

Variabilità interindividuale nell'attività del CYP2A6 e BPCO nei fumatori: prospettive per un marcatore predittivo precoce

Noemi Calabrò, Aldo Pezzuto, Alberto Ricci, Alessia Pacini, Teresa Palermo, Andrea Favari, Giuliana De Paolis, Evohe Adone, Marina Borro

Riassunto

Introduzione: Anche se il fumo di sigaretta è un fattore di rischio ben definito per la Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO), la maggior parte dei fumatori non sviluppa la malattia. La velocità individuale del metabolismo della nicotina, determinata da differenze genetiche negli enzimi metabolici della nicotina, è stata associata al comportamento dei fumatori e all'efficacia differenziale dei trattamenti per la cessazione del fumo. Abbiamo cercato di indagare la relazione tra il tasso di metabolismo della nicotina e il rischio di BPCO tra i fumatori.

Inter-individual variation in CYP2A6 activity and COPD in smokers: perspectives for an early predictive marker

Noemi Calabrò, Aldo Pezzuto, Alberto Ricci, Alessia Pacini, Teresa Palermo, Andrea Favari, Giuliana De Paolis, Evohe Adone, Marina Borro

Abstract

Introduction: Even if cigarette smoke is a well-defined risk factor for Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), most smokers do not develop the disease. The individual rate of nicotine metabolism, determined by genetic difference in nicotine metabolic enzymes, has been associated with smoking behavior and with differential efficacy of smoking cessation treatments. We sought to investigate the relation between the rate of nicotine metabolism and the risk for COPD among smokers.

Metodi: I soggetti (N = 78) afferenti al servizio di disassuefazione dal fumo dell'Azienda ospedaliero-universitaria Sant'Andrea di Roma sono stati valutati clinicamente mediante spirometria, test di valutazione della BPCO, Modified Medical Research Council test (mMRC), test di Fagerström. Il tasso di metabolismo della nicotina è stato valutato mediante analisi salivari dei metaboliti della nicotina (NMR), determinati con cromatografia liquida-tandem spettrometria liquida. I soggetti sono stati classificati in metabolizzatori lenti, normali e veloci in base alla distribuzione dei quartili di NMR ed è stata valutata l'associazione tra NMR e BPCO. La potenza statistica era $> 0,9$ ($\alpha = 0,05$).

Risultati: L'NMR è risultato significativamente più alto nei soggetti con BPCO rispetto ai soggetti non BPCO (mediana 0,89, range interquantile - IQR 0,52-1,17 vs 0,54 IQR 0,41-0,83), e gli *odds ratios* (OR) per la BPCO nei metabolizzatori veloci della nicotina sono stati 3,62 (intervallo di confidenza al 95% CI: 1,09-12,05, $p = 0,049$) e 6,53 (95% CI: 1,61-26,47, $p = 0,01$) rispetto ai metabolizzatori normali e lenti. L'analisi di regressione logistica multinomiale mostra che, nella coorte analizzata, l'NMR è un fattore di rischio indipendente per la BPCO.

Conclusioni: Il ruolo potenziale dell'NMR come fattore predittivo della BPCO è intrigante, poiché potrebbe essere facilmente determinato decenni prima dell'insorgenza della BPCO, contribuendo a una prevenzione più precoce, e merita quindi un'ulteriore valutazione in studi più ampi e multicentrici.

Parole chiave: Metaboliti della nicotina, CYP, BPCO, fumo di sigaretta.

Introduzione

La Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) è definita dalla Global Initiative for Chronic obstructive disease (GOLD) come "una malattia comune, prevenibile e cura-

bile che è caratterizzata da sintomi respiratori persistenti e da una limitazione del flusso d'aria dovuta ad anomalie delle vie aeree, solitamente causati da una significativa esposizione a particelle o gas nocivi" [1,2]. Nonostante la natura prevenibile

della malattia, essa rappresenta una delle principali cause di morte nel mondo, e richiede un grande impegno per attuare una sorveglianza e una prevenzione efficace [3]. Il fumo di sigaretta è il fattore di rischio singolo più consolidato per la

Methods: Subjects (N = 78) referring to the smoking cessation service of the Sant'Andrea Hospital of Rome were clinically evaluated by spirometry, COPD assessment test, Modified Medical Research Council test, Fagerström's test. The rate of nicotine metabolism was assessed using salivary nicotine metabolite ratio (NMR) determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Subjects were categorized in slow, normal and fast metabolizers according to the quartile's distribution of NMR, and association between NMR and COPD was evaluated. Statistical power was > 0.9 ($\alpha = 0.05$).

Results: NMR was significantly higher in COPD subjects compared to non-COPD subjects (median 0.89, IQR 0.52-1.17 vs 0.54 IQR 0.41-0.83), and the OR for COPD in fast nicotine metabolizers were 3.62 (95% CI: 1.09-12.05, $p = 0.049$) and 6.53 (95% CI: 1.61-26.47, $p = 0.01$) compared to normal and slow metabolizers, respectively. Multinomial logistic regression analysis shows that, in the analysed cohort, NMR is an independent risk factor for COPD.

Conclusion: The potential role of NMR as a predictive factor for COPD is intriguing since it could be easily determined decades before the onset of the pathology, contributing to earlier prevention, and thus deserves further evaluation in larger, multi-centric studies.

Key words: nicotine metabolite ratio, CYP, COPD development, cigarette smoking

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is defined by the Global Initiative for Chronic obstructive disease (GOLD) as "a common, preventable, and treatable disease that is characterized by persistent respiratory symptoms and airflow limitation

due to airway abnormalities, usually caused by significant exposure to noxious particles or gases" [1,2]. Despite the preventable nature of the disease, it is one of the leading causes of death worldwide, and requires a great deal of effort to implement effective surveillance and

prevention [3].

Cigarette smoking is the most well-established single risk factor for COPD [4-6]. Although, among smokers, the incidence of COPD smokers' is variable [4-7] and early recognition of susceptibility/protective factors could be important to

BPCO [4-6]. Anche se, tra i fumatori, l'incidenza della BPCO è variabile [4-7] e il riconoscimento precoce di fattori di suscettibilità/protezione potrebbe essere importante per attuare una prevenzione più precoce ed efficace. La durata e l'intensità del fumo sono associate al rischio relativo di BPCO e, di fatto, la cessazione del fumo è il principale strumento riconosciuto in grado di cambiare il decorso della malattia [8,9]. L'effetto del fumo sulla patogenesi della BPCO è correlato all'insulto chimico fornito alle vie respiratorie da milioni di particelle e sostanze tossiche contenute in un tiro di sigaretta [10]. La nicotina stessa, oltre a dare dipendenza, agisce come mediatore del danno polmonare. Promuove la fibrogenesi attraverso vari meccanismi come il danneggiamento delle barriere epiteliali/endoteliali, il rilascio di TGF- β 1, la produzione di specie reattive dell'ossigeno,

l'attivazione del collagene-proteina e il reclutamento di cellule infiammatorie [11].

Inoltre, l'esposizione alla nicotina inalata influisce direttamente sui parametri polmonari associati allo sviluppo della BPCO [12].

La nicotina viene metabolizzata principalmente in cotinina dall'enzima CYP2A6 del citocromo P450, con un contributo minore del CYP2B6.

La cotinina viene ulteriormente metabolizzata, esclusivamente dal CYP2A6, a 3-idrossicotinina. I polimorfismi che influenzano la funzione enzimatica di entrambe queste proteine, che portano ad alterazione del metabolismo della nicotina, sono ben noti [13]. Tuttavia, sia il CYP2A6 che il CYP2B6 sono altamente polimorfici, rendendo difficile una precisa previsione farmacogenomica della funzionalità enzimatica. Un test alternativo ed economico per valutare il metabolismo della nicotina

è il rapporto tra la concentrazione di 3-idrossicotinina e cotinina misurata in campioni biologici come urina, sangue o saliva, utilizzando la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LCMS/MS). Il test, noto come rapporto dei metaboliti della nicotina (NMR), è un indicatore fenotipico consolidato e convalidato del CYK [14].

Più basso è l'NMR, più bassa è l'attività del CYP2A6 e più bassa è l'attività del CYP2A6 e la *clearance* della nicotina.

Ormai l'NMR viene utilizzato principalmente come predittore della risposta individuale alle terapie per la disassuefazione dal fumo e rappresenta uno strumento potenziale per guidare la selezione personalizzata della terapia di disassuefazione [14,15]. Tuttavia, va tenuto presente che, come la maggior parte dei membri della famiglia degli xenobiotici che metabolizzano i citocro-

implement earlier and more effective prevention. The duration and intensity of smoking are associated with the relative risk of COPD, and, in fact, smoking cessation is the main recognized tool that can change the course of the disease [8,9].

The effect of smoking on the pathogenesis of COPD is related to the chemical insult provided to the airways by the million particles and airways by the million particles and toxic substances contained in a cigarette puff [10]. Nicotine itself, in addition to besides being addictive, acts as a mediator of lung damage. It promotes fibrogenesis through various mechanisms such as damage to epithelial/endothelial barriers, release of TGF- β 1, production of reactive oxygen species, collagen-protein activation, reactive oxygen species, activation of collagen-producing cells, and recruitment of inflammatory cells [11].

In addition, exposure to inhaled nicotine directly affects lung parameters associated with the development of COPD [12].

Nicotine is primarily metabolized to cotinine by the cytochrome P450 enzyme CYP2A6, with a minor contribution from CYP2B6.

Cotinine is further metabolized, exclusively by CYP2A6, to 3-hydroxycotinine. Polymorphisms affecting the enzymatic function of both of these proteins, leading to altered nicotine metabolism, are well known [13]. However, both CYP2A6 and CYP2B6 are highly polymorphic, making accurate pharmacogenomic prediction of enzyme function difficult.

An alternative and inexpensive test to assess nicotine metabolism is the following the ratio of 3-hydroxycotinine to cotinine concentration measured in biological samples such as urine, blood or saliva, using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LCMS/MS).

The test, known as nicotine metabolite ratio (NMR), is an established and validated phenotypic indicator of CYK [14].

The lower the NMR, the lower the CYP2A6 activity and nicotine clearance. By now, NMR has been used primarily as a predictor of individual response to smoking cessation therapies and is a potential tool to guide personalized selection of cessation therapy [14,15]. However, it should be kept in mind that, like most members of the xenobiotic enzyme superfamily members metabolizing cytochromes P450, CYP2A6 has broad substrate specificity and is involved in the biotransformation into toxic compounds of many molecules contained in cigarettes [16,17]. Therefore, while leading to increased nicotine clearance, more rapid CYP2A6 activity could CYP2A6 activity may lead to increased exposure to other toxic substances.

In this study, we sought to investigate the link between individual

mi P450, il CYP2A6 ha un'ampia specificità di substrato ed è coinvolto nella biotrasformazione in composti tossici di molte molecole contenute nella sigaretta [16,17]. Pertanto, pur determinando un aumento della *clearance* della nicotina, un'attività più rapida del CYP2A6 potrebbe portare a una maggiore esposizione ad altre sostanze tossiche.

In questo studio abbiamo cercato di indagare il legame tra il valore individuale di NMR e la suscettibilità dei fumatori a sviluppare la BPCO.

Materiali e metodi

Pazienti e valutazione clinica

Questo è uno studio retrospettivo di coorte che include 78 pazienti ambulatoriali consecutivi (42 femmine, 36 maschi), progressivamente da settembre 2018 a settembre 2019 presso il servizio di disassuefazione dal fumo dell'Ospedale Sant'Andrea di Roma.

Di questi, 37 hanno ricevuto una diagnosi di BPCO. La diagnosi di BPCO è stata stabilita mediante l'indice di Tiffeneau (TI), ovvero il tasso tra FEV₁ (volume espiratorio forzato di un secondo) e la capacità vitale forzata (volume espiratorio forzato) e la capacità vitale forzata (FVC) inferiore al 70%, secondo le linee guida della Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) [2].

La spirometria è stata eseguita tramite pletismografia corporea (sistema Jaeger Masterscreen, Germania) come volumi dinamici della sabbia di flusso sono stati misurati con il metodo pneumotacografico e i volumi e le resistenze con il metodo pletismografico.

I pazienti sono stati istruiti a interrompere il broncodilatatore 48 ore prima del test. Le tecniche seguivano le linee guida della American Thoracic Society e della European Respiratory Society [18].

Inoltre, sono stati utilizzati il test di Fagerström per valutare la dipendenza dal fumo, la scala Modified Medical Research Council (mMRC) per valutare la dispnea e il test di valutazione della BPCO (CAT) per rilevare il rischio di esacerbazione [19-21].

Il CO espirato è stato misurato con un dispositivo Smokerlyzer (Bedfont, U.S.A.).

Un campione di saliva (2-3 ml) è stato raccolto in una provetta sterile da 15 ml circa 1 ora dopo l'ultima sigaretta, conservato a 4°C per un massimo di 2 ore e poi inviato per il test NMR al Laboratorio di Biochimica Clinica del Sant'Andrea di Roma, dove i campioni sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'analisi. Tutti i partecipanti hanno fornito il consenso informato e lo studio è stato approvato dall'Institutional Review Board (Azienda ospedaliero-universitaria Sant'Andrea - La Sapienza Università di Roma, del. 656-13/07/2017).

NMR value and the susceptibility of smokers to develop COPD.

Materials and methods

Patients and clinical evaluation

This is a retrospective cohort study including 78 consecutive outpatients (42 females, 36 males), progressively from September 2018 to September 2019 at the smoking cessation service of Sant'Andrea Hospital in Rome.

Of these, 37 received a diagnosis of COPD. The diagnosis of COPD was established by the Tiffeneau index (TI), which is the rate between FEV₁ (forced expiratory volume of one second) and forced vital capacity (FVC) of less than 70%, according to the GOLD guidelines [2].

Spirometry was performed by body plethysmography (Jaeger masterscreen system, Germany) as dynamic flow and volumes were measured by the pneumotachographic method and volumes and resistances by

the plethysmographic method.

Patients were instructed to discontinue bronchodilator 48 hours before the test. The techniques followed the guidelines of the American Thoracic Society and the European Respiratory Society [18].

In addition, the Fagerstrom test was used to assess smoking dependence, the Modified Medical Research Council (mMRC) scale to assess dyspnea, and the COPD Assessment Test (CAT) to detect the risk of exacerbation [19-21].

Exhaled CO was measured with a smoker-lyzer device (Bedfont, U.S.A.). A saliva sample (2-3 mL) was collected in a sterile 15-mL tube approximately 1 hour after the last cigarette, stored at 4°C for up to 2 hours, and then sent for NMR testing to the Clinical Biochemistry Laboratory at Sant'Andrea in Rome, Italy, where samples were stored at -20°C until analysis.

All participants provided informed consent, and the study was approved

by the Institutional Review Board (Azienda Ospedaliera Sant'Andrea-Sapienza University of Rome, del. 656-13/07/2017).

NMR Determination

Nicotine, cotinine, 3-OH-cotinine and internal standard (IS) cotinine-(methyl-d3) standards were provided by Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, U.S.A.).

Twenty µL of saliva was added to 60 µL of 10 µg/mL IS in acetonitrile (Carlo Erba, Milan, Italy) containing 0.1% formic acid (Merck, Darmstadt, Germany). After 30 seconds vortex shaking and 10 min incubation at -20°C, the samples were centrifuged for 15 min at 14,000 g, and 20 µL of top layer was transferred into autosampler vials. Five µL were injected into the chromatographic system.

Chromatography was performed using an Agilent 1100 series liquid chromatography system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using

Determinazione NMR

Gli standard di nicotina, cotinina, 3-OH-cotinina e lo standard interno (IS) cotinina-(metil-d3) sono stati forniti da Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, U.S.A.).

Venti μL di saliva sono stati aggiunti a 60 μL di 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di IS in acetonitrile (Carlo Erba, Milano, Italia) contenente 0,1% di acido formico (Merck, Darmstadt, Germania). Dopo 30 secondi di agitazione al vortex e 10 min incubazione a -20°C , i campioni sono stati centrifugati per 15 minuti a 14.000 g e 20 μL di strato superiore sono stati trasferiti in fiale autocampionatrici. Cinque μL sono stati iniettati nel sistema cromatografico. La cromatografia è stata eseguita utilizzando un sistema di cromatografia liquida Agilent serie 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.) utilizzando una colonna Phenomenex Luna HILIC (100 $\times$ 2,0 mm, 3 μm) contenente lo stesso materia-

le di imballaggio. La colonna è stata mantenuta a 60°C . Le fasi mobili erano 0,1% di acido formico acquoso (eluente A) e acetonitrile (eluente B). L'eluizione è stata eseguita alla velocità di flusso di 180 $\mu\text{L}/\text{min}$, utilizzando un gradiente di eluizione come segue: 3 minuti con eluente B al 100% e 2 minuti di gradiente lineare al 50% di eluente B, seguito da un ulteriore periodo di 2 minuti in condizioni isocratiche e infine 3 minuti di eluente B al 100. Il tempo totale di esecuzione dell'analisi è stato di 10 minuti. Il metodo di spettrometria di massa è stato eseguito su un sistema a triplo quadrupolo 3200 (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) con una sorgente a spruzzo di ioni turbo. Il rivelatore era impostato in modalità ioni positivi, la tensione di nebulizzazione degli ioni era di 5500 V, la temperatura della sorgente di 200°C , il gas di dissociazione per l'attivazione della collisione (azoto)

era a valore medio.

I quadrupoli Q1 e Q3 sono stati sintonizzati per una risoluzione di massa unitaria.

Lo strumento è stato impostato in modalità di monitoraggio di reazioni multiple. Gli ioni specifici (m/z) monitorati erano m/z 163,2 $\rightarrow$ m/z 130,1 per la nicotina, m/z 177,1 $\rightarrow$ m/z 80,1 per la cotinina, m/z 193,1 $\rightarrow$ m/z 80,1 per la 3-OH-cotinina, con un tempo di permanenza di 100 ms. I dati sono stati acquisiti ed elaborati con Analyst 1.5.1. L'NMR è stato calcolato in base al rapporto 3-OH-cotinina/cotinina.

Analisi statistica

NMR determinato nella popolazione generale, come segue: i metabolizzatori lenti (SM) hanno un valore NMR Q1, i metabolizzatori normali (NM) hanno un valore NMR compreso tra Q2+Q3 e i metabolizzatori veloci (FM) hanno un valore NMR all'interno di Q4. L'analisi della po-

a Phenomenex Luna HILIC column (100 $\times$ 2.0 mm, 3 μm), containing the same packing material. The column was maintained at 60°C . The mobile phases were 0.1% aqueous formic acid (eluent A) and acetonitrile (eluent B). Elution was performed at flow rate of 180 $\mu\text{L}/\text{min}$, using an elution gradient as follows: 3 min with 100% eluent B and 2 min of linear gradient to 50% eluent B, followed by an additional period of 2 min in isocratic conditions and finally 3 min of 100 eluent B. The total analysis run time was 10 min. The mass spectrometry method was performed on a 3200 triple quadrupole system (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) with a turbo ion spray source. The detector was set in positive ion mode, the ion spray voltage was 5500 V, the source temperature was 200°C , and the dissociation gas for collision activation (nitrogen) was at medium value. Quadrupoles Q1 and Q3 were tuned for unity mass resolution.

The instrument was set in multiple reaction monitoring mode. The specific ions (m/z) monitored were m/z 163.2 $\rightarrow$ m/z 130.1 for nicotine, m/z 177.1 $\rightarrow$ m/z 80.1 for cotinine, m/z 193.1 $\rightarrow$ m/z 80.1 for 3-OH-cotinine, with a residence time of 100 ms. Data were acquired and processed with Analyst 1.5.1. NMR was calculated based on the 3-OH-cotinine/cotinine ratio.

Statistical analysis

NMR determined in the general population, as follows: slow metabolizers (SM) had an NMR value Q1, normal metabolizers (NM) had an NMR value between Q2+Q3, and fast metabolizers (FM), had an NMR value within Q4. Statistical power analysis showed that the available sample size, having a sampling ratio of 1.08 ($N = 41$: non-COPD group/ $N = 37$: COPD group), would allow for an assumed, a hypothesized incidence of at least 50 percent of non-normal metabolizers (NMR values Q1 or Q4)

to be detected in the COPD group compared to the COPD group.

Statistical analysis was performed using IBM SPSS version 25.0. The significance level was set $p < 0.05$. Normality of the data was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test, and values were expressed as mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range, as appropriate.

Each patient was assigned to a nicotine metabolic class based on the quartile distribution of the NMR determined in the population at the expected incidence of 25% (defined by quartile determination) with a power of 0.92 ($\alpha = 0.05$).

The association of NMR with COPD and other patient characteristics was analyzed by Mann-Whitney U-test and Spearman's correlation, while categorical variables were analyzed by χ^2 test or Fisher's exact test.

Multinomial logistic regression analysis was used to explore the associ-

tenza statistica ha mostrato che la dimensione del campione disponibile, avendo un rapporto di campionamento di 1,08 ($N = 41$: gruppo non BPCO/ $N = 37$: gruppo BPCO), consentirebbe di rilevare, nel gruppo BPCO, un'incidenza ipotizzata di almeno il 50% di metabolizzatori non normali (valori NMR Q1 o Q4) rispetto al gruppo BPCO.

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando la versione 25.0 di IBM SPSS. Il livello di significatività è stato fissato $p < 0,05$. La normalità dei dati è stata valutata tramite il test di Kolmogorov-Smirnov e i valori sono stati espressi come media e deviazione standard (DS) o mediana e intervallo interquartile, a seconda dei casi.

Ciascun paziente è stato assegnato a una classe metabolica della nicotina in base alla distribuzione dei quartili della NMR determinata nella popolazione all'incidenza prevista del 25% (definita dalla determinazione

del quartile) con una potenza di 0,92 ($\alpha = 0,05$).

L'associazione dell'NMR con la BPCO e con le altre caratteristiche dei pazienti è stata analizzata con il test U di Mann-Whitney e correlazione di Spearman, mentre le variabili categoriche sono state analizzate con χ^2 test quadratico o test esatto di Fisher.

L'analisi di regressione logistica multinomiale è stata utilizzata per esplorare l'associazione tra NMR e covariate con la BPCO, aggiustando per i fattori confondenti come età e sesso.

Risultati

I soggetti affetti da BPCO erano più anziani, più magri e fumatori più assidui in base al numero di anni di fumo (Tabella 1).

Nella popolazione complessiva, il valore NMR ha presentato una distribuzione non normale, con una mediana di 0,61 (range 0,23-3,19) e una

distribuzione in quartili come segue: $Q1 \leq 0,47$; $0,47 < Q2 \leq 0,61$; $0,61 < Q3 \leq 0,98$; $Q4 > 0,98$.

Il valore NMR non ha mostrato correlazioni significative con età, sesso, BMI, esordio, *pack-year*, CAT, mMRC o indice di Fagerström. La BPCO è stata determinata rilevando $FEV_1/FVC < 70\%$, nessuna anamnesi di asma e nessuna reversibilità osservata dopo broncodilatazione con 400 μg di salbutamolo.

Confrontando i pazienti affetti da BPCO con quelli non affetti da BPCO, abbiamo riscontrato che i due gruppi erano omogenei per età di inizio del fumo, indice di Fagerström e CO espirata.

Al contrario, sono state rilevate differenze significative in termini di età, BMI e *pack-year*: i pazienti affetti da BPCO erano più anziani, con una maggiore esposizione a fumo e un indice di massa (BMI) inferiore rispetto ai pazienti non affetti da

ation between NMR and covariates with COPD, adjusting for confounding factors such as age and sex.

Results

Subjects with COPD were older, thinner and more frequent smokers according to the number of years of smoking (Table 1).

In the overall population, the NMR value presented a non-normal distribution, with a median of 0.61 (range 0.23-3.19) and a distribution in quartiles as follows: $Q1 \leq 0.47$; $0.47 < Q2 \leq 0.61$; $0.61 < Q3 \leq 0.98$; NMR value showed no significant correlations with age, sex, BMI, onset, *pack-year*, CAT, mMRC or Fagerström index. COPD was determined by detecting $FEV_1/FVC < 70\%$, no history of asthma, and no reversibility observed after bronchodilation with 400 μg salbutamol.

Comparing COPD patients with non-COPD patients, we found that the two groups were homogeneous

in age of smoking initiation, Fagerstrom index, and exhaled CO.

In contrast, significant differences were found in age and *pack-year*: COPD patients were older, with a greater smoking exposure and lower BMI than non-COPD patients (Table 1). A significant difference was found in NMR value between COPD and non-COPD patients, that was higher in COPD ($p = 0.004$).

To evaluate the association of NMR with COPD development, subjects were grouped according to NMR value as slow metabolizers (SM) with $Q1 \leq 0.47$, normal metabolizers (NM) with $Q2$ - $Q3$ and fast metabolizers (FM) if they were in the $Q4$ quartile. We found that COPD was present in the majority of FMs (73.7%), compared with non-FM where 39% had COPD with a frequency of 43.6% in NM and 30% MS, respectively (Table 2). Indeed, in the population, the difference between FM and non-FM was significant ($p = 0.016$).

The odds ratio (OR) for FMs compared with non-FMs was 4.38 ($p < 0.016$) regarding the risk of developing COPD, specifically there was an OR of 6.53 compared with MSs and 3.52 compared with NMs (Table 3). Multinomial logistic regression analysis shows that, in the study population, NMR is an independent risk factor for COPD. A significant but slight association with COPD was also found for BMI (Table 4).

Discussion

Chronic obstructive pulmonary disease is currently the fourth leading cause of death worldwide, but is expected to become the third by 2030 [4,5].

It is a multifactorial disease resulting from complex interactions between genetic and environmental factors, among which smoking has a clear etiological role, although only a marginal proportion of smokers develop the disease [4-7]. Understanding

	Overall (N = 78)	COPD (N = 37)	Non-COPD (N = 41)	p value
Age	54.28 ± 14.09	57.97 ± 13.68	49.56 ± 14.18	0.01*
BMI	25 (23-28)	24.5 (23-27)	26.5 (23.25-29)	0.045†
Onset smoking 15 (14-17)	15 (14-17)	16 (14.5-17)	15 (14-17.5)	0.537†
Pack-year	35 (25-40)	40 (30-45)	30 (25-40)	0.03†
Fagerstrom	5 (4-6)	5 (4-6)	5 (4-6)	0.6†
Exhaled CO (ppm)	18.8 (14.2-22.9)	19.2 (14.9-22.5)	18.4 (15.1-21.7)	0.5†
NMR	0.61 (0.47-0.98)	0.89 (0.52-1.17)	0.54 (0.41-0.83)	0.004†

Tabella 1 Caratteristiche dei pazienti. I dati sono espressi come media ± DS o come mediana (intervallo interquartile), a seconda dei casi. * t-test; † test U di Mann-Whitney.

Table 1 Patients' characteristics. Data are expressed as mean ± SD or as median (interquartile range), as appropriate. * t-test; † Mann-Whitney U test.

BPCO (Tabella 1). È stata rilevata una differenza significativa nel valore di NMR tra pazienti con BPCO e non BPCO, che era maggiore nei pazienti con BPCO ($p = 0,004$). Per valutare l'associazione tra NMR e sviluppo della BPCO, i soggetti sono stati raggruppati in base al valore NMR come metabolizzatori lenti (SM) con $Q1 \leq 0,47$, metabolizzatori normali (NM) con $Q2-Q3$ e metabolizzatori veloci (FM) se erano nel quartile Q4. Abbiamo riscontrato che la BPCO era presente nella maggior parte dei FM (73,7%), in confronto ai non FM dove il 39% aveva sviluppato la BPCO con frequenza del 43,6% negli NM e del 30% SM, rispettivamente (Tabella 2). In effetti, in the population, la differenza tra gli FM e i non-FM era significativa ($p = 0,016$). L'odds ratio (OR) per gli FM rispetto ai non FM era 4,38 ($p < 0,016$) riguardo al rischio di sviluppare BPCO, in particolare vi era un OR di 6,53 rispetto agli SM e 3,52 rispetto agli NM (Tabella 3). L'analisi di regressione logistica multinomiale mostra che, nella popolazione in studio, la NMR

	COPD	non-COPD	p value*
SM (20)	6 (30%)	14 (70%)	0.019
NM (39)	17 (43.6%)	22 (56.4%)	
FM (19)	14 (73.7%)	5 (26.3%)	
Non FM	23 (39%)	36 (61%)	0.016
FM	14 (73%)	5 (26.3%)	

Tabella 2 Associazione tra BPCO e classe metabolica della nicotina (conteggi assoluti e percentuali). * test del χ^2 quadrato..

Table 2 Association between COPD and the nicotine metabolic class (absolute counts and percent). * χ^2 -squared test

the biological factors underlying this variability could help to recognize high-risk individuals early, improving preventive strategies. In the case of smokers, this is particularly relevant because the disease arises with a delay of decades after the first cigarette. Assessment of the rate of nicotine metabolism is attracting increasing interest as it is assumed to influence the extent of individual nicotine exposure. The NMR, defined as the ratio of 3-hydroxycotinine to cotinine concentration, is a reproducible marker of nicotine metabolism,[22] clearly associated with smoking behavior and response to smoking cessation treatments such as nicotine replacement therapy (NRT), varenicline and bupropion. In the case of NRT, MSs show higher rates of rapidity than FMs, while the efficacy of bupropion and varenicline appears to be higher in FMs [15,23-26]. While the better efficacy of NRT in MS may be related to lower nicotine clearance, the efficacy of nicotine-free treatments in FM has been related to their dopaminergic effect [27]. The starting hypothesis of the present study is that the individual rate of nicotine metabolism, reflecting the level of CYP2A6 activity, may influence susceptibility to COPD due to increased exposure to harmful CYP2A6 molecules including nicotine. Therefore, we determined the NMR in a cohort of patients who referred to a smoking cessation center and evaluated its association with COPD. First, we noted some baseline characteristics that were not homogeneous

è un fattore di rischio indipendente per la BPCO. Una significativa ma lieve associazione con la BPCO è stata rilevata anche per il BMI (Tabella 4).

Discussione

La BPCO è attualmente la quarta causa di morte nel mondo, ma si prevede che diventerà la terza entro il 2030 [4,5]. Si tratta di una patologia multifattoriale che deriva da complesse interazioni tra fattori genetici e ambientali, tra i quali il fumo ha un chiaro ruolo eziologico, anche se solo una parte marginale dei fumatori sviluppa la malattia [4-7]. La comprensione dei fattori biologici alla base di questa variabilità potrebbe aiutare a riconoscere precocemente i soggetti ad alto rischio, migliorando le strategie preventive. Nel caso dei fumatori, ciò è particolarmente rilevante poiché la malattia insorge con un ritardo di decenni dalla prima sigaretta.

COPD vs non-COPD		
	OR (95%CI)	p value*
SM vs NM	0.55 (0.176-1.75)	0.402
FM vs NM	3.62 (1.09-12.05)	0.049
FM vs SM	6.53 (1.61-26.47)	0.01
FM vs (SM + NM)	4.38 (1.39-13.8)	0.016

Tabella 3 Odds ratio (OR) per BPCO nei metabolizzatori della nicotina lenti, normali e veloci. * test esatto di Fisher con calcolo OR.
Table 3 Odds ratio (OR) for COPD in slow, normal and fast nicotine metabolizers.
* Fisher's exact test with OR calculation

La valutazione del tasso di metabolismo della nicotina sta suscitando crescente interesse, poiché si suppone che influisca sull'entità dell'esposizione individuale alla nicotina. NMR, definito come il rapporto tra la concentrazione di 3-idrossicotinina e quella di cotinina, è un marcatore riproducibile del metabolismo della nicotina [22] chiaramente associato al comportamento del fumatore e alla risposta ai trattamenti per la cessazione del fumo come la tera-

pia sostitutiva della nicotina (NRT), la vareniclina e il bupropione. Nel caso della NRT, gli SM mostrano tassi più elevati di rapidità rispetto ai FM, mentre l'efficacia di bupropione e vareniclina sembra maggiore nei FM [15,23-26]. Mentre la migliore efficacia della NRT nella SM può essere correlata a una minore clearance della nicotina, l'efficacia dei trattamenti senza nicotina nel FM è stata correlata al loro effetto dopaminergico [27].

Factor	B	SE	Wald	P value	Exp(B) 95%	CI of Exp (B)
Age	0.044	0.028	2.410	0.121	1.045	0.988 - 1.105
Sex (Female)	-1.242	0.652	3.635	0.057	0.289	0.081 - 1.035
BMI	-0.231	0.091	6.424	0.011	0.794	0.664 - 0.949
Smoking Onset	0.034	0.059	0.322	0.570	1.034	0.921 - 1.161
Fagerstrom	0.056	0.232	0.058	0.810	1.057	0.671 - 1.665
Pack-year	0.029	0.030	0.935	0.334	1.029	0.971 - 1.091
Exhaled CO	0.011	0.023	0.220	0.639	1.011	0.966 - 1.058
NMR	2.556	0.892	8.210	0.004	12.882	2.242 - 74.001

Tabella 4 Analisi di regressione logistica multinomiale per i fattori coinvolti nella determinazione della BPCO.
Table 4 Multinomial logistic regression analysis for factors involved in COPD determination.

between the groups of patients with COPD and those without COPD. Probably this difference is related to the clinical setting in which the study was conducted, a smoking cessation center, with patient access driven primarily by a desire to quit smoking and not directly related to the presence of lung disease. The higher median age and number of

cigarette packs and lower BMI in the COPD group could be explained by the natural history of COPD, which is more prevalent among long-time and intensive smokers. However, the correlation analysis showed that neither age, gender, BMI or other smoking-related variables significantly influence the NMR, while the regression analysis showed that higher

NMR was an independent risk factor for COPD. The same analysis showed a significant, albeit slight, association of BMI with COPD. While this result is consistent with previous reports on the effect of BMI on the onset and prognosis of COPD [23,30] we report for the first time, to our knowledge, a higher significance of COPD development among people with higher nicotine

L'ipotesi di partenza del presente studio è che il tasso individuale di metabolismo della nicotina, che riflette il livello di attività del CYP2A6, possa influenzare la suscettibilità alla BPCO, a causa dell'aumento dell'esposizione alle molecole nocive del CYP2A6 tra cui la nicotina. Pertanto, abbiamo determinato l'NMR in una coorte di pazienti che si sono rivolti a un centro per la cessazione del fumo e abbiamo valutato la sua associazione con la BPCO.

In primo luogo, abbiamo notato alcune caratteristiche basali non omogenee tra i gruppi di pazienti con BPCO e quelli senza BPCO.

Probabilmente questa differenza è legata all'ambiente clinico in cui si è svolto lo studio, un centro per la disassuefazione dal fumo, con l'accesso dei pazienti guidato principalmente dalla volontà di smettere di fumare e non direttamente correlato alla presenza di malattie polmonari. L'età

media e il numero di pacchetti di sigarette più elevato e l'IMC più basso nel gruppo con BPCO potrebbe essere spiegato dalla storia naturale della BPCO, che è più prevalente tra i fumatori di lunga data e intensivi.

Tuttavia, l'analisi di correlazione ha mostrato che né età e sesso né BMC o altre variabili legate al fumo influenzano in modo significativo l'NMR, mentre l'analisi di regressione ha mostrato che un NMR più elevato era un fattore di rischio indipendente per la BPCO. La stessa analisi ha mostrato un'associazione significativa, anche se lieve, del BMI con la BPCO. Mentre questo risultato è coerente con i precedenti rapporti sull'effetto dell'IMC sull'insorgenza e la prognosi della BPCO [23,30] riportiamo per la prima volta, a nostra conoscenza, una significatività maggiore di sviluppo di BPCO tra le persone con un metabolismo della nicotina più elevato (FM) rispetto ai metabolizza-

tori normali o lenti (NM e SM). È interessante notare che le probabilità di BPCO nei FM sono più alte rispetto agli NM, suggerendo un effetto protettivo del metabolismo lento nei confronti dello sviluppo della BPCO. Anche se questo effetto si perde confrontando la SM con la NM, il ruolo speculare del metabolismo lento e veloce ha senso e merita un'ulteriore valutazione in studi più ampi.

I meccanismi biologici alla base dell'aumento del tasso di BPCO nella FM possono essere diversi. Anche se il metabolismo veloce aumenta la velocità di eliminazione della nicotina esso è associato a un cambiamento della topologia del fumo che induce un aumento del volume totale dei tiri (per compensare l'aumento dell'estrazione di nicotina) e una maggiore esposizione a sostanze chimiche nocive [31].

Recentemente, un ampio studio che ha analizzato i dati del Population As-

metabolism (FM) than among normal or slow metabolizers (NM and SM). Interestingly, the odds of COPD in FMs are higher than in NMs, suggesting a protective effect of slow metabolism toward the development of COPD.

Although this effect is lost when comparing MS with NM, the mirror role of slow and fast metabolism makes sense and deserves further evaluation in larger studies.

The biological mechanisms underlying the increased rate of COPD in FM may be different. Although fast metabolism also increases the rate of nicotine elimination, it is associated with a change in smoking topology that induces an increase in total puff volume (to compensate for increased nicotine extraction) and increased exposure to harmful chemicals [31].

Recently, a large study that analyzed data from the Population Assessment of Tobacco use and Health, analyzed total puff volume (to compensate for increased nicotine extraction), found a

significant association between higher NMR and increased exposure to tobacco-derived chemicals [32]. Notably, this study also analyzed correlations of biological markers with NMR, finding higher levels of the inflammatory markers ICAM-1 (intracellular adhesion molecule) and PGE-M (prostaglandin E2 metabolite) in FM compared with MS. ICAM-1 is a known inflammatory marker[33] that shows higher expression in small airway epithelial cells derived from smokers than in cells derived from nonsmokers[34]. The specific induction of ICAM-1 by cigarette smoke extract has been confirmed using cultured rat tracheal tissues[35] as an evaluation model.

In addition, ICAM-1 expression increases in both large and small airways in smokers with chronic airflow limitation [36,37] and up-regulation promotes lung damage in COPD model rats [38].

PGE2 is also a mediator of smoking-induced inflammation through

activation of cyclooxygenase 2 and prostaglandin E2 synthase [39] and is markedly increased in the sputum of current COPD smokers [40,41].

In addition to the increased exposure to primary toxicants, higher NMR, which is actually a marker of CYP2A6 activity, probably increases exposure to secondary smoke toxicants produced specifically by CYP2A6.

CYP2A6 has broad substrate specificity, and in addition to nicotine, the amount of many other chemicals in cigarettes may be affected by its activity.

CYP2A6 is critical for the activation of N-diethylnitrosamine and other tobacco-related nitrosamines [16,17] Thus, increased CYP2A6 activity leads to an increased rate of conversion of cigarette chemicals into toxic compounds.

Identification of the determinants of damage, lung generated by CYP2A6 may help elucidate the molecular patterns specif-

assessment of Tobacco use and Health ha analizzato il volume totale delle boccate (per compensare l'aumento dell'estrazione di nicotina), ha rilevato un'associazione significativa tra un NMR più elevato e una maggiore esposizione a sostanze chimiche derivate dal tabacco [32]. In particolare, questo studio ha analizzato anche le correlazioni di marcatori biologici con l'NMR, trovando livelli più elevati dei marcatori infiammatori ICAM-1 (molecola di adesione intracellulare) e PGE-M (metabolita della prostaglandina E2) nella FM rispetto alla SM. ICAM-1 è un noto marcatore infiammatorio [33] che mostra un'espressione più elevata nelle cellule epiteliali delle piccole vie aeree derivate da fumatori rispetto alle cellule derivate da non fumatori [34]. L'induzione specifica di ICAM-1 da parte dell'estratto di fumo di sigaretta è stata confermata utilizzando come modello di valutazione tessuti tracheali di ratto in coltura [35]. Inoltre, l'espressione di ICAM-1 aumenta sia nelle grandi che nelle piccole vie aeree nei fumatori con limitazione cronica del flusso d'aria [36,37] e l'*up-regulation* promuove il danno polmonare nei ratti modello di BPCO [38]. La PGE2 è anche un mediatore dell'infiammazione indotta dal fumo attraverso l'attivazione della ciclossi-

genasi 2 e della prostaglandina E2 sintasi [39] ed è marcatamente aumentata nell'espettorato dei fumatori di BPCO attuali [40,41].

Oltre alla maggiore esposizione ai tossici primari, un NMR più elevato, che in effetti è un *marker* di attività del CYP2A6, probabilmente aumenta l'esposizione ai tossici secondari del fumo prodotti specificamente dal CYP2A6.

Il CYP2A6 ha un'ampia specificità di substrato, e oltre alla nicotina, la quantità di molte altre sostanze chimiche presenti nelle sigarette può essere influenzata dalla sua attività.

Il CYP2A6 è fondamentale per l'attivazione della N-dietilnitrosamina e di altre nitrosammine legate al tabacco [16,17].

Quindi, una maggiore attività del CYP2A6 porta a un aumento del tasso di conversione delle sostanze chimiche delle sigarette in composti tossici. L'identificazione dei determinanti del danno polmonare generato dal CYP2A6 può contribuire a chiarire i modelli molecolari specificamente innescati nella FM.

I nostri risultati dovrebbero essere confermati da studi più ampi e multicentrici, poiché questa ricerca presenta dei limiti.

Sebbene l'effetto di un NMR più alto sull'insorgenza della BPCO sia abba-

stanza grande da essere rilevato con un'adeguata potenza statistica in questo studio, la piccola dimensione del campione non ci ha permesso di indagare l'eventuale associazione tra metabolismo veloce e caratteristiche della BPCO come dispnea e rischio di esacerbazione.

Inoltre, non possiamo escludere che una certa disomogeneità tra i gruppi di pazienti con BPCO e non BPCO possa aver influenzato i risultati. Purtroppo, l'abbinamento caso-controllo per età, sesso e altri parametri rilevanti non è stato possibile a causa dei vincoli nell'arruolamento dei pazienti derivanti dalle dimensioni e dal tipo di ambiente clinico in cui si è svolto lo studio (centro per la disassuefazione dal fumo, 130-150 pazienti/anno). Infine, come già fatto in precedenti rapporti, abbiamo utilizzato la distribuzione in quartili dell'NMR per definire i valori di *cut-off*.

Attualmente, non è disponibile una definizione precisa dei livelli di *cut-off* di NMR: le misure di NMR sono abbastanza comparabili tra i diversi studi. La variabilità della misura determinata dalle differenze nel campionamento biologico e nei protocolli analitici richiede ancora di fare riferimento ai propri valori soglia.

ically triggered in FM.

Our results should be confirmed by larger, multicenter studies, as this research has limitations.

Although the effect of higher NMR on COPD onset is large enough to be detected with adequate statistical power in this study, the small sample size did not allow us to investigate the possible association between fast metabolism and COPD features such as dyspnea and exacerbation risk.

In addition, we cannot exclude that some inhomogeneity between COPD and non-COPD patient groups may have influenced the

results. Unfortunately, case-control matching for age, sex, and other relevant parameters was not possible due to constraints in patient enrollment resulting from the size and type of size and type of clinical setting in which the study took place (smoking cessation center, 130-150 patients/year). Finally, as done in previous reports, we used the quartile distribution of NMR to define cut-off values. Currently, a precise definition of NMR cut-off levels is not available: NMR measurements are quite comparable across studies. Measurement variability brought about by differences in biological

sampling and analytical protocols still requires one to refer to one's threshold values.

Conclusions

Nicotine metabolite ratio is a potential predictive marker of COPD development in smokers. Fast metabolizers are prevalent in COPD population meaning that regardless of exposure to tobacco smoke these individuals are more prone to airway remodeling. Fast metabolizers have a six times greater risk than slow metabolizers of developing COPD.

Conclusioni

Il rapporto dei metaboliti della nicotina è un potenziale marcatore predittivo dello sviluppo della BPCO nei fumatori. I metabolizzatori veloci sono prevalenti nella popolazione con BPCO, il che significa che, indipendentemente dall'esposizione al fumo di tabacco, questi individui sono più inclini al rimodellamento delle vie aeree. I metabolizzatori veloci hanno sei volte il rischio di sviluppare la BPCO rispetto ai lenti.

Noemi Calabrò, Aldo Pezzuto, Alberto Ricci, Alessia Pacini, Teresa Palermo, Andrea Favari, Giuliana De Paolis, Evohe Adone, Marina Borro

Cardiovascular and Respiratory Sciences Department
Sant'Andrea Hospital
Sapienza University of Rome
✉ noemi.calabro@uniroma1.it

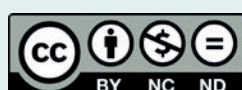
Bibliografia

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). 2020 Global strategy for prevention, diagnosis and management of COPD. https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2019/12/GOLD-2020-FINAL-ver1.2-03Dec19_WMV.pdf
2. Burkes RM, Donohue JF. An Update on the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. 2017 Guidelines with a focus on classification and management of stable COPD. *Respir Care* 2018;63:749-58. <https://doi.org/10.4187/respcare.06174>
3. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380:2095-128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)
4. Terzikhan N, Verhamme KM, Hofman A, Stricker BH, Brusselle GG, Lahousse L. Prevalence and incidence of COPD in smokers and non-smokers: the Rotterdam Study. *Eur J Epidemiol* 2016;31:785-92. <https://doi.org/10.1007/s10654-016-0132-z>
5. Quaderi SA, Hurst JR. The unmet global burden of COPD. *Glob Health Epidemiol Genom* 2018;3:e4. <https://doi.org/10.1017/ghg.2018.1>
6. Eisner MD, Balmes J, Yelin EH, Katz PP, Hammond SK, Benowitz N, et al. Directly measured secondhand smoke exposure and COPD health outcomes. *BMC Pulm Med* 2006;6:12. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-6-12>
7. Bartal M. COPD and tobacco smoke. *Monaldi Arch Chest Dis* 2005;63:213-25. <https://doi.org/10.4081/monaldi.2005.623>
8. Pezzuto A, Carico E. Effectiveness of smoking cessation in smokers with COPD and nocturnal oxygen desaturation: functional analysis. *Clin Respir J* 2020;14:29-34. <https://doi.org/10.1111/crj.13096>
9. Pezzuto A, Stellato M, Catania G, et al. Short-term benefit of smoking cessation along with glycopirronium on lung function and respiratory symptoms in mild COPD patients: a retrospective study. *J Breath Res* 2018;12:046007. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aad0a8>
10. Hikichi M, Mizumura K, Maruoka S, Gon Y. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by cigarette smoke. *J Thorac Dis* 2019;11(Suppl 17):S2129-40. <https://doi.org/10.21037/jtd.2019.10.43>
11. Mishra A, Chaturvedi P, Datta S, Sinukumar S, Joshi P, Garg A. Harmful effects of nicotine. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2015;36:24-31. <https://doi.org/10.4103/0971-5851.151771>
12. Garcia-Arcos I, Geraghty P, Baumlin N, Campos M, Dabo AJ, Jundi B, et al. Chronic electronic cigarette exposure in mice induces features of COPD in a nicotine-dependent manner. *Thorax* 2016;71:1119-29. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-208039>
13. Binnington MJ, Zhu AZ, Renner CC, Lanier AP, Hatsukami DK, Benowitz NL, et al. CYP2A6 and CYP2B6 genetic variation and its association with nicotine metabolism in South Western Alaska Native people. *Pharmacogenet Genomics* 2012;22:429-40. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283527c1c>
14. Chenoweth MJ, Tyndale RF. Pharmacogenetic optimization of smoking cessation treatment. *Trends Pharmacol Sci* 2017;38:55-66. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.09.006>
15. Lerman C, Schnoll RA, Hawk LW Jr, Cinciripini P, George TP, Wileyto EP, et al. Use of the nicotine metabolite ratio as a genetically informed biomarker of response to nicotine patch or varenicline for smoking cessation: a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med* 2015;3:131-8. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70294-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70294-2)
16. Shimada T, Murayama N, Yamazaki H, et al. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aryl and heterocyclic amines by human cytochromes P450 2A13 and 2A6. *Chem Res Toxicol* 2013;26:529-37. <https://doi.org/10.1021/tx3004906>
17. Yamazaki H, Inui Y, Yun CH, Guengerich FP, Shimada T. Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* 1992;13:1789-94. <https://doi.org/10.1093/carcin/13.10.1789>
18. Laszlo G. Standardisation of lung function testing: helpful guidance from the ATS/ERS Task Force. *Thorax* 2006;61:744-6. <https://doi.org/10.1136/thx.2006.061648>
19. Heatherton TF, Kozlowski LT, Frecker RC, Fagerström K. The Fagerström test for nicotine dependence: a revision of the Fagerström tolerance questionnaire. *British Journal of Addiction* 1991;86:1119-27. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.1991.tb01879.x>
20. Bestall JC, Paul EA, Garrod R, Garnham R, Jones PW, Wedzicha JA. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999;54:581-6. <https://doi.org/10.1136/thx.54.7.581>
21. Jones PW, Harding G, Berry P, Wiklund I, Chen WH, Kline Leidy N. Development and first validation of the COPD Assessment Test. *Eur Respir J* 2009;34:648-54. <https://doi.org/10.1183/09031936.00102509>
22. Siegel SD, Lerman C, Flitter A, Schnoll RA. The use of the nicotine metabolite ratio as a biomarker to personalize smoking cessation treatment: current evidence and future directions. *Cancer Prev Res(Phila)* 2020;13:261-72. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-19-0259>
23. Mamoun M, Bergen AW, Shieh J, Wiggins A, Brody AL. Biomarkers of response to smoking cessation pharmacotherapies: progress to date. *CNS Drugs* 2015;29:359-69. <https://doi.org/10.1007/s40263-015-0243-1>
24. Kazan T, Charntikov S. Individual differences in responding to bupropion or varenicline in a preclinical model of nicotine self-administration vary according to individual demand for nicotine. *Neuropharmacology* 2019;148:139-50. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70294-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70294-2)

- org/10.1016/j.neuropharm.2018.12.031
25. Kaufmann A, Hitsman B, Goelz PM, Veluz-Wilkins A, Blazekovic S, Powers L, et al. Rate of nicotine metabolism and smoking cessation outcomes in a community-based sample of treatment-seeking smokers. *Addict Behav* 2015;51:93-9. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2015.07.019>
 26. Schnoll RA, Patterson F, Wileyto EP, Tyndale RF, Benowitz N, Lerman C. Nicotine metabolic rate predicts successful smoking cessation with transdermal nicotine: a validation study. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;92:6-11. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.10.016>
 27. Gonzalez-Gutierrez JP, Hodar M, Viscarra F, Paillali P, Guerra-Díaz N, Pessoa-Mahana H, et al. Minimal structural changes determine full and partial nicotinic receptor agonist activity for nicotine analogues. *Molecules* 2019;24:2684. <https://doi.org/10.3390/molecules24152684>
 28. Yamaya M, Usami O, Nakayama S, Tode N, Yamada A, Ito S, et al. Malnutrition, airflow limitation and severe emphysema are risks for exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Japanese subjects: a retrospective single-center study. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2020;15:857-68. <https://doi.org/10.2147/COPD.S238457>
 29. Vanfleteren LG, Lamprecht B, Studnicka M, Kaiser B, Gnatiuc L, Burney P, et al. Body mass index and chronic airflow limitation in a worldwide population-based study. *Chron Respir dis* 2016;13:90-101. <https://doi.org/10.1177/1479972315626012>
 30. Zhou Y, Wang D, Liu S, Lu J, Zheng J, Zhong N, et al. The association between BMI and COPD: the results of two populationbased studies in Ghuan-gzhou. *COPD* 2013;10:567-72. <https://doi.org/10.3109/15412555.2013.781579>
 31. Strasser AA, Benowitz NL, Pinto AG, Tang KZ, Hecht SS, Carmella SG, et al. Nicotine metabolite ratio predicts smoking topography and carcinogen biomarker level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20:234-8. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0674>
 32. Carroll DM, Murphy SE, Benowitz NL, Strasser AA, Kotlyar M, Hecht SS, et al. Relationships between the nicotine metabolite ratio and a panel of exposure and effect biomarkers: findings from two studies of u.s. commercial cigarette smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2020;29:871-9. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0644>
 33. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1379-86. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00223-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00223-9)
 34. Takizawa H, Tanaka M, Takami T, Ohtoshi T, Ito K, Satoh M, et al. Increased expression of inflammatory mediators in smallairway epithelium from tobacco smokers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:L906-13. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.278.5.L906>
 35. Chen X, Li Y, Hua C, Jia P, Xing Y, Xue B, et al. Establishment of rapid risk assessment model for cigarette smoke extract exposure in chronic obstructive pulmonary disease. *Toxicol Lett* 2019;316:10-9. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.08.020>
 36. Lopez-Campos JL, Calero C, Arellano-Orden E, Marquez-Martín E, Cejudo-Ramos P, Ortega Ruiz F, et al. Increased levels of soluble ICAM-1 in chronic obstructive pulmonary disease and resistant smokers are related to active smoking. *Biomark Med* 2012;6:805-11. <https://doi.org/10.2217/bmm.12.64>
 37. Shukla SD, Mahmood MQ, Weston S, Latham R, Muller HK, Sohal SS, et al. The main rhinovirus respiratory tract adhesion site (ICAM-1) is upregulated in smokers and patients with chronic airflow limitation (CAL). *Respir Res* 2017;18:6. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0483-8>
 38. Wang YX, Ji ML, Jiang CY, Qian ZB. Upregulation of ICAM-1 and IL-1 β protein expression promotes lung injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Genet Mol Res*. 2016;15. <https://doi.org/10.4238/gmr.15037971>
 39. Martey CA, Pollock SJ, Turner CK, O'Reilly KM, Bagloli CJ, Phipps RP, et al. Cigarette smoke induces cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E2 synthase in human lung fibroblasts: implications for lung inflammation and cancer. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L981-91. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00239.2003>
 40. Profita M, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Ferraro M, La Grutta S, et al. Chronic obstructive pulmonary disease and neutrophil infiltration:role of cigarette smoke and cyclooxygenase products. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;298:L261-9. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90593.2008>
 41. Santini G, Mores N, Shohreh R, Valente S, Dabrowska M, Trovè A, et al. Exhaled and non-exhaled non-invasive markers for assessment of respiratory inflammation in patients with stable COPD and healthy smokers. *J Breath Res* 2016;10:017102. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/10/1/017102>
 42. Pauk N, Klimesova S, Kara J, Topinka J, Labaj J. The relevance of monitoring of antibodies against the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and PAH-DNA adducts in serum in relation to lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Neoplasma* 2013;60:182-7. https://doi.org/10.4149/neo_2013_024
 43. De Marco R, Accordini S, Marcon A, Cerveri I, Antó JM, Gislason T, et al.; European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). Risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in a European cohort of young adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:891-7. <https://doi.org/10.1164/rccm.201007-1125OC>
 44. Kessler R, Partridge MR, Miravittles M, Cazzola M, Vogelmeier C, Vogelmeier C, et al. Symptom variability in patients with severe COPD: a pan-European cross-sectional study. *Eur Respir J* 2011;37:264-72. <https://doi.org/10.1183/09031936.00051110>
 45. Stockley RA, Mannino D, Barnes PJ. Burden and pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6:524-6. <https://doi.org/10.1513/pats.200904-016DS>

HOW TO CITE

Calabrò N, Pezzuto A, Ricci A, Pacini A, Palermo T, Favari A, et al. Inter-individual variation in CYP2A6 activity and chronic obstructive pulmonary disease in smokers: perspectives for an early predictive marker. *Tabaccologia* 2024; XXII(1):12-23. <https://doi.org/10.53127/tblg-2024-A003>



OPEN ACCESS

L'articolo è open access e divulgato sulla base della licenza CCBY-NC-ND (Creative Commons Attribuzione - Non commerciale - Non opere derivate 4.0 Internazionale). L'articolo può essere usato indicando la menzione di paternità adeguata e la licenza; solo a scopi non commerciali; solo in originale. Per ulteriori informazioni: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.it>