente discontinuo degli eluenti A (ddW + 2% v/v Acetonitrile (ACN), 0,1% v/v Acido Formico) e B (ACN + 2% v/v ddW, 0,1% v/v Acido Formico) partendo dal 4% di B fino al 30% di B in 90 minuti e dal 30% di B al 55% di B in 10 minuti (velocità di flusso 0.2  $\mu\text{L}/\text{minuto}$ ).
- Il sistema di cromatografia liquida è stato connesso allo spettrometro di massa LTQ Orbitrap (ThermoScientific, US) equipaggiato con una sorgente *nanoellettrospray* (Proxeon Biosystem, Danimarca).
- Lo spettro completo delle masse è stato acquisito con la risoluzione di 60000.
- Per una misurazione accurata della massa lo strumento è stata utilizzata la modalità *lock-mass*.
- L'intervallo di acquisizione utilizzato è stato impostato su un rapporto *m/z* da 350 a 1700 Da per ciascun campione.
- I picchi a carica doppia e tripla più abbondanti sono stati selezionati automaticamente e frammentati nella trappola ionica dopo accumulo fino ad un valore di 10000.
- Tutti gli spettri MS/MS sono stati analizzati con *Mascot search engine* (Versione 2.2.06, Matrix science, UK) e *X! Tandem* (versione 2007.01.01.1). La ricerca con X! Tandem e Mascot è stata eseguita nel *database* IPI\_human\_20091021 (86379 sequenza totali).
- Per l'analisi *LTQ Orbitrap* la tolleranza sulla massa è stata settata a 5ppm e 0.6 Da per precursori e frammenti rispettivamente.
- L'identificazione dei peptidi e delle proteine tramite l'analisi MS/MS è stata validata utilizzando *Scaffold* (versione Scaffold\_2\_06\_00, Proteome Software Inc., US).
- La soglia per l'identificazione delle proteine è stata impostata al 99% e almeno due peptidi come minimo, mentre per i peptidi al 95%. La carbamilazione delle

cisteine è stata posta come fissa, mentre l'ossidazione delle metionine come modifica variabile.

### 2.7.3 La misurazione delle citochine tramite la tecnologia Bio-Plex

La concentrazione delle citochine nei campioni di EBC e' stata determinata (in doppio) con il *Bio-Plex Protein Array System* (Bio-Rad, US). E' stato utilizzato il kit commerciale *Milliplex xMAP 14-plex Cytokine kit* (Millipore, US), che ha consentito la quantificazione simultanea delle seguenti 14 citochine: GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, MCP-1 e TNF- $\alpha$ . Il kit e' stato utilizzato in accordo con il protocollo suggerito dal produttore.

- Preparazione dei reagenti utilizzati:
  - *Antibody-Immobilized Beads*: le microsferi coniugate agli anticorpi specifici sono state sonicate ed agitate su vortex prima del loro utilizzo.
  - *Quality Control*: i controlli 1 e 2 liofilizzati sono stati ricostituiti con 250  $\mu$ L di acqua ultrapura, quindi miscelati ed agitati su vortex e lasciati a TA per 10 minuti.
  - *Wash Buffer*: il *wash buffer* 10X e' stato diluito in 270 mL di acqua ultrapura.
  - *Human Cytokine Standard*: lo standard liofilizzato e' stato ricostituito con 250  $\mu$ L di acqua ultrapura, ottenendo una concentrazione (S1) di 10000 pg/mL per tutti gli analiti. Lo standard e' stato miscelato ed agitato su vortex e lasciato a TA per 10 minuti. Le diluizioni seriali sono state effettuate con *assay buffer* (da S2, 2000 pg/mL, a S6, 3.2 pg/mL).
- Protocollo:
  - Sono stati aggiunti 200  $\mu$ L di *assay buffer* per pozzetto, la piastra e stata messa in agitazione a TA per 10 minuti ed il liquido e' stato rimosso tramite filtrazione a vuoto.
  - Nei pozzetti relativi allo standard, ai controlli ed al *background* (bianco) sono stati aggiunti rispettivamente 25  $\mu$ L di standard, controllo 1, controllo 2 ed *assay buffer* e 25  $\mu$ L di acqua ultrapura (come *matrix solution*).
  - Nei pozzetti relativi ai campioni, sono stati aggiunti 25  $\mu$ L di *assay buffer* e 25  $\mu$ L di campioni di EBC, precedentemente portati a secco con una SPD1010 SpeedVac System (ThermoSavant, US) e risospesi in 25  $\mu$ L di acqua ultrapura.
  - Sono stati aggiunti 25  $\mu$ L di *Antibody-Immobilized Beads* per pozzetto.
  - La piastra e' stata incubata a 4°C o/N, in agitazione.
  - Sono stati effettuati 2 lavaggi con 200  $\mu$ L di *wash buffer* per pozzetto ed il liquido e' stato rimosso tramite filtrazione a vuoto.
  - Sono stati aggiunti 25  $\mu$ L di *detection antibody* per pozzetto e la piastra e' stata incubata a TA per 1 ora, in agitazione.
  - Senza rimuovere il liquido, sono stati aggiunti 25  $\mu$ L di *streptavidin-PE* per pozzetto e la piastra e' stata incubata a TA per 30 minuti, in agitazione.
  - Sono stati effettuati 2 lavaggi con 200  $\mu$ L di *wash buffer* per pozzetto ed il liquido e' stato rimosso tramite filtrazione a vuoto.
  - Sono stati aggiunti 150  $\mu$ L di *Sheath Fluid* per pozzetto e la piastra e' stata messa in agitazione per 5 minuti, al fine di risospendere le microsferi.
  - E' stata effettuata la lettura a bassa sensibilità e le impostazioni del *Bio-Plex Manager software 4.1* (Bio-Rad, U) sono state le seguenti:
    - Data acquisition*: 50 microsferi per regione.
    - Bead map*: 100 regioni.



*Sample size:* 50 µL.

*DD gate values:* 5000 (low) e 25000 (high).

- Le curve standard ottenute sono state ottimizzate eliminando i punti degli *standard out of range* (*OOR*< o *OOR*>), quelli stimati, e quelli al di fuori del range di accettabilità 70-130%, (calcolato secondo la formula:  $(\text{Obs}/\text{Exp}) * 100$ ).
- Le concentrazioni delle citochine sono state automaticamente calcolate dal programma *Bio-Plex Manager software 4.1* (Bio-Rad, U).

#### **2.7.4 La misurazione della proteina SP-C**

La concentrazione della proteina surfattante C (SP-C) nei campioni di EBC e' stata valutata (in doppio) utilizzando il kit commerciale *Human Pulmonary Surfactant-Associated Protein C (SP-C) ELISA kit* (Cusabio Biotech Co., US), in accordo con il protocollo suggerito dal produttore:

- I pozzetti della piastra fornita dal kit sono stati pre-coniugati ad un anticorpo specifico per SP-C.
- Sono stati aggiunti 100 µL di ciascun campione di EBC e di proteina ricombinante standard diluita serialmente (da S1, 300 ng/mL, a S9, 2.35 ng/mL), negli relativi pozzetti.
- La piastra e' stata incubata a 37°C per 2 ore.
- Il liquido e' stato aspirato dalla piastra senza effettuazione di lavaggi.
- Sono stati aggiunti 100 µL di *Biotin-antibody* per pozzetto e la piastra e' stata incubata a 37°C per 1 ora.
- Il liquido e' stato aspirato dalla piastra e sono stati effettuati 3 lavaggi con 200 µL di *wash buffer* per pozzetto.
- Sono stati aggiunti 100 µL di *HRP-avidin* per pozzetto e la piastra e' stata incubata a 37°C per 1 ora.
- Il liquido e' stato aspirato dalla piastra e sono stati effettuati 3 lavaggi con 200 µL di *wash buffer* per pozzetto.
- Sono stati aggiunti 90 µL di *TMB substrate* per pozzetto e la piastra e' stata incubata a 37°C per 30 minuti, al buio.
- Sono stati aggiunti 50 µL di *Stop solution* per pozzetto, miscelando fino ad ottenere una colorazione uniforme.
- L'assorbanza e' stata misurata alla lunghezza d'onda di 450 nm con lo spettrofotometro *iMark Microplate reader* (BIORAD, US)
- Le concentrazioni dei campioni sono state estrapolate dai valori delle assorbanze utilizzando una scala log-log o una curva a 4 parametri logistici (4PL).

#### **2.7.5 La misurazione dei metaboliti 8-isoprostano ed LTB4**

La concentrazione dell'8-isoprostano e dell'LTB-4 e' stata quantificata mediante saggi competitivi EIA (Enzime Immunoassay), utilizzando i kit commerciali *8-isoprostane EIA kit* (Cayman Chemical Company, US) e *LTB4 Parameter Assay* (R&D Systems, US), rispettivamente, in accordo con il protocollo suggerito dal produttore.

*8-isoprostane EIA kit:*

- I pozzetti della piastra fornita dal kit sono stati pre-coniugati ad un anticorpo monoclonale di *mouse anti-rabbit*.

- Sono stati aggiunti:
  - 100  $\mu$ L di *EIA buffer* nei pozzetti relativi a NSB (*non specific binding*);
  - 50  $\mu$ L di *EIA buffer* nei 3 pozzetti relativi a B<sub>0</sub> (*maximum binding*);
  - 50  $\mu$ L di *8-isoprostane EIA standard* (diluito serialmente da S1, 500 pg/mL, a S8, 0.8 pg/mL), negli relativi pozzetti;
  - 50  $\mu$ L di campioni di EBC, precedentemente concentrati, a partire da 200  $\mu$ L, con una SPD1010 SpeedVac System (ThermoSavant, US), negli relativi pozzetti;
  - 50  $\mu$ L di *8-isoprostane AChE tracer*, ad ogni pozzetto, ad esclusione di TA (*total activity*) e Blank;
  - 50  $\mu$ L di *8-isoprostane EIA rabbit antiserum*, ad ogni pozzetto, ad esclusione di TA, Blank e NSB.
- La piastra e' stata incubata a 4°C O/N.
- Sono stati effettuati 5 lavaggi con 200  $\mu$ L di *whash buffer*.
- Sono stati aggiunti 200  $\mu$ L di *Ellman's reagent* per ogni pozzetto.
- Sono stati aggiunti 5  $\mu$ L di *8-isoprostane AChE tracer* al pozzetto dedicato a TA.
- La piastra e' stata incubata a TA per 90 minuti, in agitazione al buio, per lo sviluppo colorimetrico.
- L'assorbanza e' stata misurata alla lunghezza d'onda di 412 nm con lo spettrofotometro *iMark Microplate reader* (BIORAD, US) ed e' stata controllata periodicamente fino al raggiungimento di B<sub>0</sub>=0.3 A.U. (sottratto del bianco), nell'intervallo 0.3-1 A.U..
- L'intensita' del colore e' spiegata dalla seguente relazione:  
Assorbanza  $\propto$  [8-isoprostane Tracer legato]  $\propto$  1/[8-isoprostane del campione].
- Le concentrazioni dei campioni sono state estrapolate dai valori delle assorbanze utilizzando una scala log-log o una curva a 4 parametri logistici (4PL) ed un *Data analysis tool* scaricato dal sito della Cayman ([www.caymannchem.com/analysis/eia](http://www.caymannchem.com/analysis/eia)).

#### LTB-4 Parameter Assay:

- I pozzetti della piastra fornita dal kit sono stati pre-coniugati ad un anticorpo di *rabbit anti-chicken*.
- Sono stati aggiunti:
  - 100  $\mu$ L di *Calibrator Diluent RD5-52* nei pozzetti relativi a NSB e Blank;
  - 50  $\mu$ L di *Calibrator Diluent RD5-52* nei pozzetti relativi a B<sub>0</sub>;
  - 50  $\mu$ L di *LTB-4 standard* (diluito serialmente da S1, 2500 pg/mL, a S6, 10.3 pg/mL), negli relativi pozzetti;
  - 50  $\mu$ L di campioni di EBC, precedentemente concentrati, a partire da 200  $\mu$ L, con una SPD1010 SpeedVac System (ThermoSavant, US), negli relativi pozzetti;
  - 50  $\mu$ L di *Primary Antibody Solution* (anticorpo policlonale di *chicken*), ad ogni pozzetto, ad esclusione di NSB, TA e B<sub>0</sub>.
- La piastra e' stata incubata a TA per 3 ore, in agitazione.
- Senza effettuare i lavaggi, sono stati aggiunti 50  $\mu$ L di *LTB-4 Conjugate* ad ogni pozzetto, ad esclusione di TA e Blank.
- La piastra e' stata incubata a TA per 3 ore.
- Sono stati effettuati 4 lavaggi con 400  $\mu$ L di *wash buffer* per pozzetto.
- Sono stati aggiunti 200  $\mu$ L di *Substrate Solution* per pozzetto e 5  $\mu$ L di *LTB-4 Conjugate* nel pozzetto TA.

- La piastra e' stata incubata a TA per 30 minuti, al buio.
- Sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di *Stop Solution* per pozzetto.
- L'assorbanza e' stata misurata alla lunghezza d'onda di 450 nm con lo spettrofotometro *iMark Microplate reader* (BIORAD, US)
- Le concentrazioni dei campioni sono state estrapolate dai valori delle assorbanze utilizzando una scala log-log o una curva a 4 parametri logistici (4PL), con il sussidio del programma di analisi utilizzato per l'analisi dell'8-isoprostano.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 La relazione tra le concentrazioni plasmatiche di SAA, delle citochine, della PON1 e FEV1

Abbiamo precedentemente detto che la proteina SAA in quanto proteina regolata dalla risposta infiammatoria non può essere considerata un marcatore specifico per l'individuazione dei soggetti a rischio per la neoplasia polmonare. Numerose evidenze sperimentali suggeriscono però che la SAA può essere inclusa in un gruppo di biomarcatori per la rivelazione di eventi fisiopatologici che possono associarsi con lo sviluppo tumorale e la risposta immune.

##### 3.1.1 La relazione tra le concentrazioni plasmatiche di SAA e FEV1

Per individuare più efficacemente, nel contesto della popolazione MILD, il sottogruppo di individui ad elevato rischio di tumore al polmone abbiamo ritenuto importante esplorare la relazione esistente tra i livelli di SAA plasmatica e i valori di funzionalità respiratoria, in particolare il volume di espirazione forzata in un secondo (FEV1), calcolato mediante esame spirometrico. Infatti abbiamo ipotizzato che una riduzione della funzionalità polmonare possa essere associata ad una condizione subclinica di infiammazione sistemica. Sono stati così analizzati statisticamente i dati relativi a 422 soggetti alla *baseline*. L'analisi ha evidenziato una correlazione inversa, statisticamente significativa ( $r = -1.6$ ), tra i due parametri, ad indicare come ad un aumento dei livelli di SAA corrisponda una diminuzione della FEV1% (espressa come percentuale del valore predetto FEV1) e quindi della funzionalità polmonare (Fig. 1). Tuttavia la rilevanza clinica di questa relazione deve essere ulteriormente indagata, al fine di poter determinare se la diminuzione stessa dei livelli plasmatici di SAA possa rallentare la riduzione del FEV1.

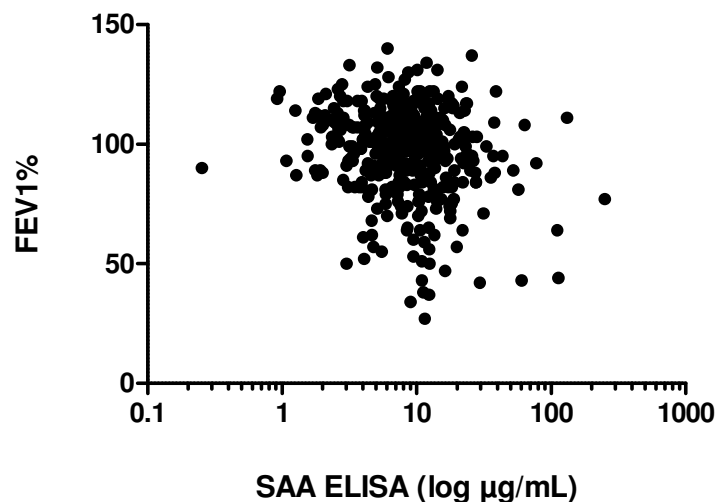


Figura 1: Rappresentazione grafica, ottenuta con software GraphPad, della correlazione inversa (Spearman correlation) tra le concentrazioni plasmatiche di SAA ed i valori di FEV1%

### 3.1.2 L'estrapolazione del pannello di citochine

Come detto in precedenza, l'attivazione della risposta immunitaria infiammatoria porta alla produzione di citochine che possono sia stimolare che inibire la crescita e la progressione neoplastica. In particolare si è visto che la sintesi di SAA e' principalmente indotta dalle citochine pro-infiammatorie IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  ed essa stessa, a sua volta, ha un ruolo nella regolazione di alcune citochine. Ci siamo quindi proposti di misurare gruppi di citochine, chemochine e fattori di crescita, per identificare putativi nuovi biomarcatori di rischio per il tumore polmonare più specifici della SAA, da incorporare in un ipotetico pannello multifattoriale di biomarcatori mirato ad una discriminazione più efficace degli individui a rischio. Per la quantificazione di questi analiti abbiamo applicato una strategia multiparametrica, la tecnologia "*Bio-Plex Suspension Array System*", un sistema di saggi multipli che, in una prima fase, ci ha permesso di misurare simultaneamente 27 citochine (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, Basic FGF (bFGF), Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES, TNF- $\alpha$ , VEGF) e 23 citochine (IL-1 $\alpha$ , IL-2R $\alpha$ , IL-3, IL-12(p40), IL-16, IL-18, CTACK, GRO- $\alpha$ , HGF, ICAM-1, IFN- $\alpha$ 2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG,  $\beta$ -NGF, SCF, SCGF- $\beta$ , SDF-1 $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TRAIL, VCAM-1) rispettivamente. Le citochine sono state valutate in 142 campioni di plasma di soggetti classificati in funzione delle concentrazioni plasmatiche di SAA; 74 con SAA elevata (valori > 0.5  $\mu$ A), 68 con SAA normale (valori < 0.5  $\mu$ A). Nella Fig. 2 sono riportate le distribuzioni delle concentrazioni plasmatiche delle citochine analizzate: i valori degli analiti LIF e IL-1 $\alpha$  sono risultati essere tutti sotto la soglia di sensibilità dello strumento, quindi la loro concentrazione plasmatica non e' risultata valutabile, mentre per altri, in particolare IL-15, IL-17, FGF-basic, TNF- $\beta$ , la misura e' riferita ad una frazione variabile di campioni.

E' importante mettere in evidenza che, ad oggi, non esiste in letteratura uno studio che descriva i valori fisiologici delle citochine solubili in una popolazione di individui sani, a causa della loro nota instabilità e della mancanza di metodi di misurazione standardizzati. Tuttavia, recentemente, sono stati pubblicati alcuni lavori che hanno utilizzato la tecnologia Bio-Plex per analizzare le concentrazioni delle citochine nel siero o nel plasma di soggetti patologici e soggetti sani di controllo. Come mostra la Tab. 4, i valori ottenuti dai nostri esperimenti (espressi sia come *range* dinamici che come *media*  $\pm$  ds) sono complessivamente paragonabili a quelli riportati in letteratura, riguardo a plasma/siero di soggetti controllo [207-209]. Come si puo' pero' notare, i valori di SCGF nel plasma dei nostri campioni sono quasi 10 volte piu' elevati rispetto a quelli di confronto. Inoltre, per altre citochine (quali, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ) i nostri valori sono risultati piu' bassi ma questo puo' essere imputato al fatto che i livelli di riferimento in letteratura per queste citochine riguardano il siero e non il plasma.

Partendo da queste considerazioni preliminari, abbiamo ritenuto affidabili i valori ottenuti con la tecnologia Bio-Plex ma non bisogna comunque sottovalutare la variabilità individuale delle citochine stesse e le complesse interazioni tra loro. Infatti, come gia' detto in precedenza, dato che le citochine interagiscono in complessi *networks*, la misurazione singola delle stesse acquisisce valore biologico limitato, mentre risulta rilevante valutarle in gruppo. Bisogna, pero', tenere in considerazione che diversi parametri possono inficiare le misurazioni dei

livelli delle citochine nei campioni biologici, quali le tempistiche di campionamento, il processamento e la conservazione dei campioni, la scelta dell'utilizzo di plasma o siero. Le citochine sono sottoposte a controllo endocrino, quindi hanno un ritmo diurno; molte citochine pro-infiammatorie, come IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , sono legate al rilascio di melatonina ed hanno il picco massimo la mattina. Inoltre, anche l'esercizio fisico ha un impatto sui livelli sistemici delle citochine, ad esempio, dopo l'attività fisica le cellule muscolari rilasciano IL-6, con il conseguente aumento temporaneo dei livelli della citochina. Durante il processamento del campione, ad esempio con la centrifugazione, le piastrine rilasciano varie citochine, come IL-6 e IL-8. Inoltre, le citochine possono legarsi, o essere rilasciate dai loro recettori solubili, risultando così sotto o sovrastimate. Le citochine possono essere conservate a -80°C per un lungo periodo di tempo; ad esempio, anche se la maggior parte delle citochine rimane stabile per un massimo di 2 anni, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17 sono sottoposte a degradazione già entro 1 anno dalla conservazione, mentre IL-2, IL-4, IL-12 e IL-18 sono stabili per 3 anni; altre citochine, quali IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-10 vengono degradate fino al 50% entro 2-3 anni dalla conservazione. Inoltre, cicli di congelamento-scongelo possono influenzare la determinazione delle citochine nel campione biologico; nonostante ciò molte citochine sono stabili in matrici ad elevata densità proteica, come il plasma, al primo ciclo di congelamento-scongelo, sarebbe meglio quindi evitare ulteriori cicli.

Inoltre, in alcuni casi, numerose proteine endogene, come gli anticorpi eterofili, i recettori solubili, il complemento, gli immunocomplessi, il lisozima, le lectine (lectine) ed alcune proteine della fase acuta possono interferire durante i saggi immunologici. Per un buon rendimento del saggio multiplo, che dipende dalla quantità di anticorpo utilizzato e dall'effetto-matrice, è fondamentale la presenza di un controllo di qualità. Qualora manchi il controllo di qualità interno, come accade per alcuni kit commerciali, vengono utilizzate diluizioni seriali degli standard di proteine ricombinanti per la costruzione della curva di calibrazione, che, però, risulta sufficiente solo per il singolo kit e non per il monitoraggio a lungo termine del rendimento della metodologia. Un altro punto cruciale è la diluizione del campione stesso, se, come nel caso del plasma, il campione è costituito da un'elevata quantità di proteine. Per contro, la necessità di diluire il campione ha lo svantaggio di ridurre proporzionalmente la sensibilità del saggio. Inoltre, poiché le citochine possono circolare legate ai propri recettori solubili o ad altre proteine, risultando biologicamente inattive, la diluizione del campione potrebbe interferire, almeno in parte, con questo legame, portando ad una sovrastima della reale concentrazione delle citochine stesse.

La determinazione dei livelli di citochine è strettamente dipendente dal tipo di piattaforma utilizzata (ad esempio, saggi multipli o saggi singoli) e la bontà della rilevazione all'interno della piattaforma dipende dal tipo di citochina in analisi. La fonte di variazione tra le piattaforme è principalmente attribuita a:

- 1) effetto-matrice: può essere corretto modificando la diluizione dei campioni;
- 2) *cross*-reattività degli anticorpi con le altre citochine: è adeguatamente valutata, documentata e controllata dai fornitori dei kit;
- 3) accuratezza della quantificazione della curva di calibrazione;
- 4) natura dell'anticorpo utilizzati per il *capture* e la *detection*: i produttori dei kit multipli utilizzano una miscela brevettata di anticorpi, che potrebbero riconoscere i

medesimi epitopi sulla proteina bersaglio, di conseguenza la piattaforma potrebbe dare risultati simili per citochine diverse;

5) utilizzo di siero o plasma come tipologia di raccolta.

Nonostante i valori quantitativi ottenuti all'interno della medesima piattaforma siano riproducibili, risulta difficile poter paragonare i risultati prodotti da piattaforme diverse. E' indispensabile seguire attentamente il protocollo fornito dal produttore, in quanto la combinazione degli anticorpi e' stata precedentemente valutata ma, nonostante cio', alcune citochine possono dare il medesimo profilo di dati, mentre altre risultano altamente variabili. Rimane comunque evidente la necessita' di utilizzare massicciamente questi saggi per aumentare la consistenza dei dati ottenibili.

Risulta, altresì, evidente la necessita' di validare i dati ottenuti in saggi multipli, utilizzando, ad esempio, saggi piu' tradizionali come l'ELISA per le singole citochine. Cio' comporta un allungamento considerevole dei tempi di analisi e l'entita' delle risorse economiche e lavorative necessarie.

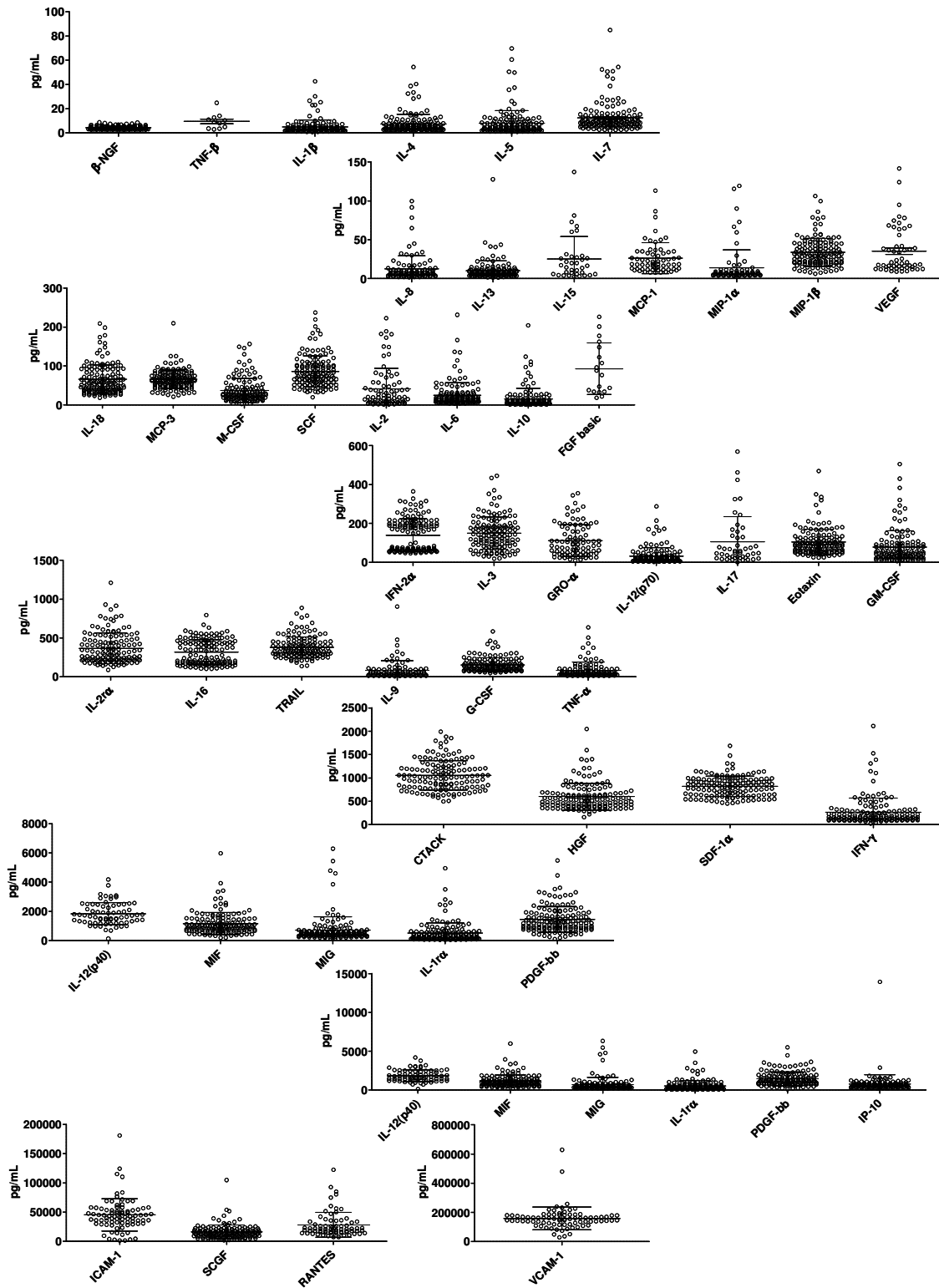


Figura 2: Rappresentazione grafica, ottenuta con software GraphPad, delle distribuzioni delle concentrazioni plasmatiche delle citochine analizzate, suddivise in base al loro range dinamico



Citochina	Range dinamici (pg/mL)	media $\pm$ ds (pg/mL)	Ref. letteratura (media $\pm$ ds) (pg/mL)
$\beta$ -NGF	2,23 - 8,73	4,3 $\pm$ 1,3	4,5 $\pm$ 1,8*
TNF- $\beta$	2,98 - 24,9	9,6 $\pm$ 6,4	7,4 $\pm$ 4,9*
IL-1 $\beta$	0,67 - 42,64	4,9 $\pm$ 5,9	16 $\pm$ 6'
IL-4	1,19 - 54,47	7,5 $\pm$ 7,9	31 $\pm$ 10'
IL-5	0,87 - 69,69	8 $\pm$ 10,6	1 $\pm$ 0'
IL-7	1,77 - 84,92	12,5 $\pm$ 11,9	7 $\pm$ 2'
IL-8	1,77 - 99,63	12,5 $\pm$ 16,9	9,56 $\pm$ 0,4 <sup>§</sup>
IL-13	1,47 - 127,86	10,1 $\pm$ 12,7	5 $\pm$ 1'
IL-15	2,44 - 137,27	25,3 $\pm$ 29	/
MCP-1	7,73 - 113,17	26,2 $\pm$ 20	173,2 $\pm$ 15,04 <sup>§</sup>
MIP-1 $\alpha$	2,97 - 119,32	13,9 $\pm$ 23	88,1 $\pm$ 14,31 <sup>§</sup>
MIP-1 $\beta$	6,22 - 106,19	33,8 $\pm$ 17,9	135,1 $\pm$ 29,22 <sup>§</sup>
VEGF	8,82 - 141,79	35,2 $\pm$ 30,3	76,6 $\pm$ 6,07 <sup>§</sup>
IL-18	18,16 - 209,07	65,5 $\pm$ 37,6	31,8 $\pm$ 13,4*
MCP-3	20,53 - 209,9	66,2 $\pm$ 23,7	89,7 $\pm$ 26,2*
M-CSF	2,11 - 156,62	36,9 $\pm$ 30,8	28,4 $\pm$ 10,4*
SCF	19,66 - 237,37	85,6 $\pm$ 39,8	42,4 $\pm$ 10,6*
IL-2	1,05 - 222,97	41,5 $\pm$ 52,6	101 $\pm$ 47'
IL-6	3,06 - 231,72	24,8 $\pm$ 31,9	195 $\pm$ 64*
IL-10	0,73 - 204,72	14,7 $\pm$ 27,4	33 $\pm$ 7'
FGF basic/	17,77 - 226,3	93 $\pm$ 66,4	/
IFN-2 $\alpha$	45,9 - 364,19	139,2 $\pm$ 84,3	450,7 $\pm$ 128,3*
IL-3	18,23 - 445,13	150,3 $\pm$ 83,2	107,4 $\pm$ 26,2*
GRO- $\alpha$	8,72 - 354,56	111,1 $\pm$ 82,1	82,1 $\pm$ 33,8*
IL-12(p70)	1,98 - 287,21	31,7 $\pm$ 44,1	31 $\pm$ 6'
IL-17	0,28 - 569,04	106,2 $\pm$ 129,2	/
Eotaxin	24,15 - 469,81	103,6 $\pm$ 67,4	159 $\pm$ 32'
GM-CSF	5,56 - 505	77,7 $\pm$ 84,4	/
IL-2 $\alpha$	87,84 - 1212,28	367,2 $\pm$ 196,6	441,6 $\pm$ 121,5*
IL-16	104,11 - 795,38	319,3 $\pm$ 159,3	280,4 $\pm$ 142*
TRAIL	137,92 - 887,8	380 $\pm$ 135,7	250,1 $\pm$ 94,4*
IL-9	7,58 - 904,95	84,7 $\pm$ 124,3	255 $\pm$ 46'
G-CSF	47,92 - 586,2	154,9 $\pm$ 89,4	114 $\pm$ 19'
TNF- $\alpha$	10,23 - 636,7	84,8 $\pm$ 104,2	34,32 $\pm$ 11,46 <sup>§</sup>
CTACK	495,51 - 1988,29	1055,3 $\pm$ 317,3	455,7 $\pm$ 124,4*
HGF	157,12 - 2046,27	598,1 $\pm$ 287,3	267,1 $\pm$ 77,3*
SDF-1 $\alpha$	447,96 - 1688,58	819 $\pm$ 215,6	309,8 $\pm$ 61,4*
IFN- $\gamma$	18,22 - 2113,59	266,1 $\pm$ 300,8	338 $\pm$ 85'
IL-12(p40)	125,98 - 4181,59	1832,9 $\pm$ 761,8	928 $\pm$ 240,4*
MIF	180,81 - 5974,65	1154,9 $\pm$ 766,8	1264,3 $\pm$ 842,3*
MIG	148,8 - 6304,45	711,2 $\pm$ 911,2	545,5 $\pm$ 315,4*
IL-1 $\alpha$	40,48 - 4957,78	514,2 $\pm$ 681,2	510 $\pm$ 178'
PDGF-bb	88,99 - 5482,68	1441,3 $\pm$ 877,6	/
IP-10	148,41 - 13929,91	769,7 $\pm$ 1190,9	/
ICAM-1	1246,83 - 181378,7	45047,7 $\pm$ 27727,9	15160,3 $\pm$ 5335,1*
SCGF	1605,16 - 104846,9	16051,9 $\pm$ 11753,2	1841,4 $\pm$ 1118,5'
RANTES	6940,2 - 122426,1	28137,9 $\pm$ 21457,3	/
VCAM-1	29591,27 - 628925,6	159274,1 $\pm$ 78506,9	16086,6 $\pm$ 5040,5*
LIF	/	/	31,8 $\pm$ 12,8*
IL-1 $\alpha$	/	/	0,8 $\pm$ 0,7*

Tabella 4: Concentrazioni delle citochine analizzate (esprese come range dinamici e come medie $\pm$ ds) paragonate a quelle riportate in letteratura (media $\pm$ ds); \* Lee KS et al, 2009 (riferiti a plasma), ° Khan IH et al., 2009 (riferiti a plasma), § Yurkovetsky et al., 2007 (riferiti a siero)

### 3.1.2.1 L'analisi statistica univariata

Con l'utilizzo del software *GraphPad*, siamo stati in grado di effettuare delle analisi di correlazione tra le concentrazioni delle citochine in studio, le concentrazioni di SAA ed i valori di diversi parametri clinici a noi disponibili (quali FEV1% e Tiffenau%).

#### 3.1.2.1.1 La relazione tra le concentrazioni plasmatiche delle citochine e di SAA

Sono state effettuate analisi statistiche di correlazione tra le concentrazioni plasmatiche delle 50 citochine e quelle della proteina SAA. Come mostrato in Fig. 3, sono state evidenziate correlazioni dirette statisticamente significative tra concentrazioni di SAA e le concentrazioni delle citochine IL-12(p40) ( $r = 0.33$ ), GRO- $\alpha$  ( $r = 0.29$ ), HGF ( $r = 0.17$ ), MCP-3 ( $r = 0.18$ ), M-CSF ( $r = 0.21$ ), SCGF ( $r = 0.17$ ), SDF-1 $\alpha$  ( $r = 0.18$ ), IL-6 ( $r = 0.23$ ) e IP-10 ( $r = 0.2$ ). Questi dati sono ora in fase di validazione.

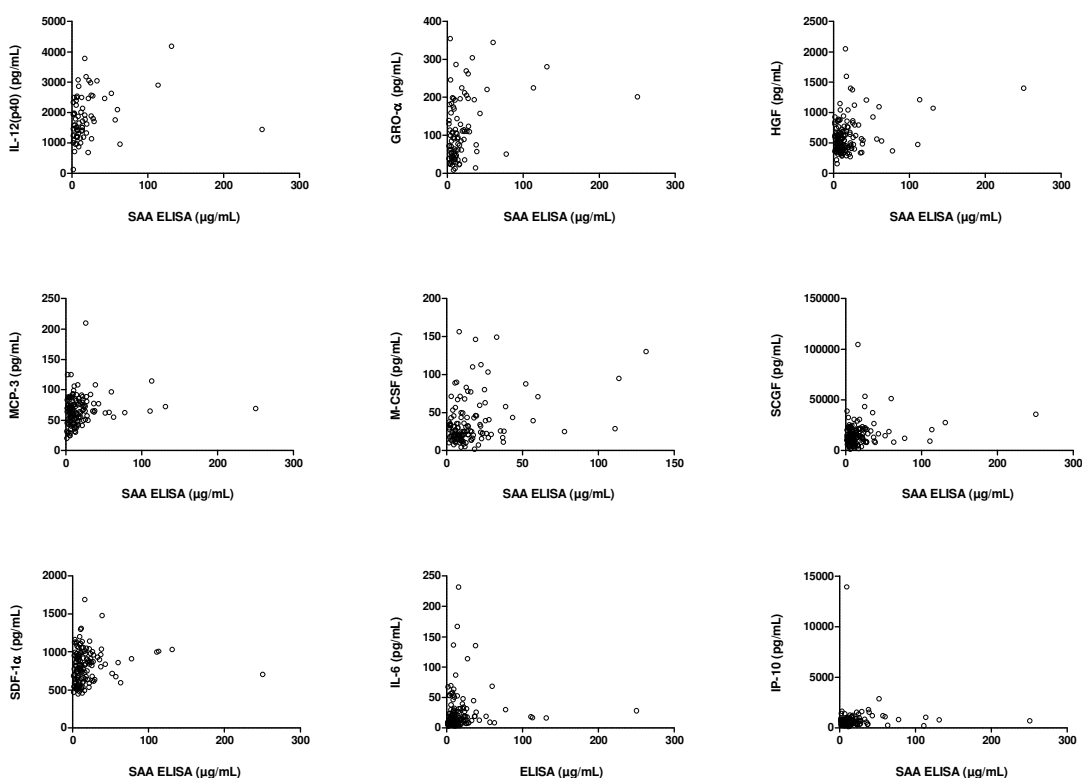


Figura 3: Rappresentazione grafica, ottenuta con software *GraphPad*, delle correlazioni dirette statisticamente significative tra le concentrazioni (Spearman correlation) di SAA e delle citochine IL-12(p40), GRO- $\alpha$ , HGF, MCP-3, M-CSF, SCGF, SDF-1 $\alpha$ , IL-6 e IP-10

#### 3.1.2.1.2 La relazione tra le concentrazioni plasmatiche delle citochine ed i parametri clinici FEV1% e Tiffenau%

Sono state effettuate analisi statistiche di correlazione anche tra le concentrazioni plasmatiche delle 50 citochine ed i valori dei parametri FEV1% e Tiffenau%.

Come mostrato in Fig. 4, sono risultati correlare inversamente i valori di FEV1% con le concentrazioni delle citochine GRO- $\alpha$  ( $r = -0.37$ ), HGF ( $r = -0.19$ ), MCP-3 ( $r = -0.21$ ),  $\beta$ -NGF ( $r = -0.21$ ), SCGF ( $r = -0.19$ ), MIG ( $r = -0.3$ ).

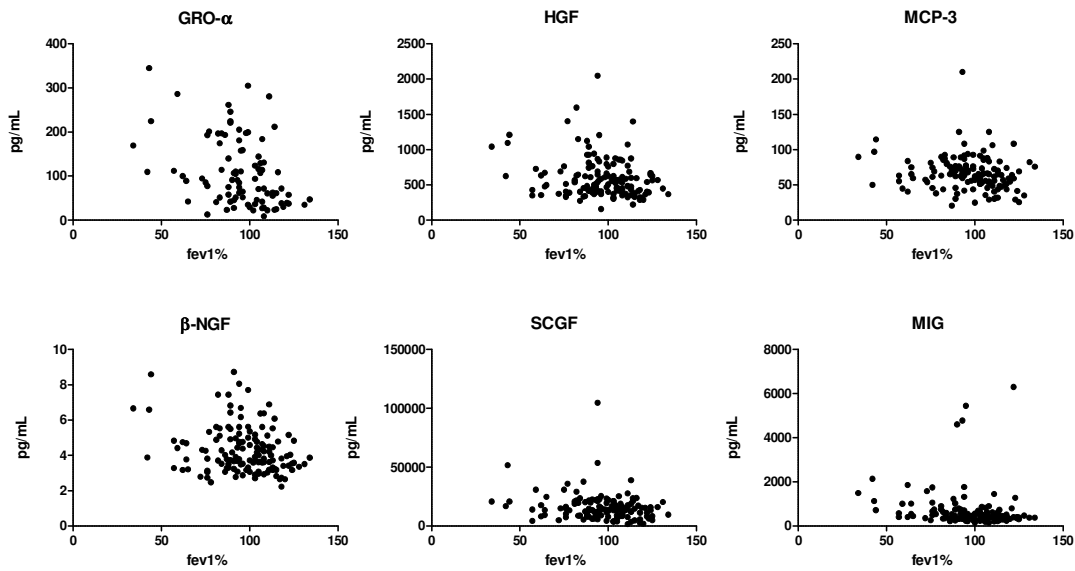


Figura 4: Rappresentazione grafica, ottenuta con software GraphPad, delle correlazioni inverse statisticamente significative (Spearman correlation) tra i valori di FEV1% e le concentrazioni delle citochine GRO- $\alpha$ , HGF, MCP-3,  $\beta$ -NGF, SCGF e MIG

Inoltre, e' stata rilevata una correlazione inversa statisticamente significativa tra i valori dell'indice di Tiffenau% e le concentrazioni plasmatiche delle citochine IL-8 ( $r = -0.18$ ) e MIG ( $r = -0.32$ ) (Fig. 5).

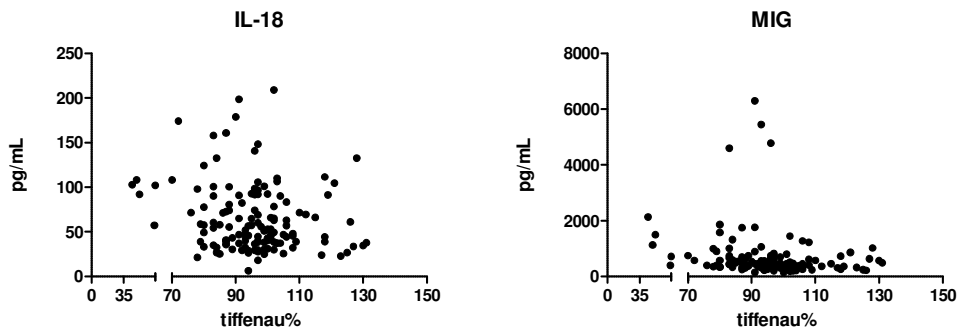


Figura 5: Rappresentazione grafica, ottenuta con software GraphPad, delle correlazioni inverse statisticamente significative (Spearman correlation) tra i valori dell'indice di Tiffenau% e le concentrazioni delle citochine IL-8 e MIG

Anche questi ultimi dati sono in fase di validazione.

Risulta, comunque, importante notare come le citochine GRO- $\alpha$ , HGF, MCP-3 ed SCGF correlino direttamente con le concentrazioni di SAA ed inversamente con i valori di FEV1% (in accordo con la correlazione inversa tra SAA e FEV1%), mentre MIG sia correlato inversamente sia con i valori di FEV1% che di Tiffenau%.

### 3.1.2.2 L'analisi statistica multivariata

L'analisi delle componenti principali (*PCA, Principal Component Analysis*), una tecnica fattoriale che si muove essenzialmente su un versante esplorativo e che prevede l'analisi di fattori o dimensioni latenti, ci ha permesso di analizzare le strutture di correlazione tra le citochine ed è stata utile per individuare un gruppo statisticamente significativo di citochine. L'analisi è stata eseguita su 32 citochine (IFN- $\alpha$ 2, IL-2 $\alpha$ , IL-16, CTACK, HGF, MIF, MIG,  $\beta$ -NGF, SDF-1 $\alpha$ , TRAIL, IL-1r, IL-7, IL-13, G-CSF, IFN- $\gamma$ , PDGF-bb, IL-3, IL-18, MCP-3, M-CSF, SCF, SCGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12(p70), Eotaxin, GM-CSF, IP-10, MIP-1 $\beta$ ), aventi meno di 15 valori di concentrazione mancanti, considerando un totale di 141 campioni (un campione è stato considerato *outlier*, poiché caratterizzato da concentrazioni estremamente elevate per tutte le citochine).

Le prime sei componenti principali identificate sono quelle con *eigenvalue* maggiore di 1 ed esprimono complessivamente il 78% della variabilità totale all'interno della popolazione in studio. L'analisi delle prime due componenti ha rivelato una grossolana struttura di associazione, cioè quella riferibile ai *plex* utilizzati per la misurazione (Fig. 6). Tuttavia, le prime due componenti fungevano da fattore normalizzante.

Le componenti principali 3 e 4 evidenziavano un'associazione significativa tra le citochine SCGF, MIG, MIF, CTACK, IL-16 e Eotaxin. In particolare, sono stati evidenziati 2 gruppi rilevanti di citochine. Infatti, come mostrato e spiegato in Fig. 7, il *cluster* di citochine costituito da SCGF, MIG e CTACK è associato a livelli elevati di SAA, mentre quello costituito da IL-16, MIF ed Eotaxin è associato a livelli normali di SAA.

È importante evidenziare che, in precedenti studi, queste sei citochine sono risultate essere coinvolte nel processo di tumorigenesi polmonare o di infiammazione.

SCGF (*Stem Cell Growth Factor*) è una citochina ematopoietica di recente interesse, in grado di stimolare i progenitori eritrocitari e macrofago/granulocitari nel midollo osseo. È noto che SCGF sia coinvolto in malattie autoimmuni, infettive e nel cancro, come leucemia e tumore al polmone. Infatti, Levina et al., in un recente lavoro, hanno dimostrato che le proprietà altamente tumorigeniche e metastatiche delle cellule staminali del tumore al polmone sono dovute ad una complessa interazione tra citochine; in particolare, in queste cellule è stato evidenziato un livello elevato di fattori di crescita ed angiogenici, incluso SCGF.

MIG (*Monokine induced by INF-gamma*) è una chemochina la cui espressione nei polmoni umani è stata ben documentata: è espressa dalle cellule follicolari e dalle cellule epiteliali delle vie aeree sovrastate. In particolare, è stato dimostrato che alcuni tipi di cellule all'interno e vicino ai follicoli linfoidi (i linfociti T e B, le cellule dendritiche CD68, le cellule endoteliali e le cellule epiteliali delle vie aeree) esprimono MIG e IP-10, entrambi ligandi di CXCR3. Inoltre, le cellule epiteliali alveolari e delle vie aeree rilasciano IP-10 e MIG in risposta alla stimolazione di citochine coinvolte nella BPCO (come IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1). Infine, IP-10 e MIG rilasciati dalle cellule T del polmone CD41 e CD81 stimolano la produzione di metalloproteasi di matrice 12 (MMP-12) da parte dei macrofagi alveolari.

MIF (*Macrophage migration Inhibitory Factor*) gioca un ruolo essenziale nel processo di immunità sia innata che acquisita. In diversi studi è stato dimostrato che MIF sia in grado di attivare i linfociti, i granulociti ed i monociti/macrofagi e che sia coinvolto nel processo di infiammazione cronica precedente lo sviluppo di

neoplasia. Inoltre, sono stati evidenziati livelli circolanti aumentati di MIF in soggetti con carcinoma polmonare.

CTACK (*Cutaneous T-cell-attracting chemokine*) e' una citochina principalmente espressa a livello della pelle ed attrae selettivamente una sottopopolazione tessuto-specifica dei linfociti B della memoria. La sua produzione e' indotta dalle citochine pro-infiammatorie TNF- $\alpha$  ed IL-1 $\beta$ .

Anche IL-16 ed Eotaxin sono coinvolte nello sviluppo del processo infiammatorio. E' stato dimostrato che livelli elevati di IL-16 sono presenti nello sputo di soggetti con BPCO esacerbante e, sempre nel medesimo lavoro, in un piccolo gruppo di individui con BPCO stabile, il numero di cellule linfomononucleari esprimanti l'mRNA per l'eotaxin era aumentato rispetto ai soggetti sani non fumatori. Inoltre, un aumento dell'eotaxin e' stato associato con una progressione di malattia per la BPCO ed un incremento significativo dei livelli di eotaxin nei lavaggi polmonari e' stato osservato in soggetti con BPCO rispetto ai controlli sani.

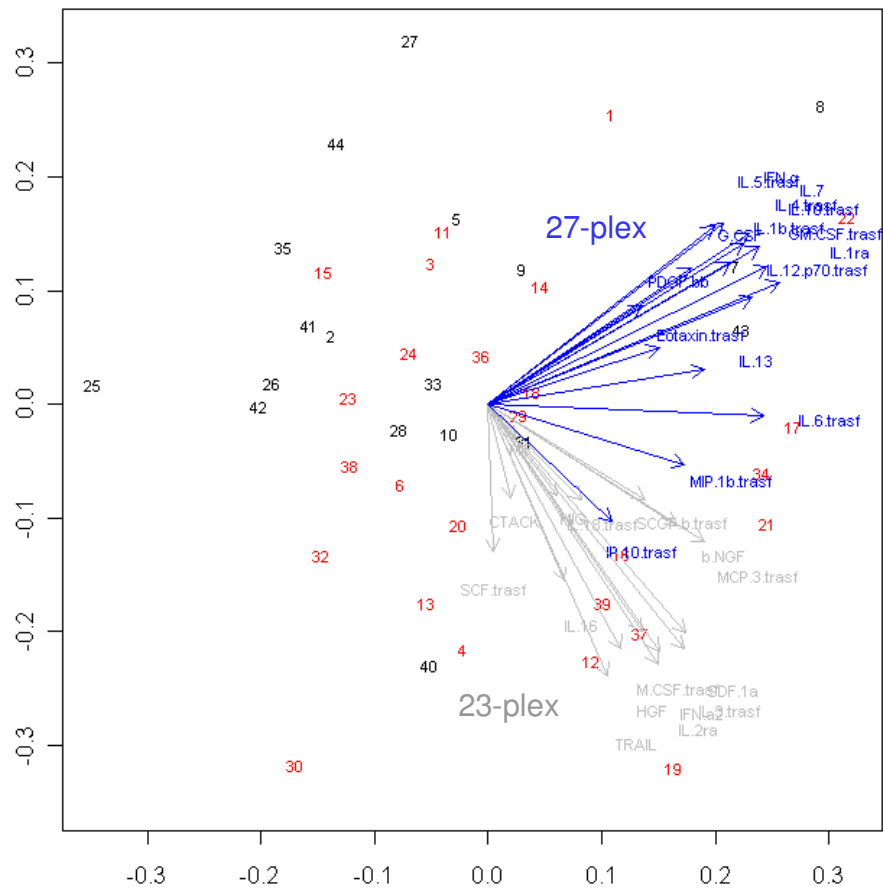


Figura 6: Biplot delle prime due componenti della PCA, che esprimono la grossolana associazione che si osserva fra le citochine, attribuibile ai plex utilizzati per l'analisi (23-plex e 27-plex)

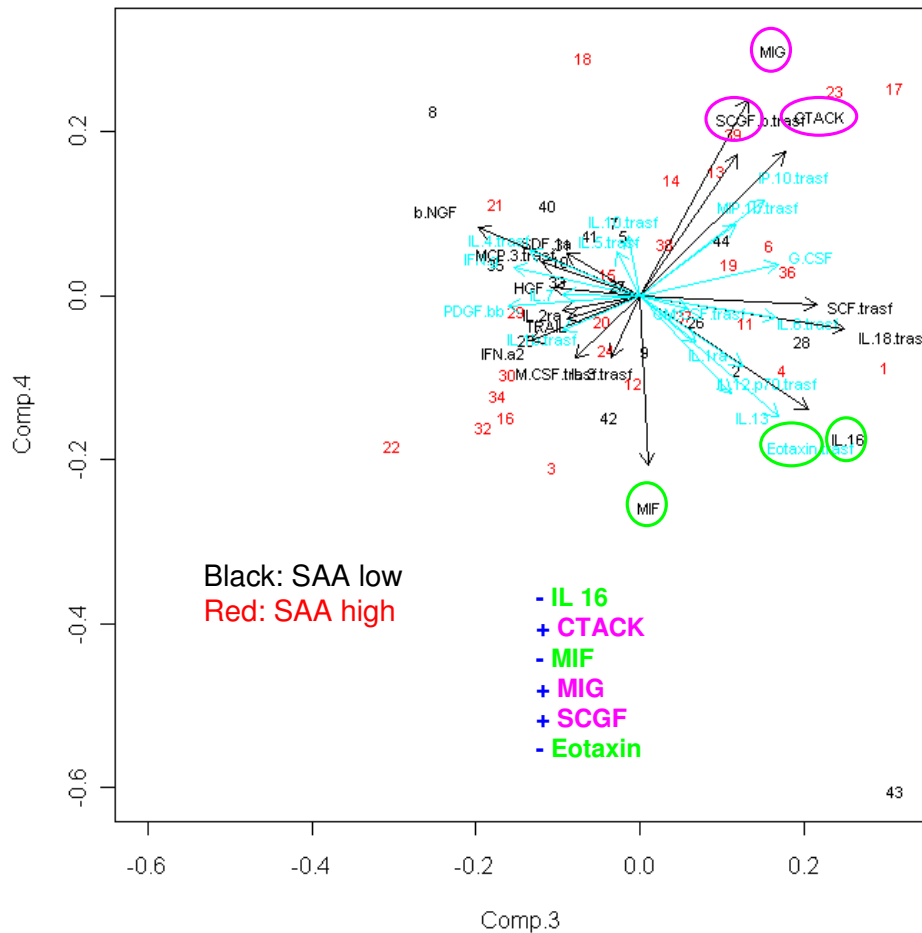


Figura 7: Rilevazione mediante PCA dell'associazione significativa tra le citochine SCGF, CTACK, MIF, MIG, IL-16 ed Eotaxin: le componenti 3 e 4 mostrano le correlazioni tra le citochine dopo sottrazione della variabilità indotta dal 23-plex (freccie azzurre) e dal 27-plex (freccie nere); in rosa sono cerchiato le tre citochine associate "positivamente" (CTACK, MIF ed SCGF) ed in verde sono cerchiato le tre citochine associate "negativamente" (IL-16, MIF ed Eotaxin), ad indicare un andamento opposto dei due gruppi di citochine nelle dimensioni latenti; nel grafico sono proiettati anche i soggetti con SAA alta (numeri rossi) e quelli con SAA normale (numeri neri).

### 3.1.2.3 La rivalutazione delle concentrazioni di SCGF, MIG, MIF, CTACK, IL-16 ed Eotaxin

Allo scopo di aumentare la precisione delle misure delle 6 citochine risultate di maggiore interesse, abbiamo ripetuto le misurazioni sui 142 campioni di plasma precedentemente analizzati utilizzando dei kit ottimizzati, cioè assemblati appositamente per la misurazione esclusiva di queste citochine. Un kit 5-plex per la misurazione di SCGF, MIG, MIF, CTACK e IL-16 ed un single-plex per la misurazione di Eotaxin. Nella Fig. 8 sono riportate le distribuzioni dei valori ottenuti. È importante evidenziare che l'utilizzo di questi kit ottimizzati non ha significativamente cambiato le distribuzioni dei valori ottenute in precedenza (Fig. 9).

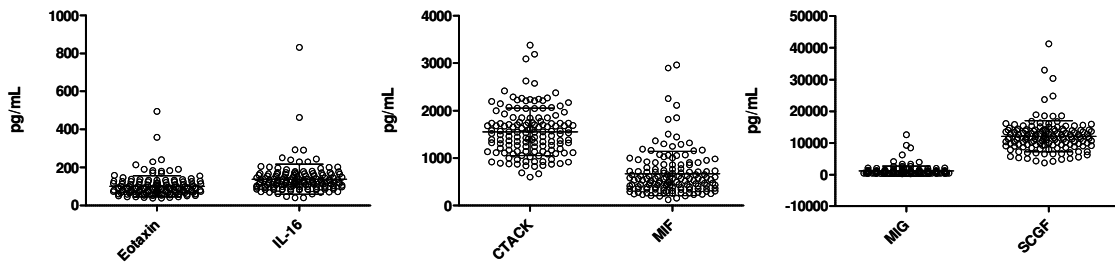


Figura 8: Rappresentazione grafica, ottenuta con software GraphPad, delle distribuzioni delle concentrazioni delle citochine SCGF, MIG, MIF, CTACK, IL-16 ed Eotaxin rivalutate con kit Bio-Plex ottimizzati.

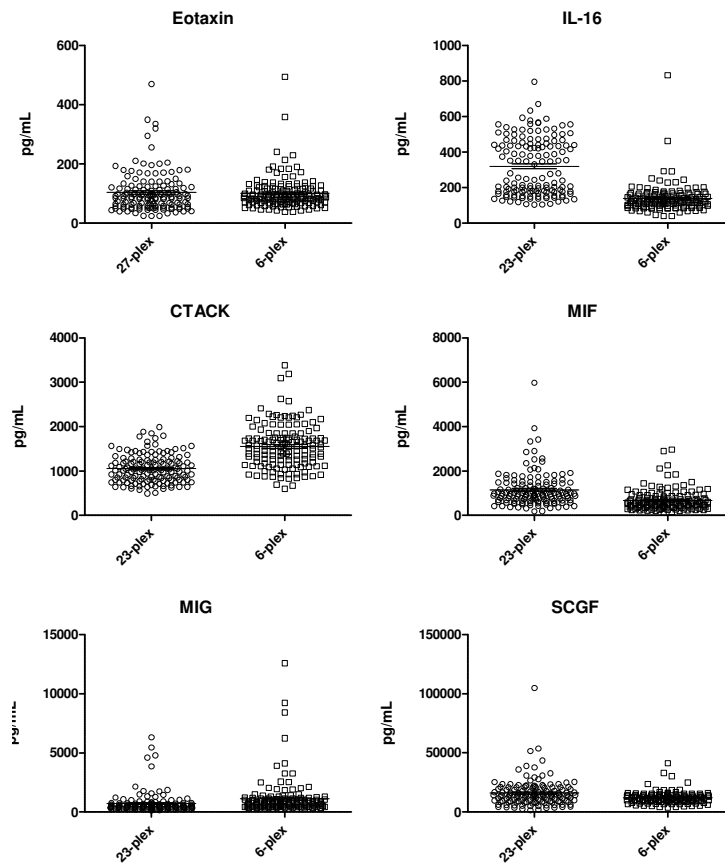
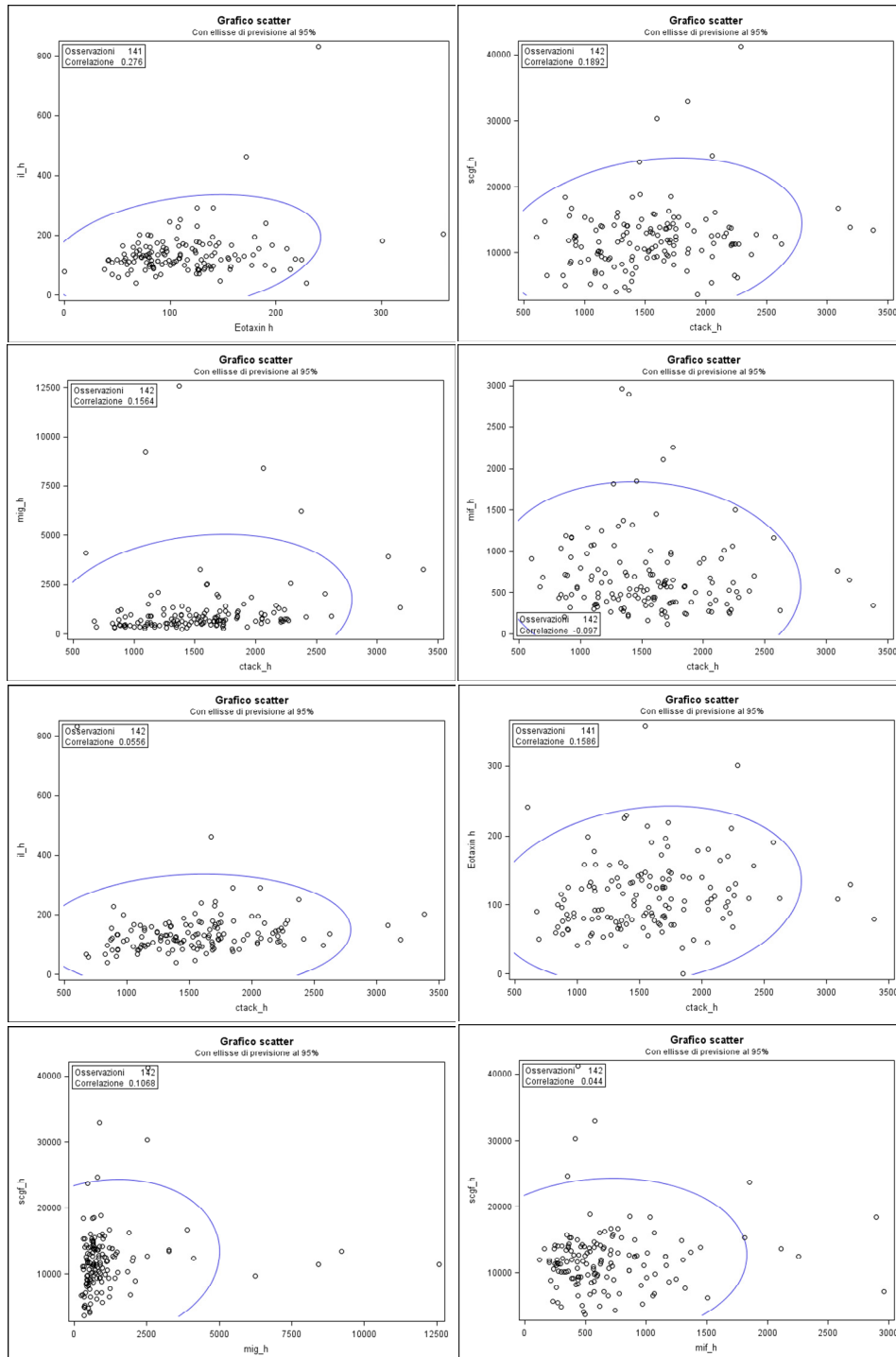


Figura 9: Rappresentazione grafica, ottenuta con software GraphPad, delle distribuzioni delle concentrazioni delle 6 citochine messe a confronto con le distribuzioni ottenute negli esperimenti precedenti (27-plex o 23-plex)

Sono state effettuate delle analisi di correlazione tra le 6 citochine e, come mostrato dai grafici della Fig. 10, sono risultate correlare direttamente IL-16 ed Eotaxin ( $r = 0.28$ ), SCGF e CTACK ( $r = 0.19$ ), MIG e CTACK ( $r = 0.16$ ), Eotaxin e CTACK ( $r = 0.16$ ), MIG e SCGF ( $r = 0.11$ ), SCGF e IL-16 ( $r = 0.14$ ), SCGF ed

Eotaxin ( $r = 0.26$ ), MIG e IL-16 ( $r = 0.26$ ), MIG ed Eotaxin ( $r = 0.27$ ), MIF ed Eotaxin ( $r = 0.13$ ).





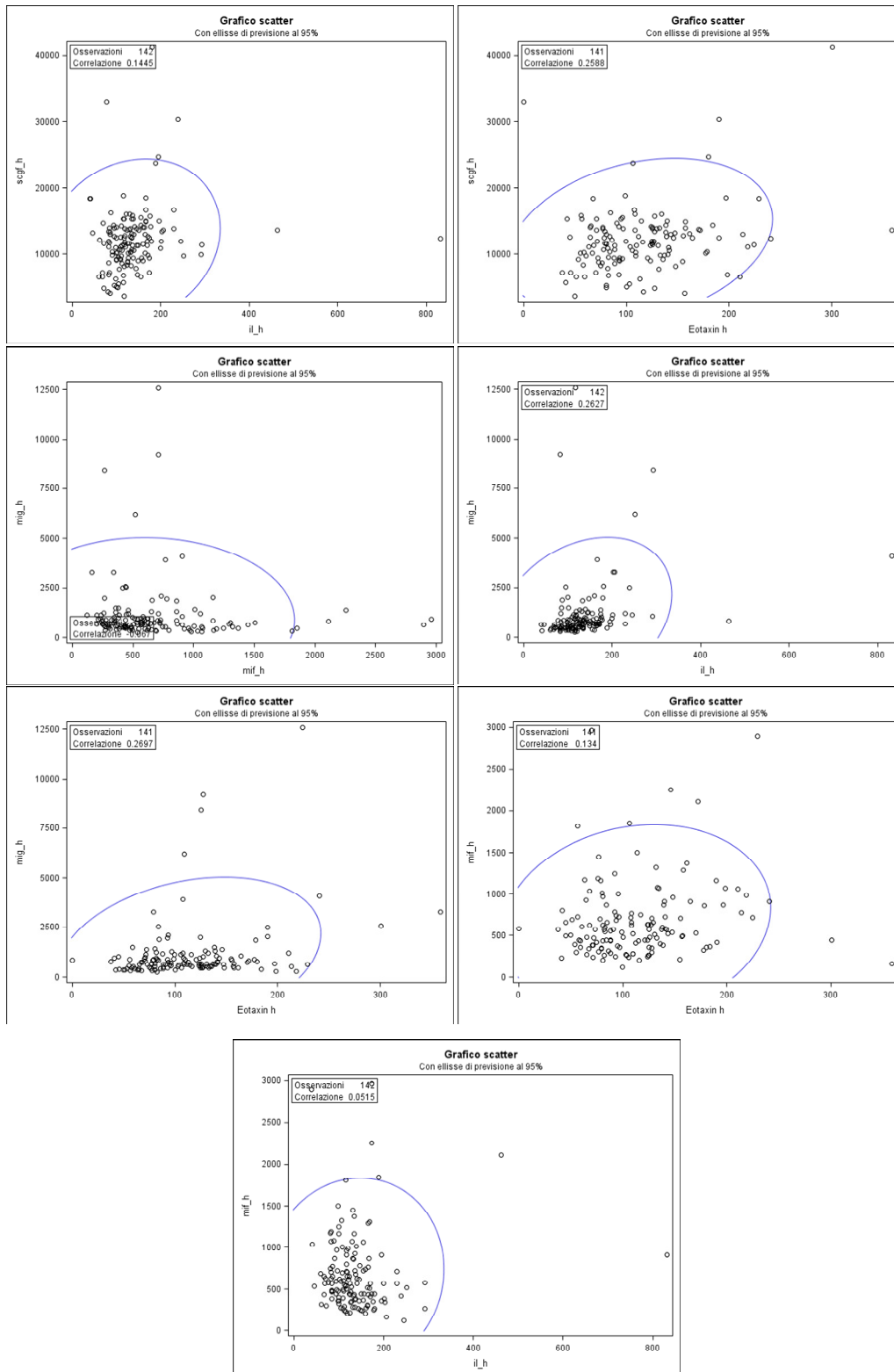


Figura 10: Rappresentazione grafica della distribuzione delle 6 citochine analizzate a coppie e la corrispondente correlazione

Inoltre, sono state valutate le distribuzioni delle 6 citochine analizzate rispetto alle variabili FEV1% alla *baseline*, FEV1% al *follow-up* e all'età dei soggetti, come mostrato dalle Fig. 11, Fig. 12, Fig. 13, Fig. 14, Fig. 15 e Fig. 16, riportate di seguito.

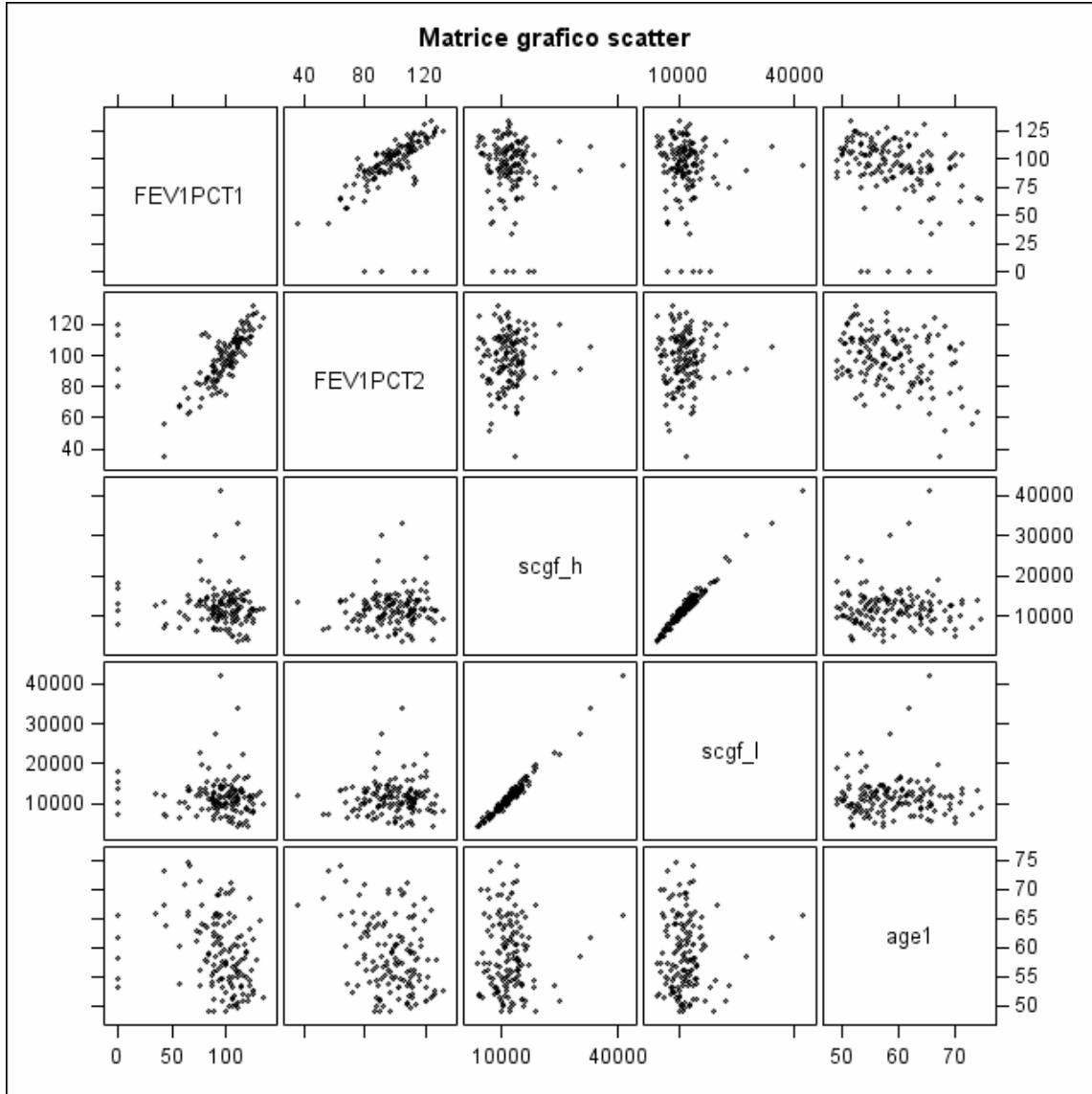


Figura 11: Correlazione tra la distribuzione delle concentrazioni di SCGF, i valori di FEV1%, alla *baseline*, FEV1% al *follow-up* e l'età dei soggetti

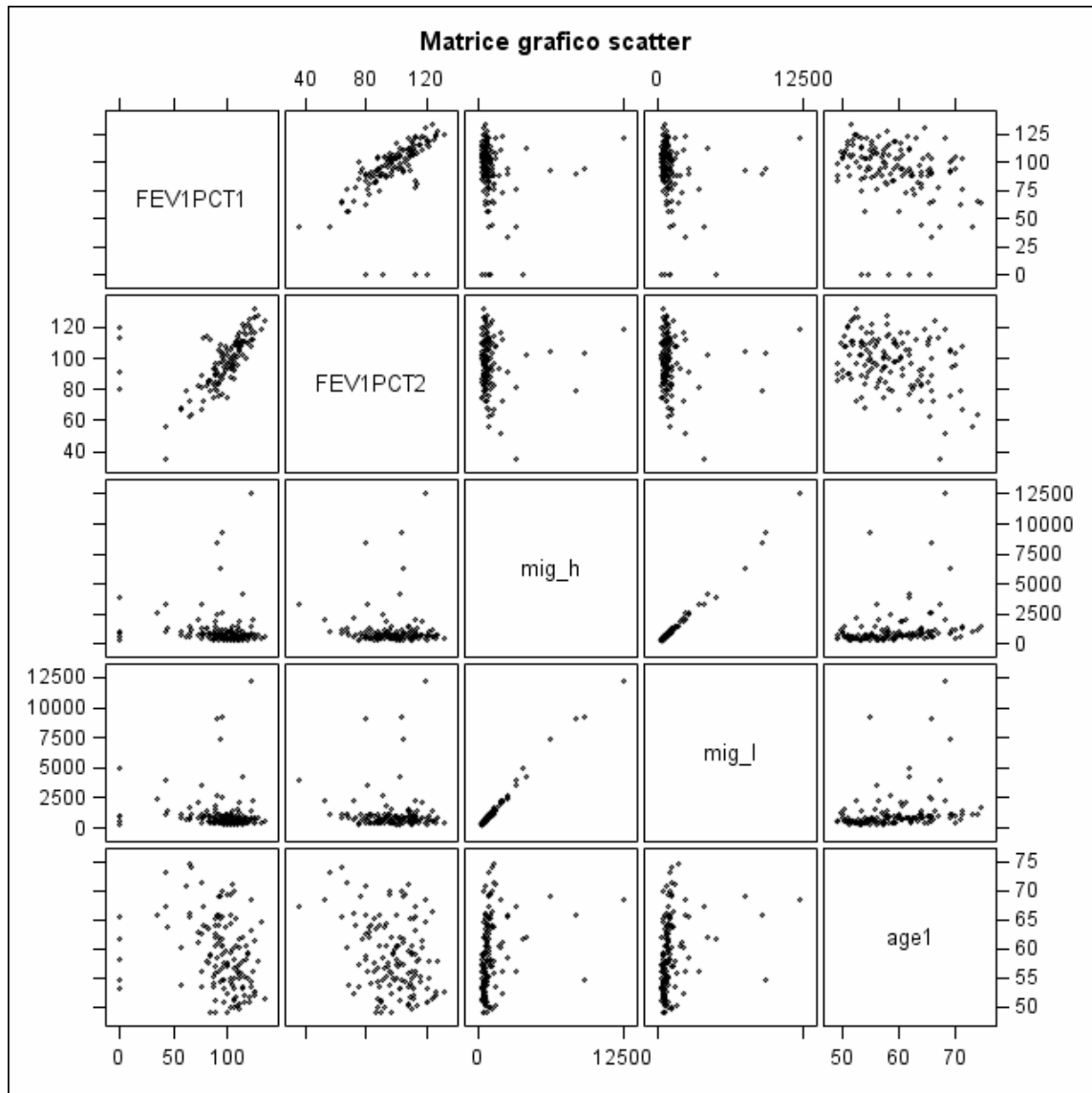


Figura 12: Correlazione tra la distribuzione delle concentrazioni di MIG, i valori di FEV1%, alla baseline, FEV1% al follow-up e l'eta' dei soggetti

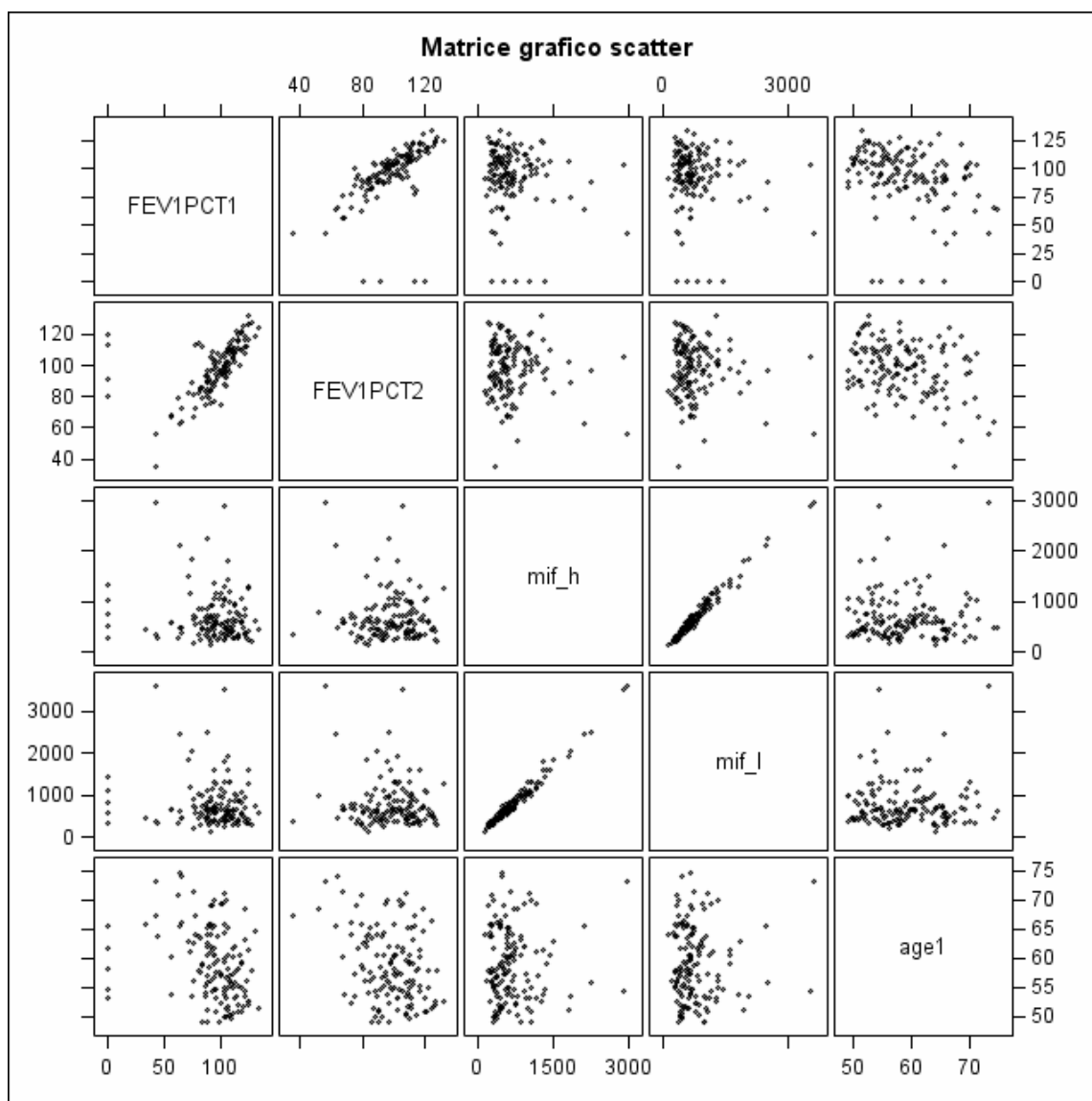


Figura 13: Correlazione tra la distribuzione delle concentrazioni di MIF, i valori di FEV1%, alla baseline, FEV1% al follow-up e l'età dei soggetti

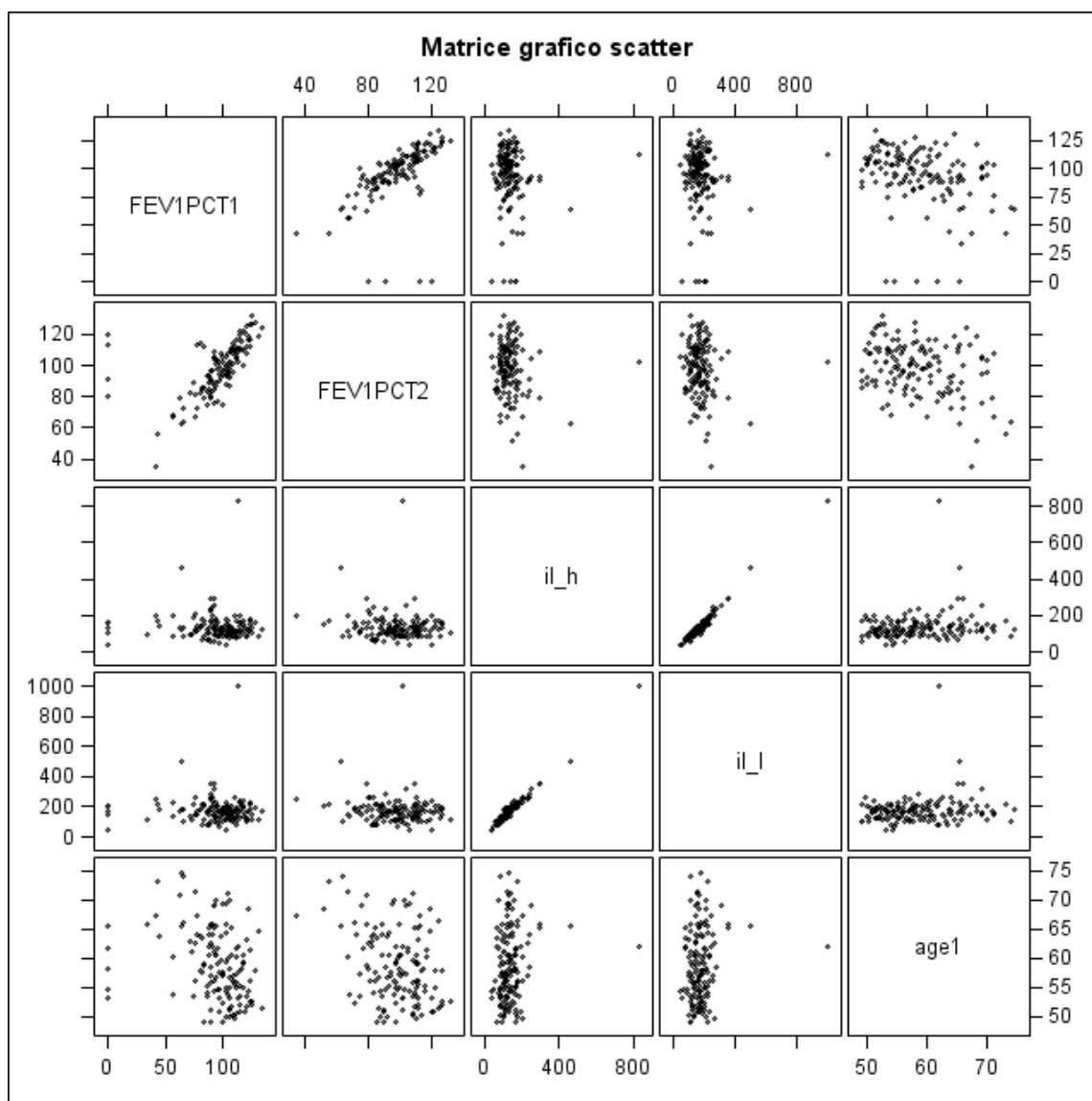
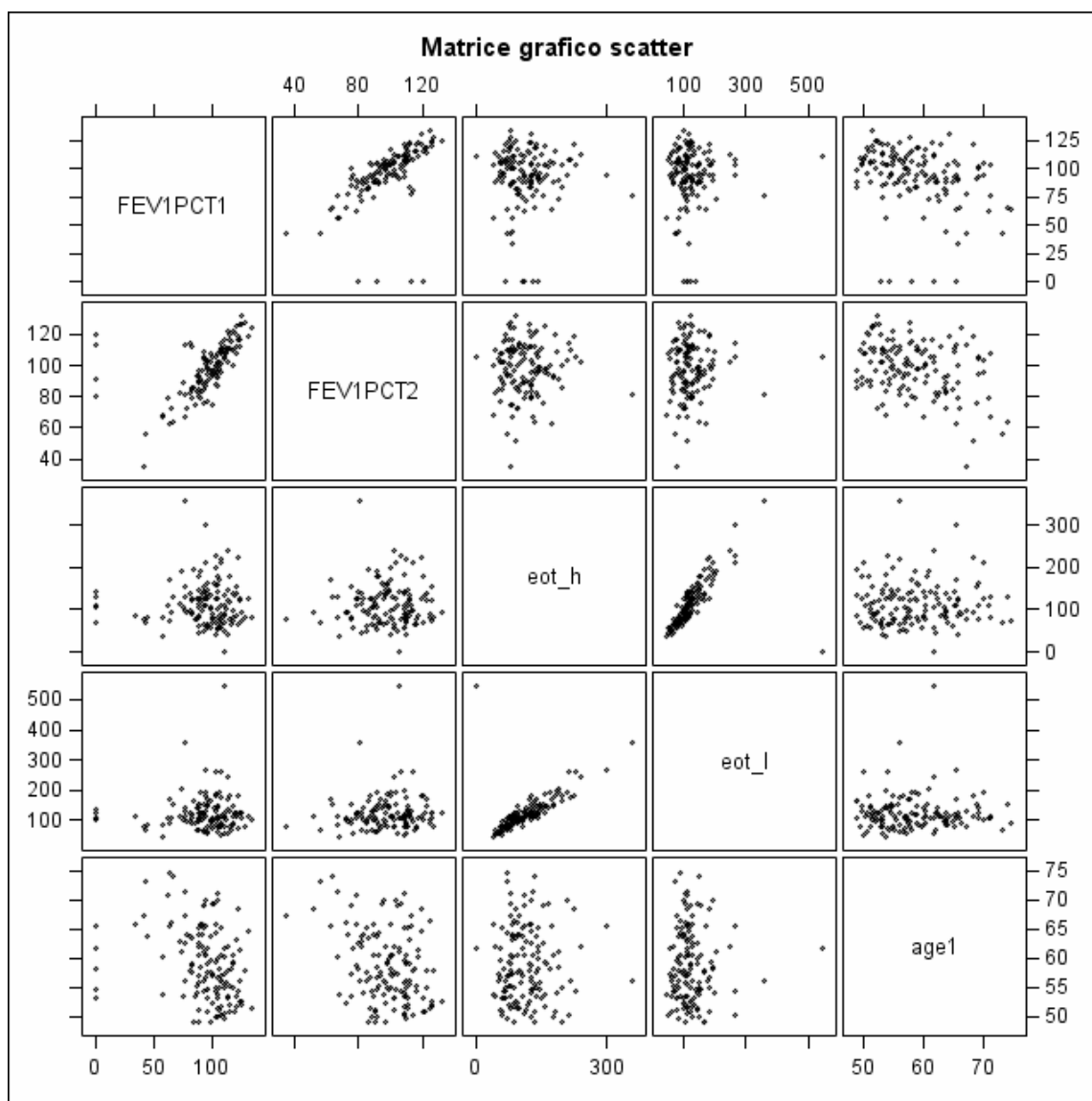
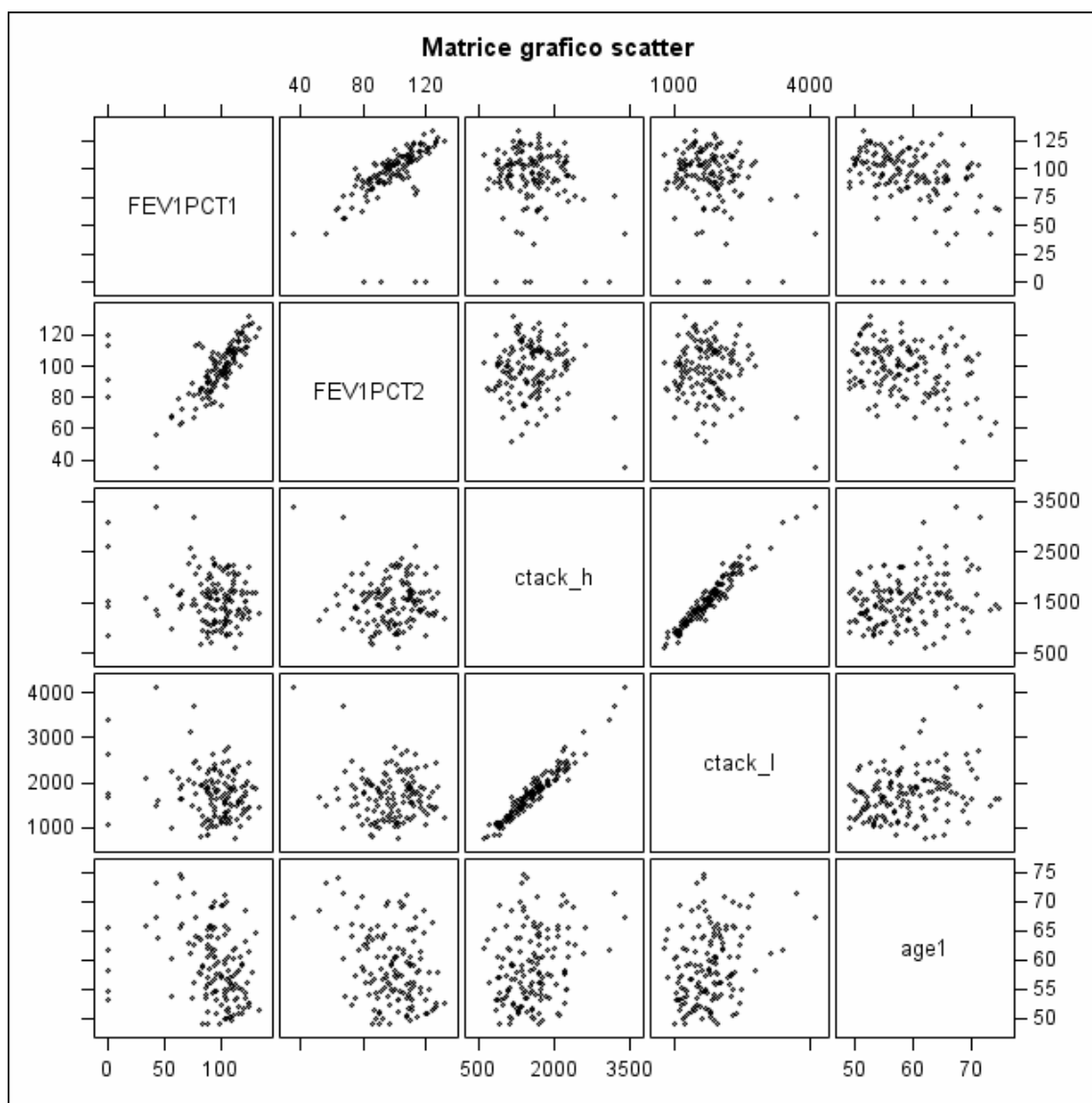


Figura 14: Correlazione tra la distribuzione delle concentrazioni di IL-16, i valori di FEV1%, alla baseline, FEV1% al follow-up e l'eta' dei soggetti



*Figura 15: Correlazione tra la distribuzione delle concentrazioni di Eotaxin, i valori di FEV1%, alla baseline, FEV1% al follow-up e l'eta' dei soggetti*



*Figura 16: Correlazione tra la distribuzione delle concentrazioni di CTACK, i valori di FEV1%, alla baseline, FEV1% al follow-up e l'età dei soggetti*

Per verificare l'associazione tra la variabile funzionale FEV1% e le diverse citochine, abbiamo applicato un modello logistico che aveva:

- variabile di risposta FEV1% in due categorie:  $> < 90$  (soglia considerata discriminante per il rischio di cancro polmonare, [194];
- variabili considerate: le diverse citochine analizzate, con aggiustamento per sesso, età e stato dell'abitudine al fumo (fumatore/ex fumatore).

Analisi del FEV1% alla *baseline*:

In una prima analisi tutte le citochine sono state inserite nel modello come variabili continue. Nessuna risulta essere associata al rischio di un minore FEV1% alla *baseline* (Tab. 5).

<b>Variabile</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
Sesso F vs M	0.381	(0.144-1.005)
Età ≤56 vs >56	0.442	(0.177-1.100)
Fumo Ex vs fumatore	0.696	(0.263-1.840)
SAA I prelievo	1.013	(0.996-1.030)
CTACK	1.001	(1.000-1.001)
Eotaxin	1.000	(0.991-1.009)
IL-16	0.999	(0.993-1.005)
MIF	1.001	(1.000-1.002)
MIG	1.000	(1.000-1.000)
SCGF	1.000	(1.000-1.000)

*Tabella 5: Odds ratios (OR) e intervalli di confidenza al 95% (IC 95%) indicanti il rischio di avere un minor FEV1% alla baseline (citochine in continuo).*

In una seconda analisi tutte le citochine sono state inserite nel modello come variabili categorizzate secondo il valore mediano. Nessuna risulta comunque essere associata al rischio di un minore FEV1% alla *baseline* (Tab. 6).

<b>Variabile</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
Sesso F vs M	0.361	(0.141-0.926)
Età ≤56 vs >56	0.563	(0.225-1.409)
Fumo Ex vs Current	0.620	(0.236-1.627)
SAA I prelievo <10 vs ≥10	0.777	(0.341-1.770)
Ctack <1533 vs ≥1533	1.181	(0.508-2.743)
Eotaxin <107 vs ≥107	1.215	(0.522-2.828)
IL-16 <126 vs ≥126	0.905	(0.388-2.109)
MIF <568 vs ≥568	0.706	(0.315-1.584)
MIG <730 vs ≥730	0.474	(0.188-1.192)
SCGF <11704 vs ≥11704	0.782	(0.339-1.804)

*Tabella 6: Odds ratios (OR) e intervalli di confidenza al 95% (IC 95%) indicanti il rischio di avere un minor FEV1% alla baseline. (citochine categoriali).*



Analisi del FEV1% al follow-up:

In una prima analisi tutte le citochine sono state inserite nel modello come variabili continue. Nessuna risulta essere associata al rischio di un minore FEV1% al follow-up (Tab. 7).

<b>Variabile</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
Sesso F vs M	0.743	(0.281-1.966)
Età ≤56 vs >56	0.426	(0.164-1.107)
Fumo Ex vs fumatore	1.340	(0.489-3.673)
SAA Il prelievo	1.036	(0.986-1.087)
CTACK	1.000	(0.999-1.001)
Eotaxin	0.998	(0.987-1.008)
IL-16	0.999	(0.994-1.005)
MIF	1.000	(0.999-1.001)
MIG	1.000	(1.000-1.000)
SCGF	1.000	(1.000-1.000)

*Tabella 7: Odds ratios (OR) e intervalli di confidenza al 95% (IC 95%) indicanti il rischio di avere un minor FEV1% al follow-up (citochine in continuo).*

In una seconda analisi tutte le citochine sono state inserite nel modello come variabili categorizzate secondo il valore mediano. Nessuna risulta comunque essere associata al rischio di un minore FEV1% al follow-up (Tab. 8).

<b>Variabile</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
Sesso F vs M	0.699	(0.271-1.802)
Età ≤56 vs >56	0.388	(0.143-1.051)
Fumo Ex vs fumatore	1.205	(0.461-3.147)
SAA Il prelievo <8 vs ≥8	0.744	(0.304-1.823)
CTACK <1533 vs ≥1533	1.486	(0.598-3.694)
Eotaxin <107 vs. ≥107	1.532	(0.621-3.782)
IL-16 <126 vs. ≥126	1.033	(0.402-2.655)
MIF <568 vs. ≥568	1.043	(0.435-2.498)
MIG <730 vs. ≥730	1.371	(0.500-3.764)
SCGF <11704 vs. ≥11704	1.093	(0.449-2.658)

*Tabella 8: Odds ratios (OR) e intervalli di confidenza al 95% (IC 95%) indicanti il rischio di avere un minor FEV1% al follow-up (citochine categoriali).*

Sia alla *baseline* che al *follow-up* si osserva che i soggetti che tendono ad avere un valore di FEV1% migliore (più elevato di 90%) sono le donne e i soggetti più giovani. La citochina che risulta avere un'associazione più rilevante (comunque

non significativa) è il MIG per il FEV1% alla *baseline*. Forse si potrebbe pensare di usare una soglia diversa dal valore mediano.

#### 3.1.2.4 La valutazione della concentrazione di SCGF in 378 campioni

Dato l'interesse del laboratorio verso l'SCGF, abbiamo ritenuto importante, anche in assenza di dati statisticamente significativi nell'analisi sul *cluster* delle 6 citochine (chiamato, in seguito, *6-plex*), procedere con un suo dosaggio su un numero ampio di campioni plasmatici di soggetti MILD (378 plasmi). L'analisi è stata effettuata utilizzando un *single-plex* (con sistema *Bio-Plex*), appositamente costruito.

La Fig. 17 riporta le distribuzioni delle misurazioni ottenute dai 3 esperimenti effettuati con la tecnologia *Bio-Plex* (*23-plex*, *6-plex* e *single-plex*). Si può notare come il *range* dinamico venga mantenuto.

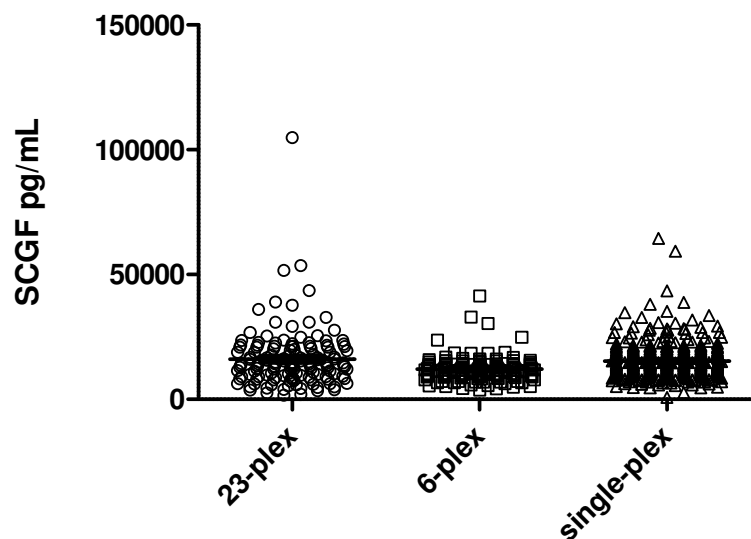


Figura 17: Rappresentazione grafica, ottenuta con software GraphPad, delle distribuzioni delle concentrazioni di SCGF nei 378 campioni (*singleplex*), in confronto a quelle ottenute negli esperimenti precedenti in 142 campioni (*23-plex* e *6-plex*)

Effettuando delle analisi di correlazione tra le concentrazioni di SCGF ottenute nei 3 esperimenti con i valori spirometrici del parametro FEV1 e con le concentrazioni della SAA, abbiamo riscontrato che la citochina dosata nel *23-plex* correla inversamente con la FEV1 ( $r = 0.18$ ) e direttamente con la SAA ( $r = 0.17$ ) (Fig. 18).

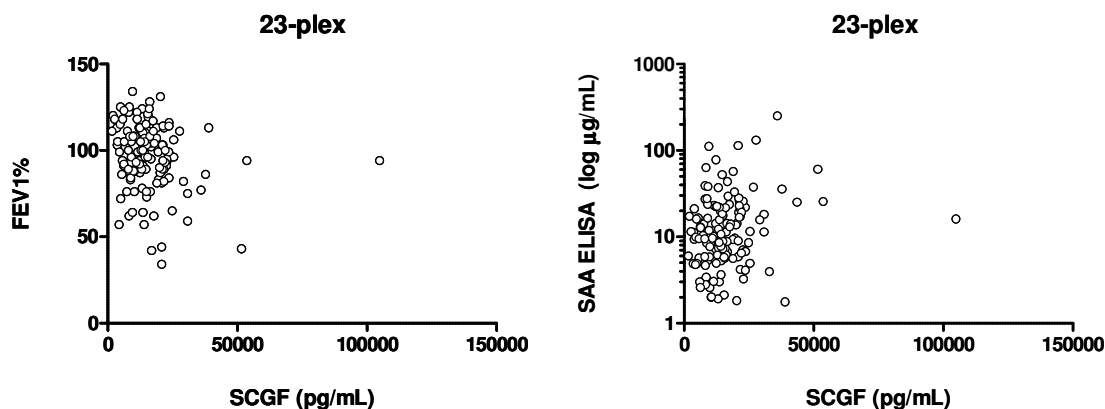


Figura 18: Rappresentazione grafica, ottenuta con software GraphPad, della correlazione inversa (Spearman correlation) tra i valori di FEV1% e le concentrazioni di SCGF e della correlazione diretta (Spearman correlation) tra le concentrazioni di SAA e di SCGF

La significatività di tali associazioni viene meno applicando le medesime analisi di correlazione con i dati ottenuti nel 6-plex e nel *single-plex*. Partendo dal presupposto che l'obiettivo atteso sarebbe stato quello di confermare l'importanza dei dati precedentemente ottenuti, risulta necessario fare delle considerazioni in merito. Innanzitutto sarebbe logico aspettarci che la semplificazione dei *plex* (da 23, a 6, a 1) possa aumentare la specificità della misurazione, in quanto riducendosi la presenza di anticorpi all'interno della miscela, dovrebbe diminuire l'ingombro sterico e dovrebbe migliorare il riconoscimento dell'epitopo bersaglio. Quindi, se così fosse, la misurazione delle citochine effettuata con il 6-plex dovrebbe essere più specifica rispetto a quella del 23-plex ma non possiamo prenderlo come dato di fatto in quanto la sensibilità e la specificità della tecnologia sono fortemente assicurate da parte del produttore. Rimane da porre l'attenzione sulle possibili alterazioni che possono indurre l'effetto matrice, la conservazione del campione e l'estrema variabilità delle citochine stesse. Il processamento del campione è rigorosamente controllato e sono stati evitati cicli multipli di scongelamento-congelamento; ciò che cambia è la differenza di tempo di conservazione dei campioni prima del loro utilizzo ma abbiamo precedentemente detto che in media le citochine sono stabili per almeno 2 anni. Quello che a noi risulta più problematico è l'effetto matrice e l'estrema variabilità individuale. I campioni sono stati opportunamente diluiti ma rimangono comunque eterogenei fra loro nella piastra. Bisogna considerare l'importanza della variabilità dei dati tra esperimenti diversi; risulta infatti fondamentale non valutare il loro valore assoluto ma il loro andamento relativo. Saranno necessarie ulteriori analisi in merito, concentrate su un possibile pretrattamento del campione in modo da poter uniformare le informazioni sulle citochine plasmatiche.

Inoltre, bisogna tenere in considerazione che la perdita di significatività statistica nelle analisi dei risultati ottenuti con il *single-plex* può essere dovuto all'assortimento campionario. Mentre l'analisi con il 23-plex è stata effettuata su una popolazione di 142 individui selezionati in base al criterio di SAA alta o bassa/normale, l'analisi con il *single-plex* è stata eseguita su una più vasta

popolazione (378 soggetti), i cui plasmi sono stati raccolti secondo un ordine temporale.

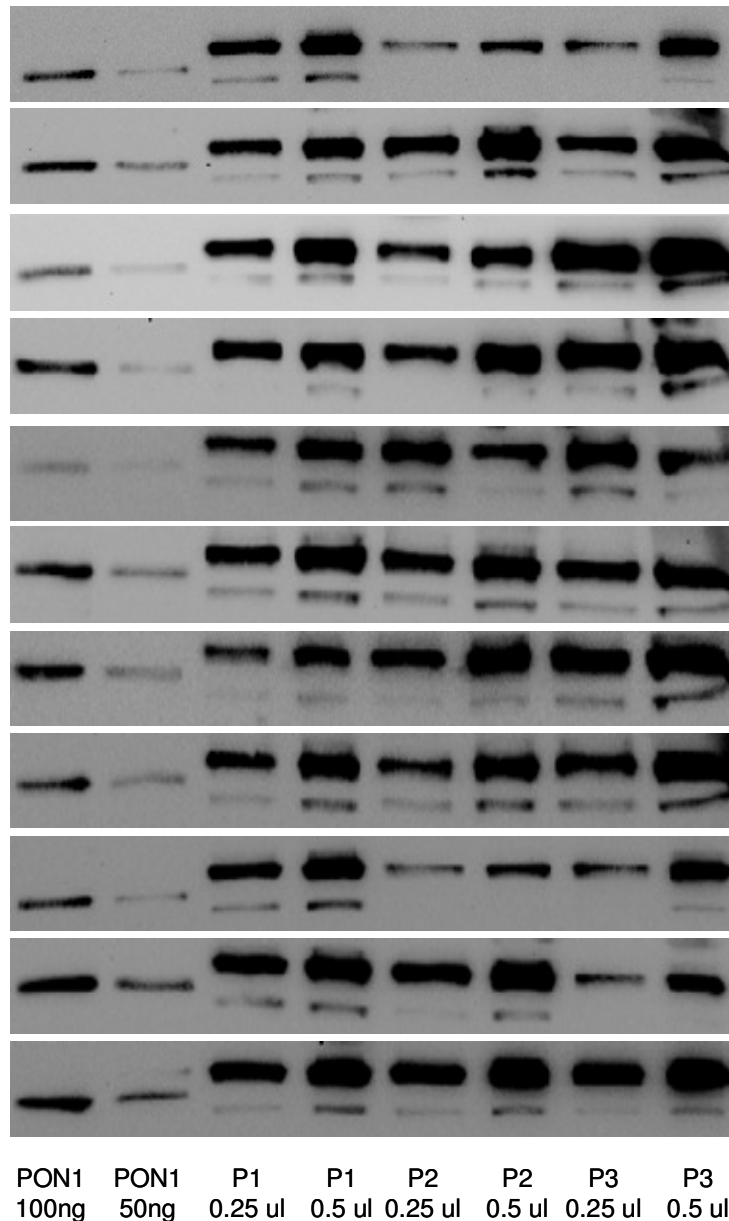
### **3.1.3 La quantificazione della PON1**

Come già' argomentato in precedenza, la PON1 e' una glicoproteina  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente, presente ad alte concentrazioni a livello sistemico. E' un enzima che utilizza una varietà di substrati, tra cui il *paraoxon*, ed e' caratterizzato da diversi siti polimorfici nelle sequenze codificanti. E' stato dimostrato che i polimorfismi a livello del promotore (-108C/T e -162A/G) hanno un ruolo influente sull'espressione della PON1.

La maggior parte dei lavori pubblicati sulla PON1 mostra dati relativi all'attività enzimatica della proteina. Queste valutazioni vengono solitamente fatte utilizzando il siero ed in particolare siero appena ottenuto o conservato in condizioni estremamente controllate. Gli studi sulla PON1 in plasma EDTA non sono stati incoraggianti, in quanto e' stato dimostrato che la presenza di EDTA, promuovendo la rimozione del calcio dall'enzima stesso, ne causa la riduzione/perdita di attività.

#### **3.1.3.1 Il dosaggio della PON1 mediante Western blot su 72 campioni di plasma**

Poiche' i campioni di plasma a nostra disposizione per l'analisi della PON1 sono stati ottenuti utilizzando l'anticoagulante EDTA e poiche', recentemente, Connelly et al. [210] hanno dimostrato la possibilità di misurare la PON1 con *immunoblotting* specifico, abbiamo utilizzato questa tecnica per il dosaggio della proteina in un gruppo di 72 plasmi dei 142 selezionati per l'analisi delle citochine. Come precedentemente spiegato da Kuo e La Du [211], l'anticorpo anti-PON1 riconosce 2 bande corrispondenti alla forma glicosilata, la piu' abbondante di 45 kDa, e la forma non glicosilata, il precursore di 40 kDa. Queste sono le 2 bande evidenziate anche nei nostri esperimenti (Fig. 19) e sono state quantificate utilizzando come riferimento una proteina ricombinate. Nella Tab. 9, sono riportati i valori relativi ai campioni analizzati in *Western blot*, che vanno da un minimo di 82.21  $\mu\text{g/mL}$  ad un massimo di 3887.62  $\mu\text{g/mL}$ .



*Figura 19: Western blot con anticorpo anti-PON1 di alcuni plasmi rappresentativi; in ogni filtro è presente la proteina PON1 ricombinante (100 ng e 50 ng, rispettivamente) e tre campioni di plasma caricati in doppio ( 0.25 µl e 0.5 µl)*

Effettuando l'analisi delle correlazioni, abbiamo riscontrato una correlazione inversa statisticamente significativa tra le concentrazioni di PON1 ottenute in *Western blot* e quelle di SAA ottenute con ELISA ( $r = -0.25$ ) (Fig 20). La correlazione inversa tra PON1 e la proteina di fase acuta SAA avvalorava i nostri dati, in quanto è in linea con la correlazione tra PON1 e PCR, già dimostrata in letteratura e di cui, precedentemente, si è già discusso.

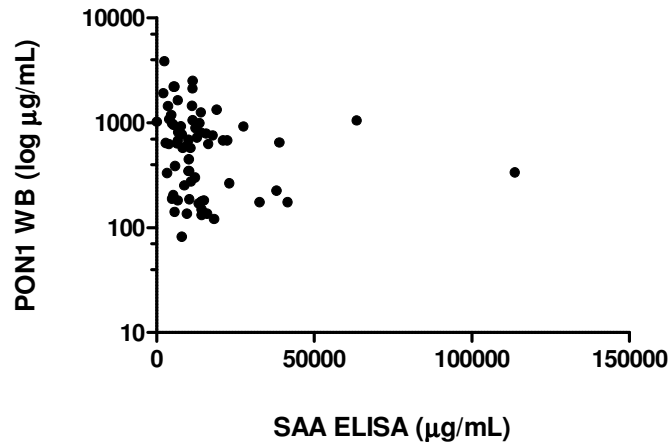


Figura 22: Rappresentazione grafica, ottenuta con software GraphPad, della correlazione inversa (Spearman correlation) tra le concentrazioni di PON1 rilevate con Western blot (PON1 WB) e di SAA misurate con ELISA (SAA ELISA) relative a 72 plasmi

### 3.1.3.2 Il dosaggio della PON1 mediante ELISA su 63 campioni di plasma

Successivamente, abbiamo misurato le concentrazioni della PON1 in 63 plasmi, dei 142 precedentemente utilizzati per l'analisi delle citochine, con un saggio immunoenzimatico di tipo ELISA.

Nella Tab. 9, sono riportati i valori relativi ai campioni analizzati, che vanno da un minimo di 192 µg/mL ad un massimo di 3360 µg/mL.

Abbiamo effettuato analisi di correlazione tra le concentrazioni di PON1 e le concentrazioni di PCR (parametro a noi disponibile per ogni campioni in studio), di SAA ed i valori di FEV1% ed abbiamo riscontrato una correlazione inversa tra PON1 e PCR ( $r = -0.3$ ) (Fig. 21) ma non tra PON1 e SAA (come invece risultava per le concentrazioni di PON1 ottenute in WB). La correlazione inversa tra PON1 e PCR corrobora quanto già presente in letteratura; infatti alcuni studi hanno dimostrato come la bassa attività dell'enzima antiossidante possa contribuire ad un incremento del rischio cardiovascolare attraverso un incremento dell'infiammazione sistemica, a cui corrisponde una PCR più elevata. Il dato più interessante è la correlazione diretta tra le concentrazioni plasmatiche della PON1 ed i valori di FEV1% ( $r = 0.36$ ) (Fig. 21).

Questi dati supportano l'ipotesi che al diminuire della funzione antiossidante della PON1 corrisponda un aumento dei livelli sistemici delle proteine di fase acuta dell'infiammazione e una diminuzione della capacità funzionale respiratoria.

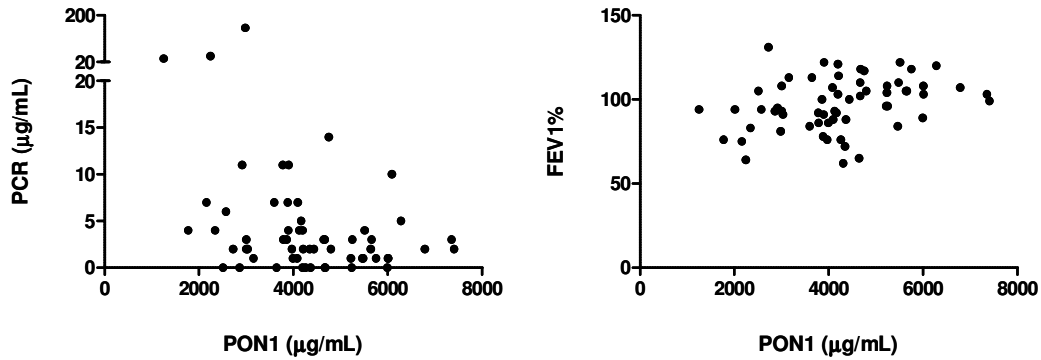


Figura 21: Rappresentazione grafica, ottenuta con software GraphPad, della correlazione (Spearman correlation) inversa tra le concentrazioni di PON1 ed i valori di PCR e diretta tra i livelli di PON1 ed i valori di FEV1%.

### 3.1.3.3 Il dosaggio della PON1 mediante ELISA su 397 campioni di plasma

L'interesse per i risultati positivi ottenuti ci ha indotto ad estendere l'analisi della PON1, con saggio ELISA, a 397 campioni di plasma della casistica MILD.

Nella Tab. 9, sono riportati i valori relativi ai campioni analizzati, che vanno da un minimo di 50.69 µg/mL ad un massimo di 931.56 µg/mL, che risultano correlati ( $r = 0.61$ ) con quelli precedentemente ottenuti sulla casistica dei 63 plasmi (Fig. 22).

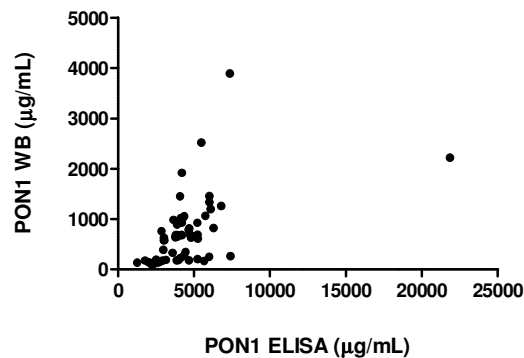


Figura 22: Rappresentazione grafica, ottenuta con software GraphPad, della correlazione diretta (Spearman correlation) tra le concentrazioni di PON1 ottenute con Western blot (PON1 WB) e quelle ottenute con ELISA (PON1 ELISA) relative a 63 plasmi

I risultati ottenuti non sono stati molto soddisfacenti, in quanto le correlazioni statisticamente significative ottenute nella prima analisi non sono state riconfermate, nonostante, in letteratura, sia chiaramente descritta la diminuzione dell'attività enzimatica in una popolazione di fumatori rispetto ai non fumatori.

Considerando le discrepanze di significatività statistica tra i risultati ottenuti e considerando che i polimorfismi del gene della PON1 influenzano la sua espressione e quindi anche la sua attività, riteniamo interessante sviluppare degli studi su tali polimorfismi, per poi rivalutare i valori delle concentrazioni della proteina, alla luce di queste ricerche.





### **3.2 Il dosaggio di molecole dell'infiammazione e dello stress ossidativo nel condensato dell'esalato respiratorio**

Per l'analisi del condensato dell'esalato respiratorio e' stata dapprima individuata e standardizzata la metodologia per la raccolta del campione biologico (vedi materiali e metodi). Abbiamo poi misurato alcuni parametri infiammatori e dello stress ossidativo in 18 soggetti forti fumatori ad alto rischio di tumore al polmone reclutati nel progetto MILD e in 18 pazienti con cancro polmonare dell'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano. Applicando tecnologie di spettrometria di massa (SELDI-TOF e n-LC-MS/MS - solo su 6 soggetti forti fumatori) e tecniche immunoenzimatiche (ELISA, EIA, BIO-PLEX), abbiamo mirato alla generazione di profili proteici del condensato ed analizzato la concentrazione di proteine e metaboliti specifici, in particolare della Proteina Surfattante C (SP-C, con specifica localizzazione polmonare), del Leucotriene B4 (potente mediatore coinvolto nelle malattie infiammatorie e nell'immunoregolazione), dell'8-Isoprostano (marcatore dello stress ossidativo) e di un gruppo di 14 citochine, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, MCP-1 and TNF-  $\alpha$ .

Abbiamo anche utilizzato la piattaforma SELDI-TOF, che pero' ha rilevato pochi picchi proteici all'interno dell'intervallo di 3-20 kDa (Tab. 10).

In accordo con risultati ottenuti da altri studi, la n-LC-MS/MS ha identificato, in aggiunta all'albumina, esclusivamente citocheratine (Tab. 10).

La misurazione delle 14 citochine effettuata con la tecnologia Bio-Plex non ha prodotto i risultati attesi, infatti, per nessuna delle citochine in studio e' stata raggiunta la soglia di sensibilità del saggio multiplo. I campioni di EBC, prima di essere analizzati con Bio-Plex, sono stati portati a secco con una centrifuga concentratrice da vuoto, una liofilizzazione subottimale potrebbe essere stata responsabile della degradazione o della riduzione del contenuto delle citochine nel campione di EBC (Tab. 10).

I dati piu' interessanti che abbiamo ottenuto sono stati quelli relativi all'8-Isoprostano, la cui misurazione e' risultata efficace per una buona parte dei campioni in analisi (2 su 18 EBC di forti fumatori e 9 su 18 EBC di pazienti con cancro) e le concentrazioni dei condensati dei pazienti sono risultate piu' elevate rispetto a quelle dei condensati dei soggetti a rischio (*p-value* < 0.0001, con intervallo di confidenza al 99%, IC99%) (Fig. 23). Per gli altri analiti (LTB-4 e SP-C) la quantificazione si e' rivelata piu' difficoltosa, i valori sono risultati in generale sotto la soglia di sensibilità analitica, limite che in futuro si potrà superare migliorando le procedure ed incrementando la numerosità del campione. Pensiamo sia utile sviluppare e valutare la potenziale utilità della misurazione dell'8-Isoprostano, i cui valori sono gia' stati dimostrati essere aumentati sia nella BPCO che nelle esacerbazioni. Quindi, standardizzeremo la valutazione dell'8-isoprostano negli EBC raccolti con la metodologia TD $\frac{1}{2}$ , miglioreremo l'accuratezza dei saggi EIA e punteremo a generare un pannello di valori per la validazione e l'integrazione con i parametri clinici.

Tipo di analisi	Tecnologia o tecnica	Soglia minima di rilevazione	Soggetti	Volume di EBC	Risultati
Profilo peptidico	SELDI-TOF	µg/mL	18 LC; 18 HR	200 µL	n° di PICCHI
					1-11;1-34
Profilo proteico	nLC/MS-MS	pg/mL	6 HR	100 µL	PROTEINE
					KRT1, KRT2, KRT3, KRT5, KRT6, KRT9, KRT10, KRT13, KRT14, KRT17, KRT73, Albumina
Citochine	Bio-Plex	pg/mL	18 LC; 18 HR	750 µL	CONCENTRAZIONE (pg/mL)
GM-CSF		9,5			< 9,5
IFN-γ		0,1			< 0,1
IL-1β		0,4			< 0,4
IL-2		0,3			< 0,3
IL-4		0,6			< 0,6
IL-5		0,1			< 0,1
IL-6		0,3			< 0,3
IL-7		1,8			< 1,8
IL-8		0,2			< 0,2
IL-10		0,3			< 0,3
IL-12(p70)		0,4			< 0,4
IL-13		0,4			< 0,4
MCP-1		0,9			< 0,9
TNF-α		0,1			< 0,1
8-isoprostano	EIA	2,7 pg/mL	18 LC; 18 HR	100 µL	9,2-118,7 (pg/mL) (9/18 LC); 4,8-10,5 (pg/mL) (2/18 HR)
LTB-4	EIA	8,2 pg/mL	18 LC; 18 HR	100 µL	< 8,2 pg/mL
SP-C	ELISA	9,4 ng/mL	18 LC; 18 HR	100 µL	< 9,4 ng/mL

Tabella 10: Schema riassuntivo dei risultati ottenuti con l'analisi dell'EBC effettuata con spettrometria di massa e saggi immunoenzimatici; LC = soggetti con tumore al polmone; HR = soggetti forti fumatori ad elevato rischio di tumore

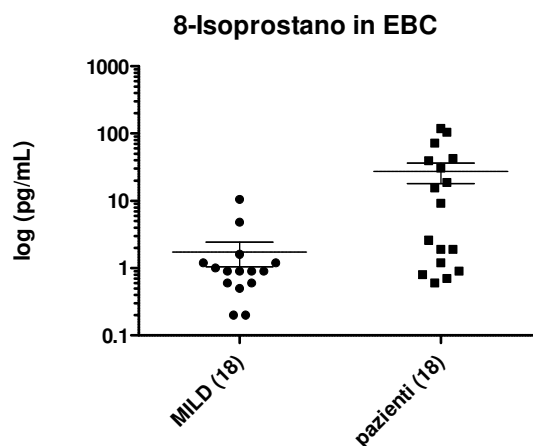


Figura 23: Rappresentazione grafica, ottenuta con software GraphPad, della distribuzione delle concentrazioni dell'8-isoprostano in EBC. I valori dei pazienti sono risultati significativamente piu' elevati rispetto a quelli dei soggetti a rischio (MILD)

## 4. CONCLUSIONI

Nel corso dell'attività di dottorato di ricerca sono stati utilizzati approcci di studio per identificare nuovi biomarcatori proteici plasmatici mirati allo sviluppo di sistemi diagnostici multiparametrici efficaci per la diagnosi precoce e non invasiva del tumore polmonare.

In un lavoro recentemente pubblicato abbiamo dimostrato che elevati livelli plasmatici della proteina di fase acuta SAA conferiscono un rischio 8 volte superiore per il tumore al polmone ai soggetti forti fumatori rispetto ai soggetti di controllo. Considerando l'infiammazione, lo stress ossidativo e la risposta immunitaria un quadro di eventi fisiologici che possono riflettere l'esordio e lo sviluppo del tumore polmonare, abbiamo ritenuto importante intraprendere uno studio sistematico di alcuni fattori potenzialmente coinvolti in questi processi e, quindi, focalizzare la nostra ricerca di biomarcatori sull'analisi di questi fattori.

A tale scopo, abbiamo effettuato la misurazione multiparametrica di 50 citochine e della PON1 plasmatica; abbiamo inoltre eseguito un profilo della composizione proteica delle proteine costituenti il condensato dell'esalato respiratorio, nonché l'analisi di alcune sue componenti, in particolare della Proteina Surfattante C, del Leucotriene B<sub>4</sub>, dell'8-Isoprostano e di 14 citochine.

Sono state complessivamente utilizzate diverse modalità d'analisi: il Bio-Plex Suspension Array System, l'ESI-MS/MS, l'ELISA, l'EIA ed il Western blot. I valori misurati delle citochine e della PON1 sono state messi in relazione statistica con la SAA e la funzionalità respiratoria (FEV<sub>1</sub>), le misurazioni effettuate sul condensato dell'espriato con la presenza/assenza di tumore polmonare.

L'analisi univariata dei dati ottenuti ha evidenziato una correlazione diretta tra le concentrazioni di SAA e delle citochine IL-12(p40) ( $r = 0.33$ ), GRO- $\alpha$  ( $r = 0.29$ ), HGF ( $r = 0.17$ ), MCP-3 ( $r = 0.18$ ), M-CSF ( $r = 0.21$ ), SCGF ( $r = 0.17$ ), SDF-1 $\alpha$  ( $r = 0.18$ ), IL-6 ( $r = 0.23$ ) e IP-10 ( $r = 0.2$ ) ed una correlazione inversa tra i valori di FEV<sub>1</sub> ed i livelli delle citochine GRO- $\alpha$  ( $r = -0.37$ ), HGF ( $r = -0.19$ ), MCP-3 ( $r = -0.21$ ),  $\beta$ -NGF ( $r = -0.21$ ), SCGF ( $r = -0.19$ ), MIG ( $r = -0.3$ ).

L'analisi multivariata (PCA) ha evidenziato un'associazione significativa tra le citochine SCGF, CTACK, MIF, MIG, IL-16 ed Eotaxin. Comunque l'associazione tra MIG e FEV<sub>1</sub> sembra essere la relazione più interessante osservata anche in una successiva analisi eseguita con un approccio analitico ottimizzato. Lo stesso tipo di analisi non ha invece confermato la relazione vista in precedenza fra SCGF e FEV<sub>1</sub>. I dati ottenuti sulla MIG saranno validati utilizzando una casistica più numerosa; la discrepanza di risultati ottenuti sulla SCGF verrà ulteriormente indagata e simultaneamente verrà fatta un'analisi genetica dei polimorfismi riguardanti il gene che si è visto influenzare la quantità plasmatica di proteina, per valutare se vi siano sbilanciamenti genetici che condizionano i risultati ottenuti.

Le nostre analisi hanno evidenziato la correlazione inversa tra PON1 e PCR ( $r = -0.3$ ), tra PON1 ed SAA ( $r = -0.25$ ) ed una correlazione diretta tra PON1 e FEV<sub>1</sub> ( $r = 0.36$ ). Questi risultati non sono stati riconfermati nelle analisi effettuate espandendo la casistica di plasmali analizzati. Successive indagini riguardano lo studio dei polimorfismi del gene della PON1 nel DNA circolante dei soggetti in studio, per una valutazione delle concentrazioni in relazione ai polimorfismi stessi.

I dati più interessanti ottenuti con gli studi sul condensato dell'esalato respiratorio sono quelli relativi all'8-Isoprostano, le cui concentrazioni nel condensato sono risultate chiaramente più elevate nei pazienti rispetto che nei controlli ( $p$ -value <

0.0001, con intervallo di confidenza al 99%, IC99%). Per gli altri analiti la quantificazione si è rivelata più difficoltosa, i valori sono risultati in generale sotto la soglia della sensibilità analitica, limite che in futuro potrà essere superato grazie al miglioramento delle procedure ed incrementando la numerosità del campione. Pensiamo quindi sia utile sviluppare ulteriormente la potenziale utilità della misurazione dell'8-Isoprostano.

In conclusione, grazie alla misurazione multifattoriale di proteine e metaboliti dell'infiammazione e dello stress ossidativo sistemico e locale (polmonare) e del danno funzionale respiratorio indotto dall'esposizione al fumo, si ritiene di avere individuato dei potenziali nuovi biomarcatori per la valutazione del rischio per il tumore al polmone.

La loro effettiva utilità clinica dovrà essere stabilita in studi futuri su un numero più elevato di soggetti.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Murray T., Thun M.J., "Cancer statistics, 2008", *CA Cancer Journal for Clinicians*, Vol. 58, n.2, 2008, pp. 71-96.
2. Alberg A.J., Ford J.G., Samet J.M., "Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2<sup>nd</sup> edition)", *Chest*, Vol. 132, n.3, 2007, pp. 29S-55S.
3. Coyle Y.M., Minahjuddin A.T., Hynan L.S., Minna J.D., "An ecological study of association of metal air pollutants with lung cancer incidence in Texas", *Journal of Thoracic Oncology*, Vol. 1, n. 7, 2006, pp. 654-661.
4. Chiu H.F., Cheng M.H., Tsai S.S. et al., "Outdoor air pollution and female lung cancer in Taiwan", *Inhalation Toxicology*, Vol. 18, n. 13, 2006, pp. 1025-1031.
5. Kabir Z., Bennet K., Clancy L., "Lung cancer and urban air-pollution in Dublin: a temporal association?", *Irish Medical Journal*, Vol. 100, n. 2, 2007, pp.367-369.
6. Biesalski H.K., Bueno de Mesquita B., Chesson A. et al., "European Consensus Statement on Lung Cancer: risk factors and prevention. Lung Cancer Panel. *CA Cancer Journal for Clinicians*, Vol. 48, n. 3, 1998, pp. 167-176.
7. US Department of Health and Human Services, "The health benefits of smoking cessation: a Report of the Surgeon general", Centres for Disease Control (CDC), Office on Smoking and Health, 1990, pp. vi, 130, 148, 152, 155, 164, 166.
8. Peto R., Lopez A.D., Boreham J. et al., **Mortality from smoking in developed countries 1950-2000: indirect estimates from National Vital Statistics**, Oxford University Press, 2006.
9. Asomaning K., "Second hand smoke, age of exposure and lung cancer risk", *Lung cancer*, Vol. 61, n. 1, 2008, pp. 13-20.
10. Hecht S., "Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer", *Nature Reviews. Cancer*, Vol. 3, n.10, 2003, pp. 733-744.
11. Sopori M., "Effects of cigarette smoke on the immune system", *Nature Reviews. Immunology*, Vol. 2, n. 5, 2002, pp. 372-377.
12. Nordquist L.T., Simon G.R., Cantor A. et al., "Improved survival in never-smokers vs current smokers with primary adenocarcinoma of the lung", *Chest*, Vol. 126, n. 2, 2004, pp. 347-351.
13. Catelinois O., Rogel A., Lauriel D., et al., "Lung cancer attributable to indoor radon exposure in France : Impact of the risk models and uncertainty analysis", *Environmental Health Perspectives*, Vol. 114, n. 9, 2006, pp. 1361-1366.
14. IARC, "Man-made minerals fibres and radon: IARC Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans", International Agency for Research on Cancer, Lyon, France , 1988, Vol. 43.
15. UK Childhood Cancer Study Investigators, "The United Kingdom Childhood Cancer Study of exposure to domestic sources of ionizing radiation: 1: radon gas", *British Journal of Cancer*, Vol. 86, 2002, pp. 1721-1726.

16. United Nation Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, "Sources and effects of ionizing radiation. UNSCEAR 2000 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes.", New York, NY, USA, 2000, Vol.I.
17. O'Reilly K.M., McLaughlin A.M., Beckett W.S., Sime P.J., "Asbestos-related lung disease.", *American Family Physician*, Vol. 75, n. 5, 2007, pp. 683-688.
18. Darnton A.J., McElvenny D.M., Hodgson J.T., "Estimating the number of asbestos-related lung cancer deaths in Great Britain from 1980 to 2000", *Annals of Occupational Hygiene*, Vol. 50, n. 1, 2006, pp. 29-38.
19. Carnevale F., Chellini E., "The diffusion of information on the carcinogenicity of asbestos in the Italian scientific community before 1965", *La Medicina del Lavoro*, Vol. 86, n. 4, 1995, pp. 295-302.
20. Nafstad P., Håheim L.L., Oftedal B., "Lung cancer and air pollution: a 27 year follow up of 16209 Norwegian men", *Thorax*, Vol. 58, 2003, pp. 1071-1076.
21. Yu I.T., Chiu Y.L., Au J.S., Wong T.W., Tang J.L., "Dose-response relationship between cooking fumes exposures and lung cancer among Chinese nonsmoking women", *Cancer Research*, Vol. 66, n. 9, 2006, pp. 4961-4967.
22. Amos C.I., Xu W., Spitz M.R., "Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility?", *Recent Results in Cancer Research*, Vol. 151, 1999, pp. 3-12.
23. Yohena T., Yoshino I., et al., "Relationship between the loss of heterozygosity and tobacco smoking in pulmonary adenocarcinoma", *Oncology Research*, Vol. 16, n. 7, 2007, pp. 333-339.
24. Garinis G.A., Gorgoulis V.G., et al., "Association of allelic loss at the FHIT locus and p53 alterations with tumor kinetics and chromosomal instability in non-small cell lung carcinomas (NSCLC)", *The Journal of Pathology*, Vol. 193, n. 1, 2001, pp.55-65.
25. Shah R., Sabanathan S., Richardson J., Mearns A.J., Goulden C., "Results of surgical treatment of stage I and II lung cancer", *Journal of Cardiovascular Surgery*, Vol. 37, n. 2, 1996, pp. 169-172.
26. Patz E.F.Jr., Rossi S., Harpole D.H. Jr., Herndon J.E., Goodman P.C., "Correlation of tumor size and survival in patients with stage IA non-smal cell lung cancer", *Chest*, Vol. 117, n. 6, 2000, pp. 1568-1571.
27. Melamed M.R., Flehinger B.J., et al., "Screening for early lung cancer. Results of the Memorial Sloan-Kettering study in New York", *Chest*, Vol. 86, n. 1, 1984, pp. 44-53.
28. Frost J.K., Ball W.C.Jr., et al., "Early lung cancer detection : results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Johns Hopkins study", *The American review of respiratory disease*, Vol. 130, n. 4, 1984, pp. 549-554.
29. Fontana R.S., Sanderson D.R., Taylor W.F., et al., "Early lung cancer detection : results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Mayo Clinic study", *The American review of respiratory disease*, Vol. 130, n. 4, 1984, pp. 561-565.
30. Soda H., Tomita H., Kohno S., Oka M., "Limitation of annual screening chest radiography for the diagnosis of lung cancer. A retrospective study", *Cancer*, Vol. 72, n. 8, 1993, pp. 2341-2346.

31. Henschke C.L., McCauley D.I., et al., "Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening", *The Lancet*, Vol. 354, n. 9173, 1999, pp. 99-105.
32. Pastorino U., Bellomi M., Landoni C., De Fiori E., Araldi P., Picchio M., Pelosi G., Boyle P., Fazio F., "Early lung-cancer detection with spiral CT and positron emission tomography in heavy smokers: 2-years results", *The Lancet*, Vol. 362, n. 9384, 2003, pp. 593-597.
33. Swensen S.J., Jett J.R. et al., "Lung cancer screening with CT: Mayo Clinic experience", *Radiology*, Vol. 226, n. 3, 2003, pp. 756-761.
34. Swensen S.J., Jett J.R., Hartman T.E., et al., "CT screening for lung cancer: five-years prospective experience", *Radiology*, Vol. 235, n. 1, 2005, pp. 259-265.
35. Crestanello J.A., Allen M.S., Jett J.R., Cassivi S.D. et al., "Thoracic surgical operations in patients enrolled in a computed tomographic screening trial", *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, Vol. 128, n. 2, 2004, pp. 254-259.
36. Lindell R.M., Hartman T.E., Swensen S.J., et al., "Five-years lung cancer screening experience: CT appearance, growth rate, location, and histologic features of 61 lung cancer", *Radiology*, Vol. 242, n. 2, 2007, pp. 555-562.
37. Humphrey L.L., Teutsch S., Johnson M., "Lung cancer screening with sputum cytologic examination, chest radiography, and computed tomography: an update for the U.S. Preventive Services Task Force", *Annals of Internal Medicine*, Vol. 140, n. 9, 2004, pp. 740-753.
38. Bach P.B., "Is our natural-history model of lung cancer wrong?", *The Lancet Oncology*, Vol. 9, n. 7, 2008, pp. 693-697.
39. Clark K.W., Gierarda D.S., et al., "Collecting 48000 CT exams for lung cancer screening study of the National Lung Screening Trial", *Journal of Digital Imaging*, Vol. 22, n. 6, 2008, pp. 667-680.
40. van den Bergh K.A., Essink-Bot M.L., et al., "Impact of computed tomography screening for lung cancer on participants in a randomized controlled trial (NELSON trial)", *Cancer*, Vol. 113, 2008, pp. 396-404.
41. van Klaveren R.J., Oudkerk M., et al., "Management of lung nodules detected by volume CT scanning", *The New England Journal of Medicine*, Vol. 361, 2009, pp. 2221-2229.
42. Pedersen J.H., Ashraf H., et al., "The Danish randomized lung cancer CT screening trial – overall design and results of the prevalence round", *Journal of Thoracic Oncology*, Vol. 4, 2009, pp. 608-614.
43. Becker N., Delorme S., Kauczor H.U., "LUSI: the German component of the European trial on the efficacy of multislice-CT for the early detection of lung cancer", *Onkologie*, Vol. 31, 2008, PO320.
44. Infante M., Lutman F.R., Cavuto S, et al., "Lung cancer screening with spiral CT: baseline results of the randomized DANTE trial", *Lung Cancer*, Vol. 59, 2008, pp. 355-363.
45. Lopes Pegna A., Picozzi G., et al., "Design recruitment and baseline results of the ITALUNG trial for lung cancer screening with low-dose CT", *Lung Cancer*, Vol. 64, n. 1, 2009, pp. 34-40.
46. Infante M., Cavuto S., Lutman F.R., et al., "A randomized study of lung cancer screening with spiral computed tomography (the DANTE Trial): three-

- year results", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 180, 2009, pp. 445-453.
47. Mountain C.F., "A new international staging system for lung cancer", *Chest*, Vol. 89, n.4, suppl. I, 1986, pp. 225S-233S.
48. Alberts W.M., "Introduction: Diagnosis and management of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2<sup>nd</sup> Edition)", *Chest*, Vol. 132, n. 3, 2007, pp. 20-22.
49. Pepe M.S., Etzioni R., et al., "Phases of biomarker development for early detection of lung cancer", *Journal of the National Cancer Institute (JNCI)*, Vol. 93, 2001, pp. 1054-1061.
50. Patz Jr E.F., Campa M.J., Gottlin E.B., et al., "Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer", *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 25, 2007, pp. 5578-5583.
51. Spira A., Beane J.E., Shah V., et al., "Airway epithelial gene expression in the diagnostic evaluation of smokers with suspect lung cancer", *Nature Medicine*, Vol. 13, 2007, pp. 361-366.
52. Qui J., Choi G., Li L., et al., "Occurrence of autoantibodies to annexin I, 14-3-3 theta and LAMR1 in prediagnostic lung cancer sera", *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 26, 2008, pp. 5060-5066.
53. Belinsky S.A., "Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer", *Nature Reviews Cancer*, Vol. 4, 2004, pp. 707-717.
54. Hokada M., Nishio W., Sakamoto T., Uchino K., Yuki T., Nakagawa A., Tsubota N., "Prognostic significance of perioperative serum carcinoembryonic antigen in nonsmall cell lung cancer: analysis of 1000 consecutive resections for clinical stage I disease", *The Annals of Thoracic Surgery*, Vol. 78, n. 1, 2004, pp. 216-221.
55. Schneider J., "Tumor markers in detection of lung cancer", *Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 42, 2006, pp. 1-41.
56. Kulpa J., Wojcik E., Reinfuss M., Kolodziejcki L., "Carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, CYFRA 21-1, and neuron-specific enolase in squamous cell lung cancer patients", *Clinical Chemistry*, Vol. 48 n. 11, 2002, pp. 1931-1937.
57. Ferrigno D., Buccheri G., Giordano C., "Neuron-specific enolase is an effective tumour marker in non-small cell lung cancer (NSCLC)", *Lung Cancer*, Vol. 41, n. 3, 2003, pp. 311-320.
58. Molina R., Filella X., Auge J.M., "ProGRP: a new biomarker for small cell lung cancer", *Clinical Biochemistry*, Vol. 37, n. 7, 2004, pp. 505-511.
59. Siemes C., Visser L.E., Coebergh J.W., Splinter T.A., Witteman J.C., Uitterlinden A.G., Hofman A., Pols H.A., Stricker B.H., "C-reactive protein levels, variation in the C-reactive protein gene, and cancer risk: the Rotterdam Study", *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 24, n. 33, 2006, pp. 5216-5222.
60. Chaturvedi A.K., Caporaso N.E., et al., "C-Reactive Protein and risk of lung cancer", *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 28, n. 16, 2010, pp. 2719-2726.
61. Montero-Martinez C., Nunez-Naviera L., et al., "Vascular endothelial growth factor (VEGF): a potential biomarker for early detection of non-small cell lung cancer (NSCLC) in risk subject", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 117, 2008, (Abstract issue) A310.



62. Blume-Jensen P., Hunter T., "Oncogenic Kinase signaling", *Nature*, Vol. 411, 2001, pp. 355-365.
63. Hirsh F.R., et al., "Epidermal growth factor receptor in non-small cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis", *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 21, n. 20, 2003, pp. 3798-3803.
64. Cho W.C., Yip T.T., et al., "Identification of serum amyloid A protein as a potentially useful biomarker to monitor relapse of nasopharyngeal cancer by serum proteomic profiling", *Clinical Cancer Research*, Vol. 10, 2004, pp. 43-52.
65. Maciel C.M., Junqueira M., et al., "Differential proteomic serum pattern of low molecular weight proteins expressed by adenocarcinoma lung cancer patients", *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, Vol. 5, 2005, pp. 31-38.
66. Huang L.J., Chen S.X., et al., "Proteomic-based identification of secreted protein dihydrodiol dehydrogenase as a novel serum markers of non-small cell lung cancer", *Lung Cancer*, Vol. 54, 2006, pp. 87-94.
67. Heo S.H., Lee S.J., et al., "Identification of putative serum glycoprotein biomarkers for human lung adenocarcinoma by multilectin affinity chromatography, and LC-MS/MS", *Proteomics*, Vol. 7, 2007, pp. 4292-4302.
68. Xue X., Zhu Y.M., Woll P.J., "Circulating DNA and lung cancer", *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1075, 2006, pp. 154-164.
69. Sozzi G., Conte D., Leon M., et al., "Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer", *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 21, 2003, pp. 3902-3908.
70. Sozzi G., Roz L., Conte D., et al., "Plasma DNA quantification in lung cancer computed tomography screening : five-years results of a prospective study", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 179, 2009, pp. 69-74.
71. Cuda G., Gallelli A., Nistico A., Tassone P., Barbieri V., Tagliaferri P.S., Costanzo F.S., Tranfa C.M., Venuta S., "Detection of microsatellite instability and loss of heterozygosity in serum DNA of small and non-small cell lung cancer patients: a tool for early diagnosis?", *Lung Cancer*, Vol. 30, n. 3, 2000, pp. 211-214.
72. Aviel-Ronen S., Blackhall F.H., Shepherd F.A., Tsao M.S., "K-ras mutations in nonsmall-cell lung carcinoma: a review", *Clinical Lung Cancer*, Vol. 8, n. 1, 2006, pp. 30-38.
73. Andriani F., Conte D., Mastrangelo T, et al., "Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers", *International Journal of Cancer*, Vol. 108, 2004, pp. 91-96.
74. El-Zein R.A., Schabath M.B., Etzel C.J., Lopez M.S., Franklin J.D., Spitz M.R., "Cytokinesis-blocked micronucleus assay as a novel biomarker for lung cancer risk", *Cancer Research*, Vol. 66, n. 12, 2006, pp. 6449-6456.
75. Phillips D.H., "DNA adducts as markers of exposure and risk", *Mutation Research*, Vol. 577, n. 1-2, 2005, pp. 284-292.
76. Marsit C.J., Okpukpara C., Danaee H., Kelsey K.T., "Epigenetic silencing of the PRSS3 putative tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer", *Molecular Carcinogenesis*, Vol. 44, n. 2, 2005, pp. 146-150.

77. Kim J.S., Kim J.W., Han J., Shim Y.M., Park J., Kim D.H., "Cohypermethylation of p16 and FHIT promoters as a prognostic factor of recurrence in surgically resected stage I non-small cell lung cancer", *Cancer Research*, Vol. 66, n. 8, 2006, pp. 4049-4054.
78. Miura N., Nakamura H., Sato R., Tsukamoto T., Harada T., Takahashi S., Adachi Y., Shomori K., Sano A., Kishimoto Y., Ito H., Hasegawa J., Shiota G., "Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer", *Cancer Science*, Vol. 97, n. 12, 2006, pp. 1366-1373.
79. Lin X., Gu J., Lu C., Spitz M.R., Wu X., "Expression of telomere-associated genes as prognostic markers for overall survival in patients with non-small cell lung cancer", *Clinical Cancer Research*, Vol. 12, n. 19, 2006, pp. 5720-5725.
80. Cho W.C., "OncomiRs: The discovery and progress of microRNAs in cancers", *Molecular Cancer*, Vol. 6, 2007, pp. 60.
81. Calin G.A., Croce C.M., "MicroRNA signatures in human cancer", *Nature Reviews Cancer*, Vol. 6, 2006, pp. 857-866.
82. Yanaihara N., Caplen N, et al., "Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis", *Cancer Cell*, Vol. 9, 2006, pp. 189-198.
83. Yu S.L., Chen H.Y., et al., "MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer", *Cancer Cell*, Vol. 10, 2008, pp. 48-57.
84. Hayashita Y., Osada H., et al., "A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation", *Cancer Research*, Vol. 65, 2005, pp. 9628-9632.
85. Wang Q.Z., Xu W., Habib N., Xu R., "Potential uses of microRNA in lung cancer diagnosis, prognosis, and therapy", *Current Cancer Drug Targets*, Vol. 9, 2009, pp. 572-594.
86. Chen X., Ba Y., et al., "Characterization of microRNA in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases", *Cell Research*, Vol. 18, 2008, pp. 997-1006.
87. Lebanony D., Benjamin H., et al., "Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small cell lung carcinoma", *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 27, 2009, pp. 2030-2037.
88. Crawford L.V., Pim D.C., Bulbrook R.D., "Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer", *International Journal of Cancer*, Vol. 30, n. 4, 1982, pp. 403-408.
89. Zhong L., Coe S.P., Stromberg A.J., Khattar N.H., Jett J.R., Hirschowitz E.A., "Profiling tumor-associated antibodies for early detection of non-small cell lung cancer", *Journal of Thoracic Oncology*, Vol. 1, n. 6, 2006, pp. 513-519.
90. Egloff A.M., Weissfeld J., Land S.R., Finn O.J., "Evaluation of anticyclin B1 serum antibody as a diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer", *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1062, 2005, pp. 29-40.
91. Madoz-Gurpide J., Kuick R., Wang H., Misek D.E., Hanash S.M., "Integral protein microarrays for the identification of lung cancer antigens in sera that induce a humoral immune response", *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 7, 2008, pp. 268-281.

92. Phillips M., Gleeson K., Hughes J.M., et al., "Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study", *The Lancet*, Vol. 353, 1999, pp. 1930-1933.
93. 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", *Respiratory Research*, Vol. 6, 2005, pp. 71.
94. Phillips M., Altorki N, Austin J.H., et al., "Detection of lung cancer using weighted digital analysis of breath biomarkers", *Clinica Chimica Acta*, Vol. 393, n. 2, 2008, pp. 76-84.
95. Peng G., Tisch U., Adams O., et al., "Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles", *Nature Nanotechnology*, Vol. 4, n. 10, 2009, pp. 669-673.
96. Hunt J.D., "Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol. 110, 2002, pp. 28-34.
97. Carpagnano G.E., Foschino-Barbaro M.P., et al., "Endothelin-1 is increased in the breath condensate of patients with non-small cell lung cancer", *Oncology*, Vol. 66, 2004, pp. 180-184.
98. Carpagnano G.E., Resta O, et al., "Interleukin-6 is increased in breath condensate of patients with non-small cell lung cancer", *The International Journal of Biological Markers*, Vol. 17, 2002, pp. 141-145.
99. Carpagnano G.E., Spanevello A., et al., "IL-2, TNF- $\alpha$ , and leptin: local versus systemic concentrations in NSCLC patients", *Oncology Research*, Vol. 16, 2007, pp. 375-381.
100. Gessner C., Kuhn H., et al., "Detection of p53 mutations in exhaled breath condensate of non-small cell lung cancer patients", *Lung Cancer*, Vol. 43, 2004, pp. 215-222.
101. Gessner C., "Detection of mutations of the K-ras gene in condensed breath of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) as a possible non-invasive screening method", *Pneumologie*, Vol. 52, 1998, pp. 426-427.
102. Carpagnano G.E., Foschino-Barbaro M.P., et al., "3p microsatellite alterations in exhaled breath condensate from patients with non-small cell lung cancer", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 172, 2005, pp. 738-744.
103. Anderson N.G., Anderson N.L., "Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present, and future", *Electrophoresis*, Vol. 17, n. 3, 1996, pp. 443-453.
104. Wong S.C., Chan C.M. et al., "Advanced proteomic strategies for cancer biomarker discovery", *Expert Review of Proteomics*, Vol. 6, n. 2, 2009, pp. 123-134.
105. Granville C.A., Dennis P.A., "An overview of lung cancer genomics and proteomics", *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, Vol. 32, n. 3, 2005, pp. 169-176.
106. Kikuchi T., Carbone D.P., "Proteomics analysis in lung cancer: challenges and opportunities", *Respirology*, Vol. 12, 2007, pp. 22-28.
107. Hu S., Loo J.A., Wong D.T., "Human body fluid proteome analysis", *Proteomics*, Vol. 6, n. 23, 2006, pp. 6326-6353.

108. Anderson N.L., Anderson N.G., "The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects", *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 1, n. 11, 2002, pp. 845-867.
109. Ping P., Vondriska T.M., Creighton C.J., Gandhi T.K., et al., "A functional annotation of subproteomes in human plasma", *Proteomics*, Vol. 5, n. 13, 2005, pp. 3506-3519.
110. States D.J., Omenn G.S., Blackwell T.W., Fermin D., Eng J., Speicher D.W., Hanash S.M., "Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study", *Nature Biotechnology*, Vol. 24, n. 3, 2006, pp. 333-338.
111. Zhang H., Liu A.Y., Loriaux P., Wollscheid B., Zhou Y., Watts J.D., Aebersold R., "Mass spectrometric detection of tissue proteins in plasma", *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 6, n. 1, 2007, pp. 64-71.
112. Nedelkov D., Kiernan U.A., Niederkofler E.E., Tubbs K.A., Nelson R.W., "Population proteomics: the concept, attributes, and potential for cancer biomarker research", *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 5, n. 10, 2006, pp. 1811-1818.
113. Niederkofler E.E., Tubbs K.A., Kiernan U.A., Nedelkov D., Nelson R.W., "Novel mass spectrometric immunoassays for the rapid structural characterization of plasma apolipoproteins", *Journal of Lipid Research*, Vol. 44 n. 3, 2003, pp. 630-639.
114. Kiernan U., Nedelkov D., Tubbs K., Niederkofler E., Nelson R., "Selected expression profiling of full-length proteins and their variants in human plasma", *Clinical Proteomics*, Vol. 1, n. 1, 2004, pp. 7-16.
115. Nelson R.W., Nedelkov D., Tubbs K.A., Kiernan U.A., "Quantitative mass spectrometric immunoassay of insulin like growth factor 1" *Journal of Proteome Research*, Vol. 3, n. 4, 2004, pp. 851-855.
116. Nedelkov D., Kiernan U.A., Niederkofler E.E., Tubbs K.A., Nelson R.W., "Investigating diversity in human plasma proteins", *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA*, Vol. 102, n. 31, 2005, pp. 10852-10857.
117. Nedelkov D., Phillips D.A., Tubbs K.A., Nelson R.W., "Investigation of human protein variants and their frequency in the general population", *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 6, n. 7, 2007, pp. 1183-1187.
118. Jensen L.E., Whitehead A.S., "Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response", *Biochemistry Journal*, Vol. 334, 1998, pp. 489-503.
119. Lin W.W., Karin M., "A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer", *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 117, 2007, pp. 1175-1183.
120. Smyth M.J., Cretney E., et al., "Cytokines in cancer immunity and immunotherapy", *Immunological Reviews*, Vol. 202, 2004, pp. 275-293.
121. Dranoff G., "Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy", *Nature Reviews Cancer*, Vol. 4, 2004, pp. 11-22.
122. Coussens L.M., Werb Z., "Inflammation and cancer", *Nature*, Vol. 420, n. 6917, 2002, pp. 860-867.
123. Ballaz S., Mulshine J.L., "The potential contributions of chronic inflammation to lung carcinogenesis", *Clinical Lung Cancer*, Vol. 5, n. 1, 2003, pp. 46-62.

124. Meneghin A., Hogaboam C.M., "Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis", *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 117, n. 3, 2007, pp. 530-538.
125. Weitzman S.A., Gordon L.I., "Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis", *Blood*, Vol. 76, n. 4, 1990, pp. 655-663.
126. Klaunig J.E., Kamendulis L.M., "The role of oxidative stress in carcinogenesis", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 44, 2004, pp. 239-267.
127. Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J. "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence", *Molecular & Cellular Biochemistry*, Vol. 266, 2004, pp. 37-56.
128. Stavrides J.C. "Lung carcinogenesis: pivotal role of metals in tobacco smoke", *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 41, 2006, pp. 1017-1030.
129. Risom L., Møller P., Loft S., "Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution", *Mutation Research*, Vol. 592, 2005, pp. 119-137.
130. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer", *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 160, n. 1, 2006, pp. 1-40.
131. Beyersmann D., Hartwig A., "Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms", *Archives of Toxicology*, Vol. 82, 2008, pp. 493-512.
132. Franco R., Schoneveld O., Georgakilas A.G., Panayiotidis M.I., "Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis", *Cancer Letters*, Vol. 266, 2008, pp. 6-11.
133. Miekisch W., Schubert J.K., Noeldge-Schomburg G.F., "Diagnostic potential of breath analysis: focus on volatile organic compounds", *Clinica Chimica Acta*, Vol. 347, 2004, pp. 25-39.
134. Meagher E.A., FitzGerald G.A., "Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitation", *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 28, 2000, pp. 1745-1750.
135. Lucrai W., Skrzydlewska E., "DNA damage caused by lipid peroxidation products", *Cellular and Molecular Biology Letters*, Vol. 8, 2003, pp. 391-413.
136. Clerkin J.S., Naughton R., Quiney C., Cotter T.G., "Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis", *Cancer Letters*, Vol. 266, 2008, pp. 30-36.
137. Ushio-Fukay M., Nakamura Y., "Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy", *Cancer Letters*, Vol. 266, 2008, pp. 37-52.
138. Pelicano H., Carney D., Huang P., "ROS stress in cancer cells and therapeutic implications", *Drug Resistance Updates*, Vol. 7, 2004, pp. 97-110.
139. Zieba M., Suwalski M., Kwiatkowska S., et al., "Comparison of hydrogen peroxide generation and the content of lipid peroxidation products in lung cancer tissue and pulmonary parenchyma", *Respiratory Medicine*, Vol. 94, 2000, pp. 800-805.
140. Zieba M., Nowak D., Suwalski M., Piasecka G., et al., "Enhanced lipid peroxidation in cancer tissue homogenates in non-small cell lung cancer", *Monaldi Archives for Chest Disease*, Vol. 56, 2001, pp. 110-114.

141. Azad N., Rojanasakul Y., Vallyathan V., "Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species", *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, Vol. 1, 2008, pp. 1-15.
141. Mayne S.T., Buenconsejo J., Dwight T., Janerich D.T., "Previous Lung Disease and Risk of Lung Cancer among Men and Women Nonsmokers", *American Journal of Epidemiology*, Vol. 149, 1999, pp. 13-20.
143. Lee G., Walzer T.C., Dubinett S.M., "Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer", *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, Vol. 15, 2009, pp. 303-307.
144. Mannino D.M., Aguayo S.M., Petty T.L., Redd S.C., "Low lung function and incident lung cancer in the United States: data From the First National Health and Nutrition Examination Survey follow-up", *Archives of Internal Medicine*, Vol. 163, 2003, pp. 1475-1480.
145. Yao H., Rahman I., "Current concepts on the role of inflammation in COPD and lung cancer", *Current Opinion in Pharmacology*, Vol. 9, 2009, pp. 375-383.
146. Kundu J.K., Surh Y.J., "Inflammation: gearing the journey to cancer", *Mutation Research*, Vol. 659, 2008, pp. 15-30.
147. Allavena P., Garlanda C., Borrello M.G., Sica A., Mantovan A., "Pathways connecting inflammation and cancer", *Current Opinion in Genetics & Development*, Vol. 18, 2008, pp. 3-10.
148. Rabe K.F., Hurd S., Anzueto A., et al., "Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 176, 2007, pp. 532-555.
149. Spurzem J.R., Rennard S.I., "Pathogenesis of COPD", *Seminars in Respiratory and Critical Care in Medicine*, Vol. 26, n. 2, 2005, pp. 142-53.
150. Bartal M., "COPD and tobacco smoke", *Monadi Archives for Chest Disease*, Vol. 63, 2005, pp. 213-225.
151. Repine J.E., Bast A., Lankhorst I., "Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease Oxidative Stress Study Group", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 156, 1997, pp. 341-357.
152. Hogg J.C., "Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease", *The Lancet*, Vol. 364, 2004, pp. 709-721.
153. Wasswa-Kintu S., Gan W.Q., et al., "Relationship between reduced forced expiratory volume in one second and the risk of lung cancer: a systemic review and meta-analysis", *Thorax*, Vol. 60, 2005, pp. 570-575.
154. Fletcher C., Peto K., "The natural history of chronic airflow obstruction", *British Medical Journal*, Vol. 1, 1977, pp. 1645-1648.
155. Cremona M., Calabro' E., Randi G., De Bortoli M., et al., "Elevated levels of the acute-phase serum amyloid A are associated with heightened lung cancer risk", *Cancer*, Vol. 116, n. 5, 2010, pp. 1326-1335.
156. Engels E.A., "Inflammation in the development of lung cancer: epidemiological evidence", *Expert Review of Anticancer Therapy*, Vol. 8, n. 4, 2008, pp. 605-615.
157. Urieli-Shoval S., Linke R.P., Matzner Y., "Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states", *Currentn Opinion in Hematology*, Vol. 7, 2000, pp. 64-69.

158. Patel H., Fellowes R., et al., "Human serum amyloid A has cytokine-like properties", *Scandinavian Journal of Immunology*, Vol. 48, 1998, pp. 410-418.
159. He R., Shepard L.W., et al., "Serum amyloid A is an endogenous ligand that differentially induces IL-12 and IL-23", *The Journal of Immunology*, Vol. 177, 2006, pp. 4072-4079.
160. Di Stefano A., Caramori G., et al., "Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview", *Clinical & Experimental Allergy*, Vol. 34, 2004, pp. 1156-1167.
161. Di Stefano A., Caramori G., et al., "Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD", *European Respiratory Journal*, Vol. 20, 2002, 556-563.
162. Hasnis E., Bar-Shai M., et al., "Cigarette smoke-induced NF-KB activation in human lymphocytes: the effects of low and high exposure to gas phase of cigarette smoke", *Journal of Physiology and Pharmacology*, Vol. 58, suppl. 5, 2007, pp. 263-274.
163. Hasnis E., Bar-Shai M., et al., "Mechanisms underlying cigarette smoke-induced NF-KB activation in human lymphocytes: the role of reactive nitrogen species", *Journal of Physiology and Pharmacology*, Vol. 58, suppl. 5, 2007, pp. 275-287.
164. Moodie F.M., Marwick J.A., Anderson C.S., et al., "Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF-kappaB activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells", *The FASEB Journal*, Vol. 18, 2004, pp. 1897-1899.
165. Szulakowski P., Crowther A.J., et al., "The effect of smoking on the transcriptional regulation of lung inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 174, 2006, 41-50.
166. De Vita F., Orditura M., et al., "Serum concentrations of proinflammatory cytokines in advanced non small cell lung cancer patients", *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, Vol. 17, n. 4, 1998, pp. 413-417.
167. Yamaguchi T., Yamamoto Y., et al., "Involvement of interleukin-6 in the elevation of plasma fibrinogen levels in lung cancer patients", *Japanese Journal of Clinical Oncology*, Vol. 28, n. 12, 1998, pp. 740-744.
168. McKeown D.J., Brown D.J.F., et al., "The relationship between circulating concentrations of C-reactive protein, inflammatory cytokines and cytokine receptors in patients with non-small-cell lung cancer", *British Journal of Cancer*, Vol. 91, 2004, pp. 1993-1995.
169. Naumnik W., Chyczewska E., et al., "Serum levels of interleukin-18 (IL-18) and soluble interleukin-2 receptor (sIL-12R) in lung cancer", *Rocz Akad Med Bialymst*, Vol. 49, 2004, pp. 246-251.
170. Tas F., Duranyildiz D., et al., "Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-8 (IL-8) levels in small cell lung cancer", *Cancer Investigation*, Vol. 24, n. 5, 2006, pp. 492-496.
171. Enewold L., Mechanic E.L., et al., "Serum concentrations of cytokines and lung cancer survival in African Americans and Caucasians", *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, Vol. 18, n. 1, 2009, pp. 215-223.
172. Su C., Zhou C., Zhou S., "Serum cytokine levels in patients with advanced non-small cell lung cancer: correlation with treatment response and survival", *Medical Oncology*, [Epub ahead of print].

173. Mosmann T.R., Fong T.A., "Specific assays for cytokine production by T cells", *Journal of Immunological Methods*, Vol. 116, 1989, pp. 151-158.
174. de Jager W., Rijkers G.T., "Solid-phase and bead-based cytokine immunoassay: a comparison", *Methods*, Vol. 38, 2006, pp. 294-303.
175. Fulton R.J., McDade R.L., et al., "Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system", *Clinical Chemistry*, Vol. 43, 1997, pp. 1749-1756.
176. Dullaart R.P., et al., "High plasma C-reactive protein is related to low paraoxonase I activity independently of high leptin and low adiponectin in type 2 diabetes mellitus", *Clinical Endocrinology (Oxf)*, Vol. 70, n. 2, 2009, pp. 221-226.
177. Kerridge I., et al., "Association between xenobiotic gene polymorphism and non-Hodgkin's lymphoma risk", *British Journal of Haematology*, Vol. 118, 2002, pp. 477-481.
178. De Roos A.J., et al., "Metabolic gene variants and risk of non-Hodgkin's lymphoma", *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, Vol. 15, n. 6, 2006, pp. 1647-1653.
179. Stevens V.L., et al., "Paraoxonase 1 (PON1) polymorphism and prostate cancer in the CPS-II Nutrition cohort", *Prostate*, Vol. 68, n. 12, 2008, pp. 1336-1340.
180. Stevens V.L., et al., "Association of polymorphism in the paraoxonase 1 gene with breast cancer incidence in CPS-II Nutrition cohort", *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, Vol. 15, n. 6, 2006, pp. 1226-1228.
181. Akcay M.N., et al., "Serum paraoxonase levels in gastric cancer", *Hepatology*, Vol. 50, suppl. 2, 2003, pp. cclxxiii-cclxxv.
182. Akcay M.N., et al., "Serum paraoxonase levels in pancreatic cancer", *Hepatology*, Vol. 50, suppl. 2, 2003, pp. cclxxv-cclxxvii.
183. Isik B., et al., "Oxidative stress in smokers and non-smokers", *Inhalation Toxicology*, Vol. 19, n. 9, 2007, pp. 767-769.
184. Elkiran E.T., et al., "Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population", *BMC Cancer*, Vol. 7, 2007, pp. 48.
185. Sakak Z.A., et al., "Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people", *Clinical and Experimental Medicine*, Vol. 5, 2005, pp. 99-105.
186. Petty T.L., "Are COPD and lung cancer two manifestations of the same disease?", *Chest*, Vol. 128, 2005, pp. 1895-1897.
187. Kishi K., et al., "The correlation of emphysema or airway obstruction with the risk of lung cancer: a matched case-controlled study", *European Respiratory Journal*, Vol. 19, 2002, pp. 1093-1098.
188. Nomura A., et al., "Prospective study of pulmonary function and lung cancer", *American Review Respiratory Disease*, Vol. 144, 1991, pp. 307-311.
189. Sillrud D.M., et al., "Higher risk of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, matched, controlled study", *Annals of Internal Medicine*, Vol. 105, 1986, pp. 503-507.
190. Van den Eeden S.K., et al., "Forced expiratory volume (1 second) and lung cancer incidence and mortality", *Epidemiology*, Vol. 3, 1992, pp. 253-257.
191. Mannino D.M., et al., "Low lung function and incident lung cancer in the United States: data from the first National Health and Nutrition Examination



- Survey follow-up”, *Archives of Internal Medicine*, Vol. 163, 2003, pp. 1475-1480.
- 192.Kuller L.H., et al., “Relation of forced expiratory volume in one second (FEV1) to lung cancer mortality in the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)”, *American Journal of Epidemiology*, Vol. 132, 1990, pp. 265-274.
- 193.Young R.P., et al., “Forced expiratory volume in one second: not just a lung function test but a marker of premature death from all causes”, *European Respiratory Journal*, Vol. 30, 2007, pp. 616-622.
- 194.Calabro’ E., et al., “Lung function predicts lung cancer risk in smokers: a tool for targeting screening programmes”, *European Respiratory Journal*, Vol. 35, 2010, pp. 146-151.
- 195.Gottlieb J., et al., “Heritability of longitudinal change in lung function: the Framingham Study”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 164, 2001, pp. 1655-1659.
- 196.Young R.P., et al., “Pharmacological actions of statins: potential utility in COPD”, *European Respiratory Review*, Vol. 18, 2009, pp. 222-232.
- 197.Kharitonov S.A., Barnes P.J., “Exhaled markers of pulmonary disease”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 163, 2001, pp. 1693–1722.
- 198.Cepelak I., Dodig S., “Exhaled breath condensate: a new method for lung disease diagnosis”, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Vol. 45, 2007, pp. 945-952.
- 199.Goldoni M., Caglieri A., Andreoli, et al., “Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters”, *BMC Pulmonary Medicine*, Vol. 5, 2005, pp. 10.
- 200.Horváth I., Hunt J., et al., “ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions”, *European Respiratory Journal*, Vol. 26, 2005, pp. 523-548.
- 201.Hunt J.D., “Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol. 110, 2002, pp. 28-34.
- 202.Kostikas K., Papatheodorou G., et al., “pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 165, 2002, pp. 1364-1370.
- 203.Borrill Z.L., et al., “Exhaled breath condensate biomarkers in COPD”, *European Respiratory Journal*, Vol. 32, 2008, pp. 472–486.
- 204.Psathakis K., et al., “Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis”, *European Journal of Clinical Investigations*, Vol. 36, 2006, pp. 362-367.
- 205.Dalaveris E., et al., “VEGF, TNF-alpha and 8-isoprostane levels in exhaled breath condensate and serum of patients with lung cancer”, *Lung Cancer*, Vol. 64, 2009, pp. 219-225.
- 206.Jobson J.D., **Applied Multivariate Data Analysis : Volume II: Categorical and Multivariate Methods**, Springer Verlag, 1992.
- 207.Lee S.K., et al., “Simultaneous measurement of 23 plasma cytokines in late-life depression”, *Neurological Sciences*, Vol. 30, 2009, pp. 435-438.

- 208.Khan H.I., et al., "Comparison of multiplex suspension array large-panel kits for profiling cytokines and chemokines in rheumatoid arthritis patients", *Clinical Cytometry*, Vol. 76B, 2009, pp. 159-168.
- 209.Yurkovetsky R.Z., et al., "Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon- $\alpha$ 2b", *Clinical Cancer Research*, Vol. 13, n.8, 2007, pp. 2422-2448.
- 210.Connelly P.W., Maguire G.F., et al., "Development of an immunoblot assay with infrared fluorescence to quantify paraoxonase 1 in serum and plasma", *Journal of Lipid Research*, Vol. 49, 2008, pp. 245-250.
- 211.Kuo C.L., La Du B.N., "Comparison of purified human and rabbit serum paraoxonase", *Drug Metabolism and Disposition*, Vol. 23, 1995, pp.935-944.