

Analisi dei composti organici volatili su matrice urinaria mediante naso elettronico in pazienti pediatrici sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche in follow-up pneumologico

Analysis of urinary volatile organic compounds by electronic-Nose in paediatric patients undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in pulmonary follow-up

Vanessa Cecchin^{1*}, Laura Tenero², Michele Piazza¹, Giuliana Ferrante¹, Giorgio Piacentini^{1&}

¹Dipartimento Scienze Chirurgiche, Odontostomatologiche e Materno Infantili, Sezione di Pediatria, Università di Verona

²Dipartimento Materno Infantile, Pediatria C, AOUI Verona

*primo autore; &autore senior

Corrispondenza: Vanessa Cecchin **e-mail:** vanessa.cecchin@gmail.com

Riassunto: L'analisi dei composti organici volatili su matrice urinaria mediante naso elettronico rappresenta un nuovo approccio clinico non invasivo, che potrebbe consentire di identificare precocemente alterazioni polmonari in pazienti in età pediatrica sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogenico, e di standardizzare il follow-up pneumologico.

Parole chiave: naso elettronico, TCSE, bronchiolite obliterante.

Summary: *The analysis of urinary volatile organic compounds by electronic nose represents a new non-invasive clinical approach that could allow early identification of pulmonary impairment in children undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation and could have a central role in pulmonary follow-up after HSCT.*

Keywords: *electronic nose, HSCT, bronchiolitis obliterans.*

INTRODUZIONE

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) allogenico rappresenta un'opzione terapeutica per varie patologie oncoematologiche, immunologiche e metaboliche dell'età pediatrica. Negli ultimi anni si è assistito ad un progressivo miglioramento del tasso di sopravvivenza post-trapianto (1). Per tale motivo è importante conoscere e diagnosticare precocemente le complicanze a medio e lungo termine correlate che rappresentano ad oggi importanti cause di morbilità in questa categoria di pazienti. Da qui emerge come il follow-up rivesta un ruolo fondamentale nella pianificazione del percorso clinico (2).

Dal punto di vista pneumologico, la Graft versus Host Disease (GvHD) cronica rappresenta un importante fattore di rischio per lo sviluppo di bronchiolite obliterante (BO) che si manifesta, solitamente nei primi 2 anni dopo il trapianto, con un'incidenza variabile dal 2 al 6% (3,4).

Il monitoraggio della funzionalità polmonare nei pazienti in età pediatrica sottoposti a TCSE è fortemente raccomandato, tuttavia non risulta essere ancora standardizzato: infatti la diagnosi delle complicanze polmonari, in particolar modo la bronchiolite obliterante, avviene spesso tardivamente (3). Inoltre, l'esecuzione delle prove di funzionalità respiratoria (PFR) non è semplice da ottenere in quanto richiede la collaborazione del paziente che spesso non è in condizioni cliniche adeguate, oppure per limiti di età, non permette di raccogliere dei dati attendibili.

I composti organici volatili (VOCs) sono derivati del carbonio che originano da processi metabolici dell'organismo umano e sono rilevabili in varie matrici organiche (urine, feci, aria esalata) attraverso l'impiego di uno strumento chiamato naso elettronico (e-Nose) (5). Il dispositivo utilizzato in questo studio è il Cyranose 320® (Pesadena, California, USA), uno strumento dotato di un *array* di 32 nano sensori di polimeri di carbonio in grado di rilevare gruppi di VOCs presenti nelle matrici organiche. Successivamente, attraverso algoritmi di *pattern recognition system* (6) lo strumento è in grado di elaborare una sorta di "impronta olfattiva" (*breathprint*) caratteristica per ognuno dei campioni analizzati. Questa tecnica emergente in campo biomedico, non invasiva, di facile utilizzo e con costi relativamente contenuti è impiegata in differenti branche della medicina per discriminare i soggetti malati rispetto ai soggetti sani (7-10).

Lo scopo di questo studio è analizzare mediante e-Nose i VOCs presenti nella matrice urinaria di una coorte di pazienti pediatrici sottoposti a TCSE allogenico e valutare la relazione con le prove di funzionalità respiratoria nella fase pre-trapianto e nel follow-up.

MATERIALI E METODI

Lo studio è di tipo longitudinale prospettico monocentrico approvato dal Comitato Etico per la Sperimentazione Clinica delle Province di Verona e Rovigo (CESC 3047).

Sono stati inclusi, previa firma del consenso informato, pazienti di età pediatrica tra 0 e 18 anni sottoposti a TCSE allogenico secondo i protocolli di trattamento di riferimento (1), tra gennaio 2020 e agosto 2021. Lo studio coordinato dal Servizio di Broncopneumologia Pediatrica è stato condotto in collaborazione con il Servizio di Oncoematologia Pediatrica dell'Ospedale della Donna e del Bambino, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona (AOUI-Verona).

Sono stati esclusi i pazienti precedentemente esposti a radioterapia polmonare, con coesistente malattia polmonare interstiziale, o che abbiano assunto steroidi sistemici (a dosaggio uguale o superiore a 2 mg/kg/die) nella settimana precedente l'avvio del protocollo per TCSE allogenico.

In Tabella 1 sono rappresentati i principali timing di raccolta dei campioni, in linea con le più recenti raccomandazioni per il follow-up pneumologico nei pazienti sottoposti a TCSE allogenico (11).

L'arruolamento dei pazienti (To) è avvenuto una settimana prima del trapianto e prima dell'avvio del regime terapeutico di condizionamento. I timing successivi sono stati impostati a 6 settimane dal trapianto e successivamente ogni 3 mesi. Ad ogni rilevazione è stata effettuata raccolta dei campioni uri-

TIMING	GIORNI DA TCSE	RACCOLTA URINE	PFR
TO	-7	X	X
TCSE	0		
T6	+42	X	X
T10	+90	X	X
T13	+180	X	X
T16	+270	X	X
T19	+365	X	X
T20	+455	X	X
T21	+545	X	X

Tab. 1: Flow chart delle rilevazioni da effettuare nei pazienti dei gruppi di studio; TCSE: trapianto di cellule staminali ematopoietiche; PFR= prove di funzionalità respiratoria; x= esame da eseguire.

Flow-chart of timing and detections carried out in the study group.

nari stoccati a -20°C in attesa di essere analizzati con e-Nose.

Nei pazienti collaboranti con età superiore a 5 anni sono state eseguite inoltre le seguenti PFR: spirometria (Jaeger-Carefusion®) con test di broncodilatazione (400mg di salbutamolo), oscillometria ad impulsi (MasterScreen, Jaeger-Carefusion®) con test di broncodilatazione (400mg di salbutamolo) ed infine l'analisi di LCI (Lung Clearance Index) tramite N2-multiple breath washout (N2-MBW) (Exhalyzer-D, Eco-Medics®).

Le variabili continue sono presentate come valore medio e deviazione standard, mentre le variabili ordinali e nominali sono presentate con la frequenza ed il valore percentuale.

Per ogni campione di urina raccolto è stata eseguita un'analisi in triplicato, ed è stato considerato il valore medio delle misure. La relazione tra l'intensità di segnale dei sensori e le variabili dei dati di funzionalità respiratoria sono stati indagati applicando il test di Spearman o il test di Pearson. La significatività statistica è stata considerata per un valore di $p < 0.05$.

RISULTATI

Sono stati arruolati 21 pazienti (10 maschi e 11 femmine) con un'età media di 9 anni. Le PFR sono state eseguite in 12 pazienti. Il follow-up medio è stato di 10 mesi (range 1-18 mesi).

Dieci pazienti hanno sviluppato GvHD acuta e tre hanno manifestato segni di GvHD cronica.

Dall'analisi dei dati ottenuti mediante Cyranose 320® sono emerse differenze statisticamente significative tra le impronte olfattive appartenenti ai diversi campioni e alcuni parametri di funzionalità respiratoria.

Si evidenzia una correlazione inversa tra il parametro $\Delta FEV_1\%$ ($FEV_1\%$ prima e dopo somministrazione di 400µg di salbutamolo) e i sensori S5, S10, S12 e S31 (rispettivamente $p=0.032$, $p=0.02$, $p=0.028$, $p=0.016$). Inoltre, si evidenzia una correlazione inversa tra il valore di $\Delta FEV_{25-75}\%$ (prima e dopo somministrazione di 400µg di salbutamolo) e i sensori S5, S12, S21 e S26 ($p=0.022$, $p=0.022$, $p=0.026$, $p=0.022$, rispettivamente).

Nella valutazione attraverso l'oscillometria ad impulsi, è emersa una correlazione diretta tra il parametro D5-20% e i sensori S1, S3, S27, S28 ($p=0.004$, $p=0.001$, $p=0.003$, $p=0.005$, rispettivamente) (Figura 1).

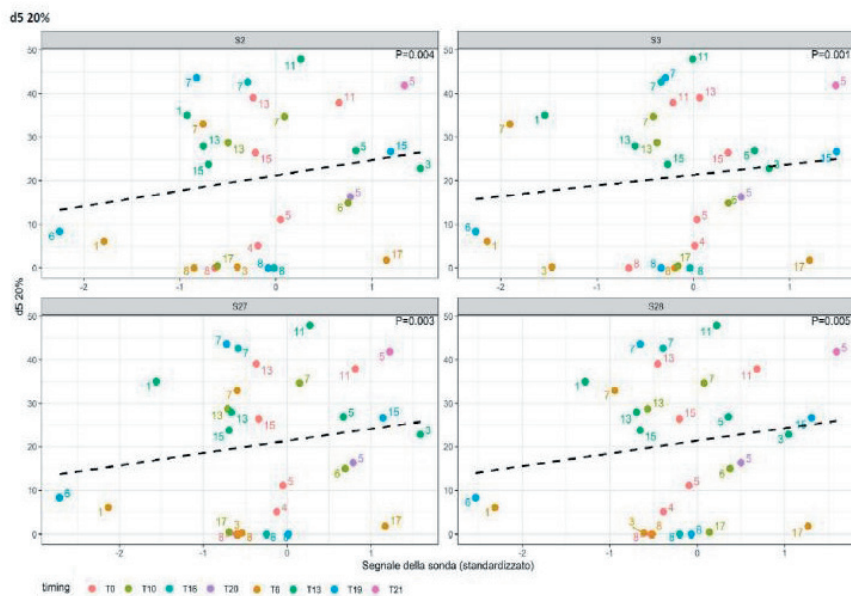


Fig. 1: Scatter plot per l'associazione tra alcuni sensori di e-Nose e D5-20%.
Scatter plot for the relationship between e-Nose and D5-20%.

Infine, LCI 2.5% ottenuto tramite N2-MBW mostra una correlazione inversa con i sensori S1 e S27 (rispettivamente $p=0.004$ e $p=0.001$) (Figura 2).

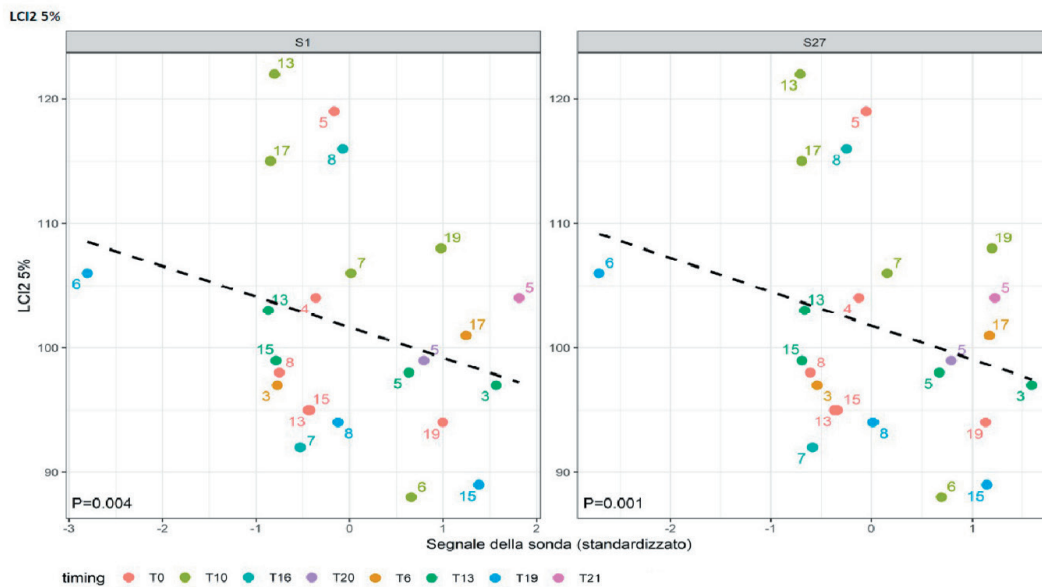


Fig. 2: Scatter plot per l'associazione tra alcuni sensori di e-Nose e LCI 2.5%.
Scatter plot for the relationship between e-Nose and LCI 2.5%.

DISCUSSIONE

Ad oggi lo studio è il primo ad analizzare i VOCs urinari tramite e-Nose in pazienti in età pediatrica sottoposti a TCSE allogenico. L'analisi dei VOCs mediante e-Nose è oggetto di crescente interesse scientifico, in quanto ha permesso di ottenere risultati promettenti nello studio di *biomarker* per la caratterizzazione di differenti patologie (respiratorie, infettive, gastroenterologiche, neoplastiche, etc). Inoltre, si evidenzia come questa tecnologia dall'approccio non invasivo sia di facile applicazione, in quanto la raccolta di campioni di urina è ben accettata dal paziente, e permette di mantenere il costo dell'analisi relativamente contenuto (7-10).

Dai risultati preliminari emergono relazioni significative tra alcuni parametri di funzionalità respiratoria che forniscono informazioni sulle piccole vie aeree, D₅-20% ottenuto dall'oscillometria ad impulsi e LCI 2.5% estrapolato da N₂-MBW. Recenti studi hanno messo in evidenza come nei pazienti affetti da BO vi sia un aumento di LCI e come questo parametro possa essere considerato un indicatore precoce di alterazione delle piccole vie aeree (12, 13). Tuttavia, l'esecuzione della metodica di N₂-MBW richiede una particolare collaborazione del paziente.

Alla luce di queste considerazioni, l'analisi dei VOCs urinari tramite e-Nose potrebbe rappresentare una metodica aggiuntiva da utilizzare nel follow-up pneumologico di pazienti pediatrici sottoposti a TCSE, in quanto permetterebbe di superare le difficoltà correlate all'esecuzione delle prove di funzionalità respiratoria stesse.

I limiti di questo studio riguardano la ridotta dimensione del campione analizzato e l'eterogenea durata del follow-up a causa del carattere prospettico e dell'arruolamento dei pazienti in tempi diversi. Inoltre, la pandemia da COVID-19 ha imposto la sospensione dell'esecuzione delle PFR per vari mesi, per cui la raccolta dati è stata parziale per alcuni pazienti coinvolti nel protocollo.

CONCLUSIONI

Dai risultati preliminari emerge la capacità di Cyranose 320® di identificare VOCs urinari correlati ad alterazioni polmonari delle piccole vie aeree.

Questo approccio clinico non invasivo, a costi contenuti potrebbe rappresentare uno strumento aggiuntivo da utilizzare nel follow-up pneumologico di pazienti pediatrici sottoposti a TCSE, consentendo di standardizzare in precisi timing il monitoraggio della funzionalità respiratoria e poter identificare precocemente un'alterazione polmonare.

E-nose potrebbe quindi acquisire un potenziale ruolo nella diagnosi precoce e non invasiva di alterazione polmonare, che potrebbe essere precursore di BO.

Sarà necessaria la prosecuzione dello studio in modo da aumentare la numerosità campionaria e la durata del follow-up per confermare tale ipotesi.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Duarte R.F., et al. European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Indications for haematopoietic stem cell transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe*. Bone Marrow Transplant. 2019;54:1525-1552.
- (2) Thakkar D., et al. *Pediatric Hematopoietic stem cell transplantation - What a pediatrician should know?* J. Pediatr. Crit. Care 2018;5:51-54.
- (3) Duncan C.N., et al. *Bronchiolitis obliterans following pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant. 2008;41:971-5.
- (4) Kurland G., et al. *Bronchiolitis obliterans in children*. Pediatr. Pulmonol. 2005;39:193-208
- (5) Amann A., et al. *The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva*. J. Breath. Res. 2014;8:034001
- (6) Röck F., et al. *Electronic nose: current status and future trends*. Chem. Rev. 2008;108:705-25.
- (7) Dragonieri S., et al. *Electronic Nose Technology in Respiratory Diseases*. Lung. 2017;195:157-165.
- (8) Buijck M., et al. *Sniffing out paediatric gastrointestinal diseases: the potential of volatile organic compounds as biomarkers for disease*. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2016;63:585-591.
- (9) Dragonieri S., et al. *An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls*. J. Allergy Clin. Immunol. 2007;120:856-62.
- (10) Tenero L., et al. *Electronic nose in discrimination of children with uncontrolled asthma*. J. Breath Res. 2020;14:046003.
- (11) Gassas A., et al. *Chest health surveillance utility in the early detection of bronchiolitis obliterans syndrome in children after allo-SCT*. Bone Marrow Transplant. 2013;48:814-8.
- (12) Lahzami S., et al. *Small airways function declines after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation*. Eur. Resp. J. 2011;38:1180-1188.
- (13) Nyilas S., et al. *Inert gas washout in bronchiolitis obliterans following hematopoietic cell transplantation*. Chest. 2018;154:157-168.