



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

Τοξικολογία

Βουγέλλη Αγάπη

Χημικός

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ GC-MS ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ
ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟΝ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟ ΑΕΡΑ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΩΡΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΤΣΑΚΑΛΩΦ ΑΝΔΡΕΑΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ,
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΤΣΑΚΑΛΩΦ ΑΝΔΡΕΑΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ,
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΚΟΥΡΕΑΣ ΜΙΧΑΗΛ, ΜΕΤΑΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ,
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΧΑΤΖΗΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ ΧΡΗΣΤΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Τσακάλωφ Ανδρέα, για την ανάθεση του θέματος αυτού καθώς και όλη την καθοδήγηση και βοήθειά του κατά τη διάρκεια εκπόνησής του.

Επίσης, ευχαριστώ τον κύριο Κουρέα Μιχαήλ, χωρίς την υποστήριξη του οποίου, τόσο σε θεωρητικό όσο και πρακτικό επίπεδο, δε θα ήταν δυνατή η εκπόνηση και συγγραφή της παρούσης εργασίας, όπως και τον κύριο Χατζηχριστοδούλου Χρήστο που αποτέλεσε μέλος της επιστημονικής μου επιτροπής.

Τέλος, την οικογένειά μου για όλη τη συμπαράσταση, κατανόηση και ενθάρρυνσή τους σε κάθε στάδιο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Η έγκαιρη διάγνωση συνδέεται με σημαντικά βελτιωμένη πρόγνωση σε αντίθεση με τη διάγνωση σε προχωρημένο στάδιο. Διαγνωστικές μέθοδοι όπως η αξονική τομογραφία, η βρογχοσκόπηση και η βιοψία, παρουσιάζουν κινδύνους αλλά και σημαντικό κόστος. Σήμερα η ενόργανη ανάλυση του μεταβολικού προφίλ της ανθρώπινης εκπνοής αναδύεται ως μια πολύ υποσχόμενη, μη επεμβατική μέθοδος για την παρακολούθηση της υγείας του ανθρώπου και τον προσυμπτωματικό έλεγχο νοσημάτων. Η αλλοίωση του μεταβολισμού κατά την ανάπτυξη της νόσου οδηγεί στην αλλαγή του μεταβολικού προφίλ του εκπνεόμενου αέρα και αλλαγές στα επίπεδα μεταβολιτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την ανίχνευση και παρακολούθηση της νόσου

Στόχος της εργασίας

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και η πιλοτική εφαρμογή αναλυτικής μεθοδολογίας βασισμένης στην αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών για την στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα με τον ποσοτικό προσδιορισμό 20 πτητικών οργανικών ενώσεων (ΠΟΕ) που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως πιθανοί βίο-δείκτες του καρκίνου του πνεύμονα.

Μεθοδολογία

Η μεθοδολογία ανάλυσης που αναπτύχθηκε περιλαμβάνει τα στάδια: 1) δειγματοληψίας του εκπνεόμενου αέρα (1L Tedlar® bags), 2) απομόνωσης και προσυγκέντρωσης των αναλυτών με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (ίνες Carboxen/Polydimethylsiloxane), 3) ενόργανης ανάλυσης με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (Finnigan Trace GC Ultra/PolarisQ MSn). Σχετικά με την εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα εκπνοής, η συλλογή των δεδομένων που αφορούσαν σε δημογραφικά χαρακτηριστικά, ιατρικό ιστορικό, συνήθειες (κάπνισμα διατροφή, αλκοόλ) και δείκτη μάζας σώματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ερωτηματολογίων. Για την ανίχνευση συσχετίσεων, μεταξύ των συγκεντρώσεων των ΠΟΕ και των χαρακτηριστικών του πληθυσμιακού δείγματος χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες Mann-Whitney και student's t-test, οι συντελεστές συσχέτισης spearman και pearson και η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης. Ως στατιστικώς σημαντικά θεωρήθηκαν τα ευρήματα με τιμή $p\text{-value} < 0.05$.

Αποτελέσματα

Η μέθοδος παρουσιάζει καλή γραμμικότητα ($R^2 \geq 0.99$) σε ένα εύρος συγκεντρώσεων δύο τάξεων μεγέθους ενώ η ευαισθησία επιτρέπει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων σε πραγματικά δείγματα (όρια ανίχνευσης (LOD) $\div 0.11\text{-}14.14 \text{ ng/l αέρα}$). Παράλληλα με τις 20 ουσίες στόχους, ταυτοποιήθηκαν και οι ενώσεις 3-methylfuran και 2,5-dimethylfuran μετά από μελέτη του φάσματος των κορυφών σε πραγματικά δείγματα που προέρχονταν από καπνιστές. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από αποδεκτή ενδοημερήσια (intraday) και ημερήσια (interday) επαναληψιμότητα για την πλειονότητα των ουσιών (CV a(slope) $\div 3.51\text{-}22,34\%$) και ικανοποιητική ακρίβεια. Η πλειονότητα των ουσιών ήταν ανιχνεύσιμες στο πληθυσμιακό

δείγμα που μελετήθηκε (n=28) με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να παρουσιάζονται στις ουσίες ακετόνη (3247 ng/l, IQR: 1722-4684), ισοπρένιο (810 ng/l, IQR: 693-1072) και ισοπροπανόλη (245 ng/l, IQR: 138-696). Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε μια σειρά συσχετίσεων των επιπέδων των ΠΟΕ με χαρακτηριστικά και συνήθειες του πληθυσμού. Συγκεκριμένα η καπνιστική συνήθεια είχε πολύ ισχυρή σχέση με τις συγκεντρώσεις βενζολίου (p<0.001), 3-μεθυλφουρανίου (p<0.001), 2,5-μεθυλφουρανίου(p=0.002) και οκτανίου (p=0.031), αναδεικνύοντας τη δυνατότητα διάκρισης καπνιστών/μη καπνιστών μέσω της ανάλυσης της εκπνοής. Επιπλέον, η ηλικία συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα της ακετόνης(β:-119.72, p=0.002), του τολουολίου (β:-1.11, p=0.005), του εθυλ-βουτυρικού εστέρα (β:-0.25, p=0.024), και του εθυλ-βενζολίου (β:0.125, p=0.004), Ενώ το ΒΜΙ συσχετίστηκε αρνητικά με την ακετόνη (β:-207.23, p=0.003) και θετικά με το ισοπρένιο (β:22,78,p=0.029).

Συμπεράσματα

Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε χαρακτηρίζεται από χαμηλά όρια ανίχνευσης, καλή γραμμικότητα, αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα και μπορεί να βρει πρακτική εφαρμογή σε επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες για την μελέτη του μεταβολικού προφίλ της ανθρώπινης εκπνοής σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα.

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

ΠΟΕ: Πτητικές Οργανικές Ενώσεις

CAR/PDMS: Carboxen/Dimethylsiloxane

GC-MS: Gas Chromatography- Mass Spectrometry

LDCT: Low Dose Computed Tomography

LOD: Limit of Detection

LOQ: Limit of Quantitation

NTME: Needle Trap Microextraction

PTR-MS: Proton Transfer Reaction- Mass Spectrometry

SIFT-MS: Selected Ion Flow Tube- Mass Spectrometry

SPE: Solid Phase Extraction

SPME: Solid Phase Microextraction

VOC: Volatile Organic Compound

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1.Εισαγωγή

1.1.1 Ο καρκίνος ως κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως

1.1.2 Διάγνωση του καρκίνου

1.2 Η ανθρώπινη εκπνοή στη διάγνωση ασθενειών

1.2.1 Σύσταση της ανθρώπινης εκπνοής

1.2.2 Φάσεις της ανθρώπινης εκπνοής

1.3 Πτητικές Οργανικές Ενώσεις (ΠΟΕ)

1.3.1 Κανονικά βιοχημικά μονοπάτια προέλευσης των ΠΟΕ

1.3.2 Βιοχημικά μονοπάτια ορισμένων ΠΟΕ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2.1 Μέθοδοι δειγματοληψίας του εκπνεόμενου αέρα

2.1.1 Σάκοι δειγματοληψίας

2.1.2 Bio-VOC δειγματολήπτης (Bio-VOC sampler)

2.1.3 Μεταλλικές φιάλες

- 2.1.4 Γυάλινες φιάλες
- 2.2 Μέθοδοι δειγματοληψίας πολλαπλής αναπνοής/ Θερμική εκρόφιση
 - 2.2.1 Μικροεκχύλιση με προσρόφιση σε υλικό τοποθετημένο σε βελόνα (Needle trap microextraction / NTME)
 - 2.2.2 ReCIVA δειγματολήπτης εκπνεόμενου αέρα (ReCIVA breath sampler)
- 2.3 Απομόνωση και προσυγκέντρωση των πτητικών οργανικών ενώσεων με τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction-SPME)
 - 2.3.1 Τα πλεονεκτήματα της SPME
 - 2.3.2 Επικαλύψεις (coatings) της SPME
 - 2.3.3 Λειτουργία της SPME

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

- 3. Μέθοδοι ενόργανης ανάλυσης των ΠΟΕ στον εκπνεόμενο αέρα
 - 3.1 Φασματομετρία μαζών με ιοντισμό μεταφοράς πρωτονίου (PTR-MS)
 - 3.2 Φασματομετρία μάζας – σωλήνας ροής επιλεγμένων ιόντων (SIFT-MS)
 - 3.3 Αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μαζών (GC-MS)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

- 4. Ανασκόπηση μελετών με στόχο τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα μέσω του προσδιορισμού ΠΟΕ στον εκπνεόμενο αέρα.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1. Πειραματικό μέρος

1.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

1.2. Απομόνωση αναλυτών από μίγμα αέρα

1.2.1 Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών απομόνωσης αναλυτών

1.3 Ενόργανη ανάλυση/ Επιλογή παραμέτρων GC-MS

1.4 Πρωτόκολλο ανάλυσης

1.5 Ευαισθησία, επαναληψιμότητα και γραμμικότητα της μεθόδου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. Πιλοτική εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. Συμπεράσματα

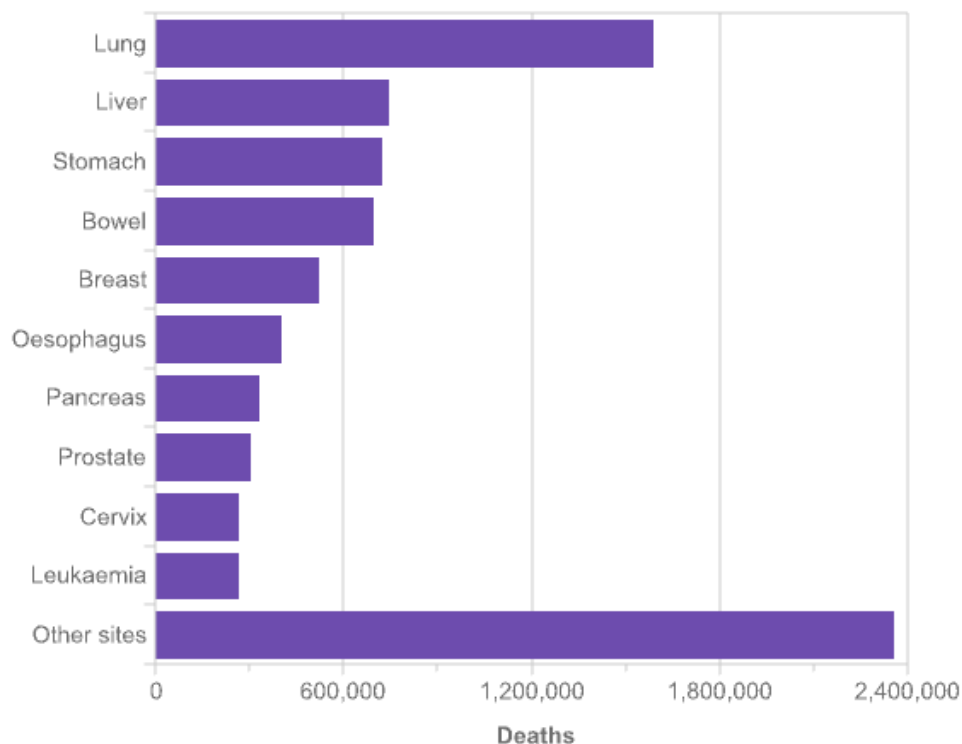
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.1 Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΩΣ ΚΥΡΙΑ ΑΙΤΙΑ ΘΑΝΑΤΟΥ ΠΑΓΚΟΣΜΙΩΣ

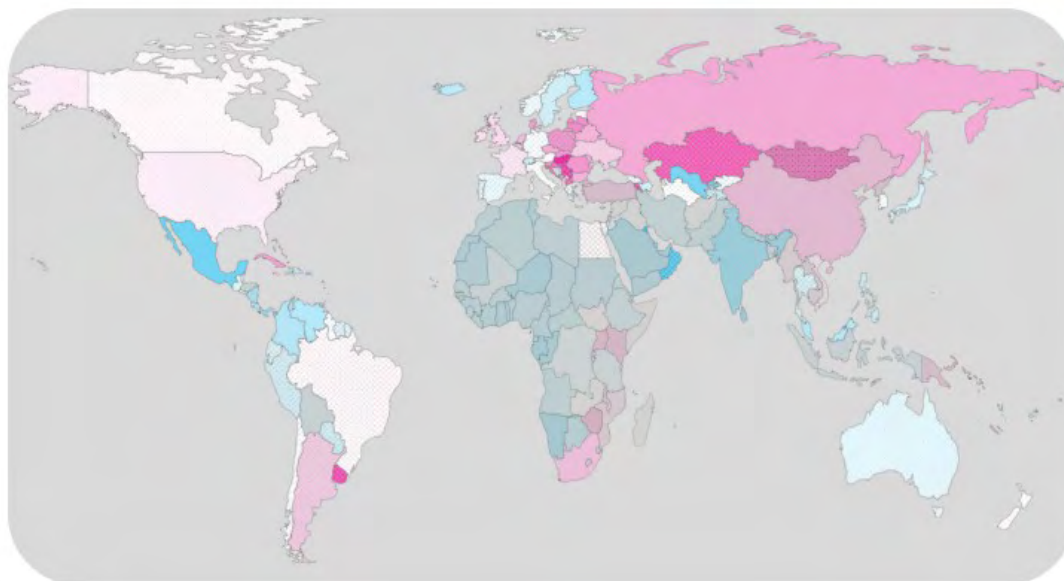
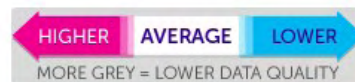
Σύμφωνα με στοιχεία του Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) για το 2018, υπολογίστηκαν περίπου 18,1 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου παγκοσμίως, καθιστώντας τον μία από τις κύριες αιτίες θανάτου. Μεταξύ των διαφόρων τύπων, ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί τον πιο συνήθη και στα δύο φύλα, με τη μεγαλύτερη θνησιμότητα αφού προκαλεί το 18,4% των συνολικών θανάτων που οφείλονται σε καρκίνο.^[1] Ακολουθούν ο καρκίνος του στήθους για τις γυναίκες και ο καρκίνος του προστάτη για τους άνδρες, ενώ αρκετά συχνοί είναι και ο καρκίνος του στομάχου και του ήπατος.^[1] Βάσει μελετών παρατηρήθηκε πως ειδικά για τον καρκίνο του πνεύμονα, η συχνότητα εμφάνισής του σε άνδρες στην ευρύτερη περιοχή των Ηνωμένων Πολιτειών μειώνεται συνεχώς από τη δεκαετία του 1980 , σε αντίθεση με την περίπτωση των γυναικών όπου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση από το 1975 έως το 2005, μετά το οποίο σταδιακά μειώνεται.^[2] Τα δεδομένα αυτά μπορούν να ερμηνευθούν εάν ληφθεί υπόψη η διαφορά στην καπνιστική συνήθεια μεταξύ ανδρών και γυναικών: είναι γνωστό ότι οι γυναίκες ξεκίνησαν το κάπνισμα σε μετέπειτα εποχή και σε κατά κανόνα μεγαλύτερη ηλικία ενώ έχει παρατηρηθεί ότι το σταματούν με μεγαλύτερη δυσκολία σε σχέση με τους άνδρες.^{[3][4]} Στην εικόνα 1.1.1, παρουσιάζονται οι 10 πιο συνήθεις τύποι καρκίνου με υψηλή θνησιμότητα σε παγκόσμιο επίπεδο, με βάση στατιστικές του Cancer Research UK για το 2012.



Εικόνα 1.1.1: Οι 10 πιο συήθειες τύποι καρκίνου με υψηλή θνησιμότητα παγκοσμίως. (Cancer Research UK, 2012, ανακτήθηκε στις 15/07/2018 από <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/mortality>)

Ένα μεγάλο ποσοστό των θανάτων που προκαλούνται από τον καρκίνο, οφείλεται σε έναν ή περισσότερους από τους εξής παράγοντες κινδύνου: αυξημένο σωματικό βάρος, μειωμένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, κάπνισμα ή κατάχρηση αλκοόλ. Σε μικρότερο ποσοστό, οι θάνατοι οφείλονται στην κληρονομικότητα του καρκίνου. Τα ποσοστά αυτά διαφέρουν ανάλογα με τη χώρα και την περιοχή, σύμφωνα με εκτιμήσεις του Cancer Research UK. Στην εικόνα 1.1.2, παρουσιάζεται η θνησιμότητα ανά χώρα παγκοσμίως αναφορικά με τον καρκίνο ανεξαρτήτως τύπου, ενώ στη συνέχεια παρουσιάζονται οι διάφοροι τύποι σε σειρά φθίνουσας πρόκλησης θανάτων. Για την εκτίμηση της συχνότητας εμφάνισης και της θνησιμότητας, λαμβάνονται πάντα υπόψη το μέγεθος του πληθυσμού, το φύλο των ατόμων καθώς και η ηλικία τους.

Cancer mortality – Worldwide



Worldwide cancer mortality — 8,201,030 cancer deaths per year:

Lung	Stomach	Oesophagus	Leukaemia	Kidney	Nas... KS
			NHL	Gallbla...	Thy... HL
Liver	Bowel	Pancreas	Brain	Pharynx	Others
	Breast	Prostate	Bladder	Larynx	
Cervix		Lip	Ovary	Myeloma	
				Uterus	
				Melan...	

Εικόνα 1.1.2 : Θνησιμότητα ανά χώρα παγκοσμίως αρχικά ανεξάρτητα του τύπου του καρκίνου και στη συνέχεια για κάθε είδος ξεχωριστά. Η σειρά καταγραφής των τύπων στη δεύτερη περίπτωση είναι με βάση τη φθίνουσα σειρά πρόκλησης θανάτων σε παγκόσμιο επίπεδο. (Cancer Research UK, 2012, , ανακτήθηκε στις 15/07/2018 από <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer-mortality>)

Πιο συγκεκριμένα για τον καρκίνο του πνεύμονα, που εξετάζεται στην παρούσα εργασία, θεωρείται ότι υπάρχουν τρία διαφορετικά είδη: μη μικροκυτταρικού τύπου, μικροκυτταρικού τύπου και καρκινοειδής όγκος. Είναι απαραίτητη η γνώση της εκάστοτε κατηγορίας του καρκίνου, προκειμένου να γίνει σωστή πρόγνωση και εφαρμογή της κατάλληλης θεραπείας. (American Cancer Society, ανακτήθηκε στις 2/10/2018 από <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer.html>)

Ο καρκίνος μη μικροκυτταρικού τύπου, είναι ο πιο συνήθης, καταλαμβάνοντας το 85% περίπου, των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα παγκοσμίως. Υποκατηγορίες του, αποτελούν το αδenoκαρκίνωμα, το πλακώδες καρκίνωμα και ο καρκίνος μεγαλοκυτταρικού τύπου.

Στην κατηγορία μικροκυτταρικού τύπου, περιλαμβάνεται το 10-15% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα και είναι ο τύπος που εξαπλώνεται πιο εύκολα και γρήγορα.

Τέλος, ο καρκινοειδής όγκος, είναι η πιο σπάνια κατηγορία, με λιγότερο από 5% συχνότητα εμφάνισης. Συνήθως, εξαπλώνεται πιο σπάνια και μεγαλώνει πολύ αργά.

Περίπου το 20% των ατόμων που πεθαίνουν από καρκίνο του πνεύμονα ετησίως στην Αμερική, είναι μη καπνιστές, σύμφωνα με την American Cancer Society. Κυριότερες αιτίες, θεωρούνται το παθητικό κάπνισμα, η έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες στον επαγγελματικό χώρο, η μόλυνση της ατμόσφαιρας και πιθανές γενετικές μεταλλάξεις που οφείλονται κατά κύριο λόγο στον τρόπο ζωής. (American Cancer Society, 2017, Lung Cancer Risks for Non-Smokers, ανακτήθηκε στις 2/10/2018 από <https://www.cancer.org/latest-news/why-lung-cancer-strikes-nonsmokers.html>)

1.1.2 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Υπάρχουν δύο βασικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην πολύ αρνητική πρόγνωση για την εξέλιξη κάθε νόσου και ιδιαίτερα του καρκίνου. Αυτοί είναι: (α) Η καθυστερημένη διάγνωση, η οποία συνήθως εκτελείται με επεμβατικές και δαπανηρές διαδικασίες, όταν οι ασθενείς έχουν ήδη φτάσει σε απειλητική για τη ζωή στάδιο και (β) η κρίσιμη έλλειψη ιατρικών και εργαστηριακών υποδομών. Ως εκ τούτου, υπάρχει επείγουσα ανάγκη για ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών μεθοδολογιών διάγνωσης, ιδίως εκείνων που εντοπίζουν αξιόπιστα τις ασθένειες στα αρχικά στάδιά τους και είναι εύκολα εφαρμόσιμες και για προληπτική σάρωση (screening) του πληθυσμού. Η ανάλυση των πτητικών οργανικών ενώσεων (ΠΟΕ) στον εκπνεόμενο αέρα είναι μια νέα υποσχόμενη μεθοδολογία που καλύπτει αυτές τις απαιτήσεις.

Ανάλογα με το στάδιο αλλά και τον τύπο του καρκίνου, στην κλινική πράξη εφαρμόζονται διαφορετικές τεχνικές διάγνωσης. Μερικές από αυτές είναι οι εξετάσεις αίματος, οι ακτινογραφίες, οι μαστογραφίες, οι μαγνητικές τομογραφίες και άλλες. Με το συνδυασμό ορισμένων από αυτές, είναι δυνατός ο προσδιορισμός του ακριβούς σημείου και μεγέθους του όγκου, ωστόσο για την περαιτέρω επιβεβαίωση, απαιτείται στις περισσότερες περιπτώσεις, η πραγματοποίηση βιοψίας. Δυστυχώς, η τεχνική αυτή έχει συχνά ανεπιθύμητες επιπτώσεις στους ασθενείς και ειδικότερα στις περιπτώσεις του καρκίνου ήπατος ή πνεύμονα, όπου η πιθανότητα θανάτου είναι αυξημένη λόγω αιμορραγίας.

Για τον καρκίνο του πνεύμονα, υπάρχουν πέντε βασικές μέθοδοι ελέγχου για την πρόωρη διάγνωσή του:

1. Ακτινογραφία θώρακος

Αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μορφή ακτινογραφίας, όπου μια μικρή δόση ιονίζουσας ακτινοβολίας, εφαρμόζεται για την παραγωγή εικόνας στο εσωτερικό του σώματος. Πρόκειται για μια αρκετά κοινή και γρήγορη μέθοδο, απαραίτητη σε περιπτώσεις όπου υπάρχει η ανάγκη για άμεση διάγνωση. Επιπλέον, έχει χαμηλό κόστος και ελάχιστες έως μηδενικές επιπτώσεις. Παρά το γεγονός ότι σα μέθοδος έχει μεγάλη εξέλιξη τα τελευταία χρόνια με τη χρήση υψηλής ανάλυσης ακτινών, το μικρότερο δυνατό μέγεθος που μπορεί να ανιχνευτεί είναι 1 με 2 εκατοστά. Επιπλέον, τα ποσοστά ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, κυμαίνονται από 10 έως 20%. (Ανακτήθηκε στις 12/01/2019 από <https://www.itnonline.com/article/lung-screening-x-ray-or-ct-which-one-better-detects-lung-cancer>)

2. Χαμηλής δόσης αξονική τομογραφία (LDCT)

Είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται κυρίως σε άτομα με αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα, που ωστόσο δεν εμφανίζουν συμπτώματα της νόσου. Η αύξηση της συχνότητας χρήσης της, οφείλεται στα πλεονεκτήματα που παρατηρήθηκαν από διάφορες μελέτες ([Wang, Liu, Shen, Li, Chen and Wang](#)^[5]) όπως είναι η αυξημένη πιθανότητα πρόωρης διάγνωσης σε σχέση με άλλες μεθόδους, καθώς και η δυνατότητα διάγνωσης όγκων πολύ μικρού μεγέθους. Από την άλλη, βασικό της μειονέκτημα είναι η πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων κι η σχετικά μειωμένη ειδικότητα της μεθόδου αυτής. Απόδειξη αποτελεί μία μελέτη, κατά την οποία εντοπίστηκαν ογκίδια στο 78% περίπου των συμμετεχόντων, ενώ μόνο το 4% αυτών είχαν τελικά καρκίνο του πνεύμονα^[6]

3. Βιοδείκτες ορού

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για να ελαττώσει τα βασικά μειονεκτήματα της LDCT, δηλαδή τη μειωμένη ειδικότητα και τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα και βασίζεται στις ιδιότητες του καρκίνου. Για την ανάπτυξη ενός κακοήθους όγκου, παράγονται και εκκρίνονται στην κυκλοφορία του αίματος, πρωτεΐνες και κύτταρα, απαραίτητα για την εξάπλωση και μετάστασή του. Έτσι, οι πρωτεΐνες του ορού, χρησιμοποιούνται για τη διάκριση μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων, ούτως ώστε να μπορεί με βάση αυτές να γίνει έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου.^[7]

4. Ανάλυση των πτητικών οργανικών ενώσεων (ΠΟΕ) της ανθρώπινης εκπνοής

Οι ΠΟΕ αποτελούν μία κατηγορία κλινικών βιοδεικτών που δε βρίσκει ακόμα άμεση εφαρμογή, ωστόσο παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον ως μέθοδος διάγνωσης ασθενειών, για λόγους που θα αναφερθούν παρακάτω. Είναι ενώσεις παρούσες στην εκπνοή, η συγκέντρωση και το προφίλ των οποίων διαφέρουν μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων. Με την ανίχνευση αυτών, είναι εφικτή η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, χωρίς τα μειονεκτήματα των προηγούμενων μεθόδων.

5. Βρογχοσκόπηση και βιοψία

Η βρογχοσκόπηση είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται όταν έχει ήδη ανιχνευτεί μέσω ακτινογραφίας ή αξονικής τομογραφίας κάποιος όγκος στον πνεύμονα. Κατά τη διάρκειά της, λαμβάνεται ένα δείγμα κυττάρων (βιοψία) μέσω του βρογχοσκοπίου και εξετάζεται με μικροσκόπιο για την ύπαρξη κακοήθειας. Η διαδικασία αυτή είναι αρκετά απλή και σύντομη, με καλή ακρίβεια αποτελεσμάτων, ωστόσο για τους ασθενείς μπορεί να αποβεί πολύ άβολη. Υπάρχουν και άλλοι τύποι βιοψίας για τους όγκους στον πνεύμονα, όπως είναι η χρήση βελόνας που εισέρχεται στον οργανισμό μέσω του δέρματος (needle biopsy) ή η χειρουργική βιοψία, όπου δημιουργούνται μικρές τομές για τη λήψη δειγμάτων του όγκου.

1.2 Η ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΕΚΠΝΟΗ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ

Από τα αρχαία χρόνια η ανθρώπινη αναπνοή βρήκε εφαρμογή στη διάγνωση ασθενειών, όπως ο διαβήτης και η ηπατική ανεπάρκεια, όταν έγιναν αντιληπτές χαρακτηριστικές οσμές στην αναπνοή ανθρώπων που νοσούσαν. Πλέον είναι γνωστό ότι οι οσμές αυτές, οφείλονται στο πλήθος των ουσιών που είναι παρούσες στην ανθρώπινη εκπνοή. Στην εικόνα 1.2.1 παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές οσμές που συνδέονται με παθολογικές καταστάσεις.

Disease type	Body source	Descriptive aroma (odors)
Diabetes	Breath	Fingernail polish remover
Fetor hepaticus	Breath	Newly-mown clover
Hyperaminoaciduria	Infant's skin	Dried malt or hops
Hypermethioninemia	Infant's breath	Boiled cabbage
Isovaleric acidemia	Skin, sweat, breath	Sweaty feet
Liver failure	Breath	Musty fish
Maple syrup urine disease	Sweat, urine, ear wax	Maple syrup
<i>Pseudomonas</i> infection	Skin, sweat	Grape juice
Rubella	Sweat	Freshly plucked feathers
Smallpox	Skin	Pox stench
Trimethylaminuria	Skin, urine	Fishy
Tuberculosis lymphadenitis	Skin	Stale beer
Typhoid	Skin	Freshly-baked brown bread
Yellow fever	Skin	Butcher's shop

Εικόνα 1.2.1: Συσχέτιση ασθενειών με χαρακτηριστικές οσμές (Wilson A. Dan, 2016, Finding aroma clues in the human breath to diagnose diseases, Atlas of Science. Ανακτήθηκε στις 2/10/2018 από <https://atlasofscience.org/finding-aroma-clues-in-the-human-breath-to-diagnose-diseases/> .

Το πιο γνωστό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του διαβήτη. Ήδη από τις αρχές του 1900 και πριν την ανακάλυψη της ινσουλίνης, ο διαβήτης μπορούσε να διαγνωστεί αρκετά εύκολα, με κυριότερα χαρακτηριστικά τον καταρράκτη, την απώλεια όρασης, τη γάγγραινα και άλλα.^[8] Εξίσου χαρακτηριστική για τη διάγνωση των ατόμων που έπασχαν, αποτελούσε η αναπνοή τους, αφού έχει περιγραφεί ότι είχε οσμή γλυκιά, σαν σάπια μήλα (Bliss M. eds. The Discovery of Insulin. Toronto: The University of Chicago Press, McClelland and Stewart Limited, 1984) . Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει γνωστό πως η οσμή αυτή, οφείλεται στην παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων ακετόνης, καθώς μελέτες έχουν αποδείξει την ιδιότητά της ως βιοδείκτη στα άτομα που πάσχουν από διαβήτη.^[9] Αυτό συμβαίνει, γιατί όταν ο διαβήτης δεν αντιμετωπίζεται, δεν παράγεται αρκετή ινσουλίνη στον οργανισμό, για τη διάσπαση της γλυκόζης και κατά συνέπεια αυτή δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, το σώμα να χρησιμοποιεί την καύση λίπους ως πηγή ενέργειας, που οδηγεί στην παραγωγή παρα-προϊόντων κετονών, σημαντικότερη από τις οποίες είναι η ακετόνη.

Ένα εξίσου σημαντικό παράδειγμα, αποτελεί και η φαινυλκετονουρία. Πρόκειται για μια ασθένεια όπου τα άτομα δε μπορούν να διασπάσουν το αμινοξύ φαινυλαλανίνη, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδά της στο αίμα. Λόγω της αυξημένης συγκέντρωσής της στον οργανισμό, έχει παρατηρηθεί η οσμή μούχλας στην εκπνοή των ατόμων που πάσχουν. (USA National Library of Medicine, 2018, Phenylketonuria, Ανακτήθηκε στις 3/10/2018 από <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/phenylketonuria#synonyms>)

1.2.1 ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΕΚΠΝΟΗΣ

Η ανθρώπινη εκπνοή, αποτελείται από περισσότερες από 3500 διαφορετικές ενώσεις, τόσο οργανικές όσο και ανόργανες. Το μεγαλύτερο τμήμα της εκπνοής, καταλαμβάνουν αέρια όπως το άζωτο, το οξυγόνο, το νερό και το διοξείδιο του άνθρακα. Οι συγκεντρώσεις αυτών στην εκπνοή, διαφέρουν αρκετά από αυτές στην εισπνοή, όπως παρατηρείται στον πίνακα 1.2.2.

COMPOSITION OF INHALED AND EXHALED AIR

Composition Of Inhaled And Exhaled Air^[3]		
Gas	Amount in inhaled air	Amount in exhaled air
Oxygen	20.84%	13.6% - 16%
Carbon Dioxide	Very small amount (0.04%)	4% - 5.3%
Nitrogen	78.62%	78.04%
Water vapour	Small amount (0.5%)	Large amount
Argon	0.96%	1%

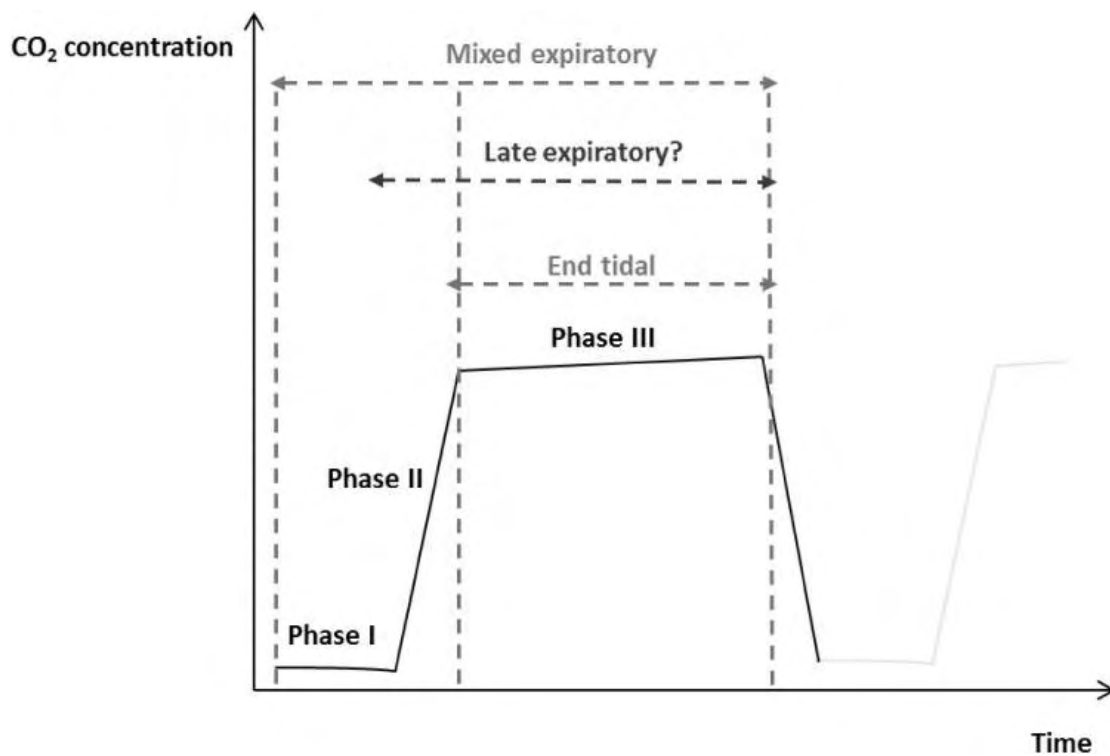
Εικόνα 1.2.2: Πίνακας με τα βασικότερα συστατικά της αναπνοής και τα ποσοστά αυτών στην εισπνοή και εκπνοή.^[10]

Ένα μικρότερο μέρος, καταλαμβάνουν οι πτητικές οργανικές ενώσεις (ΠΟΕ), με το 50% αυτών να είναι ενδογενείς και να σχετίζονται αποκλειστικά με τη λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος.^[11] Όσον αφορά τις εξωγενείς ΠΟΕ, το προφίλ και οι συγκεντρώσεις αυτών, διαφέρουν από άνθρωπο σε άνθρωπο ανάλογα με το περιβάλλον όπου ζει και εκτίθεται, τη διατροφή και άλλα.

1.2.2 ΦΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΕΚΠΝΟΗΣ

Έχουν προσδιοριστεί τρεις κατηγορίες της ανθρώπινης εκπνοής που αντιστοιχούν σε διαφορετικά τμήματα αυτής: τελικό τμήμα εκπνοής (late expiratory), το κυψελιδικό τμήμα εκπνοής (end-tidal), και την ολική εκπνοή (mixed expiratory)

Στην εικόνα 1.2.3, παρατηρούνται οι 3 φάσεις-κατηγορίες της αναπνοής, συγκριτικά με το χρόνο και τη συγκέντρωση του CO₂.



Εικόνα 1.2.3: Απεικόνιση των 3 φάσεων της αναπνοής, συναρτήσε του χρόνου και της συγκέντρωσης CO₂.^[12]

Η κατασκευή του διαγράμματος, έγινε με τη χρήση οπτικών μεθόδων και πιο συγκεκριμένα, με τον οπτικό έλεγχο του CO₂. Στη μέθοδο αυτή, γίνεται μέτρηση των συγκεντρώσεων του CO₂ κατά τη διάρκεια της εκπνοής με τη βοήθεια συσκευής που αποκαλείται καπνόμετρο και επιτρέπει την οπτικοποίηση των διάφορων φάσεων. Όπως

παρατηρείται, αρχικά τα επίπεδα είναι αρκετά χαμηλά στη φάση I, όμως σταδιακά αυξάνονται κατά τη διάρκεια της φάσης II μέχρι που προσεγγίζουν ένα πλατό με την έναρξη της φάσης III.

Η πρώτη κατηγορία της εκπνοής, περιλαμβάνει την απομάκρυνση του αρχικού τμήματός της, που θεωρείται ότι προέρχεται απευθείας από το αναπνευστικό σύστημα, χωρίς να συμμετέχει σε αντιδράσεις ανταλλαγής των ΠΟΕ μεταξύ διαφόρων τμημάτων του οργανισμού. Με βάση την παραπάνω εικόνα, περιλαμβάνει τις φάσεις II και III της εκπνοής. Συνήθως, επιλέγεται αυτή η κατηγορία, καθώς επιτρέπει την καλύτερη συσχέτιση των ενδογενών ΠΟΕ με τα αποτελέσματα, μειώνοντας παράλληλα την επίδραση των εξωγενών. Η επιλογή αυτού του τμήματος της εκπνοής, μπορεί να γίνει είτε με απλή απόρριψη των πρώτων δευτερολέπτων της, είτε με απευθείας εκπνοή του ατόμου σε κατάλληλη συσκευή που επιτρέπει την επιλογή μόνο του τμήματος που ενδιαφέρει για ανάλυση. Η πρώτη μέθοδος, όμως, είναι αρκετά αναξιόπιστη και μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της επαναληψιμότητας, καθώς δεν έχει καθοριστεί ένας κοινά αποδεκτός χρόνος εκπνοής, εφόσον αυτός εξαρτάται από την καρδιολογική και αναπνευστική κατάσταση του κάθε ατόμου. Ιδανική μέθοδος είναι η ατομική προσαρμογή μιας συσκευής με βάση την εν λόγω κατάσταση κάθε φορά, για βέλτιστη επιλογή του τμήματος που πρόκειται να αναλυθεί. Μία τέτοια μέθοδος θα ήταν χρονοβόρα, περίπλοκη και αρκετά απαιτητική, ωστόσο θα οδηγούσε σε μείωση των επιμολύνσεων και σε πιο επαναλήψιμα αποτελέσματα.

Η δεύτερη κατηγορία αφορά τον κυψελιδικό αέρα, ο οποίος θεωρείται ότι περιέχει μεγάλες συγκεντρώσεις ενδογενών ΠΟΕ και ελάχιστες επιμολύνσεις. Σύμφωνα με την εικόνα 1.2.3 περιλαμβάνει μόνο τη φάση III της εκπνοής. Η επιλογή αυτού του τμήματος, είναι πιο ακριβής από ότι αυτή της πρώτης κατηγορίας, καθώς χρησιμοποιούνται οπτικά ερεθίσματα για τη συλλογή του αέρα.

Η τρίτη κατηγορία, είναι η πιο απλή, αφού περιλαμβάνει την ολική εκπνοή και άρα το σύνολο των φάσεών της. Παρά την απλότητά της, συνίσταται να αποφεύγεται, γιατί μπορεί να αποτελείται κι από πλήθος επιμολύνσεων και εξωγενών ΠΟΕ, που να οδηγούν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα κατά την ανάλυση.

1.3 ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ (ΠΟΕ)

Ο όρος ΠΟΕ, αναφέρεται σε οργανικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους και μεγάλης πτητικότητας σε φυσιολογικές θερμοκρασίες, που είναι παρούσες στον ανθρώπινο οργανισμό καθώς και στο περιβάλλον. Η ύπαρξή τους στο περιβάλλον, οφείλεται σε μεγάλη ποικιλία πηγών, όπως είναι κάποιες μεταβολικές διεργασίες στα φυτά αλλά και σε ανθρωπογενείς πηγές προέλευσης, όπως οι εξατμίσεις των αυτοκινήτων ή οι εκπομπές των βιομηχανιών και εργοστασίων.

Στον ανθρώπινο οργανισμό μπορούν να παρεβρεθούν ΠΟΕ εξωγενούς προέλευσης, λόγω της έκθεσης του ανθρώπου σε αυτές, όπως και ΠΟΕ ενδογενούς προέλευσης που

παράγονται μέσα στον οργανισμό κυρίως ως προϊόντα μεταβολικών διεργασιών. Σημαντικό είναι ότι οι παθολογικές καταστάσεις έχουν συσχετιστεί με τις αλλοιώσεις του μεταβολισμού και της σύνθεσης των παραγόμενων ενδογενών ΠΟΕ. Σήμερα πιστεύεται ότι η ανάλυση και η ταυτοποίηση αυτών των αλλαγών μπορεί να έχει σημαντική αξία για την μη επεμβατική διάγνωση και αξιολόγηση της κατάστασης μιας σειράς ασθενειών, π.χ. διαφόρων ειδών του καρκίνου. Ως βιολογικά δείγματα για τον προσδιορισμό των ΠΟΕ μεταβολικής προέλευσης χρησιμοποιούνται ούρα, ιδρώτας και κυρίως εμπνεόμενος αέρας. Ο εκπνεόμενος αέρας περιέχει ΠΟΕ τόσο εξωγενούς όσο και ενδογενούς προέλευσης. Η διάκρισή τους γίνεται με τον προσδιορισμό της κυψελιδικής κλίσης. Η τελευταία υπολογίζεται ως η διαφορά των συγκεντρώσεων των ΠΟΕ στον περιβάλλοντα αέρα και των συγκεντρώσεών τους στην ανθρώπινη εκπνοή.

1.3.1 ΚΑΝΟΝΙΚΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΕ

Εξωγενείς

Οι εξωγενούς προέλευσης ΠΟΕ, παίζουν σημαντικό ρόλο στον οργανισμό, καθώς αποτελούν έναν πιθανό δείκτη ατομικής έκθεσης σε καρκινογόνες ουσίες. Πιο συγκεκριμένα, είναι αρκετά δραστικές, με αποτέλεσμα να προκαλούν βλάβες στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπαρά οξέα, προωθώντας την καρκινογένεση με το πέρασμα των χρόνων. Η προέλευσή τους οφείλεται κυρίως στην εισπνοή του καπνού του τσιγάρου.

Το πιο σημαντικό παράδειγμα εξωγενούς ΠΟΕ, αποτελεί το βενζόλιο. Παράγεται τόσο από ανθρωπογενείς πηγές προέλευσης όσο και από φυσικές πηγές. Στις φυσικές πηγές ανήκουν τα ηφαίστεια και οι πυρκαγιές, ενώ στις ανθρωπογενείς, ανήκουν ο καπνός του τσιγάρου, τα καυσαέρια των αυτοκινήτων και τα βιομηχανικά απόβλητα. Για το λόγο αυτό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλες ουσίες, ως πιθανός βιοδείκτης για τη διάκριση μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών. Πιο συγκεκριμένα, σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την εκτίμηση των επιπέδων του βενζολίου, ανάμεσα σε καπνιστές και μη καπνιστές, παρατηρήθηκε μεγάλη απόκλιση μεταξύ των τιμών στους πρώτους και των τιμών στους δεύτερους, όπου στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν είχε ανιχνευτεί.^[13] Επιπλέον, παρατηρήθηκε σχέση μεταξύ του βενζολίου αλλά και άλλων ενώσεων του τσιγάρου, και του διαστήματος που μεσολάβησε από το τελευταίο τσιγάρο στους καπνιστές, αφού σε πολλές περιπτώσεις οι συγκεντρώσεις μειώνονταν δραστικά εντός μερικών λεπτών ή και ωρών.

Παρόμοιο παράδειγμα, αποτελεί και το 1,3-βουταδιένιο. Πρόκειται για αλκένιο που φυσιολογικά διασπάται πολύ εύκολα στην ατμόσφαιρα, όμως έχει παρατηρηθεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις πόλεις, λόγω των καυσαερίων και των εκπομπών των βιομηχανιών. Άλλες γνωστές πηγές, αποτελούν ο καπνός του τσιγάρου και οι πυρκαγιές. Μελέτες έχουν αποδείξει τις καρκινογόνες ιδιότητές του σε ποντίκια κι αρουραίους^[14], ενώ πλέον ταξινομείται κι ως καρκινογόνο κατηγορίας 1 για τον άνθρωπο. Έρευνες σε βιομηχανικές περιοχές της Αμερικής και του Καναδά, προτείνουν πως το μεγαλύτερο ποσοστό λευχαιμίας

και άλλων μορφών καρκίνου, παρατηρήθηκε σε εργαζόμενους που είχαν εκτεθεί σε μεγάλες ποσότητες βουταδιενίου για αρκετά χρόνια^[15], καθιστώντας το έτσι ιδανικό βιοδείκτη, για τη διάγνωση διαφόρων τύπων καρκίνου.

Ενδογενείς

Οι ενδογενείς ΠΟΕ, θεωρούνται ότι παράγονται στον οργανισμό μέσω διάφορων μεταβολικών οδών, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις τους να μεταβάλλονται σε περιπτώσεις ασθενειών, όπου οι οδοί αυτές επηρεάζονται, ή να προκύπτει παραγωγή νέων ΠΟΕ, που δεν παρατηρούνται σε υγιή άτομα.

Στην περίπτωση ορισμένων τύπων καρκίνου, δύο είναι οι οδοί που πιθανολογείται ότι οδηγούν σε διαφορετικά προφίλ των VOCs στον οργανισμό:

- Κατά τη φάση του οξειδωτικού στρες, η ισορροπία οξειδωτικών/αντιοξειδωτικών έχει μεταβληθεί προς το μέρος των πρώτων, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) στον οργανισμό. Η παραγωγή αυτή μπορεί να πυροδοτείται από ενδογενείς, για παράδειγμα την ενεργοποίηση των CYP450 ενζύμων αλλά και από εξωγενείς παράγοντες, όπως το κάπνισμα ή η ακτινοβολία. Οι ελεύθερες ρίζες και οι ROS, με τη σειρά τους, επιδρούν σε ενδογενή μόρια όπως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ή οι πρωτεΐνες, οδηγώντας σε παραγωγή πτητικών ενώσεων, κυρίως αλκανίων, που εξέρχονται με την εκπνοή.
- Στην καρκινογένεση, συνήθως πραγματοποιείται μεταβολή στα γονίδια και κατά συνέπεια και στην έκφραση αυτών, που οδηγεί στην παραγωγή νέων ΠΟΕ, που δεν παρατηρούνται στον υγιή πληθυσμό.

1.3.2. ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΠΟΕ

Έχει προταθεί, ότι ΠΟΕ που προέρχονται από διαφορετικά μέρη του ανθρώπινου σώματος, φέρουν και διαφορετικές πληροφορίες οπότε είναι απαραίτητη η γνώση της βιοχημικής οδού από όπου προήλθαν, σε κάθε περίπτωση.

- Υδρογονάνθρακες (ισοπρένιο, εξάνιο, οκτάνιο, κυκλοεξάνιο)
Κύρια οδός παραγωγής των υδρογονανθράκων είναι το οξειδωτικό στρες. Ειδικότερα, τα αλκάνια παράγονται κατά τη λιπιδική υπεροξειδωση και κατά συνέπεια η παρουσία τους

στην αναπνοή μπορεί να λειτουργήσει ως δείκτης της υπεροξειδωσης αυτής. Λόγω της μικρής τους διαλυτότητας στο αίμα, οι υδρογονάνθρακες δε μεταβολίζονται στο σώμα κι έτσι αποβάλλονται με την εκπνοή εντός μερικών λεπτών.^[16]

- Αλκοόλες (ισοπροπανόλη, 1-προπανόλη, 1-βουτανόλη, δεκανόλη)

Οι αλκοόλες μπορούν να απορροφηθούν από κάθε τμήμα του γαστρεντερικού συστήματος, κυρίως μέσω διάχυσης στο αίμα ή αποτελούν προϊόντα μεταβολισμού των υδρογονανθράκων. Ο μεταβολισμός τους στον οργανισμό, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, κυρίως από τις διαφορές στην περιεκτικότητα νερού και λίπους μεταξύ των ατόμων και των φύλων. Τα βασικότερα ένζυμα μεταβολισμού τους είναι η αλκοολική δευδρογονάση και ένζυμα του κυτόχρωματος P450, τα οποία καταλύουν την οξειδωσή των αλκοολών στο σώμα. Οι εναπομείναντες αλκοόλες, αποβάλλονται μέσω της εκπνοής, των ούρων, του ιδρώτα και του σιέλου.^[16]

- Αλδεΐδες (προπανάλη, εξανάλη, οκτανάλη, 2-εθυλ-εξανάλη, εννεανάλη)

Οι αλδεΐδες παράγονται στο σώμα, ως μέρος φυσιολογικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα, με πολλές από αυτές να παίζουν σημαντικό ρόλο στην κανονική λειτουργία του οργανισμού. Υπάρχουν τουλάχιστον 4 πηγές αλδευδών στο ανθρώπινο σώμα: η πρώτη σχετίζεται με το μεταβολισμό των αλκοολών, η δεύτερη με την αναγωγή των υπεροξειδίων από το κυτόχρωμα P450 ως δευτερεύοντα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Μία άλλη πηγή σχετίζεται με το κάπνισμα, καθώς τόσο κορεσμένες όσο και ακόρεστες αλδεΐδες, όπως η φορμαλδεΐδη ή η ακεταλδεΐδη, βρίσκονται στον καπνό του τσιγάρου. Τέλος, αλδεΐδες μπορεί να παραχθούν στον οργανισμό ανάλογα με τις διατροφικές συνήθειες του ατόμου.^[16]

- Κετόνες (ακετόνη, 2-βουτανόνη, κυκλοεξανόνη)

Στη φάση της καρκινογένεσης, αλλαγές στις μεταβολικές συνθήκες μπορεί να οδηγήσουν στο σχηματισμό κετονών. Το ίδιο παρατηρείται και κατά την οξειδωση των πρωτεϊνών, καθώς και κατά τη διάρκεια καταστάσεων που σχετίζονται με τις νόσους αυτές, όπως για παράδειγμα η απώλεια βάρους. Μεταξύ των κετονών, η πιο συχνά παραγόμενη είναι η ακετόνη, η οποία αποβάλλεται εύκολα μέσω της εκπνοής, των ούρων και του δέρματος. Δεν μπορεί να αποτελέσει, ωστόσο, από μόνη της δείκτη καρκινογένεσης, καθώς οι συγκεντρώσεις της επηρεάζονται από την άσκηση και τις διατροφικές συνήθειες του ατόμου.^[16]

- Νιτρίλια και αρωματικές ενώσεις (βενζόλιο, θειοφαίνιο, τολουόλιο, εθυλοβενζόλιο, αιθυλενοβενζόλιο)

Οι ενώσεις αυτές, είναι κατά κύριο λόγο εξωγενούς προέλευσης, ωστόσο έχουν μεγάλη σημασία καθώς πολλές, είναι καρκινογόνες. Η παρουσία τους στον οργανισμό, είναι δείκτης της ατομικής έκθεσης στον καπνό του τσιγάρου, αλκοόλ, περιβαλλοντική μόλυνση και ακτινοβολία. Πρόκειται για αρκετά δραστικές ενώσεις, που με την είσοδό τους στον οργανισμό, προκαλούν οξειδωτική καταστροφή των βιολογικών μακρομορίων όπως οι πρωτεΐνες και το DNA, οδηγώντας σταδιακά σε ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Καθώς αποθηκεύονται στον λιπώδη ιστό του σώματος, έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και χρόνια έκθεση σε αυτές, έχουν μεγάλες συγκεντρώσεις των ενώσεων αυτών στην εκπνοή τους και κατά συνέπεια, χρησιμοποιούνται συχνά ως βιοδείκτες διάφορων ασθενειών.^[16]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΤΟΥ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ

Η μέθοδος δειγματοληψίας που θα χρησιμοποιηθεί στην εκάστοτε πειραματική διαδικασία, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το κόστος, η ευκολία ή δυσκολία στο χειρισμό αλλά κατά κύριο λόγο από το τμήμα της εκπνοής που επιθυμείται. Συνήθως, είθισται να λαμβάνεται η ολική εκπνοή παρά τα μειονεκτήματά της, επομένως οι σάκοι δειγματοληψίας είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος, λαμβάνοντας υπόψη και άλλες παραμέτρους, όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.1.1 ΣΑΚΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

Αποτελούν την πιο συνήθη μέθοδο δειγματοληψίας και αποθήκευσης, κυρίως λόγω της απλότητας στη χρήση και του μειωμένου κόστους αυτών. Υπάρχει διαθέσιμη μεγάλη ποικιλία σάκων, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το κόστος αλλά και ως προς τη χρονική διάρκεια αποθήκευσης. Κάποιοι από τους πλέον χρησιμοποιούμενους, είναι οι Tedlar , και οι Nalorphan. Μεταξύ των δύο ειδών, οι Nalorphan είναι πιο οικονομικοί και, κατά συνέπεια, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εφάπαξ κι έπειτα να απορριφθούν. Το μεγαλύτερο μειονέκτημά τους, είναι ότι συχνά παρατηρείται διάχυση αερίων από και προς τον περιβάλλοντα αέρα, με αποτέλεσμα να προκύπτουν επιμολύνσεις ή και απώλεια των προς ανάλυση δειγμάτων. Από την άλλη, οι σάκοι Tedlar, έχουν αρκετά μεγαλύτερο κόστος, και συνεπώς συνήθως γίνονται προσπάθειες επαναχρησιμοποίησής τους. Για να είναι αυτό εφικτό, απαιτείται σχολαστικός καθαρισμός τους, κάτι που είναι αρκετά δύσκολο να γίνει, αφού ίχνη από προηγούμενα δείγματα είναι σχεδόν πάντα παρόντα. Εάν, ωστόσο, υπάρχει ανάγκη για μεγαλύτερη χρονική διάρκεια αποθήκευσης, οι σάκοι αυτοί είναι πιο ιδανικοί.^[17] Διάχυση αερίων μπορεί να παρατηρηθεί και σε αυτό το είδος σάκων, ωστόσο κατά κανόνα θεωρείται πιο σταθερό από ότι το Nalorphan. Υπάρχουν διαθέσιμα πολλά ακόμα είδη, όπως οι σάκοι Teflon ή οι Flexfoil.



Εικόνα 2.1.1: Σάκος δειγματοληψίας Tedlar (Ανακτήθηκε στις 30/11/2018, από <https://www.apexinst.com/product/gas-sampling-bags>)

2.1.2 BIO-VOC ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΗΣ (BIO-VOC) SAMPLER

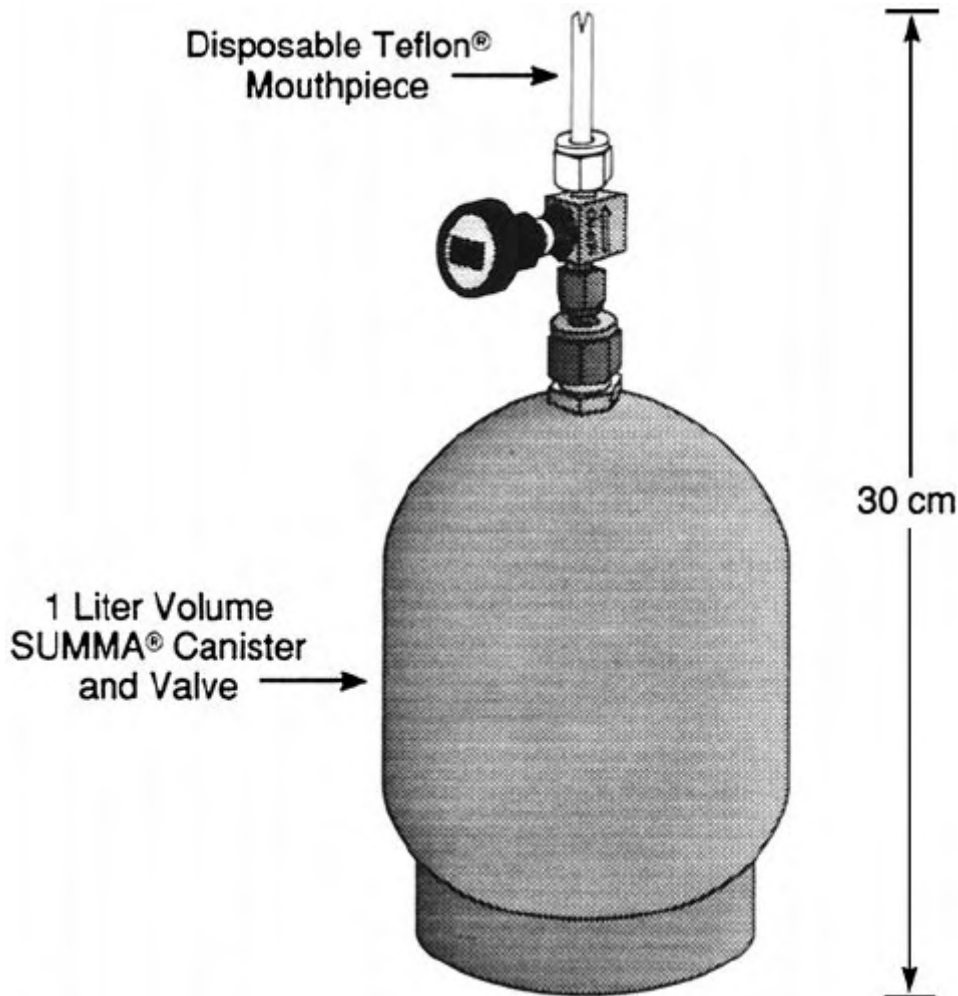
Η μέθοδος αυτή, είναι αρκετά απλή στη χρήση, χωρίς να απαιτεί ειδικές γνώσεις, δεξιότητες ή την επιτήρηση από εξειδικευμένο προσωπικό. Επιτρέπει τη συλλογή του κυψελιδικού μόνο αέρα, μέσω εφαρμοσμένου στομίου, με απόρριψη του αρχικού τμήματος της εκπνοής. Έτσι, αποτρέπει την επιμόλυνση των δειγμάτων, ενώ παράλληλα ελαχιστοποιείται η διάχυση των ΠΟΕ, από και προς το περιβάλλον. Χάρη στα πλεονεκτήματα αυτά, η μέθοδος χρησιμοποιείται επίσης και για τον προσδιορισμό της επαγγελματικής ή περιβαλλοντικής έκθεσης σε χημικές ουσίες. Το βασικότερο μειονέκτημα των Bio-VOC δειγματοληπτών, είναι η περιορισμένη χωρητικότητα, η οποία κυμαίνεται από 100 έως 150ml, αρκετά μικρότερη δηλαδή από τις άλλες μεθόδους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την υποχρεωτική επανάληψη της δειγματοληψίας, για τον προσδιορισμό ΠΟΕ, που βρίσκονται σε ιχνοποσότητες στην αναπνοή.^[18]



Εικόνα 2.1.4: Απεικόνιση ενός Bio VOC δειγματολήπτη (Ανακτήθηκε στις 23/08/2018 από <https://www.markes.com/Products/Sampling-accessories/Sampling/BIO-VOC-breath-sampler.aspx>)

2.1.3 ΜΕΤΑΛΛΙΚΕΣ ΦΙΑΛΕΣ

Αυτή η μέθοδος δειγματοληψίας, χρησιμοποιείται πλέον πιο σπάνια, καθώς οι φιάλες είναι ακριβές και δύσκολες στον καθαρισμό τους. Βασικό τους, ωστόσο, πλεονέκτημα, είναι ότι επιτρέπουν τη λήψη μόνο του κυψελιδικού αέρα, καθώς απορρίπτονται τα πρώτα δευτερόλεπτα της εκπνοής. Στη συνέχεια, η βαλβίδα ανοίγει για να επιτρέψει την είσοδο του υπόλοιπου τμήματος της εκπνοής. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται όσο το δυνατόν μικρότερη επιμόλυνση των δειγμάτων. Επιπλέον, οι φιάλες αυτές παρέχουν μεγάλη διάρκεια αποθήκευσης, καθότι οι περισσότερες ΠΟΕ μπορούν να παραμείνουν σταθερές στο εσωτερικό τους για διάστημα μεγαλύτερο των 30 ημερών. Τέλος, είναι δυνατή η επαναχρησιμοποίησή τους, ύστερα από σχολαστικό καθαρισμό.^[19]



Εικόνα 2.1.3: Απεικόνιση μεταλλικής φιάλης, χωρητικότητας 1L κυψελιδικού αέρα. ^[19]

2.1.4 ΓΥΑΛΙΝΕΣ ΦΙΑΛΕΣ

Οι γυάλινες φιάλες εμφανίζουν το βασικό πλεονέκτημα της επιλογής του επιθυμητού τμήματος της εκπνοής μέσω των 2 βαλβίδων που διαθέτουν. Είναι αρκετά πρόσφατες και όχι τόσο διαδεδομένες στη χρήση, κάτι που οφείλεται κατά κύριο λόγο στη μεγάλη δυσκολία καθαρισμού τους έπειτα από κάθε χρήση, καθώς και στο μεγάλο κόστος τους, συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους. Ωστόσο, πέραν αυτών των μειονεκτημάτων, μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν και παρέχουν τη δυνατότητα μεγάλου χρονικού διαστήματος αποθήκευσης του αέρα.



Εικόνα 2.1.5: Απεικόνιση μιας γυάλινης φιάλης για τη συλλογή εκπνοής που περιλαμβάνει στόμιο, βαλβίδα εισόδου αέρα, θάλαμος συλλογής αέρα, βαλβίδα εξόδου και septum για τη δειγματοληψία. ^[20]

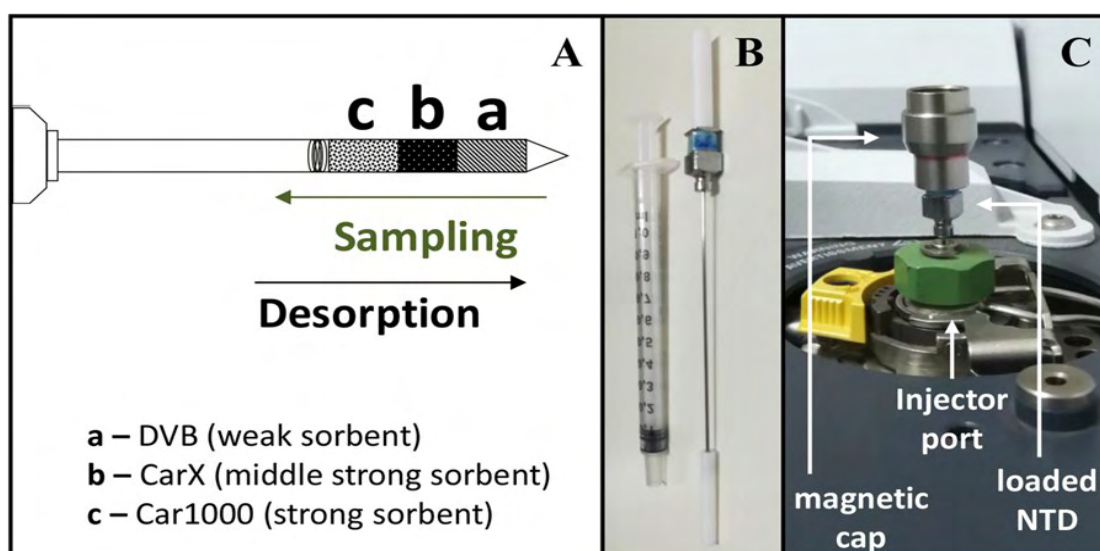
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΑΝΑΠΝΟΗΣ/ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΚΡΟΦΗΣΗ

Η θερμική εκρόφηση είναι μία τεχνική προ-συγκέντρωσης, που αναπτύχθηκε το 1970 περίπου, ως μία προσαρμογή στην κλασική μέθοδο αέριας χρωματογραφίας. Σε αυτή, χρησιμοποιούνταν κατάλληλα υλικά για την εκρόφηση οργανικών ενώσεων, οι οποίες πρώτα είχαν προσροφηθεί από δείγματα αερίων και στη συνέχεια γινόταν έγχυση στο GC. Άλλες εφαρμογές, περιλάμβαναν τη χρήση σωλήνων που έφεραν κατάλληλο προσροφητικό υλικό, όπου γινόταν διάχυση των οργανικών ουσιών, πριν εκροφηθούν και αυτές στο σύστημα GC για ανάλυση και αφορούσε κυρίως τον έλεγχο του διοξειδίου του θείου ή του αζώτου.^[21] Πλέον, χρησιμοποιούνται παρόμοιοι σωλήνες που περιλαμβάνουν προσροφητικό υλικό, όπου συλλέγονται οι οργανικές ενώσεις κι έπειτα εφαρμόζεται θέρμανση για την εκρόφηση αυτών στο σύστημα ανάλυσης. Είναι συμβατή με την αέρια χρωματογραφία, επιτρέποντας την ανάλυση ουσιών πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων. Σε σύγκριση με άλλες τεχνικές εκχύλισης, πλεονεκτεί στην απουσία οργανικών διαλυτών, αποφεύγοντας έτσι την επιμόλυνση του μίγματος από διαλύτες. Επιπλέον, συνδυάζεται εύκολα με το GC/MS σύστημα, παρέχοντας τη δυνατότητα απευθείας έγχυσης των ουσιών στον αναλυτή και έτσι περιορίζεται στο ελάχιστο δυνατό, η απώλεια δείγματος. Μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής, θεωρούνται τα υπολείμματα δείγματος μετά το πέρας της και η επαγόμενη πιθανή μόλυνση του συστήματος.^[22] Βρίσκει εφαρμογή στην ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων, την ανάλυση του αέρα σε εργασιακούς χώρους, στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών καθώς και στην ανάλυση του αέρα για τη διάγνωση ασθενειών.

Ανεξαρτήτως της μεθόδου δειγματοληψίας που θα επιλεγεί, ο εκπνεόμενος αέρας μπορεί να περιλαμβάνει πλήθος ενώσεων που επιμολύνουν την ανάλυση ή δεν παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Επιπλέον, η εισαγωγή των προς ανάλυση ενώσεων στο σύστημα ανάλυσης πρέπει να πραγματοποιείται με τον ελάχιστο δυνατό όγκο αερίων. Για να εξασφαλιστούν αυτές οι συνθήκες, συνήθως χρησιμοποιούνται οι τεχνικές προσυγκέντρωσης στις off-line αναλύσεις. Οι δύο πιο γνωστές είναι η θερμική εκρόφηση και η μικροεκχύλιση στερεής φάσης.

2.2.1 ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΣΕ ΥΛΙΚΟ ΤΟΠΟΘΕΤΗΜΕΝΟ ΣΕ ΒΕΛΟΝΑ (NEEDLE TRAP MICROEXTRACTION / NTME)

Αποτελεί μία εναλλαγή των κλασικών μεθοδολογιών μικροεκχύλισης όπως η SPME, που αναλύεται στην παρούσα εργασία εκτενέστερα. Χρησιμοποιείται για την ανάκτηση κυρίως οργανικών ενώσεων από διάφορα δείγματα και φέρει ένα συνδυασμό πλεονεκτημάτων των τεχνικών SPME και SPE. Κυριότερες μεταξύ αυτών, είναι η δυνατότητα χρήσης μικρών ποσοτήτων των δειγμάτων αλλά και η υψηλή ευαισθησία της μεθόδου.^[23] Για την χρήση της NTME, απαιτούνται κατάλληλες συσκευές, οι needle trap devices (NTDs). Οι εν λόγω συσκευές, μπορούν να προσαρμοστούν στις ιδιότητες των εκάστοτε προς ανάκτηση ενώσεων μέσω επιλογής του κατάλληλου προσροφητικού υλικού.^[24] Στην εικόνα 2.2.1, παρουσιάζεται μία NTD που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μεταβολικών προφίλ σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα.^[23]

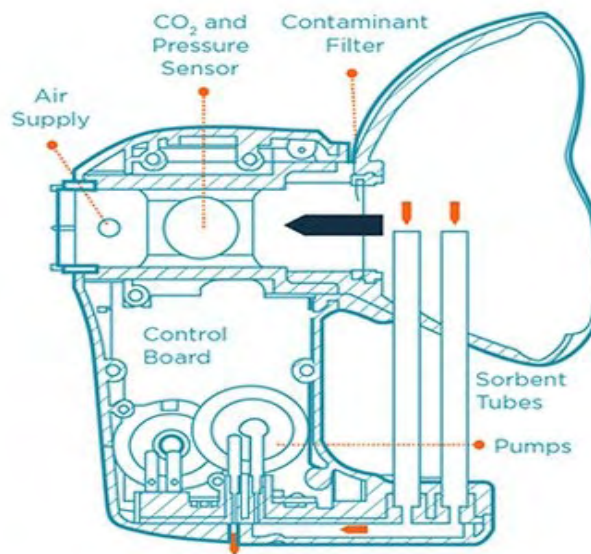


Εικόνα 2.2.1: Αναπαράσταση συσκευής needle trap για την ανάλυση του μεταβολικού προφίλ οργανικών ενώσεων^[23].

Τα τρία διαφορετικά στρώματα απορρόφησης, επιτρέπουν την εκλεκτική προσρόφηση ενώσεων και άρα τη ξεχωριστή ανάκτησή τους.

2.2.2 RECIVA ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΠΤΗΣ ΕΚΠΝΕΟΜΕΡΟΥ ΑΕΡΑ (RECIVA BREATH SAMPLER)

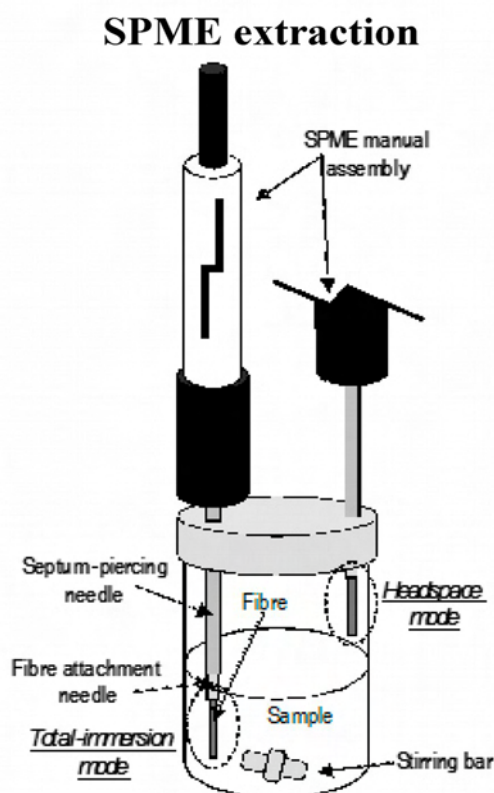
Πρόκειται για συσκευή που χρησιμοποιείται με όλο και αυξανόμενο ρυθμό σε μελέτες ανάκτησης και ανάλυσης των ΠΟΕ για τη διάγνωση ασθενειών. Τα βασικά της πλεονεκτήματα είναι η αξιοπιστία και η επαναληψιμότητα, καθώς και η αυξημένη ευαισθησία συγκριτικά με άλλες τεχνικές. Η λειτουργία της περιλαμβάνει την ανάκτηση της ανθρώπινης εκπνοής για χρονικό διάστημα έως και 10 λεπτά, προ-συγκεντρώνοντας έτσι τις οργανικές ενώσεις και διατηρώντας της για μεγάλο χρονικό διάστημα, χωρίς το φόβο επιμόλυνσης. Στην εικόνα 2.2.2, παρουσιάζονται τα βασικά τμήματα μιας τέτοιας συσκευής:



Εικόνα 2.2.2: Αναπαράσταση μια ReCIVA συσκευής και των βασικών τμημάτων της (Ανακτήθηκε στις 5/12/2018 από <https://www.owlstonemedical.com/products/reciva/>).

2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΩΝ ΠΗΤΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΑΣ ΦΑΣΗΣ (SOLID-PHASE MICROEXTRACTION-SPME)

Η τεχνική SPME είναι μια απλή τεχνική προσρόφησης και εκρόφησης η οποία αναπτύχθηκε στις αρχές του 1990 στο Πανεπιστήμιο του Waterloo στον Καναδά. Πρόκειται για μία τεχνική, αρκετά αποτελεσματική, η οποία εξαλείφει την ανάγκη για οργανικούς διαλύτες ενώ παράλληλα επιτρέπει την απλοποίηση της διαδικασίας απομόνωσης πτητικών και μη πτητικών ενώσεων σε υγρά ή αέρια δείγματα. Περιλαμβάνει τη χρήση ίνας, επικαλυμμένης με τη φάση της εκχύλισης που αποτελείται από καθαρό πολυμερές ή από προσροφητικά μόρια ενσωματωμένα σε πολυμερές. Με τη βοήθεια αυτής της επικάλυψης, απομονώνονται οι επιθυμητές ουσίες από τα δείγματα, είτε με απορρόφηση στην περίπτωση του πολυμερούς, είτε με προσρόφηση στην περίπτωση του προσροφητικού υλικού. Συνήθως, η τεχνική αυτή συνδυάζεται με την GC-MS για ανάλυση ενώσεων, οπότε μετά την απομόνωση αυτών, ακολουθεί εισαγωγή της ίνας στον αναλυτή για εκρόφηση και ανάλυση. Τα τελευταία χρόνια, βρίσκει εφαρμογή σε ευρύ φάσμα πεδίων, όπως είναι η ανάλυση τροφίμων και ποτών, η ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων και αερίων, η τοξικολογία και η ανάλυση φαρμακευτικών και βιολογικών προϊόντων.



Εικόνα 2.3.1: Απεικόνιση μιας συσκευής SPME και των εξαρτημάτων της.^[25]

2.3.1 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ SPME

- Δεν απαιτεί τη χρήση διαλυτών
- Εύκολη στην αυτοματοποίηση
- Απλή και αποδοτική
- Συμβατή με την οργανολογία GC ή GC/MS
- Οικονομική
- Επαναχρησιμοποιήσιμη
- Γρήγορη
- Μη καταστρεπτική
- Αποδοτικότερη της SPE
- Παρέχει γραμμικά αποτελέσματα για ένα εύρος συγκεντρώσεων των ενώσεων προς ανάλυση

2.3.2 ΕΠΙΚΑΛΥΨΕΙΣ (COATINGS) SPME

Η επικάλυψη της ίνας στην SPME, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο τόσο στην εκχύλιση όσο και στην εκρόφιση, καθώς το υλικό της είναι αυτό που καθορίζει την κατανομή του αναλύτη μεταξύ στατικής φάσης και δείγματος ^[26]. Οι πιο κοινές κι εμπορικές επικαλύψεις, περιλαμβάνουν πολύ-διμεθυλοσιλοξάνια, διβινυλοβενζόλιο και άλλα, καθώς και μίγματα αυτών. Το μειονέκτημα με αυτά, είναι η χαμηλή θερμική και χημική σταθερότητα, η ευθραυστότητα καθώς κι η χαμηλή αποτελεσματικότητα και ειδικότητα. ^[26] Με βάση τις σύγχρονες εξελίξεις στην επικάλυψη των ινών, αυτές κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες^[27]:

- Carbon Nanotubes (CNTs)
- Metal Organic Frameworks (MOFs)
- Zeolitic Imidazole Frameworks
- Covalent Organic Frameworks
- Molecularly Imprinted Polymers
- Ionic Liquids
- Biocompatible SPME Coatings

2.3.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ SPME

Η γενική οργανολογία της SPME, αποτελείται από μία ίνα επικαλυμμένη, η οποία προσδένεται σε κατάλληλο μεταλλικό έμβολο και συγκρατείται σε μία σύριγγα. Κατά τη χρήση της, το έμβολο πιέζεται για να κινείται η ίνα πάνω και κάτω μέσα στη σύριγγα. Για την έκθεση σε δείγμα αέρα, ο αναλυτής πιέζει το έμβολο εκθέτοντας την ίνα στο δείγμα για κάποιο διάστημα, μέχρι να επέλθει ισορροπία (συνήθως κοντά στα 30min) . Έπειτα, η ίνα επανέρχεται εντός της σύριγγας και απομακρύνεται από το δείγμα. Για την εκρόφιση των ενώσεων που έχει απομονώσει η ίνα, απαιτείται ξανά έκθεσή της σε κατάλληλο σύστημα ανάλυσης. Στην SPME, η ισορροπία επέρχεται μεταξύ της συγκέντρωσης της ουσίας στο δείγμα και αυτής πάνω στην επικάλυψη της ίνας και εκφράζεται για τις πολυμερικές επικαλύψεις, ως εξής:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s}$$

Όπου n=η μάζα του αναλύτη που προσροφήθηκε στην ίνα

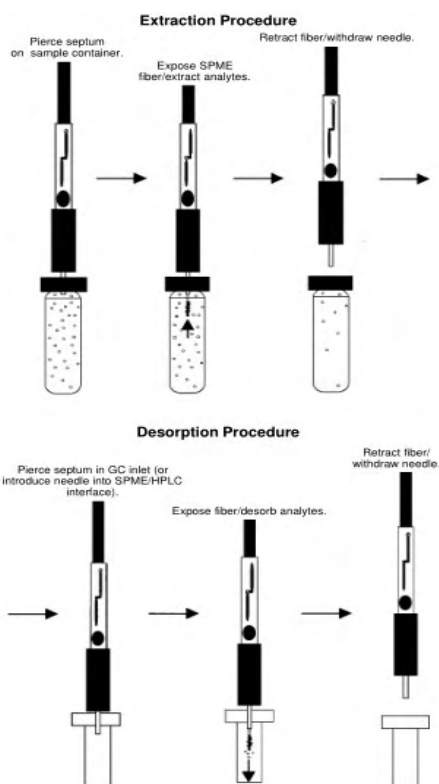
C_0 = η αρχική συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα

K_{fs} = ο συντελεστής διαχωρισμού του αναλύτη μεταξύ του δείγματος και της ίνας

V_f = ο όγκος της επικάλυψης

V_s = ο όγκος του δείγματος

Στην εικόνα 2.3.2, παρουσιάζονται συνοπτικά τα στάδια που ακολουθούνται στην SPME και ο τρόπος που αυτή λειτουργεί:



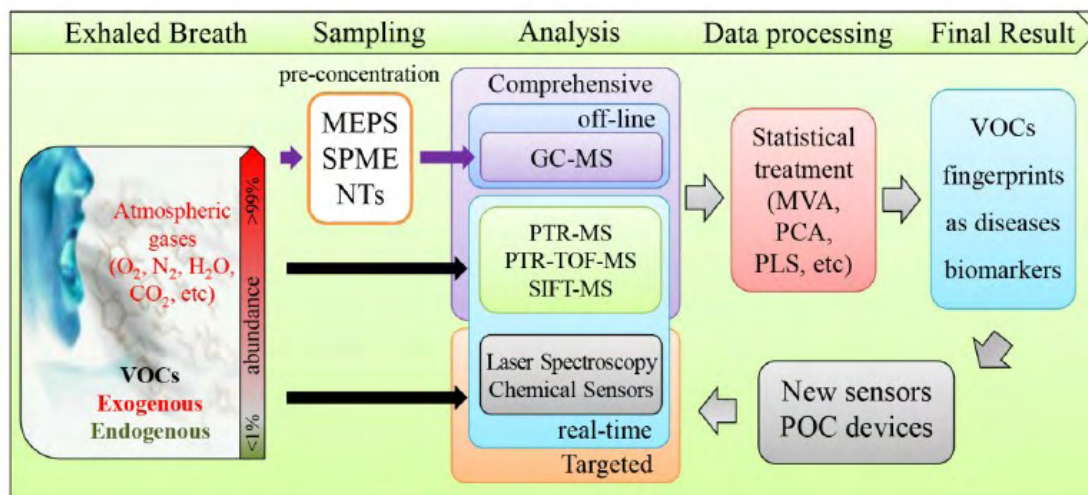
Εικόνα 2.3.2: Απεικόνιση των σταδίων και της γενικής λειτουργίας της SPME.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΝΟΡΓΑΝΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ VOC_s ΣΤΟΝ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟ ΑΕΡΑ

3.1 ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ

Στην εικόνα 3.1.1, παρουσιάζονται τα βασικά βήματα που ακολουθούνται στην ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα.



Εικόνα 3.1.1: Απεικόνιση των κύριων βημάτων ανάλυσης του εκπνεόμενου αέρα.^[25] (Ανακτήθηκε στις 21/10/2018 από https://www.researchgate.net/figure/Generic-layout-for-exhaled-breath-EB-analysis-Abbreviations-used-GC-gas-c_fig1_270908234)

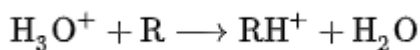
Όπως παρατηρείται, η σειρά που ακολουθείται είναι η εξής: δειγματοληψία της εκπνοής, ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων. Οι μέθοδοι ανάλυσης, διακρίνονται σε δύο είδη: στις on-line (real-time), δηλαδή σε αυτές όπου η ανάλυση πραγματοποιείται αμέσως μετά τη δειγματοληψία χωρίς αποθήκευση των δειγμάτων και τις off-line, δηλαδή αυτές όπου απαιτείται και ένα ενδιάμεσο στάδιο προ-συγκέντρωσης και αποθήκευσης των δειγμάτων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα real-time τεχνικών είναι η PTR-MS και η SIFT-MS, ενώ κύρια off-line είναι η GC-MS που εξετάζεται στην παρούσα εργασία. Ένα τελικό στάδιο στην ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα, αποτελεί η λήψη αποτελεσμάτων τα οποία καθορίζουν και την πιθανή χρήση των ενώσεων της εκπνοής ως βιοδείκτες ασθενειών.

Η ανάλυση της ανθρώπινης εκπνοής για την έγκαιρη διάγνωση νοσημάτων, προσελκύει το ενδιαφέρον κυρίως λόγω του μη επεμβατικού χαρακτήρα της, καθώς και του μειωμένου χρόνου που απαιτεί. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά εμπόδια στην εξέλιξή της, όπως για παράδειγμα ο μεγάλος αριθμός των αναλυτικών οργάνων που χρησιμοποιούνται και που μπορεί να οδηγούν σε διαφορετικά αποτελέσματα. Επιπλέον, ο περιβάλλοντας αέρας ή ο αέρας όπου το κάθε άτομο έχει εκτεθεί, μπορούν επίσης να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της ανάλυσης. Τέλος, η δειγματοληψία καθώς και η αποθήκευση των δειγμάτων εκπνοής, είναι αρκετά απαιτητική.

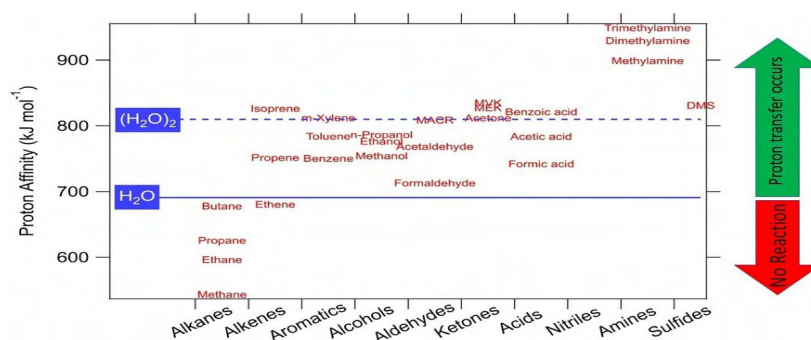
3.2 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΜΕ ΙΟΝΤΙΣΜΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΠΡΩΤΟΝΙΟΥ (PROTON TRANSFER REACTION MASS SPECTROMETRY /PTR-MS)

Πρόκειται για μια τεχνική ανάλυσης, που βασίζεται στη χρήση ιόντων υδροξωνίου H_3O^+ ως αντιδραστήρια. Αναπτύχθηκε το 1995 στην Αυστρία, σε μια προσπάθεια

αντικατάστασης της κλασικής φασματομετρίας μάζας, που οδηγούσε σε θραυσματοποίηση πολλών ιόντων.^[29] Παρατηρήθηκε πως με μεταφορά θερμότητας για ιονισμό των ενώσεων, μειωνόταν σημαντικά ο αριθμός των θραυσμάτων, ενώ ακόμα καλύτερα αποτελέσματα είχε η χρήση αντιδράσεων μεταφοράς ιόντων προς τους ουδέτερους αναλύτες. Πιο συγκεκριμένα, όταν χρησιμοποιείται το H_3O^+ , ως πηγή ιόντων, πραγματοποιείται η εξής αντίδραση:

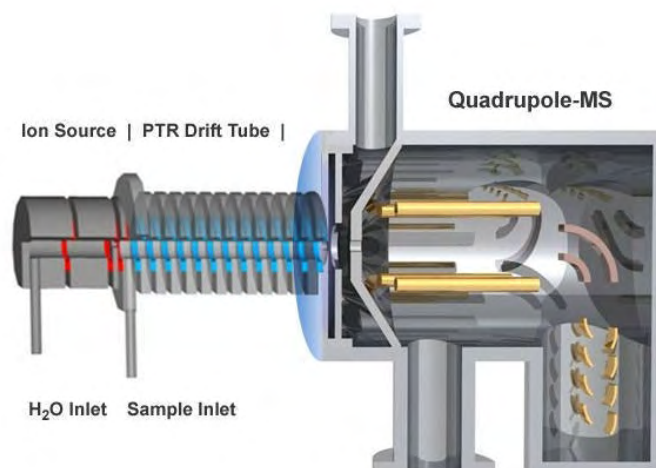


όπου R είναι οποιαδήποτε ένωση του αέρα έχει μεγαλύτερη συγγένεια προς το πρωτόνιο. Προκειμένου η παραπάνω εξίσωση να ισχύει θα πρέπει να είναι εξώθερμη, δηλαδή η συγγένεια των πρωτονίων στο R να είναι μεγαλύτερη από αυτή του νερού. Στην εικόνα 3.2.1 παρουσιάζεται η σχέση της συγγένειας προς το πρωτόνιο των πιο κοινών ΠΟΕ συγκριτικά με του νερού. Αυτές οι ενώσεις που έχουν μεγαλύτερη συγγένεια από το νερό, είναι ανιχνεύσιμες μέσω PTR-MS.



Εικόνα 3.2.1: Παρουσίαση της συγγένειας προς το πρωτόνιο των πιο κοινών ΠΟΕ, εν συγκρίσει με του νερού. (Ανακτήθηκε στις 16/1/2019 από https://www.tofwerk.com/proton-transfer-reaction-mass-spectrometry/?gclid=Cj0KCQiA1NbhBRCBARIsAKOTmUvfuGNHZtKoVQuA-eSd60JHcq_jm2OfuOIVnByoiYykuFd7IHRqtwAlOaEALw_wcB)

Οργανολογικά, αποτελείται από την πηγή ιόντων, το χώρο αντίδρασης, το σωλήνα εκτροπής και με έναν αναλυτή μαζών (τετραπολικό/Quadrupole ή χρόνου πτήσης/TOF), όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.2.1



Εικόνα 3.2.1: Απεικόνιση της οργάνολογίας ενός συστήματος PTR-MS. Περιλαμβάνει μία πηγή ιόντων, το σημείο εισαγωγής του H₂O και το αντίστοιχο του δείγματος, το χώρο αντίδρασης, το σωλήνα μέσω του οποίου τα παραγόμενα ιόντα διέρχονται στον αναλυτή μαζών και τον αναλυτή που στην προκειμένη περίπτωση είναι ο τετραπολικός. (Ανακτήθηκε στις 11/10/2018 από <https://www.ionicon.com/information/events/7th-international-ptr-ms-conference-2016>)

- Πηγή ιόντων: Η πιο κοινή μορφή των πηγών αυτών περιλαμβάνει μια κάθοδο που παράγει τα H₃O⁺ από αέρα. Άλλα ιόντα, που είναι παρόντα στην κάθοδο παράλληλα με τα H₃O⁺ υφίστανται περαιτέρω αντιδράσεις με το H₂O προς σχηματισμό ιόντων υδροξωνίου, έτσι ώστε τελικά να προκύψει περιεκτικότητα 99.5% στα ιόντα αυτά.
- Χώρος αντίδρασης: Οι αντιδράσεις μεταξύ των ιόντων υδροξωνίου και των ΠΟΕ, πραγματοποιούνται σε χώρο ελεγχόμενων ηλεκτρικών πεδίων και σταθερής θερμοκρασίας και πίεσης. Η σταθερότητα στις παραμέτρους αυτές είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των ΠΟΕ σε πραγματικό χρόνο.
- Διεπιφάνεια συγκέντρωσης ιόντων: Γίνεται μεταφορά των ιόντων από το χώρο αντίδρασης στον αναλυτή μαζών μέσω ρύθμισης της διαφοράς πίεσης ανάμεσα στα δύο αυτά τμήματα του φασματογράφου.
- Αναλυτής μαζών: Ανιχνεύει τα ιόντα των αναλυτών και επιτρέπει την ταυτοποίηση των ΠΟΕ με βάση το λόγο m/z, ενώ παράλληλα προσδιορίζει τις συγκεντρώσεις τους βάσει της έντασης των κορυφών τους.

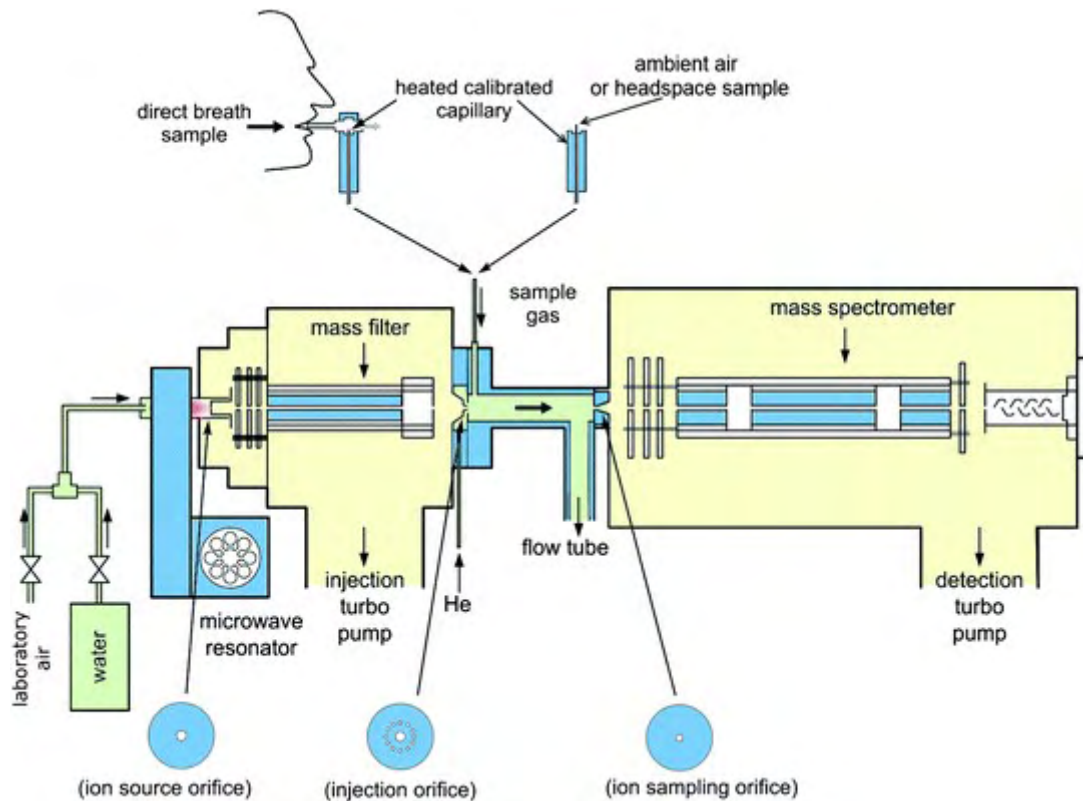
Αυτό το σύστημα, βρίσκει εφαρμογή στην ανάλυση των ΠΟΕ σε δείγματα αέρα, στην ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων, τη βιομηχανία τροφίμων και ποτών καθώς και στην ιατρική και βιοτεχνολογία. Εκτός από το βασικό πλεονέκτημα, που είναι η χαμηλή θραυσματοποίηση, το σύστημα PTR-MS έχει επίσης μεγάλη αποτελεσματικότητα και ευαισθησία και δεν απαιτεί προετοιμασία ή διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος πριν την ανάλυση. Από την άλλη, δε μπορεί πάντα να ανιχνεύσει όλα τα μόρια, καθώς όπως αναφέρθηκε πολλά έχουν μικρότερη συγγένεια από το νερό κι άρα δεν αντιδρούν με το H₃O⁺.

Επιπλέον, η μέγιστη μετρήσιμη συγκέντρωση είναι περιορισμένη κι έτσι οι ολικές ΠΟΕ στον αέρα, δε θα πρέπει να ξεπερνούν τα 10ppm, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η γραμμικότητα των αποτελεσμάτων.

3.3 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ-ΣΩΛΗΝΑΣ ΡΟΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΙΟΝΤΩΝ (SELECTED ION FLOW TUBE MASS SPECTROMETRY/ SIFT-MS)

Είναι μία τεχνική μέτρησης της συγκέντρωσης πτητικών ενώσεων στον αέρα συμπεριλαμβανομένου και της εκπνοής, σε πραγματικό χρόνο. Βασίζεται στο χημικό ιονισμό των προς ανάλυση ενώσεων, με τη χρήση θετικά φορτισμένων ιόντων όπως τα H_3O^+ , NO^+ και O_2^+ μέσω αντιδράσεων που πραγματοποιούνται σε προκαθορισμένο χρόνο. (SIFT-MS Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry, ανακτήθηκε από <http://www.sift-ms.net/> στις 2/11/2018) Η επιλογή των αντιδρώντων ιόντων, γίνεται έτσι ώστε να μην αντιδρούν γρήγορα με τις κύριες ενώσεις του αέρα, δηλαδή με τα N_2 , O_2 , Ar και CO_2 , αλλά να αντιδρούν εύκολα με αέρια και ατμούς που βρίσκονται σε ίχνη και έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ιατρική ή το περιβάλλον. Οι συγκεντρώσεις υπολογίζονται από την αναλογία αντιδρώντων ιόντων και των προϊόντων, με σύνηθες όριο ανίχνευσης το 1 ppb, χωρίς να υπάρχει ανάγκη για προετοιμασία των δειγμάτων και βαθμονόμηση του οργάνου. Αρχικά αναπτύχθηκε ως μία επέκταση της SIFT τεχνικής, για χρήση στην ανάλυση της ανθρώπινης εκπνοής και αποδείχθηκε αρκετά αποτελεσματική ως μη επεμβατική τεχνική για την πρόωρη διάγνωση ασθενειών. Επιπλέον, έχει εφαρμογή και σε άλλα πεδία όπως είναι η ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων και η βιομηχανία τροφίμων και ποτών.

Όπως παρατηρείται στην εικόνα 3.2.1, η οργανολογία ενός συστήματος SIFT-MS αποτελείται από μία πηγή ιόντων πλάσματος, συνήθως από ένα μίγμα εργαστηριακού αέρα και ατμών ύδατος. Από το σχηματιζόμενο πλάσμα, μόνο ένα συγκεκριμένο είδος ιόντων επιλέγεται μέσω κατάλληλου φίλτρου (mass filter) και αποτελούν τα πρόδρομα ιόντα. Στις περισσότερες αναλύσεις με SIFT-MS, ως πρόδρομα ιόντα χρησιμοποιούνται τα H_3O^+ , NO^+ και O_2^+ , που είναι γνωστό ότι δεν αντιδρούν σημαντικά με τα κύρια μόρια του αέρα, ενώ μπορούν να αντιδράσουν με αρκετές ενώσεις που βρίσκονται ακόμα και σε ίχνη στον αέρα. Στη συνέχεια, τα ιόντα αυτά εισέρχονται σε ένα φέρον αέριο, συνήθως He , και ρέουν κατά μήκος του σωλήνα ροής. Ταυτόχρονα, γίνεται εισαγωγή των μορίων προς ανάλυση με αποτέλεσμα να προκύπτει χημικός ιονισμός αντιδρώντας με τα πρόδρομα μόρια, προς σχηματισμό νέων προϊόντων ιόντων. Η πιθανότητα χημικού ιονισμού, εξαρτάται από τις χημικές ιδιότητες των αναλυτών, όπως είναι η συγγενεία τους προς το πρωτόνιο ή η ενέργεια ιονισμού τους. Τέλος, τα προϊόντα εισέρχονται στο φασματογράφο, ο οποίος περιλαμβάνει ένα δεύτερο φίλτρο μαζών καθώς και ανιχνευτή για τη διάκριση των ιόντων βάσει του λόγου m/z και τον υπολογισμό των εντάσεων των κορυφών.



Εικόνα 3.3.1: Απεικόνιση της οργανολογίας SIFT-MS, που χρησιμοποιείται για την ανάλυση της ανθρώπινης εκπνοής. (Ανακτήθηκε από <http://www.sift-ms.com/> στις 5/11/2018).

3.4 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (GAS CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY /GC-MS)

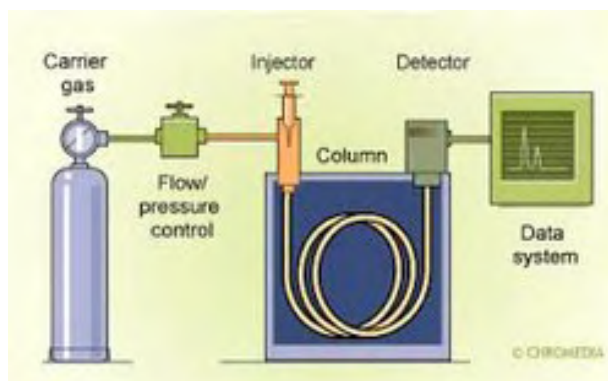
Πρόκειται για off-line τεχνική ανάλυσης, που συνδυάζει την αέρια χρωματογραφία με τη φασματομετρία μάζας. Αναπτύχθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1950 ^[27] κι έκτοτε η εισαγωγή νέων και βελτιωμένων μηχανημάτων και υπολογιστών, οδήγησε σε αρκετά μειωμένους χρόνους ανάλυσης με μεγαλύτερη αποδοτικότητα. Οργανολογικά, αποτελείται από δύο τμήματα: το χρωματογράφο και το φασματογράφο μάζας, όπως παρατηρείται και στην εικόνα 3.4.1.



Εικόνα 3.4.1: Σύστημα Thermo Electron Corporation Ultra PolarisQ GC/MS Ion Trap Mass Spectrometer , παρόμοιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. (Ανακτήθηκε στις 12/12/2018 από https://americanlaboratorytrading.com/lab-equipment-products/thermo-electron-corporation-ultra-polarisq-gcms-ion-trap-mass-spectrometer-system_10833)

Αέρια Χρωματογραφία

Πρόκειται για τον πιο συνήθη τύπο χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την ανάλυση πτητικών ενώσεων. Όπως κάθε τύπος χρωματογραφίας, αποτελείται από δύο φάσεις, μία στατική και μία κινητή. Στην περίπτωση της αέριας χρωματογραφίας η κινητή φάση περιλαμβάνει ένα φέρον αέριο, συνήθως αδρανές όπως το ήλιο ή το άζωτο, ενώ η στατική αποτελείται από ένα στρώμα υγρού ή πολυμερούς, που συγκρατείται σε αδρανές στερεό υλικό εντός της χρωματογραφικής στήλης. Ο διαχωρισμός των ουσιών, βασίζεται στη διαφορετική κατανομή τους μεταξύ των δύο φάσεων, ως αποτέλεσμα της διαφορετικής συγγένειας κι άρα αλληλεπίδρασης της κάθε μίας με τη στατική φάση. Ο χρόνος κατακράτησης, δηλαδή ο χρόνος που χρειάζεται κάθε ουσία από τη στιγμή εισόδου της στον αέριο χρωματογράφο μέχρι να εξέλθει από αυτόν, είναι χαρακτηριστικός της κάθε ουσίας, βοηθώντας στην ταυτοποίησή τους. Στην εικόνα 3.4.2, παρουσιάζεται η γενική οργάνολογία ενός αέριου χρωματογράφου:

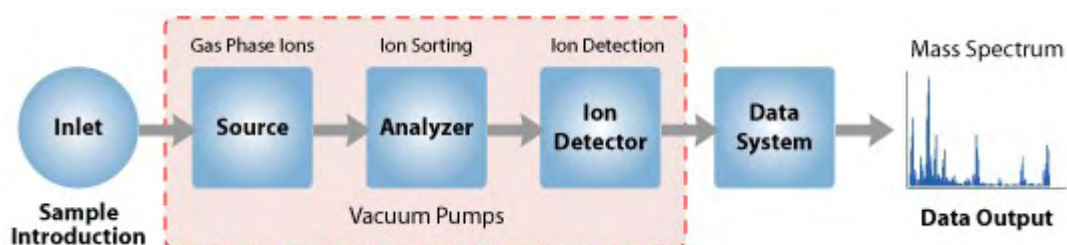


Εικόνα 3.4.2: Σύστημα αέριου χρωματογράφου που περιλαμβάνει τη φιάλη φέροντος αερίου, το ρυθμιστή ροής του αερίου, το σύστημα έγχυσης δείγματος, τη χρωματογραφική στήλη, τον ανιχνευτή και τέλος τον καταγραφέα σήματος. (Ανακτήθηκε στις 27/11/2018 από <https://chem-net.blogspot.com/2013/07/what-is-gas-chromatography-gc.html>)

Όπως παρατηρείται, η στήλη διατηρείται μέσα σε φούρνο, η θερμοκρασία του οποίου ρυθμίζεται ηλεκτρονικά. Ο ρυθμός διέλευσης δείγματος μέσω της στήλης, εξαρτάται άμεσα από τη θερμοκρασία αυτή, έτσι απαιτείται προσεκτική ρύθμιση του θερμοκρασιακού προγράμματος για την επίτευξη μέγιστου διαχωρισμού των ουσιών και την επιλεκτική ανάλυσή τους.

Φασματομετρία μάζας

Πρόκειται για μια ομάδα τεχνικών ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων και της μοριακής δομής τους. Βασίζεται στον ιονισμό των ενώσεων ενός δείγματος και τη μετέπειτα αλληλεπίδραση των ιόντων αυτών με το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο. Η κίνησή τους εντός του πεδίου, εξαρτάται άμεσα από το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z), οδηγώντας έτσι στο διαχωρισμό τους και την καταγραφή του φάσματος μαζών για κάθε ουσία. Η οργανολογία ενός φασματομέτρου μάζας παρουσιάζεται στην εικόνα 3.4.3:



Εικόνα 3.4.3: Απεικόνιση της γενικής οργανολογίας ενός φασματομέτρου μάζας, καθώς και των βασικών βημάτων που ακολουθούνται. (Ανακτήθηκε στις 6/12/2018 από <http://chemicalinstrumentation.weebly.com/mass-spectrometry.html>)

Ένας φασματογράφος μάζας περιλαμβάνει 3 βασικά τμήματα : την πηγή ιόντων, τον αναλυτή μαζών και τον ανιχνευτή.

Υπάρχουν πολλές πηγές ιόντων, ωστόσο αυτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνεργασία με αέρια χρωματογραφία είναι ο χημικός ιονισμός (CI) και ο ιονισμός με ηλεκτρόνια (EI). Στην παρούσα εργασία, ο φασματογράφος μάζας περιλαμβάνει τη δεύτερη πηγή , δηλαδή ο ιονισμός πραγματοποιείται μέσω κρούσης των μορίων του δείγματος, με ηλεκτρόνια εντός της πηγής. Βασικό πλεονέκτημα αυτού του τρόπου ιονισμού είναι η υψηλή θραυσματοποίηση , ως αποτέλεσμα της χρήσης ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. Το θετικό με τη θραυσματοποίηση, είναι η παροχή περισσότερων πληροφοριών για το μοριακό βάρος και τη μοριακή δομή της αναλυόμενης ουσίας οδηγώντας έτσι στην ταυτοποίησή της. Επιπλέον, παρέχει βέλτιστη επαναληψιμότητα των φασμάτων από εργαστήριο σε εργαστήριο , επιτρέποντας έτσι τη διαμόρφωση βιβλιοθηκών φασμάτων που ωφελούν την άμεση ταυτοποίηση των ενώσεων. Από την άλλη, φέρει και σημαντικά μειονεκτήματα, όπως τη μικρή αφθονία ή και απουσία του μοριακού ιόντος, καθώς και τη δυσκολία στην ερμηνεία των φασμάτων λόγω πιθανών μεταθέσεων.

Ο αναλυτής μαζών είναι το τμήμα του φασματογράφου, όπου καταλήγουν τα ιόντα που έχουν δημιουργηθεί για να διαχωριστούν με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z), πριν φτάσουν στον ανιχνευτή. Οι κύριοι τύποι αναλυτών είναι ο τετραπολικός (Quadrupole) , ο αναλυτής χρόνου πτήσης (TOF) , ο παγίδας ιόντων (Ion Trap) και ο τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής παγίδας ιόντων, που αποτελεί ένα συνδυασμό μαγνητικών πεδίων, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη δέσμευση φορτισμένων σωματιδίων. Κύριο πλεονέκτημα αυτού του αναλυτή, είναι το χαμηλό κόστος και οι μειωμένες απαιτήσεις σε χώρο. Ωστόσο, έχει μικρότερη διακριτική ικανότητα σε σχέση με άλλους, όπως ο τετραπολικός αναλυτής, και μέτρια ακρίβεια μάζας στα 50-100 ppm.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΜΕΛΕΤΩΝ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΟΕ ΣΤΟΝ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟ ΑΕΡΑ

Τα τελευταία χρόνια πολλές έρευνες πραγματοποιούνται για τη μελέτη του μεταβολικού προφίλ των οργανικών ενώσεων στον ανθρώπινο οργανισμό, λόγω της επιτακτικής ανάγκης για την πρόωρη διάγνωση ασθενειών όπως ο καρκίνος. Παρά το ότι σε αρκετές από τις έρευνες αυτές χρησιμοποιήθηκαν άλλες μέθοδοι διαχωρισμού και ανάλυσης των ενώσεων της εκπνοής, οι περισσότερες πλέον τείνουν προς τη χρήση του GC-MS, καθώς είναι δυνατός ο διαχωρισμός και προσδιορισμός πλήθους ενώσεων με μεγάλο ενδιαφέρον όπως είναι η ακετόνη, το βενζόλιο, η βουτανόνη και άλλες.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 108 ασθενείς με μη φυσιολογικά ευρήματα στις ακτινογραφίες θώρακος, συλλέχθηκαν δείγματα εκπνοής τα οποία αναλύθηκαν με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας. Επιπλέον, υπολογίστηκε η κλίση του κυψελιδικού αέρα και η διαφορά στη συγκέντρωση ανάμεσα στον περιβάλλοντα αέρα και την εκπνοή για κάθε μία από τις ΠΟΕ που ταυτοποιήθηκαν. Τέλος, μέσω του διαφορετικού προφίλ ενώσεων στην εκπνοή ασθενών-υγιών ατόμων, έγινε προσπάθεια εκτίμησης των πιθανών βιοδεικτών που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση του καρκίνου. Από τους 108 ασθενείς, μόνο οι 60 διαγνώστηκαν τελικά με καρκίνο του πνεύμονα.^[31] Παρατηρήθηκαν 22 ΠΟΕ, κατά κύριο λόγο αλκάνια ή παράγωγα αυτών, που διέφεραν μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων και οι οποίες ήταν ανεξάρτητες του σταδίου της ασθένειας. Η διαφορά ανάμεσα στα στάδια του καρκίνου, παρατηρήθηκε μόνο στην ευαισθησία της μεθόδου, αφού στο πρώτο στάδιο και για τις 22 ενώσεις επετεύχθη ευαισθησία 100% ενώ για τα επόμενα στάδια μειωνόταν. Τέλος, με διασταύρωση των δεδομένων που προέκυψαν από την ανάλυση της εκπνοής και της διάγνωσης για το κάθε άτομο, επιβεβαιώθηκε η συσχέτιση της παρουσίας των 22 αυτών ενώσεων με τον καρκίνο του πνεύμονα.^[31] Στον πίνακα 4.1.1, παρατηρούνται οι 22 ενώσεις με στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων.

Styrene (ethenylbenzene)
 Heptane, 2,2,4,6,6-pentamethyl
 Heptane, 2-methyl
 Decane
 Benzene, propyl-
 Undecane
 Cyclopentane, methyl-
 Cyclopropane, 1-methyl-2-pentyl-
 Methane, trichlorofluoro-
 Benzene
 Benzene, 1,2,4-trimethyl-
 1,3-butadiene, 2-methyl- (isoprene)
 Octane, 3-methyl-
 1-hexene
 Nonane, 3-methyl-
 1-heptene
 Benzene, 1,4-dimethyl
 Heptane, 2,4-dimethyl
 Hexanal
 Cyclohexane
 Benzene, 1-methylethenyl-
 Heptanal

Πίνακας 4.1.1: 22 ΠΟΕ για τις οποίες παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ ασθενών-υγιών ατόμων ^[31]

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε άλλες μελέτες ασθενών-μαρτύρων. Κατά τους Ligor et al, συλλέχθηκαν δείγματα αέρα από 65 ασθενείς διαφορετικών σταδίων καρκίνου του πνεύμονα οι οποίοι ακολουθούσαν διαφορετικές θεραπευτικές αγωγές και από υγιή άτομα. Τα δείγματα αυτά ταυτοποιήθηκαν και αναλύθηκαν μέσω SPME/GC-MS με χρήση CAR/PDMS ίνας. Με τη μέθοδο αυτή, επετεύχθη ταυτοποίηση 103 ενώσεων εκ των οποίων το 1/3 ήταν υδρογονάνθρακες, όπως αρωματικές ενώσεις, κετόνες και αλδεΐδες. Το 15% των ενώσεων, είχε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην εκπνοή σε σχέση με τον περιβάλλοντα αέρα, κάτι που πιθανολογείται ότι οφείλεται στις διατροφικές αλλά και τις καθημερινές συνήθειες των ατόμων, όπως το κάπνισμα ή η άθληση. Αρκετές ενώσεις, όπως η ακετόνη, το ισοπρένιο και η ισοπροπανόλη ήταν παρούσες σε όλα τα δείγματα ανεξαιρέτως, οπότε δε λήφθηκαν υπόψη για τη διάκριση μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων. Επιπλέον, άλλες ενώσεις όπως το βενζόλιο και το ακετονιτρίλιο παρατηρήθηκαν μόνο σε καπνιστές, ανεξαρτήτως του αν ήταν ασθενείς ή υγιείς. Από το σύνολο των ταυτοποιημένων ενώσεων, οι 80 ήταν παρούσες μόνο στους καρκινοπαθείς και όχι σε υγιή άτομα. Προτάθηκε ωστόσο, πιθανά λόγω χαμηλής ευαισθησίας της SPME, οι ενώσεις να ήταν παρούσες και στους μάρτυρες σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες του ορίου ανίχνευσης (LOD). Τέλος η διάκριση ανάμεσα στα υγιή και τα ασθενή άτομα, δηλαδή η διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, βασίστηκε σε 8 ενώσεις που δεν παρατηρήθηκαν στους πρώτους. Αυτές ήταν η 1-προπανόλη, η 2-βουτανόλη, η 3-βουταν-2-όλη, η βενζαλδεΐδη, το 2-μεθυλ-πεντάνιο, το 3-μεθυλ-πεντάνιο, το ν-πεντάνιο και το ν-εξάνιο.

Κατά τους Phillips et al, αναλύθηκαν μέσω GC-MS δείγματα εκπνοής από 178 ασθενείς με μη φυσιολογικά ευρήματα βρογχοσκόπησης και 41 υγιή άτομα. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα της ανάλυσης δειγμάτων από ασθενείς με πρωτογενή καρκίνο του πνεύμονα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα υγιών ατόμων, προς δημιουργία ενός πιθανού διαγνωστικού μοντέλου. Τέλος, έγινε διασταύρωση των δεδομένων που προέκυψαν από το μοντέλο αυτό

με ασθενείς που δεν είχαν διαγνωστεί με καρκίνο και με ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα. Η κλινική διάγνωση έδειξε καρκίνο του πνεύμονα μόνο σε 87 από τους 178 ασθενείς, εκ των οποίων οι 67 είχαν πρωτογενή, οι 15 μεταστατικό ενώ για 5 δεν έγινε ταυτοποίηση. Το διαγνωστικό μοντέλο που δημιουργήθηκε, βασίστηκε σε 9 ΠΟΕ και προέβλεψε τον πρωτογενή καρκίνο με ευαισθησία 89,6% (60 από τους 67 ασθενείς) και με ειδικότητα 82,9% (34 από τους 41 ασθενείς). Με τη διασταύρωση δεδομένων, επετεύχθη διάγνωση του μεταστατικού καρκίνου με ευαισθησία 66,7% (10 από 15 ασθενείς) και ταξινόμησε τους ασθενείς με αρνητικά αποτελέσματα βρογχοσκόπησης ως μη καρκινοπαθείς με ευαισθησία 37,4% (34 από 91 ασθενείς)^[32]

Πρόσφατα δημοσιευμένες βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις, παρέχουν μια σύνοψη των δεδομένων αναφορικά με το μεταβολικό προφίλ των ΠΟΕ στον καρκίνο του πνεύμονα. Χαρακτηριστικά για τους Hua et al, 38 μελέτες με 4873 συμμετέχοντες πληρούσαν τα κριτήρια για να συμπεριληφθούν στη συστηματική ανασκόπηση που υλοποιήθηκε. Συνοπτικά, παρατηρήθηκε πως 34 πτητικές ενώσεις, μεταξύ των οποίων αλκάνια, αλδεΐδες, κετόνες, αλκένια και παράγωγα βενζολίου ανιχνεύθηκαν σε τρεις ή περισσότερες μελέτες. Η πιο κοινή ΠΟΕ για την ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα ήταν το βενζόλιο, το οποίο ανιχνεύτηκε συνολικά σε 10 μελέτες. ^[33]Σε 3 ή περισσότερες μελέτες παρατήθηκαν, επίσης, αρκετά συχνά τα αλκάνια και πιο συγκεκριμένα το δεκάνιο, και οι αλδεΐδες, καθιστώντας τις δύο αυτές ομάδες ενώσεων πιο πιθανές για την ανίχνευση του καρκίνου σε σχέση με τις υπόλοιπες. ^[33]Σε αρκετές από τις μελέτες, υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ΠΟΕ στον εκπνεόμενο αέρα για κάθε τύπο καρκίνου του πνεύμονα. Εν αντιθέσει, τα αποτελέσματα αναφορικά με τη σχέση των ΠΟΕ και των σταδίων της ασθένειας είναι αμφιλεγόμενα και απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση. Από τη συγκεκριμένη ανασκόπηση προκύπτει πως δεδομένες ΠΟΕ στην ανθρώπινη εκπνοή, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, ωστόσο είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση επιπλέον μελετών στον τομέα αυτό, πριν εφαρμοστούν στην κλινική πράξη.

Παρόμοια ευρήματα προκύπτουν και στην ανασκόπηση των J. Zhou et al, όπου συμπεριλήφθηκαν μελέτες για το χρονικό διάστημα 1999 έως και το Μάιο του 2017. Στην ανασκόπηση αυτή, παρουσιάζονται οι 19 πιο κοινές ΠΟΕ μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται το βενζόλιο και τα παράγωγά του, αλκάνια, αλδεΐδες και κετόνες. Ο προσδιορισμός αυτών πραγματοποιήθηκε στο μεγαλύτερο μέρος των μελετών με GC-MS ανάλυση και η απομόνωση κατά κύριο λόγο έγινε με τη χρήση της μεθόδου SPME. Οι ενώσεις ανιχνεύθηκαν με καλή ευαισθησία για όλες τις μελέτες, με εύρος από 70% έως και 100% και με ειδικότητα από 71.7% ως 100%. ^[34]Βάσει της ανασκόπησης παρατηρήθηκε πως για τις 19 αυτές ΠΟΕ, οι συγκεντρώσεις στην εκπνοή ήταν αυξημένες ή μειωμένες σε σχέση με τις αντίστοιχες σε υγιή άτομα. Αντίστοιχα με την ανασκόπηση των Hua et al, δεν τεκμηριώθηκε η συσχέτιση μεταξύ των ΠΟΕ και των σταδίων του καρκίνου του πνεύμονα. Συμπέρασμα της ανασκόπησης αυτής είναι πως δεδομένες ΠΟΕ έχουν τη δυνατότητα να αποτελέσουν βιοδείκτες για τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, ωστόσο η κλινική εφαρμογή δεν είναι άμεσα εφικτή λόγω έλλειψης προτυποποίησης των μεθόδων συλλογής δειγμάτων και ανάλυσής τους. ^[34]Συνεπώς, επιπλέον μελέτες απαιτούνται για την αύξηση των

πιθανοτήτων ανακάλυψης και επικύρωσης κλινικών βιοδεικτών για τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα και τη διάκριση μεταξύ των διαφορετικών τύπων του.

Σε πλήθος αναφορών σχετικά με τις «ηλεκτρονικές μύτες» (electronic noses), έχει αποδειχτεί η χρήση τους ως μέθοδος ανάλυσης του εκπνεόμενου αέρα. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Rocco et al, οι ηλεκτρονικές μύτες έχουν τη δυνατότητα διάκρισης και κατηγοριοποίησης μεταξύ των διάφορων χρόνιων ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος.^[35] Χαρακτηριστικό παράδειγμα βάσει της βιβλιογραφίας, είναι η διάκριση μέσω e-nose μεταξύ των ατόμων με άσθμα και των ατόμων χωρίς.^[36] Επιπλέον, η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στη διάκριση μεταξύ ασθενών με νευρολογικές διαταραχές και υγιών ατόμων.^[37] Αναφορικά με τον καρκίνο του πνεύμονα, κατά τους McWilliams et al παρατηρήθηκε πως η ηλεκτρονική μύτη μπορούσε να διακρίνει μεταξύ ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και υγιών καπνιστών, με ακρίβεια μεγαλύτερη του 80% αποτελώντας ένα πιθανό εργαλείο διάγνωσης του καρκίνου.^[38] Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν οι Rocco et al όπου με την επικύρωση και χρήση της μεθόδου e-nose, προσδιόρισαν τη διαφορά στο προφίλ των ενώσεων σε ασθενείς και υγιή άτομα με ευαισθησία και ακρίβεια 86 και 95% αντίστοιχα.^[39] Με βάσει τις ήδη δημοσιευμένες αναφορές, η ηλεκτρονική μύτη είναι μια αρκετά υποσχόμενη μέθοδος ανάλυσης των ΠΟΕ με πιθανή εφαρμογή στη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, παρά το πλήθος των περιορισμών που μπορεί να φέρει. Επομένως, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περισσότερων μελετών με σκοπό τη σταδιακή εφαρμογή της στην κλινική πράξη για τη διάγνωση χρόνιων ασθενειών.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

- Φιαλίδια Supelco χωρητικότητας 15ml
- Φιαλίδια Supelco χωρητικότητας 4ml
- Φιαλίδια Perkin Elmer χωρητικότητας 2ml
- Πιπέτα BIORIT χωρητικότητας 100-1000μl
- Μικρο-σύριγγα Trajan 100μl
- Μικρο-σύριγγα ILS 10μl
- Πρότυπα διαλύματα ουσιών (ισοπρένιο, ακετόνη, ισοπροπανόλη, εξάνιο, 1-προπανόλη, 2-βουτανόνη, κυκλοεξάνιο, βενζόλιο, θειοφένιο, 1-βουτανόλη, τολουόλιο, οκτάνιο, εξανάλη, εθυλ-βενζόλιο, στυρένιο, κυκλοεξανόνη, οκτανάλη, εννεάλη, δεκανόλη)
- Διαλύτης μεθανόλη Sigma Aldrich Chromasolv for HPLC, $\geq 99.9\%$

Για την απομόνωση των αναλυτών από τα δείγματα αέρα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική SPME με τα εξής υλικά:

- Ίνα Supelco SPME Fiber Assembly
75μm CAR/PDMS, Fused Silica
24Ga, Manual Holder, 3pk (Black)
- Ίνα Supelco SPME Fiber Assembly
100um PDMS, Fused Silica
24Ga, Manual Holder, 3pk (Red)
- Σάκοι δειγματοληψίας Tedlar χωρητικότητας 1L

1.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΒΕΛΤΙΣΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΑΝΑΛΥΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΑΕΡΙΟ ΔΕΙΓΜΑ

Η δειγματοληψία πραγματοποιείται σε σάκους Tedlar όγκου 1 L και η προσυγκέντρωση επιτυγχάνεται με τη μέθοδο SPME. Στα πλαίσια της ανάπτυξης της μεθοδολογίας, ήταν απαραίτητος ο καθορισμός των βέλτιστων συνθηκών απομόνωσης των ουσιών από τα δείγματα αέρα. Για τον καθορισμό αυτό, πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων με σκοπό i) την επιλογή της κατάλληλης ίνας SPME για τις ουσίες που μελετώνται ii) την επιλογή του βέλτιστου χρόνου έκθεσης της ίνας στο αέριο μείγμα.

1.2.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΙΝΑΣ SPME

Για την επιλογή της κατάλληλης ίνας SPME, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά υλικά επικάλυψης : τα PDMS 100 μ m και CAR/PDMS 75 μ m. Η σύγκριση μεταξύ των δύο είχε ως σκοπό την εκτίμηση της πιο αποδοτικής, σύμφωνα με το λόγο των εμβαδών των κορυφών που ελήφθησαν . Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση ενισχυμένων δειγμάτων 8 ενώσεων με κάθε μία από τις ίνες και ελήφθησαν τα εμβαδά των κορυφών τους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 1.2.1.

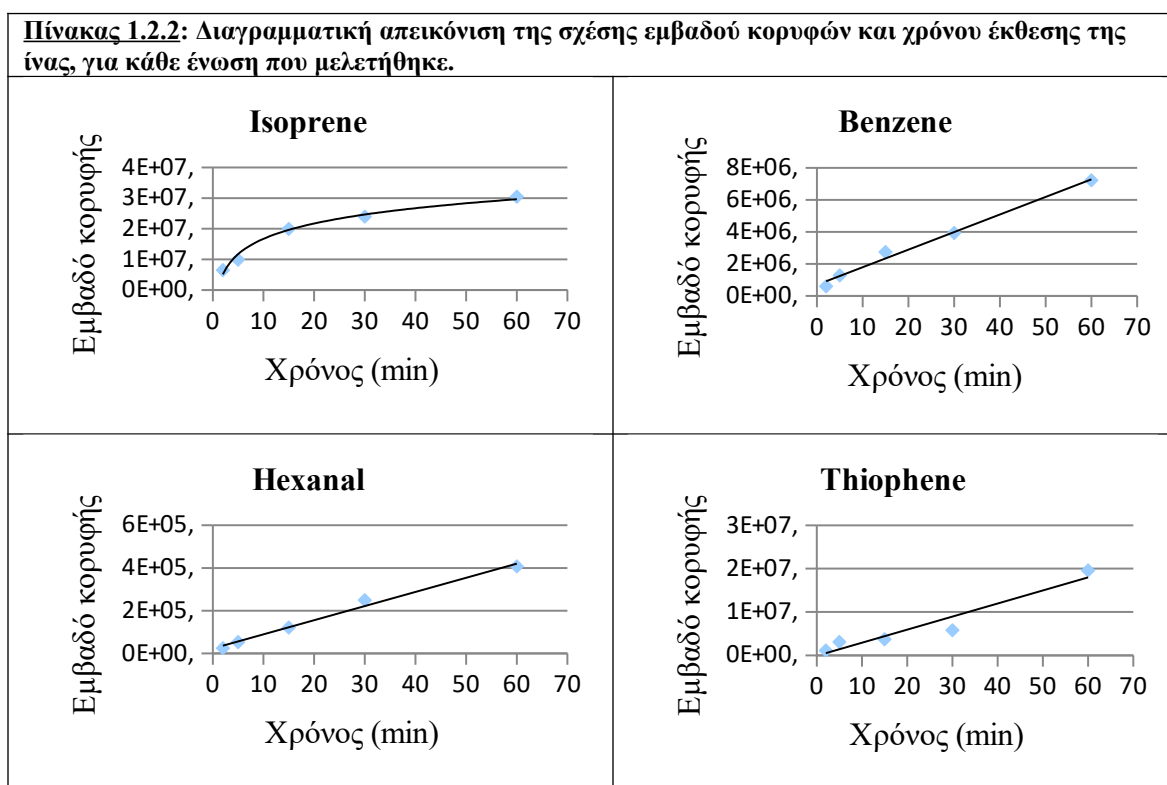
Πίνακας 1.2.1: Παρουσίαση των αποτελεσμάτων σύγκρισης της απόδοσης των δύο διαφορετικών ινών.			
	Area (PDMS)	Area (CAR/PDMS)	Ratio
Isoprene	ND	1791254	NA
Benzene	34972	6670646	190.7
Thiophene	29116	8484231	291.4
Ethyl-butyrate	20016	735332	36.7
Hexanal	18842	493256	26.2
Octane	26751	789423	29.5
Styrene	346297	5382974	15.5
Cyclohexanone	207008	22573590	12.4

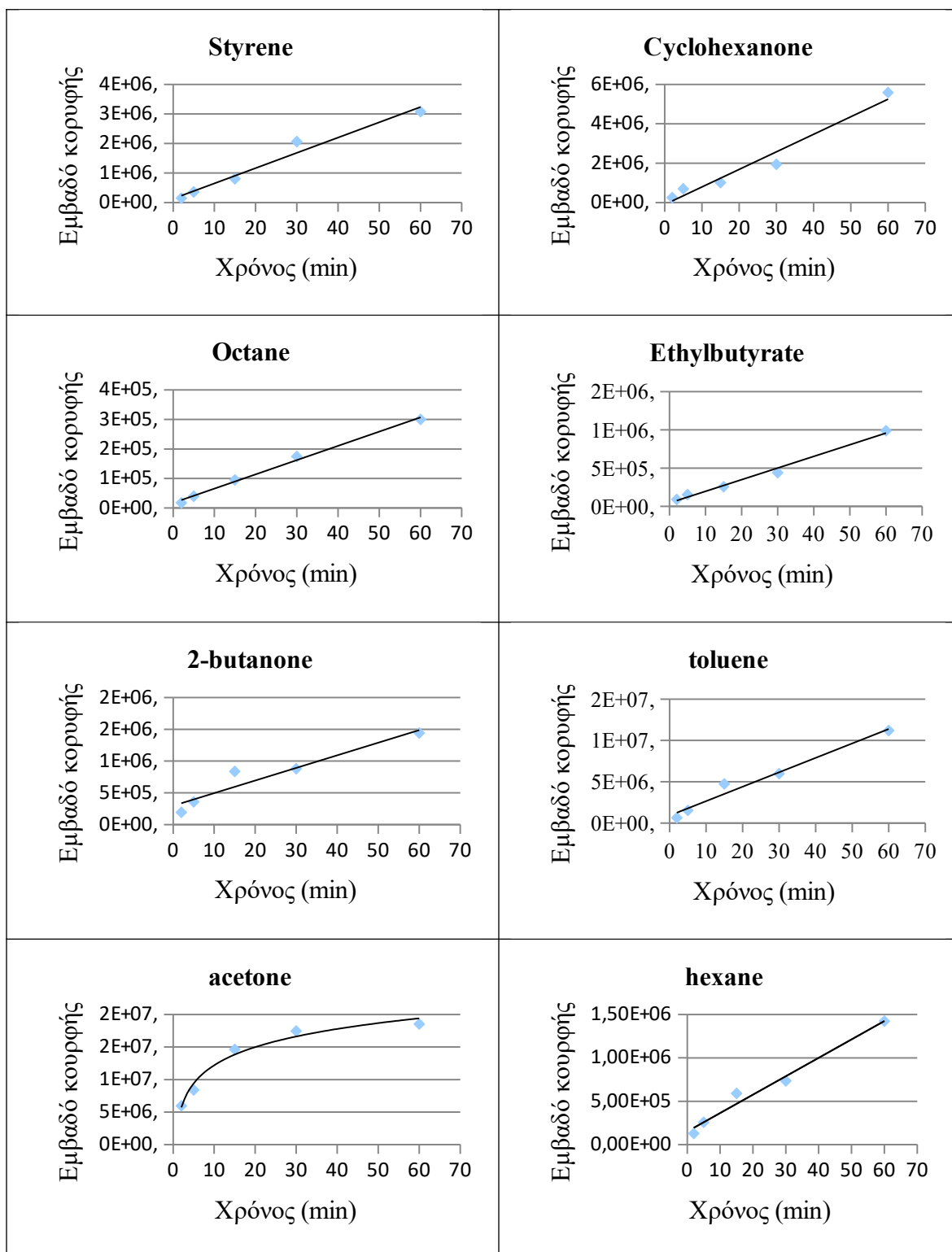
Από τον πίνακα παρατηρείται ότι ο λόγος των εμβαδών κυμαίνεται από περίπου 12 έως 291 ανάλογα με την ένωση, που σημαίνει πως η ανάκτησή τους είναι καλύτερη στην περίπτωση της CAR/PDMS ίνας. Τα αποτελέσματα αυτά, συμφωνούν με τα αναμενόμενα με βάση τη βιβλιογραφία, όπου αναφέρεται πως οι CAR/PDMS ίνες είναι πιο αποδοτικές στην ανάκτηση ενώσεων με χαμηλό μοριακό βάρος σε σχέση με τις PDMS. ^[40] Οι τελευταίες παρουσιάζουν μικρότερη ανάκτηση στην περίπτωση των πτητικών ενώσεων, ειδικότερα όσο αυξάνεται το μοριακό τους βάρος και μειώνεται η πτητικότητα. ^[41] Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγούν και τα δεδομένα από την πειραματική διαδικασία που πραγματοποιήθηκε, καθώς όπως φαίνεται από τον πίνακα, όσο πιο μεγάλο το μοριακό βάρος της ένωσης τόσο πιο μικρή

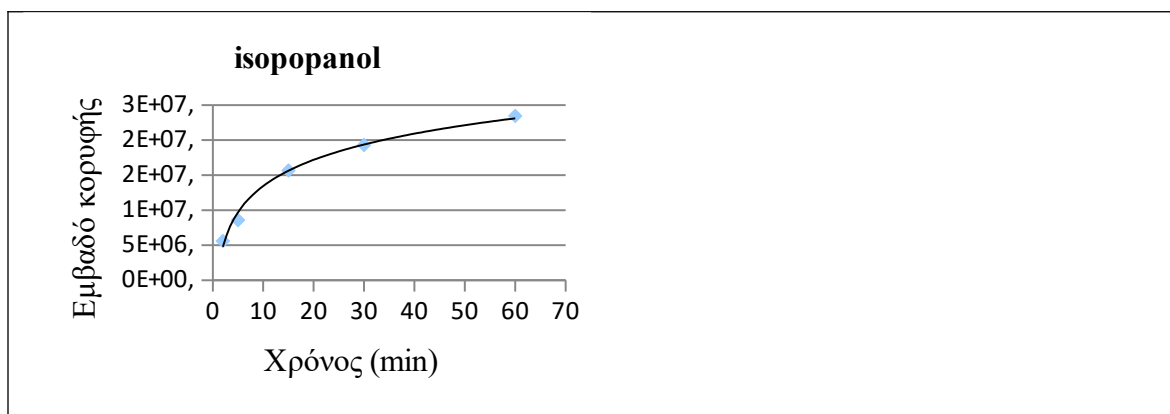
η ανάκτηση με PDMS ίνα και άρα τόσο πιο μεγάλος ο λόγος των εμβαδών. Στην περίπτωση των θειοφένιο και βενζόλιο για παράδειγμα, με μοριακά βάρη 84.14 g/mol και 78.11 g/mol αντίστοιχα, οι λόγοι είναι 291.4 και 190.7 δηλαδή όσο αυξημένο το μοριακό βάρος, τόσο καλύτερη η απόδοση της CAR/PDMS σε σχέση με τη PDMS ίνα.

1.2.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΒΕΛΤΙΣΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΕΚΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΙΝΑΣ ΣΤΟ ΑΕΡΙΟ ΜΙΓΜΑ

Για την μελέτη της επίδρασης του χρόνου έκθεσης της ίνας πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις ενισχυμένων (spiked) δειγμάτων καθορισμένης συγκέντρωσης (calibration level 7) σε διαφορετικούς σάκους, εφαρμόζοντας διαφορετικούς χρόνους έκθεσης. Οι χρόνοι που εφαρμόστηκαν ήταν 2min, 5min, 15min, 25min και 60min. Στον πίνακα 1.2.2 παρουσιάζονται τα διαγράμματα εμβαδού κορυφών-χρόνου έκθεσης για κάθε μία από τις ενώσεις που μελετήθηκαν.

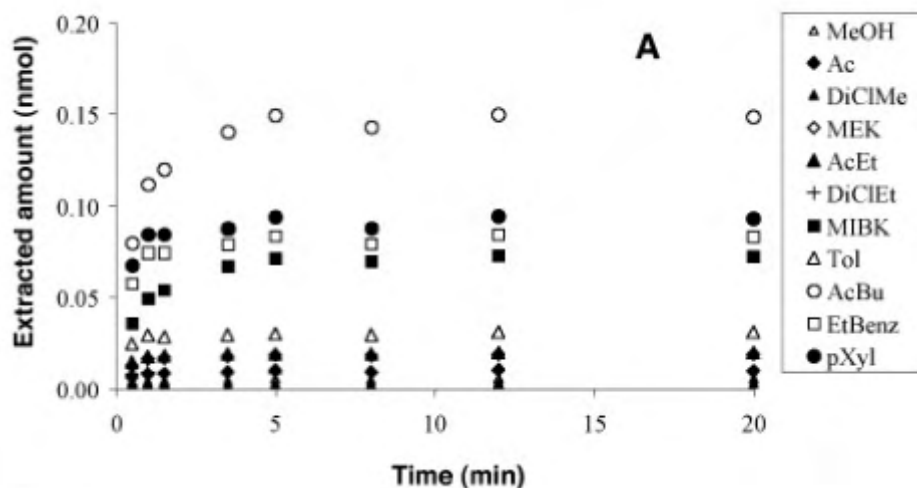




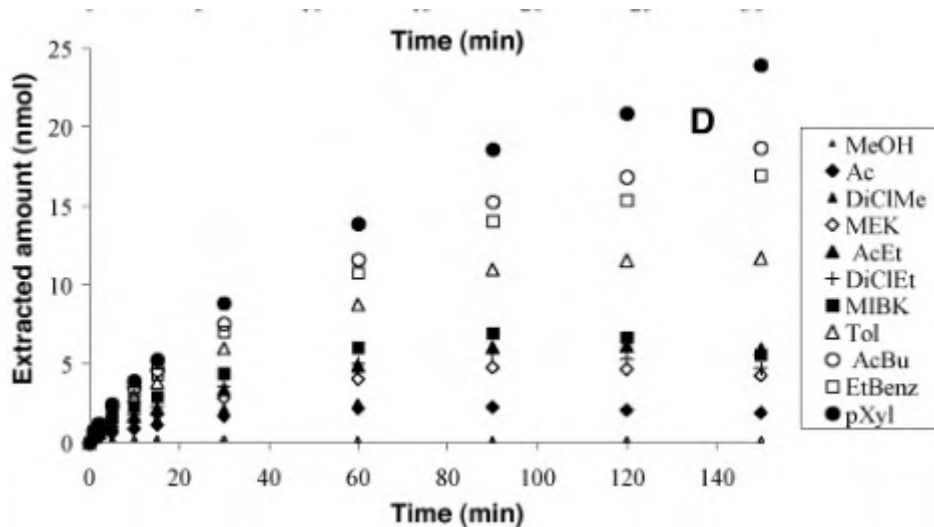


Όπως παρατηρείται, για το σύνολο των ουσιών το εμβαδό των κορυφών αυξήθηκε με την αύξηση του χρόνου έκθεσης. Για κάθε ένωση, η σχέση της αύξησης αυτής διαφέρει. Για τις ενώσεις βενζόλιο, εξανάλη, στυρένιο, οκτάνιο, εθυλ-βουτυρικός εστέρας, 2-βουτανόνη, τολουόλιο, θειοφένιο, κυκλοεξανόνη και εξάνιο, η σχέση αυτή είναι γραμμική. Αντίθετα, για τις ενώσεις ισοπροπανόλη, ακετόνη και ισοπρένιο, η σχέση είναι λογαριθμική. Για τις περισσότερες ενώσεις η ανάκτηση ήταν μεγαλύτερη στα 60min, ωστόσο επελέγησαν τα 25min ως βέλτιστος χρόνος έκθεσης αφού όλες οι ΠΟΕ ήταν ανιχνεύσιμες. Βασική προϋπόθεση είναι να τηρείται ακρίβεια στο χρόνο έκθεσης της ίνας, καθώς όπως είναι εμφανές από τα διαγράμματα, μικρή μεταβολή του χρόνου μπορεί να προκαλέσει μεγάλη αύξηση του ποσοστού ανάκτησης.

Σημαντικό ρόλο στην επιλογή του βέλτιστου χρόνου έκθεσης, φαίνεται να παίζει και το υλικό επικάλυψης της ίνας με βάση τη βιβλιογραφία. Κατά τους Tuduri et al, ως χρόνος εκχύλισης ορίστηκε ο χρόνος μέχρι τη στιγμή που επέρχεται ισορροπία στο δείγμα και μελετήθηκε με τη χρήση PDMS και CAR/PDMS ίνας. Στην έρευνα αυτή, παρατηρήθηκε πως ο χρόνος που απαιτήθηκε κατά μέσο όρο για την επίτευξη της ισορροπίας με PDMS ίνα ήταν τα 5min ενώ για την CAR/PDMS ίνα ήταν τα 150min. Στις εικόνες 1.2.1 και 1.2.2 παρουσιάζονται τα γραφήματα χρόνου εκχύλισης και ποσότητας που εκχυλίστηκε για τις PDMS και CAR/PDMS ίνες αντίστοιχα ^[40]



Εικόνα 1.2.1: Ποσότητα ουσιών που εκχυλίστηκαν σε σχέση με το χρόνο εκχύλισης με χρήση PDMS ίνας. [40]



Εικόνα 1.2.2: Ποσότητα ουσιών που εκχυλίστηκαν σε σχέση με το χρόνο εκχύλισης με χρήση CAR/PDMS ίνας. [40]

Από τα γραφήματα, παρατηρείται πως για τις PDMS ίνες μετά τα 5min έχει επέλθει ισορροπία και συνεπώς η ποσότητα των ουσιών που εκχυλίζονται, δε μεταβάλλεται περαιτέρω με το χρόνο. Αντιθέτως στο γράφημα όπου είχε χρησιμοποιηθεί η CAR/PDMS ίνα η εκχυλιζόμενη ποσότητα αυξάνεται συνεχώς με το χρόνο εκχύλισης.

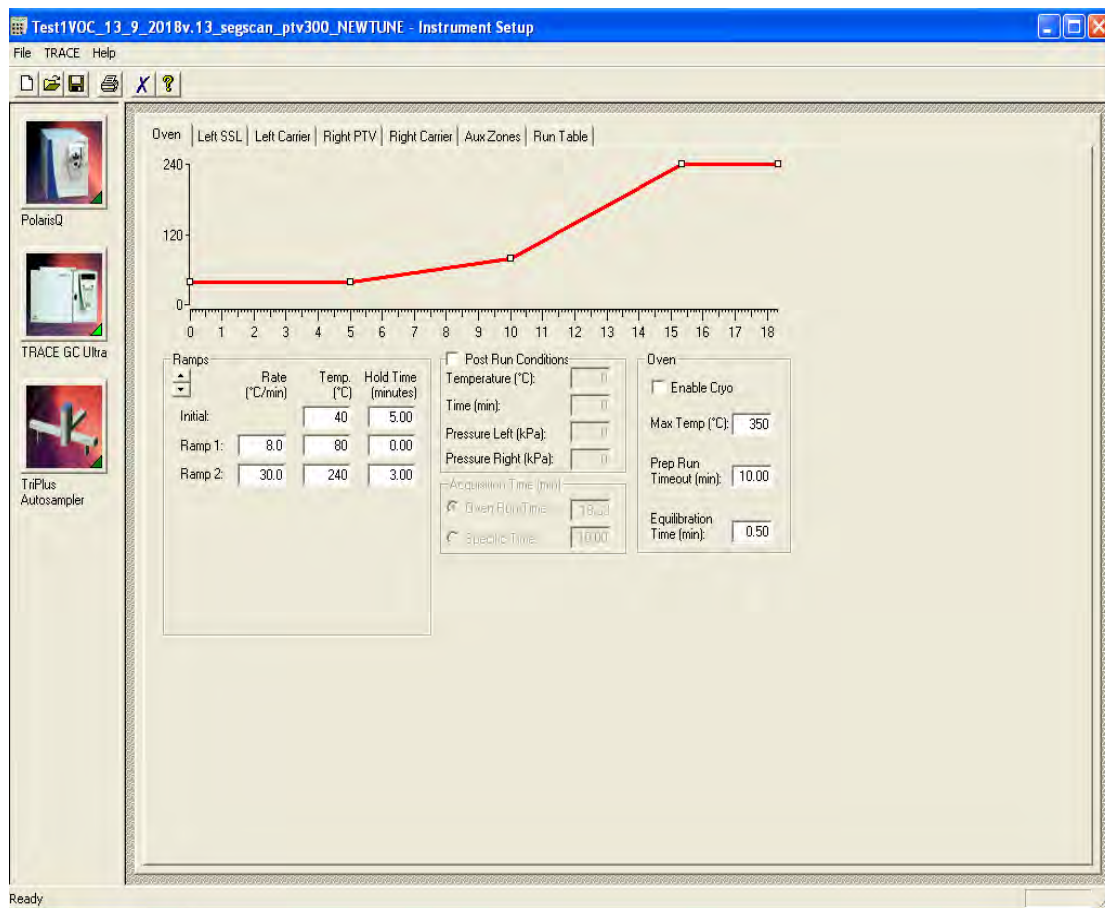
1.3 ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ/ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ GC-MS

Για την ενόργανη ανάλυση, χρησιμοποιείται το σύστημα αέριου χρωματογράφου-φασματογράφου μάζας (GC/MS/MS Finnigan Trace GC Ultra/Polaris – Quadrupole Ion Trap). Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιείται ως εξής: Μετά την έκθεση στο εκάστοτε ενισχυμένο δείγμα, η ίνα εισάγεται στη χρωματογραφική στήλη όπου και εκτίθεται σε κατάλληλη θερμοκρασία για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, απομακρύνεται και ξεκινά η έκθεση στο επόμενο δείγμα. Η ανάλυση διαρκεί συνολικά 18 λεπτά με τις συνθήκες να έχουν ρυθμιστεί κατάλληλα εξαρχής. Στις εικόνες 1.3.1 -1.3.4 , παρουσιάζονται οι συνθήκες που επελέγησαν για το χρωματογράφο και το φασματογράφο πριν την έναρξη των αναλύσεων.

a. Συνθήκες αέριου χρωματογράφου

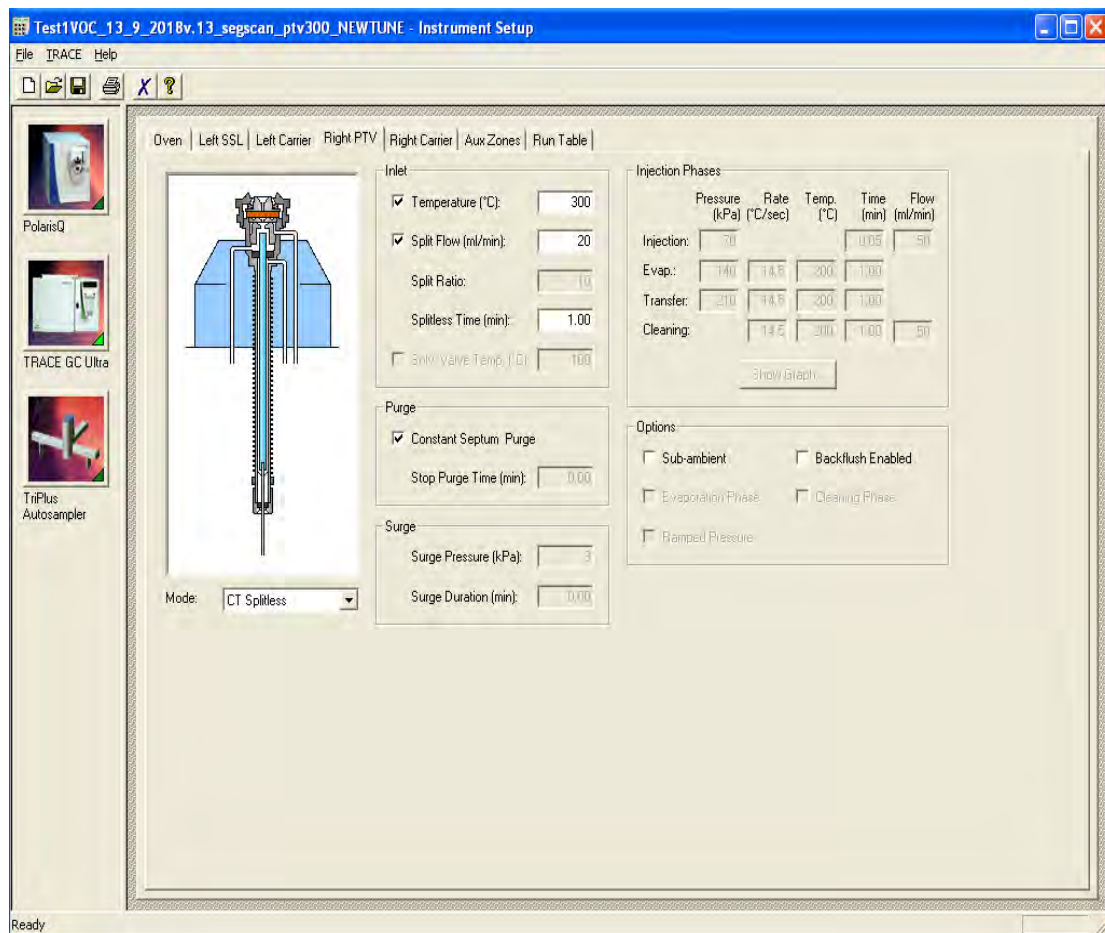
Για τον αέριο χρωματογράφο, ρυθμίστηκε το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου, ο ρυθμός ροής του δείγματος καθώς και η θερμοκρασία της στήλης και ο ρυθμός split/splitless.

Για το φούρνο (εικόνα 1.3.1) , η αρχική θερμοκρασία είναι σταθερή στους 40°C για 5 λεπτά, έπειτα αυξάνεται στους 80°C και αγγίζει την τελική τιμή 240°C όπου και παραμένει σταθερή για 3 λεπτά. Ο ρυθμός αύξησης αρχικά, μετά τα 5 λεπτά που η θερμοκρασία είναι σταθερή, είναι μικρός ούτως ώστε να δίνεται η δυνατότητα διαχωρισμού των πολύ πτητικών ενώσεων.



Εικόνα 1.3.1: Απεικόνιση του θερμοκρασιακού προγράμματος που ρυθμίστηκε για το φούρνο στον αέριο χρωματογράφο.

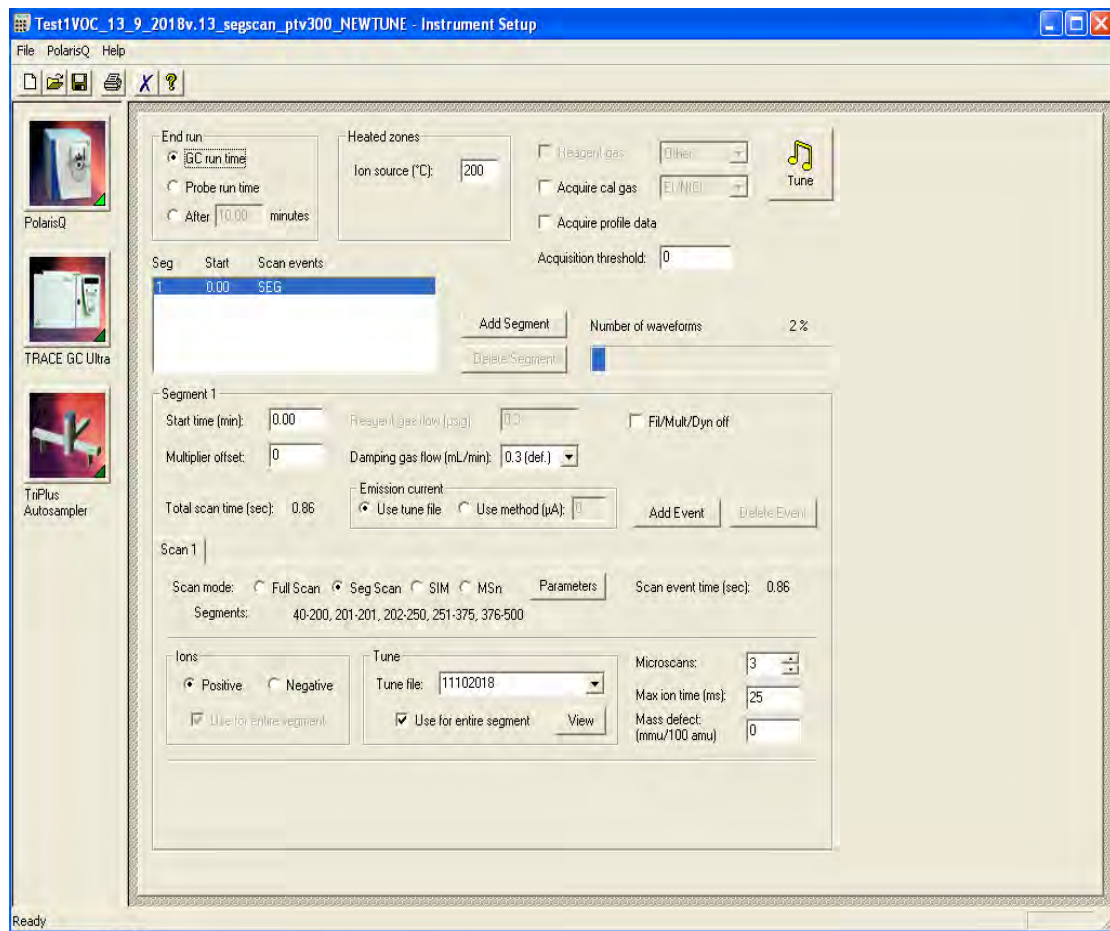
Κατά την πειραματική διαδικασία, διαπιστώθηκε ότι η αύξηση του ρυθμού ροής από 1 ml/min σε 2 ml/min είχε σημαντική επίδραση στον καλύτερο χρωματογραφικό διαχωρισμό ιδιαίτερα των πολύ πτητικών ενώσεων. Έτσι ο ρυθμός ροής διατηρείται σταθερός στα 2ml/min κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, ενώ για τη στήλη η θερμοκρασία ορίστηκε στους 300 °C.



Εικόνα 1.3.3 : Απεικόνιση των συνθηκών όπως ορίστηκαν για το σημείο εισαγωγής του δείγματος.

b. Συνθήκες φασματογράφου μάζας

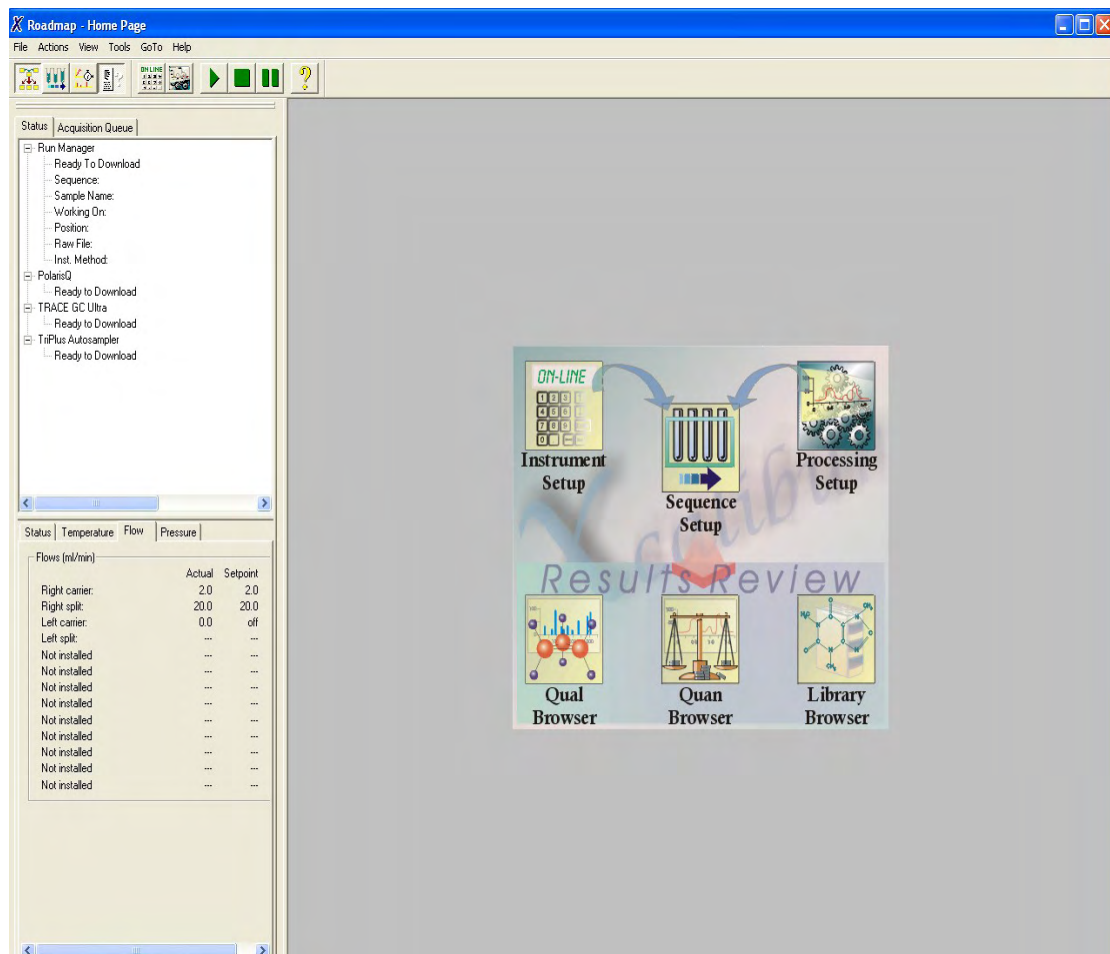
Για το φασματογράφο μάζας, ορίζονται η θερμοκρασία στην πηγή ιόντων στους 200° C καθώς και η λειτουργία σάρωσης κατά τμήματα. Η σάρωση αυτή, ρυθμίστηκε έτσι ώστε να αφορά μόνο τις περιοχές m/z από 40 έως 200, καθώς οι ενώσεις που μελετήθηκαν ήταν χαμηλού μοριακού βάρους που δεν ξεπερνούσε τα 200g/mol.



Εικόνα 1.3.4 : Απεικόνιση των συνθηκών του φασματογράφου μάζας για την ταυτοποίηση των ενώσεων.

ε. Ανάλυση και επεξεργασία των δειγμάτων

Η ανάλυση ρυθμίζεται μέσω του λογισμικού Xcalibur της Thermo Electron Corporation, με την εκκίνηση του οποίου παρατηρείται η εξής αρχική σελίδα:



Εικόνα 1.3.5: Αρχική σελίδα του προγράμματος Xcalibur.

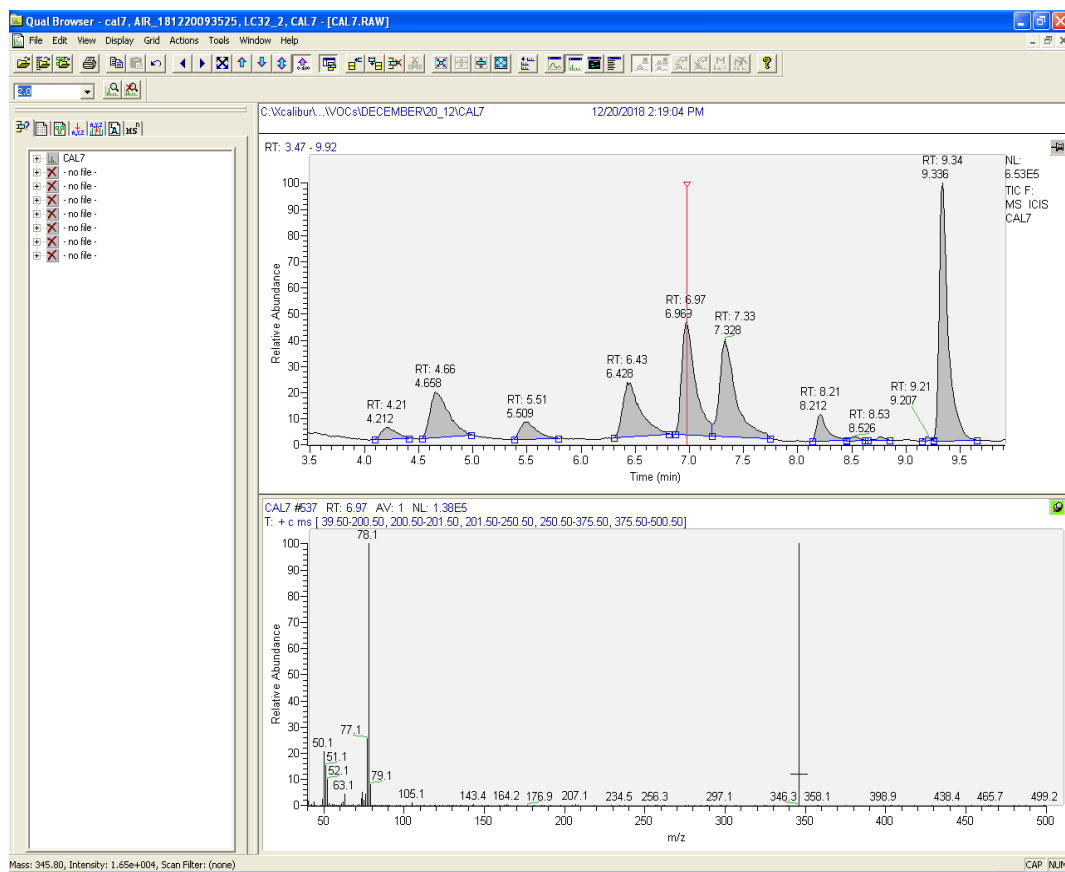
Το sequence setup , χρησιμοποιείται για τους εξής σκοπούς: i) τη δημιουργία μίας ακολουθίας δειγμάτων όπου θα περιγράφεται ο τρόπος με τον οποίο τα δεδομένα λαμβάνονται ή/και επεξεργάζονται ii) την ανάλυση ενός δείγματος ή μιας ομάδας δειγμάτων και λήψη ανεπεξέργαστων δεδομένων iii) την ανάλυση ενός δείγματος ή μιας ομάδας δειγμάτων και την παράλληλη επεξεργασία των δεδομένων και iv) την επεξεργασία προηγούμενων δεδομένων (batch reprocess). Επιπλέον , μέσω του sequence setup, μπορεί να οριστεί η μέθοδος επεξεργασίας για τα δεδομένα που λαμβάνονται από ένα δείγμα ή μια ομάδα αυτών, η διαδρομή εντός του συστήματος όπου θα αποθηκευτούν οι πληροφορίες και τα αποτελέσματα αυτά καθώς και ο όγκος δείγματος που θα εγχέεται σε κάθε ανάλυση. Ο προκαθορισμένος όγκος είναι τα 10μl.

Η ανίχνευση άγνωστων ενώσεων και η επιβεβαίωση της παρουσίας στοχευόμενων ενώσεων, έγινε με την χρήση του Qual browser του λογισμικού Xcalibur. Για τους σκοπούς αυτούς, έχουν καθοριστεί προηγουμένως οι παράμετροι, οι οποίες είναι ο χρόνος έκλουσης καθώς και τα ιόντα κάθε ένωσης. Για το φάσμα μάζας έχουν επιλεγεί συγκεκριμένα ιόντα, χαρακτηριστικά για κάθε ΠΟΕ έτσι ώστε να διευκολύνεται η ανίχνευσή τους. Στον πίνακα 1.3.1 παρουσιάζονται οι καθορισμένες παράμετροι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των 20 ΠΟΕ που μελετήθηκαν.

Πίνακας 1.3.1: Παρουσίαση των χρόνων έκλουσης και των ιόντων που καθορίστηκαν για την αντίχρευση κάθε ένωσης.

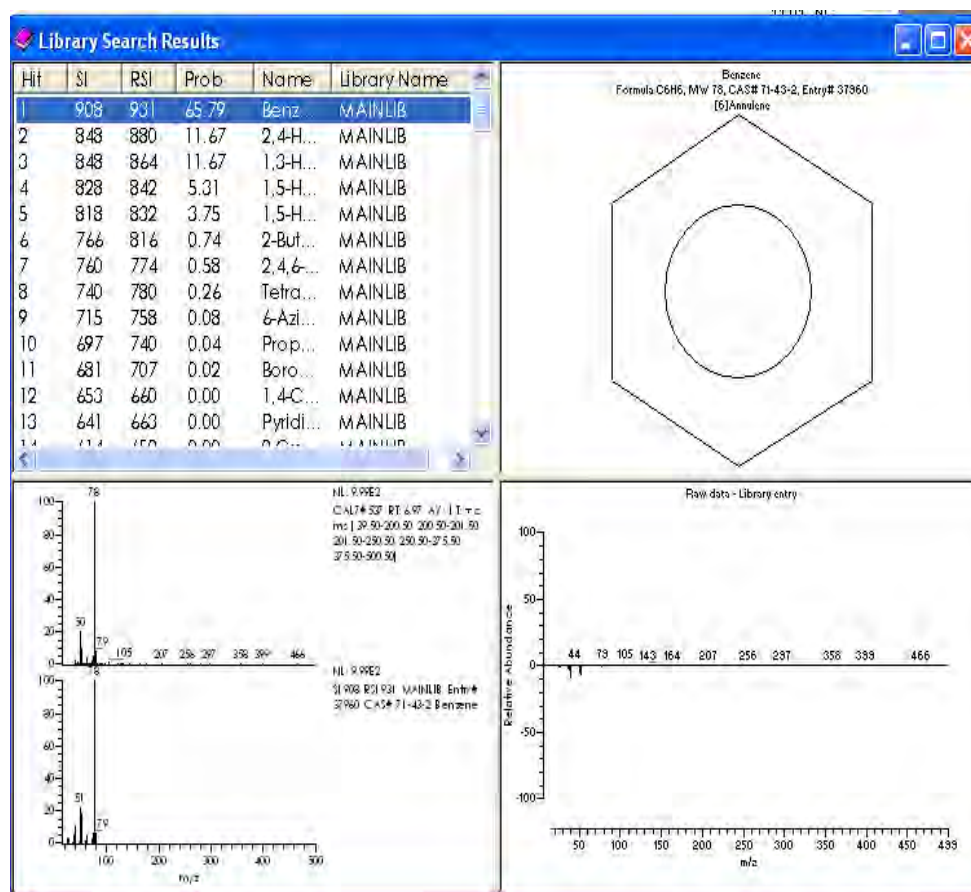
Ουσία	Retention Time	Selected Ions
Isoprene	2.80	69,68
Acetone	3.06	43
Isopropanol	3.25	45
Hexane	4.51	57
1-propanol	4.98	59
3-methylfuran	5.20	55,82
2-butanone	5.69	57,72
Cyclohexane	6.74	56
Benzene	7.33	78,51
Thiophene	7.68	58,84
1-butanol	8.54	41,55,57
2,5-dimethylfuran	8.72	96
Toluene	10.60	91
Octane	10.81	43,85
Ethylbutyrate	11.26	73,88
Hexanal	11.45	41,67
Ethyl benzene	12.10	91
Styrene	12.51	104
Cyclohexanone	12.81	55,98
Octanal	13.52	67,129
Nonanal	14.22	67,81
Decanol	15.16	55,83

Στην εικόνα 1.3.6 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και το φάσμα μάζας ενός δείγματος δεδομένης συγκέντρωσης (calibration level 7), όπου έχει επισημανθεί ο χρόνος έκλουσης που αναμένεται σύμφωνα με τη βιβλιογραφία να αντιστοιχεί στην κορυφή του βενζολίου.



Εικόνα 1.3.6: Χρωματογράφημα και φάσμα μάζας ενός πρότυπου δείγματος (calibration level 7).

Για την επιβεβαίωση της ταυτοποίησης, το λαμβανόμενο φάσμα συγκρίνεται με το αντίστοιχο θεωρητικό στη βιβλιοθήκη (library browser) του Xcalibur. Στη βιβλιοθήκη αυτή δίνονται όλες οι ουσίες που θεωρητικά μπορεί να αντιστοιχούν στο φάσμα που ελήφθη καθώς και η πιθανότητα ταυτοποίησης της κάθε μίας. Στην εικόνα 1.3.7 παρουσιάζεται η ταυτοποίηση του βενζολίου το προαναφερθέν δείγμα μέσω της σύγκρισης του θεωρητικού φάσματος, με αυτό που επελέγη στην εικόνα 1.3.6. Η πιθανότητα ταυτοποίησης με βάση τη βιβλιοθήκη είναι στο 66% περίπου για το βενζόλιο. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με το αναμενόμενο, αφού το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν πρότυπο με γνωστή την παρουσία του βενζολίου.

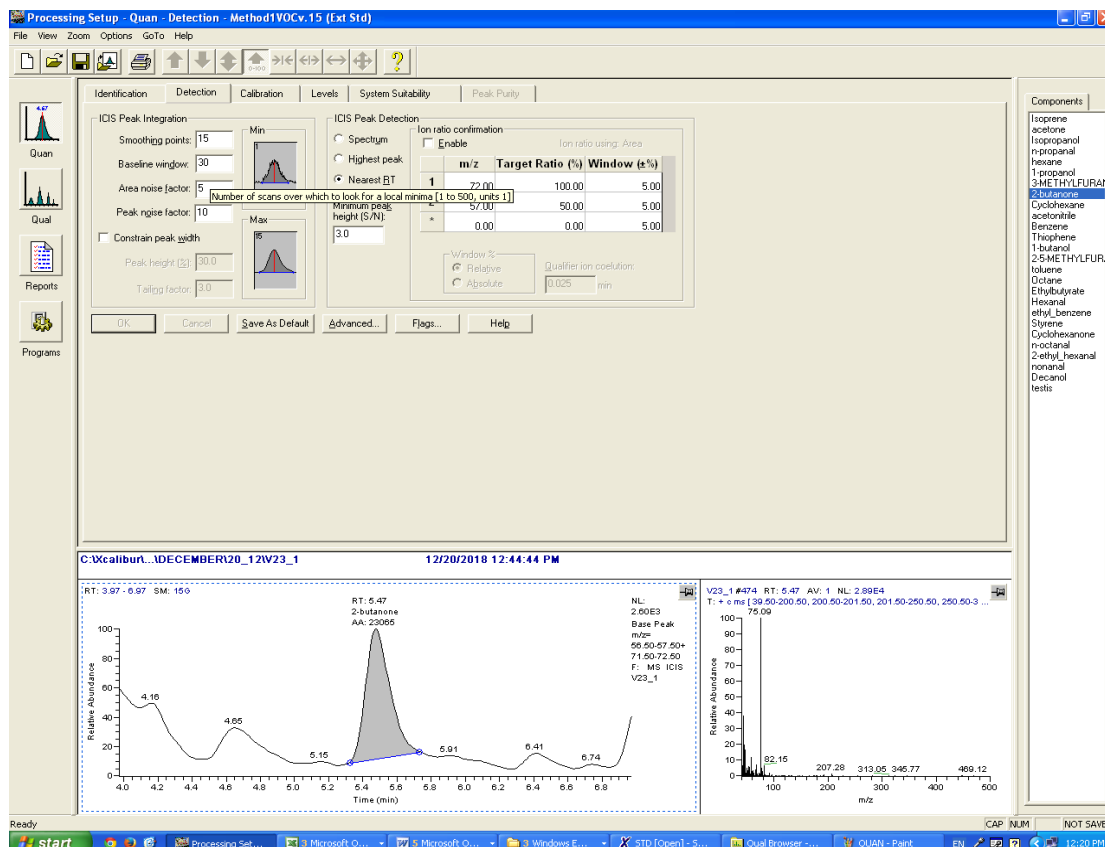


Εικόνα 1.3.7 : Απεικόνιση των αποτελεσμάτων αναζήτησης στη βιβλιοθήκη με βάση το φάσμα που ελήφθη.

Τέλος, καθορίζονται οι παράμετροι ανίχνευσης μέσω Quan Browser καθώς και ο τρόπος υπολογισμού του εμβαδού των χρωματογραφικών κορυφών.

Η ανίχνευση γίνεται με χρήση της μεθόδου SIM (Selected Ion Monitoring), σύμφωνα με την οποία ο ανιχνευτής σαρώνει μόνο συγκεκριμένες τιμές m/z , χαρακτηριστικές για τις στοχευόμενες ενώσεις. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, ο αναλυτής μαζών εναλλάσσει μεταξύ των τιμών m/z που καθορίστηκαν και υπολογίζει τις αντίστοιχες εντάσεις των κορυφών. Συνεπώς, παράγονται φάσματα αποκλειστικά για τα προκαθορισμένα ιόντα.

Στην εικόνα 1.3.6, δίνεται ένα παράδειγμα επεξεργασίας μέσω Quan Browser ενός δείγματος, όπου έχει επιλεγεί η 2-βουτανόνη και παρουσιάζονται οι παράμετροι που έχουν καθοριστεί για την ανίχνευσή της.



Εικόνα 1.3.6: Απεικόνιση των παραμέτρων όπως καθορίστηκαν για την ταυτοποίηση της 2-βουτανόνης σε ένα τυχαίο δείγμα.

1.4 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Μετά την πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό των παραμέτρων, διαμορφώθηκε το κάτωθι πρωτόκολλο ανάλυσης:

Σε σάκους δειγματοληψίας Tedlar χωρητικότητας 1L που είχαν καθαριστεί και πληρωθεί με αέριο άζωτο, γίνεται έγχυση με μικροσύριγγα διαλυμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις. Εφόσον επέλθει ισορροπία, περίπου μετά από 30-60min, η ίνα εκτίθεται στο δείγμα αυτό για 25min. Στη συνέχεια, μετά την εκχύλιση η ίνα εισάγεται και εκτίθεται στο σύστημα αερίου χρωματογράφου-φασματογράφου μάζας. Αρχικά πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος και στη συνέχεια η ανίχνευση και ταυτοποίησή τους από το φασματογράφο προς παραλαβή του φάσματος μάζας. Οι συνθήκες έχουν ρυθμιστεί εξαρχής, με τη θερμοκρασία να αυξάνεται σταδιακά από τους 40 στους 240°C και το ρυθμό ροής να διατηρείται σταθερός στα 2ml/min. Η ανάλυση διαρκεί συνολικά 18min με φέρον αέριο το ήλιο καθαρότητας 99,999%.

1.5 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τόσο η γραμμικότητα όσο και η ευαισθησία (LOQ, LOD) και η επαναληψιμότητα, προσδιορίστηκαν με την κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης. Οι καμπύλες βαθμονόμησης προέκυψαν από την ανάλυση ενισχυμένων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάζονται ως εξής: αρχικά γίνεται ταξινόμηση των ενώσεων σε δύο διαφορετικές ομάδες, ανάλογα με την απαιτούμενη τελική συγκέντρωση. Στην ομάδα 1 ανήκουν οι ενώσεις ισοπρένιο, ισοπροπανόλη και ακετόνη, ενώ στην ομάδα 2 ανήκουν όλες οι υπόλοιπες. Έπειτα, γίνεται παρασκευή του stock solution, με αραιώση 1:1000 και των δύο ομάδων ενώσεων σε διαλύτη μεθανόλη με τελικό όγκο 4ml. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται το working solution για το οποίο απαιτείται αραιώση 1:2 για το σετ 1 και 1:30 για την ομάδα 2 των ενώσεων σε μεθανόλη με τελικό όγκο 10ml. Τέλος, τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάζονται σε 8 διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων με αντίστοιχες αραιώσεις 1:1000, 1:500, 1:250, 1:100, 1:50, 1:25, 1:10, 1:5 και για τις δύο ομάδες ενώσεων. Για την παρασκευή «ενισχυμένων δειγμάτων» (spiked samples), το ειδικό διάφραγμα του σάκου διαπερνάται από μικροσύριγγα και πραγματοποιείται έγχυση διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης (10 µl). Το δείγμα αφήνεται να ισορροπήσει για 1h.

Στον πίνακα 1.5.1, παρουσιάζονται οι τελικές συγκεντρώσεις όλων των ενώσεων για τα 8 διαφορετικά επίπεδα που παρασκευάστηκαν:

	Calibration levels (ng/l)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Isoprene	3.405	6.81	13.62	34.05	68.1	136.2	272.4	544.8
Acetone	3.92	7.84	15.68	39.2	78.4	156.8	313.6	627.2
Isopropanol	3.93	7.86	15.72	39.3	78.6	157.2	314.4	628.8
Hexane	0.21	0.42	0.84	2.1	4.1	8.2	16.4	32.8
1-propanol	0.267	0.534	1.068	2.67	5.34	10.68	21.36	42.72
2-butanone	0.26	0.52	1.04	2.6	5.2	10.4	20.8	41.6
Cyclohexane	0.26	0.52	1.04	2.6	5.2	10.4	20.8	41.6
Benzene	0.29	0.58	1.16	2.9	5.8	11.6	23.2	46.4
Thiophene	0.35	0.7	1.4	3.5	7	14	28	56
1-butanol	0.27	0.54	1.08	2.7	5.4	10.8	21.6	43.2
Toluene	0.28	0.56	1.12	2.8	5.6	11.2	22.4	44.8
Octane	0.23	0.46	0.92	2.3	4.6	9.2	18.4	36.8
Ethylbutyrate	0.29	0.58	1.16	2.9	5.8	11.6	23.2	46.6
Hexanal	0.27	0.54	1.08	2.7	5.4	10.8	21.6	43.2
Ethyl-benzene	0.286	0.572	1.144	2.86	5.72	11.44	22.88	45.76
Styrene	0.3	0.6	1.2	3	6	12	24	48
Cyclohexanon	0.31	0.62	1.24	3.1	6.2	12.4	24.8	49.6

e								
n-octanal	0.273	0.546	1.092	2.73	5.46	10.92	21.84	43.68
Nonanal	0.273	0.546	1.092	2.73	5.46	10.92	21.84	43.68
Decanol	0.277	0.554	1.108	2.77	5.54	11.08	27.7	55.4

Για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης, έγινε ανάλυση δειγμάτων ενισχυμένων με πρότυπα διαλύματα, συνήθως σε 7 επίπεδα συγκεντρώσεων σε διαφορετικές ημέρες. Προηγουμένως, πραγματοποιούνταν ανάλυση ενός σάκου έπειτα από καθαρισμό του, που αποτελούσε το τυφλό δείγμα (blank). Στον πίνακα 1.5.2. παρουσιάζεται ο μέσος συντελεστής γραμμικότητας, η μέση κλίση και ο συντελεστής διακύμανσης της κλίσης καθώς και τα LOD (όριο ανίχνευσης) και LOQ (όριο ποσοτικού προσδιορισμού).

Πίνακας 1.5.2: Σύνοψη των αποτελεσμάτων κατασκευής καμπυλών βαθμονόμησης, όπου παρουσιάζεται το μέσο R² η κλίση (a) και ο συντελεστής διασποράς του a, καθώς και τα LOD και LOQ.					
Ουσία	mean R ²	a(slope)	CV%(a)	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
isoprene	0,9989	4340	13,84%	14,14	46,67
acetone	0,9981	1962	11,50%	12,36	40,79
isopropanol	0,9968	1082	14,57%	5,83	19,23
Hexane	0,9982	921	19,69%	0,49	1,60
1-propanol	0,9987	5725	8,24%	0,19	0,62
2-butanone	0,9879	1220	22,34%	0,46	1,52
cyclohexane	0,9975	2395	6,46%	0,19	0,61
Benzene	0,9981	38861	14,90%	0,11	0,38
thiophene	0,9987	2128	10,10%	0,41	1,36
1-butanol	0,9984	9013	9,75%	0,56	1,85
toluene	0,9972	71838	5,92%	0,66	2,16
octane	0,9966	6182	7,01%	0,38	1,26
ethyl butyrate	0,9910	3507	7,51%	0,45	1,47
hexanal	0,9920	6156	15,74%	0,44	1,47
ethylbenzene	0,9951	72527	4,78%	0,53	1,75
styrene	0,9963	29899	5,12%	0,53	1,75
cyclohexanone	0,9954	7260	16,94%	0,48	1,58
n-octanal	0,9924	5001	12,27%	0,38	1,25
nonanal	0,9911	2155	12,09%	1,25	4,13
1-decanol	0,9829	1275	3,51%	1,86	6,13

Όπως παρατηρείται, η μέθοδος έχει πολύ καλή γραμμικότητα εφόσον για το σύνολο των ενώσεων επετεύχθη μέσος συντελεστής γραμμικότητας R² πολύ κοντά στη μονάδα (≥ 0.99).

Όσον αφορά την ευαισθησία της μεθόδου, υπολογίστηκε το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOD και LOQ αντίστοιχα) για κάθε ένωση βάσει της κλίσης a (slope) και της τυπικής απόκλισης όπως φαίνεται στον πίνακα 1.5.2 παραπάνω. Για τις περισσότερες ενώσεις, η ευαισθησία είναι καλή, με τα όρια να είναι χαμηλότερα από τη χαμηλότερη συγκέντρωση που αναλύθηκε (calibration standard 2).

Για την επαναληψιμότητα υπολογίστηκε ο συντελεστής διακύμανσης των κλίσεων για κάθε ένωση, εκφρασμένος ως ο λόγος της τυπικής απόκλισης προς τη μέση τιμή τους. Για όλες τις ενώσεις πλην του εξανίου, της 2-βουτανόνης και της κυκλοεξανόνης, ο CV είναι μικρότερος του $\pm 15\%$, δηλαδή βρίσκεται εντός αποδεκτών ορίων. Κατά συνέπεια, η επαναληψιμότητα της μεθόδου που αναπτύχθηκε είναι καλή για τις περισσότερες ενώσεις.

Με χρήση των καμπυλών βαθμονόμησης, είναι δυνατός ο ανάδρομος υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρότυπων δειγμάτων για κάθε ένωση. Ενδεικτικά για τα πρότυπα διαλύματα (calibration standards) 5, 6 και 7 για κάθε ένωση προέκυψαν οι εξής συγκεντρώσεις (σε ng/ml) μέσω ανάδρομου υπολογισμού.

Πίνακας 1.5.3: Οι θεωρητικές και οι υπολογισμένες συγκεντρώσεις, καθώς και η απόκλιση μεταξύ τους για 3 επίπεδα πρότυπων διαλυμάτων και για κάθε ένωση.

Ουσία	CAL5			CAL6			CAL7		
	Known conc.	Calculated conc.	Deviation	Known conc.	Calculated conc.	Deviation	Known conc.	Calculated conc.	Deviation
Isoprene	68.1	68.58	0.71%	136.2	136.34	0.10%	272.4	272.32	-0.03%
Acetone	78.4	77.45	1.21%	156.8	157.02	0.14%	313.6	313.83	0.08%
Isopropanol	78.4	79.24	1.07	156.8	162.53	3.66%	313.6	311.6	0.00%
Hexane	4.1	4.13	0.74%	8.2	8.16	-0.37%	16.4	16.36	0.23%
1-propanol	5.34	5.4	1.17%	10.68	10.43	-2.34%	21.36	21.37	0.04%
2-butanone	5.2	4.97	-4.29%	10.4	10.31	-0.85%	20.8	20.84	0.21%
Cyclohexane	5.2	5.09	-1.99%	10.4	10.32	-0.70%	20.8	20.80	0.00%
Benzene	5.8	5.77	-0.40%	11.6	11.81	1.85%	23.2	23.23	0.13%
Thiophene	7.0	6.97	-0.43%	14.0	14.09	0.70%	28.0	28.0	0.00%
1-butanol	5.4	5.44	0.76%	10.8	10.77	-0.24%	21.6	21.62	0.11%
Toluene	5.6	5.61	0.33%	11.2	11.24	0.43%	22.4	22.28	-0.50%
Octane	4.6	4.6	0.00%	9.2	9.28	0.88%	18.4	18.31	-0.44%
Ethylbutyrate	5.8	6.44	11.07	11.6	11.45	-1.23%	23.2	23.35	0.66%
Hexanal	5.4	5.49	1.82%	10.8	11.15	3.33%	21.6	21.60	0.00%
Ethylbenzene	5.72	5.79	1.28%	11.44	11.76	2.84%	22.88	22.89	0.04%
Styrene	6.0	5.97	0.44%	12.0	11.87	-1.03%	24.0	23.96	-0.15%
Cyclohexanone	6.2	6.07	-2.06%	12.4	12.83	3.52%	24.8	24.84	0.19%
N-octanal	5.46	5.50	0.74%	10.92	10.97	0.52%	21.84	21.80	-0.16%
Nonanal	5.4	5.03	6.74%	10.8	10.29	-4.66%	21.6	21.6	0.00%
Decanol	5.52	5.53	0.13%	11.04	11.70	6.03%	22.08	220.7	-0.02%

Από τον πίνακα 1.5.3 παρατηρείται ότι για κανένα επίπεδο συγκέντρωσης και καμία ένωση, η απόκλιση δεν ξεπέρασε το $\pm 15\%$, άρα όλες οι υπολογισμένες συγκεντρώσεις είναι

στα αποδεκτά όρια. Συνεπώς η μέθοδος δίνει τη δυνατότητα υπολογισμού των συγκεντρώσεων άγνωστων δειγμάτων με πολύ καλή ακρίβεια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. ΠΙΛΟΤΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Μετά την ανάπτυξη της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε πιλοτική εφαρμογή της σε δείγμα εθελοντών. Από κάθε εθελοντή, ελήφθησαν 2 δείγματα εκπνοής ενώ παράλληλα λαμβάνονταν και ένα δείγμα από τον περιβάλλοντα αέρα όπου εκτελούνταν η δειγματοληψία των συμμετεχόντων. Τα δείγματα φυλάσσονταν σε σάκους Tedlar χωρητικότητας 1L και η ανάλυσή τους πραγματοποιούνταν εντός 6 ωρών από τη στιγμή λήψης τους. Πριν την έναρξη των δειγματοληψιών, συλλέχτηκαν από κάθε εθελοντή πληροφορίες που αφορούσαν το φύλο, την ηλικία, το σωματικό βάρος, τις διατροφικές συνήθειες, το κάπνισμα και το ιατρικό ιστορικό του. Οι πληροφορίες αυτές καθώς και τα αποτελέσματα των αναλύσεων των δειγμάτων, καταχωρήθηκαν τελικά σε βάσεις δεδομένων μέσω Microsoft Excel και επεξεργάστηκαν στατιστικά με τη χρήση IBM S.P.S.S. Επιπλέον, η συσχέτιση της ηλικίας και του δείκτη μάζας σώματος με τις συγκεντρώσεις των VOCs, εξετάστηκε με τη μέθοδο γραμμικής παλινδρόμησης, με στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα αυτά όπου ίσχυε $p\text{-value} < 0.05$. Το δείγμα των εθελοντών αποτελούνταν από 28 άτομα εκ των οποίων τα 9 ήταν άνδρες και τα 19 γυναίκες. Η μέση ηλικία ήταν τα 39 έτη και η μέση τιμή δείκτη μάζας σώματος το 25.04. Από το σύνολο των συμμετεχόντων, το 25% δήλωσαν ενεργοί κανπιστές, το 28.5% πρώην κανπιστές και το 46.5% δήλωσαν ότι δεν κάπνισαν ποτέ.

Λαμβάνοντας υπόψη τις συγκεντρώσεις των VOCs στον περιβάλλοντα αέρα και αυτές που υπολογίστηκαν σε κάθε δείγμα, ήταν δυνατός ο υπολογισμός της κυψελιδικής κλίσης για κάθε μία από αυτές. Στον πίνακα 2.1, παρουσιάζονται οι τιμές αυτές για κάθε ένωση. Εξαιρέση αποτελούν οι ενώσεις 3-μεθυλ-φουράνιο και 2,5-διμεθυλ-φουράνιο, που δεν προέκυψαν από στοχευμένη ανάλυση αλλά εντοπίστηκαν στην εκπνοή των κανπιστών εθελοντών.

Πίνακας 2.1: Συγκεντρώσεις των VOCs στην εκπνοή (ng/l) και οι αντίστοιχες κυψελιδικές κλίσεις.			
Ουσία	Διάμεσος	Ενδοτεταρτημοριακός εύρος	Διάμεση κυψελιδική κλίση
Isoprene	810	693-1072	805,9
Acetone	3247	1722-4684	3220,79
Isopropanol	245	138-696	71,33
Hexane	1,05	n.d-2,60	0,18
1-propanol	4,65	2,26-8,25	0,38
2-butanone	7,14	4,23-9,90	4,98
Cyclohexane	0,89	0,47-1,33	0,22

Benzene	1,99	0,74-7,45	-0,04
Thiophene	n.d	n.d-n.d	n.d
1-butanol	0,66	n.d-0,89	0,12
Toluene	13,59	2,52-28,75	9,58
Octane	0,8	n.d-2,90	0,72
Ethyl-butyrate	9,8	5,81-13,72	6,94
Hexanal	3,56	2,22-5,36	1,37
Ethyl-benzene	2,39	0,56-4,20	1,58
Styrene	1,77	n.d-2,91	1,56
Cyclohexanone	0,94	n.d-1,46	-0,46
Octanal	1,07	0,68-1,86	-0,26
Nonanal	3,18	1,86-5,79	-3,97
Decanol	2,85	1,44-4,59	-0,21
3-methyl-furane	13339	n.d-41373	13339
2,5-dimethyl-furane	1287	n.d- 78343	1287

Από τον πίνακα αυτό παρατηρείται πως τις πιο υψηλές συγκεντρώσεις στην εκπονή έχουν η ακετόνη, το ισοπρένιο και η ισοπροπανόλη, όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες.^[42] Για τις δύο πρώτες ενώσεις, η προέλευση θεωρείται ενδογενής εφόσον οι κυψελιδικές κλίσεις είναι σχεδόν ίσες με τις συγκεντρώσεις τους στην εκπονή, ενώ αντίθετα οι συγκεντρώσεις της ισοπροπανόλης φαίνεται να επηρεάζονται άμεσα από τις αντίστοιχες στον περιβάλλοντα αέρα. Τέλος, για συγκεκριμένες ενώσεις όπως η κυκλοεξανόλη, η εννεάλη ή η δεκανόλη παρατηρούνται αρνητικές κυψελιδικές κλίσεις.

- Συσχέτιση ηλικίας, φύλου και σωματικού βάρους με τις συγκεντρώσεις των VOCs.

Από τη μελέτη των 3 αυτών χαρακτηριστικών, δηλαδή την ηλικία, το φύλο και το δείκτη μάζας σώματος, το φύλο φαίνεται να είναι αυτό που δεν επηρεάζει το προφίλ των ουσιών στην εκπονή τόσο στην παρούσα εργασία όσο και σε άλλες μελέτες που είχαν πραγματοποιηθεί^[43]. Η συσχέτιση του φύλου με τις συγκεντρώσεις των ουσιών, μπορούν να παρατηρηθούν στον πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Συσχέτιση φύλου με τις συγκεντρώσεις των VOCs στην εκπονή (σε ng/l αέρα). Δεν ισχύει $p < 0,05$, άρα τα αποτελέσματα δεν είναι στατιστικά σημαντικά και συνεπώς τα φύλο δε φαίνεται να επηρεάζει τις συγκεντρώσεις αυτές.					
Ουσία	Άνδρες		Γυναίκες		p-value
	Διάμεσος	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	Διάμεσος	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	
Isoprene	1064	741-1170	807	652-963	0,103
Acetone	2813	1708-4518	3276,93	1735-5054	0,444
Isopropanol	177	87-248	331,78	138-817	0,410
Hexane	1,43	1,15-3,93	0,56	n.d-1,80	0,10

					5
1-propanol	2,87	1,68-7,20	5,16	2,71-9,31	0,468
2-butanone	8,68	8,20-9,71	6,18	3,20-10,04	0,117
Cyclohexane	1,03	0,93-1,77	0,69	0,39-1,19	0,760
Benzene	3,05	2,32-10,64	1,48	0,40-3,52	0,156
Thiophene	0,01	n.d	n.d	n.d	n.a
1-butanol	0,45	n.d-0,77	0,67	n.d-0,97	0,332
Toluene	18,61	12,69-24,03	12,3	1,15-36,01	0,562
Octane	1,2	n.d-2,31	0,41	n.d-3,58	0,772
Ethyl-butyrate	6,45	5,31-10,77	10,57	6,82-13,94	0,250
Hexanal	3,45	2,41-5,00	3,68	2,03-6,14	0,699
Ethy-benzene	2,29	1,37-3,49	2,5	n.d-4,44	0,847
Styrene	1,61	0,58-3,11	1,89	n.d-2,71	0,595
Cyclohexanone	0,98	n.d-1,24	0,91	0,50-1,68	0,428
Ocatanal	0,75	0,66-0,95	1,41	0,70-1,87	0,243
Nonanal	2,73	1,31-3,25	4,06	1,92-9,39	0,105
Decanol	n.d	n.d-4,56	3,03	n.d-4,75	0,332
3-methyl-furane	21168	10676-205272	9750,8	n.d-38851	0,263
2,5-dimethyl-furane	1970	1329-312177	745,89	n.d-21840	0,156

Αναφορικά με την ηλικία, φαίνεται να σχετίζεται αρνητικά με τις συγκεντρώσεις ορισμένων ουσιών όπως είναι η ακετόνη, το τολουόλιο, ο εθυλ-βουτυρικός εστέρας και το εθυλ-βενζόλιο. Από την άλλη, η ακετόνη σχετίζεται επίσης αρνητικά με το δείκτη μάζας σώματος, δηλαδή οι συγκεντρώσεις της μειώνονται με αύξηση του BMI, σε αντίθεση με το ισοπρένιο. Στους πίνακες 2.3 και 2.4 αντίστοιχα παρουσιάζονται οι συσχετίσεις της ηλικίας και του δείκτη μάζας σώματος με τα επίπεδα των VOCs στην εκπνοή.

Πίνακας 2.3: Γραμμική παλινδρόμηση για τη μελέτη συσχέτισης της ηλικίας με τις συγκεντρώσεις των VOCs (σε ng/l αέρα).

Ουσία	Ηλικία	
	b	p-value
Isoprene	-0,58	0,925
Acetone	-119,721	0,002
Isopropanol	97,611	0,321
Hexane	-0,024	0,762
1-propanol	1,007	0,5
2-butanone	0,108	0,65
Cyclohexane	0,005	0,831
Benzene	0,021	0,962
Thiophene	-	-
1-butanol	-0,003	0,755
Toluene	-1,107	0,005
Octane	0,016	0,778
Ethyl-butyrate	-0,25	0,024
Hexanal	0,056	0,735
Ethyl-benzene	-0,125	0,004
Styrene	-0,098	0,011
Cyclohexanone	0,01	0,539
Octanal	0,003	0,92
Nonanal	-0,041	0,732
Decanol	-0,05	0,413
3-methyl-furane	477	0,959
2,5-dimethyl-furane	-1481	0,899

Πίνακας 2.4 : Γραμμική παλινδρόμηση για τη μελέτη συσχέτισης του δείκτη μάζας σώματος με τις συγκεντρώσεις των VOCs (σε ng/l αέρα).

Ουσία	Δείκτης μάζας σώματος (BMI)	
	b	p-value
Isoprene	22,776	0,029
Acetone	-207,234	0,003
Isopropanol	-64,229	0,714
Hexane	0,063	0,651
1-propanol	-1,204	0,65
2-butanone	0,306	0,464
Cyclohexane	-0,007	0,863
Benzene	0,495	0,532
Thiophene	-	-
1-butanol	-0,013	0,492
Toluene	-0,914	0,213
Octane	-0,003	0,42
Ethyl-butyrate	-0,195	0,34
Hexanal	-0,059	0,84

Ethyl-benzene	-0,111	0,169
Styrene	-0,102	0,152
Cyclohexanone	0,008	0,766
Octanal	-0,044	0,339
Nonanal	-0,243	0,251
Decanol	-0,161	0,132
3-methyl-furane	10906	0,503
2,5-dimethyl-furane	10898	0,598

- Συσχέτιση καπνιστικής συνήθειας με τις συγκεντρώσεις των VOCs.

Για τη μελέτη της συσχέτισης αυτής, οι εθελοντές διαχωρίστηκαν σε καπνιστές και μη καπνιστές, ενώ στη δεύτερη κατηγορία τοποθετήθηκαν και οι πρώην καπνιστές. Παρατηρήθηκε (πίνακας 2.5) ότι με το κάπνισμα συσχετίστηκαν οι ενώσεις βενζόλιο, 3-μεθυλ-φουράνιο και 2,5-διμεθυλ-φουράνιο, οι οποίες ήταν αναμενόμενες εφόσον περιλαμβάνονται στον καπνό του τσιγάρου.

Πίνακας 2.5: Συσχέτιση της καπνιστικής συνήθειας με τις συγκεντρώσεις των VOCs στην εκπονή (σε ng/l αέρα).

Ουσία	Καπνιστές		Μη καπνιστές		p-value
	Διάμεσος	Ενδοτεταρτομοριακό εύρος	Διάμεσος	Ενδοτεταρτομοριακό εύρος	
Isoprene	741,76	699-1170	811	652-1064	0,623
Acetone	1735,97	1265-6393	3277	2230-4292	0,966
Isopropanol	172,48	55-547	261	159-818	0,208
Hexane	1,8	0,94-10,25	0,67	0,11-1,72	0,101
1-propanol	5,69	2,83-28,99	4,15	1,95-6,34	0,272
2-butanone	8,2	5,15-19,30	6,37	3,49-9,71	0,208
Cyclohexane	1,01	0,59-2,84	0,79	0,45-1,19	0,092
Benzene	13,62	10,64-54,43	1,39	0,45-2,43	<0,001
Thiophene	n.d	n.d-0,45	n.d	n.d	
1-butanol	0,56	n.d-0,70	0,7	n.d-0,97	0,101
Toluene	24,03	12,30-38,16	12,69	1,87-28,72	0,208
Octane	2,78	1,20-4,59	0,33	n.d-1,68	0,031
Ethyl-butyrate	6,45	5,12-11,50	10,57	6,82-14,48	0,339
Hexanal	3,68	1,76-15,69	3,45	2,55-5,29	1,000
Ethyl-benzene	1,8	1,10-4,48	2,5	n.d-4,07	0,640
Styrene	0,53	n.d-2,69	2,13	0,56-3,11	0,499
Cyclohexanone	1,36	1,17-1,79	0,85	n.d-1,17	0,296
Octanal	1,07	0,75-1,41	1,3	0,63-1,87	0,756
Nonanal	4,53	2,17-9,39	3,12	1,80-4,66	0,499

Decanol	4,45	n.d-5,98	2,67	n.d-4,38	0,384
3-methyl-furane	205272	148295-1218788	9746	0-15814	<0,00 1
2,5-dimethyl-furane	312177	134847-1666181	746	0-1674	0,002

- Συσχέτιση ιατρικού ιστορικού με τις συγκεντρώσεις των VOCs

Αναφορικά με τη συσχέτιση του ιατρικού ιστορικού των εθελοντών με τις συγκεντρώσεις των ενώσεων στην εκπονή τους, παρατήθηκε πως όσοι έπασχαν από υπέρταση είχαν 3,5 φορές μικρότερες συγκεντρώσεις ακετόνης, ισοπροπανόλης, 2-βουτανόλης, εθυλ-βενζολίου και οκτανάλης. Επιπλέον, όσοι συμμετέχοντες είχαν αυξημένα τριγλυκερίδια, είχαν σχετικά μειωμένες συγκεντρώσεις ακετόνης και στυρενίου. Ωστόσο, ο αριθμός των εθελοντών ήταν σχετικά μικρός για να θεωρηθούν οι συσχετίσεις αυτές απόλυτες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Με βάση την βιβλιογραφία, επιλέχθηκαν 20 πτητικές οργανικές ενώσεις (ΠΟΕ) που αναφέρονται ως βιοδείκτες του καρκίνου.
- Αναπτύχθηκε αναλυτική μεθοδολογία GC-MS για την ποσοτική ανάλυση των 20 στοχευόμενων πτητικών οργανικών ενώσεων στην ανθρώπινη εκπνοή. Η μεθοδολογία περιλαμβάνει τα στάδια: 1) δειγματοληψίας του εκπνεόμενου αέρα, 2) απομόνωσης και προσυγκέντρωσης των αναλυτών με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME), 3) ενόργανης ανάλυσης με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών.
- Η μέθοδος παρουσιάζει χαμηλά όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ), καλή γραμμικότητα ($R^2 \geq 0.99$) για όλες τις ενώσεις σε εύρος βαθμονόμησης 2 τάξεων μεγέθους που καλύπτει τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις σε πραγματικά δείγματα.
- Πραγματοποιήθηκε μερική επικύρωση της μεθοδολογίας όπου διαπιστώθηκε αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα εντός της ημέρας (intraday) και από μέρα σε μέρα (interday) για το σύνολο των ουσιών που μελετήθηκαν.
- Η μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς σε υγιή πληθυσμό αναδεικνύοντας πολύ ισχυρές συσχετίσεις των επιπέδων βενζολίου και φουρανίων με την καπνιστική συνήθεια που επιτρέπουν την διάκριση καπνιστών/ μη καπνιστών μέσω της ανάλυσης της εκπνοής.
- Οι ουσίες ακετόνη, ισοπρένιο και η ισοπροπανόλη παρουσίασαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στη εκπνοή του πληθυσμιακού δείγματος που μελετήθηκε.
- Η ηλικία συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα ακετόνης, τολουόλιου, εθυλβουτυρικού εστέρα και εθυλ-βενζολίου ενώ το σωματικό βάρος σχετίζεται αρνητικά με την ακετόνη και θετικά με το ισοπρένιο. Δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις με το φύλο.
- Η παρουσία υπέρτασης συσχετίστηκε με τα επίπεδα ακετόνης, ισοπροπανόλης, 2-βουτανόνης, εθυλ-βενζολίου και οκτανάλης. Παράλληλα, όσοι δήλωσαν ότι έχουν αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων, είχαν μειωμένες συγκεντρώσεις ακετόνης και στυρενίου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J Clin* **2018**, *68*, 394-424.
- [2] G. Boloker, C. Wang and J. Zhang, Updated statistics of lung and bronchus cancer in United States, *Journal of Thoracic Disease* **2018**, 1158-1161
- [3] R. L. Siegel, K. D. Miller and A. Jemal, Cancer statistics, 2018, *CA Cancer J Clin* **2018**, *68*(1), 7-30
- [4] A. Jemal, J. Ma, P. S. Rosenberg, R. Siegel and W. F. Anderson, Increasing lung cancer death rates among young women in southern and midwestern States, *J Clin Oncol*, **2012**, *30*(22), 2739-44
- [5] X. Wang, H. Liu, Y. Shen, W. Li, Y. Chen and H. Wang, Low-dose computed tomography (LDCT) versus other cancer screenings in early diagnosis of lung cancer: A meta-analysis, *Medicine (Baltimore)* **2018**, *97*, e11233.
- [6] S. J. Swensen, J. R. Jett, T. E. Hartman, D. E. Midthun, S. J. Mandrekar, S. L. Hillman, A. M. Sykes, G. L. Aughenbaugh, A. O. Bungum and K. L. Allen, CT screening for lung cancer: five-year prospective experience, *Radiology* **2005**, *235*, 259-265.
- [7] E. F. Patz, Jr., M. J. Campa, E. B. Gottlin, I. Kusmartseva, X. R. Guan and J. E. Herndon, Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer, 2nd, *J Clin Oncol* **2007**, *25*, 5578-5583.
- [8] J. Unger, Measuring the sweet smell of success in diabetes management, *Ann Transl Med* **2014**, *2*, 119.
- [9] Z. Wang and C. Wang, A quantitative study of the influence of inhaled compounds on their concentrations in exhaled breath, *Journal of Breath Research* **2013**, *7*.
- [10] G. Ejaimi and S. Saeed, An Introduction to Airway Assessment and Management (Concise Airway Anatomy and Pathophysiology), **2016**, p.
- [11] T. A. Popov, Human exhaled breath analysis, *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011, *106*, 451-456; quiz 457.
- [12] O. Lawal, W. M. Ahmed, T. M. E. Nijssen, R. Goodacre and S. J. Fowler, Exhaled breath analysis: a review of 'breath-taking' methods for off-line analysis, *Metabolomics* 2017, *13*, 110.
- [13] S. Capone, M. Tufariello, A. Forleo, V. Longo, L. Giampetruzzi, A. V. Radogna, F. Casino and P. Siciliano, Chromatographic analysis of VOC patterns in exhaled breath from smokers and nonsmokers, *Biomed Chromatogr* 2018, *32*.
- [14] J. E. Huff, R. L. Melnick, H. A. Solleveld, J. K. Haseman, M. Powers and R. A. Miller, Multiple organ carcinogenicity of 1,3-butadiene in B6C3F1 mice after 60 weeks of inhalation exposure, *Science* 1985, *227*, 548-549.

- [15] E. Delzell, N. Sathiakumar, J. Graff, M. Macaluso, G. Maldonado, R. Matthews and I. Health Effects, An updated study of mortality among North American synthetic rubber industry workers, *Research report (Health Effects Institute)* 2006, 1-63; discussion 65-74.
- [16] H. Haick, Y. Y. Broza, P. Mochalski, V. Ruzsanyi and A. Amann, Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers, *Chem Soc Rev* 2014, 43, 1423-1449.
- [17] S. Ghimenti, T. Lomonaco, F. G. Bellagambi, S. Tabucchi, M. Onor, M. G. Trivella, A. Ceccarini, R. Fuoco and F. Di Francesco, Comparison of sampling bags for the analysis of volatile organic compounds in breath, *J Breath Res* 2015, 9, 047110.
- [18] J. Kwak, M. Fan, S. W. Harshman, C. E. Garrison, V. L. Dershem, J. B. Phillips, C. C. Grigsby and D. K. Ott, Evaluation of Bio-VOC Sampler for Analysis of Volatile Organic Compounds in Exhaled Breath, *Metabolites* 2014, 4, 879-888.
- [19] A. B. Lindstrom and J. D. Pleil A review of the USEPA's single breath canister (SBC) method for exhaled volatile organic biomarkers, *Biomarkers* 2002, 7, 189-208.
- [20] K. Schallschmidt, R. Becker, C. Jung, W. Bremser, T. Walles, J. Neudecker, G. Leschber, S. Frese and I. Nehls, Comparison of volatile organic compounds from lung cancer patients and healthy controls-challenges and limitations of an observational study, *J Breath Res* 2016, 10, 046007.
- [21] E. D. Palmes and A. F. Gunnison, Personal monitoring device for gaseous contaminants, *Am Ind Hyg Assoc J* 1973, 34, 78-81.
- [22] H. Meng, J.-H. Zhao, C.-F. Duan, L. Hao and Y.-F. Guan Thermal Desorption-Gas Chromatography or Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Analysis of Semi-Volatile Compounds on Atmospheric Particulate Matters, *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 2014, 42, 931-936.
- [23] J. P. Priscilla Porto-Figueira, Wolfram Miekisch & José S. Câmara, Breath Analysis as a Potential and Non-Invasive Frontier in Disease Diagnosis: An Overview *Scientific Reports*, volume 8 2018.
- [24] P. Trefz, S. Kischkel, D. Hein, E. S. James, J. K. Schubert and W. Miekisch Needle trap micro-extraction for VOC analysis: effects of packing materials and desorption parameters, *Journal of Chromatography A* 2012, 1219, 29-38.
- [25] C. Nerin, J. Salafranca, M. Aznar and R. Batlle, Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes, *Anal Bioanal Chem* 2009, 393, 809-833.
- [26] X. Hou, L. Wang and Y. Guo, *Recent Developments in Solid-phase Microextraction Coatings for Environmental and Biological Analysis*, 2017, p. 1444-1455.
- [27] N. Reyes-Garcés, E. Gionfriddo, G. A. Gómez-Ríos, M. N. Alam, E. Boyacı, B. Bojko, V. Singh, J. Grandy and J. Pawliszyn, Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions, *Analytical Chemistry* 2018, 90, 302-360.
- [28] J. Pereira, P. Figueira, C. Cavaco, K. Taunk, S. Rapole, R. Dhakne, H. Nagarajaram and J. Câmara, *Breath Analysis as a Potential and Non-Invasive Frontier in Disease Diagnosis: An Overview*, 2015, p. 3-55.

- [29] A. Hansel, A. Jordan, R. Holzinger, P. Prazeller, W. Vogel and W. Lindinger Proton transfer reaction mass spectrometry: on-line trace gas analysis at the ppb level, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1995**, 149-150, 609-619.
- [30] R. S. Gohlke and F. W. McLafferty, Early gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1993**, 4, 367-371.
- [31] M. Phillips, K. Gleeson, J. M. B. Hughes, J. Greenberg, R. N. Cataneo, L. Baker and W. P. McVay, Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study, *The Lancet* **1999**, 353, 1930-1933.
- [32] M. Phillips, R. N. Cataneo, A. R. C. Cummin, A. J. Gagliardi, K. Gleeson, J. Greenberg, R. A. Maxfield and W. N. Rom, Detection of lung cancer with volatile markers in the breath, *Chest* **2003**, 123, 2115-2123.
- [33] Q. Hua, Y. Zhu and H. Liu, Detection of volatile organic compounds in exhaled breath to screen lung cancer: a systematic review, *Future Oncol*, **2018**, 14(16), 1647-1662
- [34] J. Zhou, Z. Huang, U. Kumar and D.Y. Chen, Review of recent developments in determining volatile organic compounds in exhaled breath as biomarkers for lung cancer diagnosis, *Analytica Chimica Acta*, 996, 1-9.
- [35] G. Rocco, G. Pennazza, M. Santonico, F. Longo, R. Rocco, P. Crucitti and R. Antonelli Incalzi, Breathprinting and Early Diagnosis of Lung Cancer, *Journal of Thoracic Diseases*, 13(7), 883-894
- [36] P. Montuschi, M. Santonico and C. Mondino, Diagnostic performance of an electronic nose, fractional exhaled nitric oxide, and lung function testing in asthma. *Chest*. 2010;137:790-796.
- [37] A. Mazzatenta, M. Pokorski, F. Sartucci, L. Domenici and C. Di Giulio, Volatile organic compounds (VOCs) fingerprint of Alzheimer's disease, *Respir Physiol Neurobiol*, **2015**;209:81-84
- [38] A. McWilliams, P. Beigi, A. Srinidhi, S. Lam and C.E. MacAulay, Sex and Smoking Status Effects on the Early Detection of Early Lung Cancer in High-Risk Smokers Using an Electronic Nose, *IEEE Trans Biomed Eng.*, **2015**;62:2044-54
- [39] R. Rocco, R. Antonelli Incalzi and G. Pennazza, BIONOTE e-nose technology may reduce false positives in lung cancer screening programmes, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* **2016**;49:1112-1117
- [40] L. Tuduri, V. Desauziers and J. L. Fanlo, Potential of Solid-Phase Microextraction Fibers for the analysis of Volatile Organic Compounds in air, *Journal of Chromatographic Science* **2001**, 39, 521-529.
- [41] M. Garcia-Esteban, D. Ansorena, I. Astiasaran and J. Ruiz, Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME), *Talanta* **2004**, 64, 458-466.
- [42] J. D. Fenske and S. E. Paulson, Human Breath Emissions of VOCs, *Journal of the Air and Waste Management Association* **1999**, 49, 594-598.
- [43] S. Dragonieri, V. N. Quaranta, P. Carratu, T. Ranieri and O. Resta, *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia* **2016**, 42, 143-145.

