

Profilare il respiro dei fumatori tramite spettrometria di massa per identificare una *signature* correlata al consumo di tabacco in una prospettiva diagnostica

Chiara Veronese, Francesco Segrado, Riccardo Caldarella, Roberto Boffi, Rosaria Orlandi

Riassunto

L'analisi del respiro per la ricerca di composti organici volatili tramite spettrometria di massa è una tecnologia molto innovativa, non invasiva, che rappresenta una grande opportunità per ridisegnare la diagnostica clinica in un contesto di diagnosi precoce e personalizzata. In questo studio pilota abbiamo reclutato una serie di volontari, fumatori e non fumatori, ben caratterizzati dal punto di vista della funzionalità respiratoria, per la profilazione del loro esalato. Lo scopo dello studio è quello di identificare una *signature* molecolare volatile associata al consumo di tabacco tramite tecnologia SESI-HR-MS. L'analisi supervisionata ha evidenziato 32 *feature* che discriminano il respiro dei 2 gruppi, fumatori e non fumatori, al *baseline*. Possiamo quindi affermare di aver identificato una *signature* molecolare strettamente correlata al fumo di tabacco, che dovrà essere caratterizzata in studi successivi.

Parole chiave: fumo di tabacco, BPCO, spettrometria di massa, analisi del respiro.

Profiling exhaled breath of smokers using mass spectrometry to identify a signature related to tobacco use for diagnostic perspectives

Chiara Veronese, Francesco Segrado, Riccardo Caldarella, Roberto Boffi, Rosaria Orlandi

Abstract

Breath analysis for the identification of volatile organic compounds by mass spectrometry is a very innovative and non-invasive technology, which represents a great opportunity for an early and personalised diagnosis. In this pilot study we recruited a series of volunteers, smokers and non-smokers, characterized from the respiratory point of view, and profiled their exhaled breath through SESI-HRMS technology. The aim of the study is to identify a volatile molecular signature associated with tobacco use. The supervised analysis highlighted 32 features that discriminate the breath of smokers and non-smoker subjects, at the baseline. We therefore identified a volatile molecular signature closely related to tobacco smoke, which will be characterized in subsequent studies.

Keywords: tobacco smoke, COPD, mass spectrometry, breath analysis.

Introduzione

Il fumo di sigaretta è il principale fattore di rischio per l'insorgenza e l'esacerbazione di patologie infiammatorie a carico dell'apparato respiratorio, come la Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) e l'asma bronchiale, e di patologie oncologiche, come i tumori del polmone. Il consumo di tabacco ha un duplice ruolo nel generare il caratteristico stato infiammatorio: diretto, attraverso gli agenti ossidanti in esso contenuti, come l'ossido nitrico (NO) e i radicali liberi, e indiretto attraverso la stimolazione delle cellule dell'infiammazione, che una volta attivate producono sostanze reattive dell'ossigeno (ROS) in grado di contribuire al meccanismo di flogosi e danno tissutale. Inoltre, tra i molteplici danni da fumo annoveriamo in prima battuta quelli sull'epitelio respiratorio: inattivazione delle antiproteasi, ipersecrezione mucosale, aumentato sequestro di neutrofili nel

microcircolo polmonare ed espressione genica di mediatori pro-infiammatori. I composti presenti nel fumo di tabacco provocano quindi un'intensa flogosi bronchiale e la persistenza dell'abitudine tabagica adduce un danno cumulativo che facilita il rimodellamento delle vie aeree, come nel caso della BPCO e dell'asma [1]. A oggi la diagnosi di queste due patologie infiammatorie croniche viene suffragata dall'esecuzione di una spirometria (esame per la valutazione della funzionalità polmonare) in un paziente che presenti un'anamnesi coerente col sospetto diagnostico. La spirometria, tuttavia, conferma la presenza e definisce il grado di ostruzione bronchiale, ma non fornisce indicazioni sul grado di infiammazione, soprattutto nei primi stadi di malattia. L'analisi del respiro per la ricerca di composti organici volatili (VOC) è una tecnologia molto innovativa, che rappresenta una grande opportunità per ridisegnare la diagnostica clinica in un

contesto di diagnosi precoce e personalizzata. Si tratta di una procedura totalmente non invasiva, con la possibilità di un campionamento illimitato, riproducibile e di facile esecuzione, molto ben accettata anche da pazienti fragili, con difficoltà respiratorie e con una potenzialità diagnostica, specialmente per malattie respiratorie quali asma, BPCO e tumore del polmone [2]. Le concentrazioni di VOC rilevabili nell'esalato umano possono essere alterate da processi infiammatori, in particolare per l'ossidazione dei lipidi e l'azione di specie radicaliche [3]. Negli ultimi anni sono stati riportati studi preliminari basati sull'analisi dell'esalato di pazienti con BPCO per valutare il livello dello stato infiammatorio e il rischio di esacerbazione [4,5]. Fens e coll. hanno inoltre suggerito l'associazione fra alcuni VOC esalati tipicamente coinvolti nella perossidazione dei lipidi e il numero di eosinofili e neutrofili, che promuovono la formazione di ROS [6].

Introduction

Cigarette smoking is the main risk factor for the onset and exacerbation of inflammatory diseases of respiratory system, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma, and of oncological diseases, such as lung tumours. Tobacco consumption has a dual role in generating the characteristic inflammatory state: direct, through the oxidizing agents it contains, such as nitric oxide (NO) and free radicals, and indirectly through the stimulation of inflammatory cells, which once activated, produce reactive oxygen substances (ROS) capable of contributing to the mechanism of inflammation and tissue damage. In addition, among the many damages caused by smoking we include, in the first instance, those on the respiratory epithelium, the inactivation of antiproteases, mucosal hypersecretion, increased sequestration of neutrophils in the pulmonary microcircula-

tion and the gene expression of pro-inflammatory mediators. The compounds present in tobacco smoke cause intense bronchial inflammation and the persistence of the smoking habit leads to cumulative damage that facilitates the remodelling of the airways, as in the case of COPD and asthma [1]. To date, the diagnosis of these two chronic inflammatory diseases is supported by carrying out of a spirometry (examination for the evaluation of lung function) in a patient who has a history consistent with the suspected diagnosis. However, spirometry confirms the presence and defines the degree of bronchial obstruction, but does not provide information on the degree of inflammation, especially in the early stages of the disease. Breath analysis for the search of volatile organic compounds (VOCs) is a very innovative technology, which represents a great opportunity to redesign clinical diagnostics in a con-

text of early and personalized diagnosis. It is a totally non-invasive procedure, with the possibility of unlimited sampling, reproducible and easy to perform, very well accepted even by fragile patients, with breathing difficulties, especially for respiratory diseases such as asthma, COPD and lung cancer [2]. Concentrations of VOC detectable in human exhalation can be altered by inflammatory processes, in particular due to the oxidation of lipids and the action of radical species [3]. In recent years, preliminary studies based on the analysis of the exhalation of COPD patients have been reported to assess the level of the inflammatory state and the risk of exacerbation [4, 5]. Fens also suggested the association between some exhaled VOCs typically involved in lipid peroxidation and the number of eosinophils and neutrophils, which promote the formation of ROS.

Obiettivo dello studio

In questo studio pilota ci siamo proposti di utilizzare una tecnologia analitica molto sensibile basata sulla spettrometria di massa (MS) e disegnata per la pratica clinica, al fine di analizzare il respiro di soggetti volontari sani. Lo studio ha previsto il reclutamento di una serie di volontari, fumatori e non fumatori, ben caratterizzati dal punto di vista delle prove di funzionalità respiratoria (PFR), livelli di monossido di carbonio espirato (CO), ossido nitrico (FeNO) e abitudine al fumo. Il loro esalato è stato analizzato utilizzando la spettrometria di massa allo scopo di:

- individuare le differenze in termini di composti organici volatili (VOC) presenti nell'esalato di volontari sani fumatori rispetto all'esalato di soggetti sani non fumatori;
- identificare e caratterizzare una *signature* molecolare volatile associata al consumo cronico di ta-

bacco;

- identificare e caratterizzare una *signature* molecolare volatile relativa all'esalato raccolto subito dopo il consumo di una sigaretta.

Metodi

Disegno dello studio e campionamento

Lo studio, effettuato presso la Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori (INT) di Milano e approvato dal Comitato Etico (INT 16/17 emendamento 4), ha previsto il reclutamento di 45 volontari sani di sesso maschile, di cui 22 fumatori e 23 non fumatori, dal dicembre 2020 al marzo 2021. Per evitare l'introduzione di fattori confondenti legati alle variabili correlate al sesso, si è optato per il reclutamento di soli uomini.

Inoltre, per fare in modo che lo stile di vita non portasse alla rilevazione di sostanze capaci di interferire con l'analisi strumentale, nelle 2 ore pre-

cedenti al test non era per loro possibile:

- fumare;
- mangiare cibo o caramelle;
- bere (esclusa acqua);
- usare il burro cacao;
- assumere farmaci (se indispensabili, andavano assunti ma informandone il personale).

Nella prima fase, i partecipanti allo studio, dopo aver compilato l'apposito consenso informato, un questionario che accertasse la mancanza di sintomi riconducibili al COVID-19 e un questionario anamnestico e sullo stile di vita, venivano invitati a eseguire una spirometria semplice, la misurazione del FeNO per la valutazione dello stato infiammatorio a livello bronchiale e quella del CO esalato per quantificare l'esposizione al fumo di tabacco. A tutti i soggetti fumatori è stato proposto il percorso di disassuefazione al fumo presso il Centro Antifumo dell'INT.

Objective of the study

In this pilot study we used a very sensitive analytical technology based on mass spectrometry (MS) and designed for clinical practice, in order to analyze the breath of healthy volunteers. The study involved the recruitment of a series of volunteers, smokers and non-smokers, well characterized in terms of respiratory function, levels of exhaled carbon monoxide (CO), nitric oxide (FeNO) and smoking habits. Their exhalation was analyzed using mass spectrometry in order to:

- identify the differences in terms of volatile organic compounds (VOCs) present in the exhalation of healthy smoking volunteers compared to the breath of healthy non-smoking subjects;
- identify and characterize a volatile molecular signature associated with chronic tobacco use;
- identify and characterize a volatile molecular signature relating

to the breath collected immediately after the consumption of a cigarette.

Methods

Study design

The study carried out at the IRCCS National Cancer Institute (INT) Foundation in Milan and approved by the Ethics Committee (INT 16/17 amendment 4), envisaged the recruitment of 45 healthy male volunteers, of which 22 smokers and 23 non-smokers, from December 2020 to March 2021. To avoid the introduction of confounding factors related to sex-related variables, it was opted for the recruitment of men only. Furthermore, to ensure that the lifestyle did not lead to the detection of substances capable of interfering with the instrumental analysis, in the 2 hours prior to the test it was not possible:

- to smoke;
- to eat food or candy;
- to drink (excluding water);

- use cocoa butter;
- take medications (if necessary, take them and inform the staff).

In the first phase, the study participants, after completing the appropriate informed consent, a questionnaire that ascertained the absence of symptoms attributable to COVID-19 and an anamnestic and lifestyle questionnaire, were invited to perform a spirometry, the FeNO measurement to assess bronchial inflammation and CO measurement to quantify exposure to tobacco smoke. All smokers were offered the access to our anti-smoking centre for smoking cessation. In the second phase, the study participants were conducted in an environment dedicated to exhalation sampling, equipped with an air purification system. The collection of breath samples took place by inflating 2-liter nalophan balloons, self-produced and sterilized with hydrogen peroxide vapours, with a single deep exhalation. At the same

Nella seconda fase, i partecipanti allo studio erano condotti in un ambiente dedicato al campionamento dell'esalato, dotato di un sistema di purificazione dell'aria. La raccolta dei campioni di respiro è avvenuta gonfiando con un'unica espirazione profonda palloni in nallophan da 2 litri, autoprodotti e sterilizzati con vapori di perossido d'idrogeno. Contestualmente veniva raccolta anche l'aria della stanza per valutare la presenza d'interferenti ambientali. I partecipanti allo studio erano invitati a riempire con il proprio esalato due palloni. Dopo una pausa di 20 minuti, durante i quali ai pazienti fumatori era chiesto di fumare una sola sigaretta (unica differenza procedurale tra i due gruppi), veniva raccolto nuovamente l'esalato tramite il riempimento di altri 2 palloni, per un totale di 4 palloni per ciascun volontario. La raccolta del respiro veniva condotta adottando le più aggiornate disposizioni di contrasto alla diffusione del-

la pandemia da COVID-19: in particolare, i palloni sono stati dotati di un boccaglio con filtro tale da trattenere batteri/virus ma che permetteva comunque il passaggio di VOC senza alterarne la composizione. Gli operatori hanno, inoltre, fatto uso di tutti i DPI prescritti in ambiente ospedaliero per il contenimento della pandemia. I campioni, condotti in laboratorio, venivano analizzati entro 120 minuti dalla raccolta per scongiurare il loro deterioramento. Il campionamento e la successiva analisi strumentale sono avvenuti in conformità con le procedure operative standardizzate (SOP) precedentemente validate da studi dell'INT. Ogni eventuale non conformità a esse è stata registrata e i campioni non conformi relativi a 2 soggetti sono stati raccolti nuovamente e analizzati.

Analisi dei campioni di esalato

L'analisi dell'esalato è stata effettuata con tecnologia SESI-HRMS (ionizzazio-

ne secondaria a elettrospray accoppiata a spettrometria di massa in alta risoluzione) per la rilevazione dei composti organici volatili presenti nell'espirato umano, essenzialmente come descritto da Martinez-Lozano Sinues e coll. [7]. L'estrazione dei dati spettrali e la loro conversione a dati numerici è stata effettuata mediante il software Mzmine [8] e la successiva analisi statistica dei dati è avvenuta tramite la nostra procedura di *pre-processing* e analisi supervisionata utilizzando il software R [7]. Il risultato finale è rappresentato da una *signature*, cioè una lista di *feature* differenzialmente presenti nei gruppi analizzati, riconducibili a picchi rilevati in MS e quindi alle composizioni elementari dei VOC e ai loro relativi valori di intensità.

Risultati

Descrizione del campione

Sono stati arruolati 45 volontari sani

time, the room air was also collected to assess the presence of environmental interferers. Study participants were asked to fill two balloons with their exhalation. After a 20-minute break, during which smoking patients were asked to smoke only one cigarette (the only procedural difference between the two groups), the exhalation was collected again by filling another 2 balloons, for a total of 4 balloons for each volunteer. Breath collection was carried out by adopting the most up-to-date provisions to combat the spread of the COVID-19 pandemic: in particular, the balloons were equipped with a mouthpiece with a filter capable of retaining bacteria / viruses but which still allowed the passage of VOCs without alter its composition. The operators also made use of all the PPE prescribed in a hospital environment for the containment of the pandemic. The samples, conducted in the laboratory, were analyzed within 120 minutes of

collection to avoid their deterioration. Sampling and subsequent instrumental analysis took place in accordance with standardized operating procedures (SOPs) previously validated by other INT studies. Any non-compliance with them was recorded and the non-compliant samples relating to 2 subjects were collected and analyzed again.

Analysis of exhaled samples

The analysis of the exhaled was carried out with SESI-HRMS technology (secondary electrospray ionization-high resolution mass spectrometry) for the detection of volatile organic compounds present in the human breath, essentially as described by Martinez-Lozano Sinues [7]. The extraction of the spectral data and their conversion to numerical data was carried out using the Mzmine software [8] and the subsequent statistical analysis of the data took place through our pre-process-

ing and supervised analysis procedure using the R [7] software. The final result is represented by a signature, that is a list of features differentially present in the analyzed groups, attributable to peaks detected in MS and therefore to the elementary compositions of the VOCs and their relative intensity values.

Results

Sample description

Were enrolled 45 healthy male volunteers, aged 24 to 67, 23 non-smokers and 22 smokers. The average age of smokers and non-smokers is 42 for both groups. The data collection relating to the smoking history of 22 smokers led to the following average values: 13 cig / day, 23 years of smoking, 16 P / Y.

The analysis of CO, FeNO and spirometry (Figure 1) shows:

- the validity of the CO levels that confirm the smoking status declared by the volunteers (Fig. 1 a);

di sesso maschile, di età compresa tra i 24 e i 67 anni, 23 non fumatori e 22 fumatori. L'età media di fumatori e non fumatori è di 42 anni per entrambi i gruppi. La raccolta dati relativa all'anamnesi tabagica dei 22 fumatori ha portato ai seguenti valori medi: 13 sig/die, 23 anni di fumo, 16 P/Y.

Dall'analisi di CO, FeNO e spirometria semplice riportati in Figura 1 si evince:

- la validità dei livelli di CO esalato che confermano lo status tabagico dichiarato dai volontari (Figura 1a);
- la chiara relazione tra consumo giornaliero di sigarette e valori di CO. In 4 soggetti abbiamo riscontrato una spirometria alterata (sindrome ostruttiva) e pertanto sono stati inviati al medico pneumologo per i necessari accertamenti. Tutte e quattro spirometrie alterate (valore 1) si associavano a fumatori che consumavano un numero di si-

garette/die \geq di 20 (Figura 1b);

- che i valori di FeNO divisi tra fumatori e non fumatori confermano come questo indicatore infiammatorio sia minore nei fumatori. Questa considerazione era già nota in letteratura, anche se con un meccanismo che non è ancora del tutto chiarito [9] (Figura 1c);
- che non si osservano correlazioni tra numero di sig/die e valori di FeNO (Figura 1d).

Analisi del respiro

I dati relativi ai campioni di respiro campionati sia al *baseline* che dopo 20 minuti (4 campioni per ogni soggetto) hanno generato un *dataset* di 19.896 *feature* per 180 campioni, che è stato sottoposto in fase di *pre-processing* a controlli di qualità, normalizzazione e filtrazione dei dati. Il *dataset* finale contiene 2.332 *feature* per 168 campioni.

L'analisi supervisionata ha evidenzia-

to 32 e 184 *feature* che discriminano il respiro dei 2 gruppi al *baseline* e al secondo prelievo, rispettivamente. Sono state identificate 5 *feature* maggiormente significative rilevate al *baseline* ancora da caratterizzare. Si evidenzia che le differenze sono state rilevate fra soggetti non fumatori e fumatori ma in astensione da fumo da almeno due ore. Queste *feature* potrebbero quindi essere ricondotte al consumo cronico di tabacco.

Dall'analisi dell'esalato raccolto subito dopo il consumo di tabacco emergono, invece, alcune *feature* caratteristiche dei soli fumatori. Siamo quindi anche in grado di rilevare segnali derivanti dall'uso diretto e immediato della sigaretta.

Conclusioni e futuri risvolti clinici

Nella prima fase del presente studio abbiamo confermato i risultati attesi

- a clear relationship between daily cigarette consumption and CO values. In 4 subjects we found an altered spirometry (obstructive syndrome) and therefore they were sent to the pulmonologist for investigations. All four altered spirometries (value 1) were associated with smokers of ≥ 20 cigarettes / day (Fig. 1 b);
- FeNO values divided between smokers and non-smokers confirm that this inflammatory indicator is lower in smokers. This consideration was already known in the literature, even if with a mechanism still not fully understood [9] (Fig. 1 c);
- no correlations are observed between cig / day number and FeNO values (Fig. 1 d).

Breath analysis

The data relating to the breath samples sampled both at baseline and after 20 minutes (4 samples for each

subject) generated a dataset of 19,896 features for 180 samples that were subjected in the pre-processing phase to quality controls, normalization and data filtration. The final dataset contains 2,332 features for 168 samples. The supervised analysis highlighted 32 and 184 features that discriminate the breathing of the 2 groups at the baseline and the second sampling, respectively. Five most significant features were identified at the baseline yet to be characterized. It should be noted that the differences were found between non-smokers and smokers who had been abstaining from smoking for at least two hours. These features could therefore be traced back to chronic tobacco use. On the other hand, some features characteristics of smokers only emerge from the analysis of the exhalation collected immediately after tobacco consumption. We are therefore also able to detect signals deriving from the direct and immediate use of the cigarette.

Conclusions and future clinical implications

In the first phase of the present study we confirmed the expected results measured in terms of CO (correlation with the cigarettes consumed) and FeNO (lower in smokers). As for the second phase, by comparing the breath prints of smokers and non-smokers obtained through breath analysis, we detected molecular differences and identified features significantly related to chronic tobacco use and direct and immediate exposure to cigarette smoke. We can therefore say that we have identified a molecular signature closely related to tobacco smoke, which will have to be characterized in subsequent studies.

This pilot study opens up to numerous design scenarios, with important clinical implications:

- follow-up and sampling of the 22 smokers, whether they have quit smoking (to date, 2 subjects maintain their abstention after being

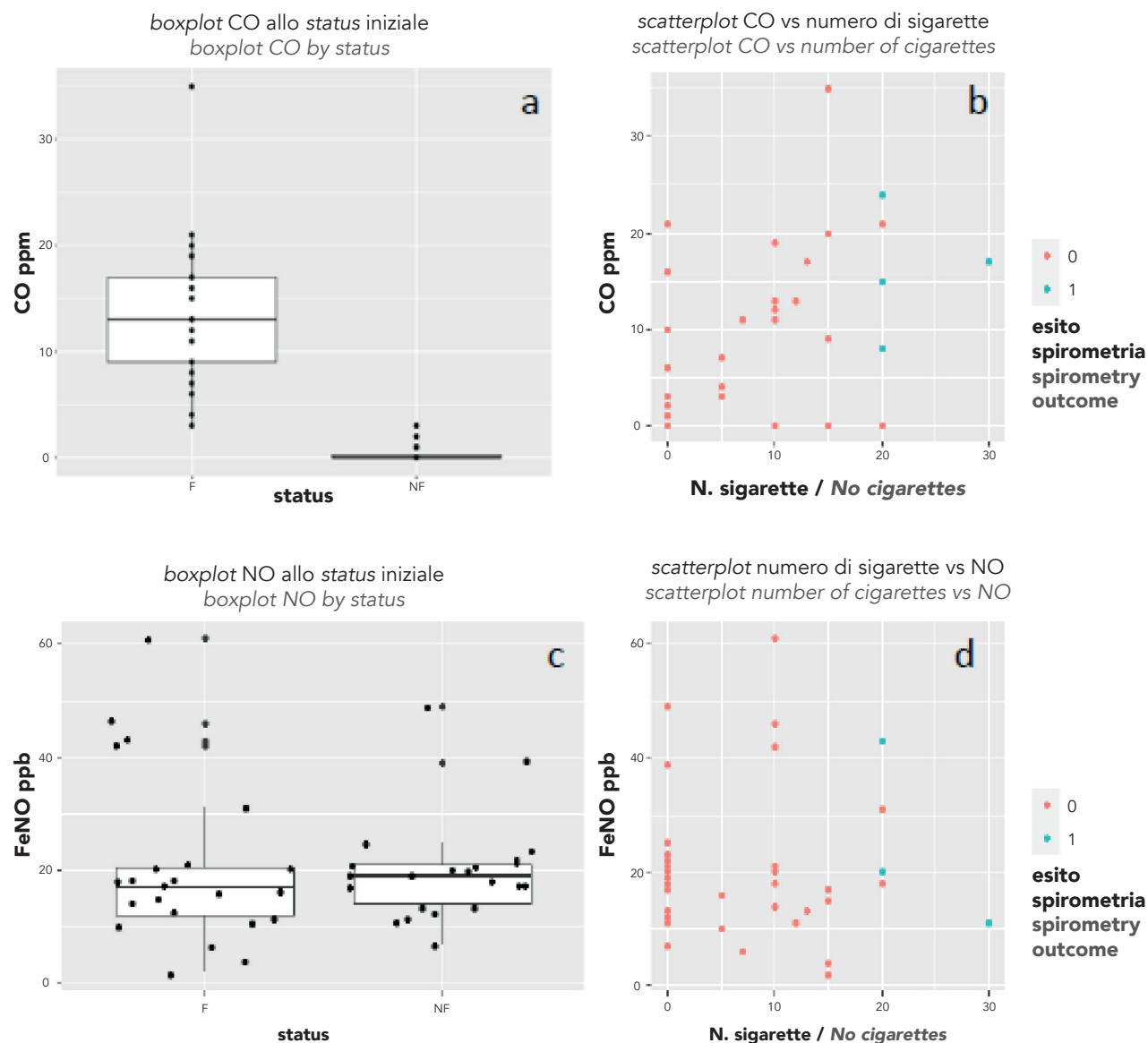


Figura 1 Valori misurati di CO e FeNO ed esito dell'esame spirometrico dei soggetti.

Figure 1 Measured values of CO and FeNO and the outcome of the subjects' spirometry.

- sent to our Anti-Smoking Center) or have continued to smoke, to evaluate the performance of the features considered to be characteristic;
- validation of the signature through a study with a larger sample size for the characterization of the VOCs present in the exhaled and their contextualization in human metabolic pathways related to tobacco consumption, in order to obtain a

- greater understanding of the inflammatory and biochemical mechanisms underlying the damage from smoke, not yet fully clarified;
- the existence of a smoking-associated profile will make it possible to set up larger studies including smokers with inflammatory diseases at different stages, which will therefore make it possible to associate this profile with smoke-related inflammatory diseases in the

perspective of an early, reproducible, sustainable diagnosis and completely non-invasive;

- Finally, the information obtained from this study will make it possible to identify the presence of smoke-related confounders in clinical studies involving the search for biomarkers associated with cancer in breath.

misurati in termini di CO esalato (correlazione con le sigarette consumate) e FeNO (minore nei soggetti fumatori). Per quanto riguarda la seconda fase, confrontando i *breath print* di soggetti fumatori e non fumatori ottenuti mediante analisi del respiro, abbiamo rilevato differenze molecolari e identificato *feature* significativamente correlate al consumo cronico di tabacco e all'esposizione diretta e immediata al fumo di sigaretta. Possiamo quindi affermare di aver identificato una *signature* molecolare strettamente correlata al fumo di tabacco, che dovrà essere caratterizzata in studi successivi.

Questo studio pilota apre a numerosi scenari progettuali, con importanti risvolti clinici:

- *follow-up* e ricampionamento dei 22 soggetti fumatori, sia che abbiano smesso di fumare (a oggi 2 soggetti mantengono l'astensione dopo l'invio al nostro Centro Antifumo) sia che abbiano continuato a fumare, per valutare l'andamento delle *feature* ritenute caratterizzanti;
- validazione della *signature* mediante uno studio con maggior dimensione campionaria per la caratterizzazione dei VOC presenti nell'esalato e la loro contestualizzazione in *pathway* metabolici umani relativi al consumo di tabacco, al fine di ottenere una maggior comprensione dei meccanismi infiammatori e biochimici alla base dei danni da fumo, non ancora del tutto chiariti;
- l'esistenza di un profilo fumo-associato permetterà di allestire studi di maggiori dimensioni comprendenti soggetti fumatori con malattie infiammatorie a stadi diversi, che consentiranno quindi di associare questo profilo alle patologie infiammatorie fumo-correlate nella prospettiva di una diagnosi precoce, ripro-

ducibile, sostenibile e completamente non invasiva;

- da ultimo, le informazioni ricavate da questo studio permetteranno di individuare la presenza di confondenti fumo-correlati negli studi clinici che prevedono la ricerca nell'esalato di biomarcatori associati al tumore.

[*Tabaccologia* 2022; XX(1):19-25]
<https://doi.org/10.53127/tblg-2022-A005>

Chiara Veronese

Roberto Boffi

S.S.D. Pneumologia, Fondazione IRCCS
Istituto Nazionale dei Tumori di Milano

Francesco Segrado

Riccardo Caldarella

Rosaria Orlandi

S.S.D. Bersagli Molecolari,
Fondazione IRCCS Istituto Nazionale
dei Tumori di Milano

Corresponding author:

Chiara Veronese

S.S.D. Pneumologia, Fondazione IRCCS
Istituto Nazionale dei Tumori di Milano
✉ chiara.veronese@istitutotumori.mi.it

► **Disclosure:** gli autori dichiarano l'assenza di conflitto d'interessi.

► **Fondi e finanziamento:** nessuno.

Bibliografia

1. Melillo E, Melillo G. Fumo di tabacco e stress ossidativo respiratorio. *Tabaccologia* 2004;II(1):15-9.
2. Ibrahim W, Carr L, Cordell R, Wilde MJ, Salman D, Monks PS, et al. Breathomics for the clinician: the use of volatile organic compounds in respiratory diseases. *Thorax* 2021;76:514-21. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-215667>
3. Arterbery VE, Pryor WA, Sehnert SS, Foster WM, Abrams RA, Williams JR, et al. Breath ethane generation during clinical total body irradiation as a marker of oxygen-free-radical-mediated lipid peroxidation: a case study. *Free Radic Biol Med* 1994;17:569-76. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90096-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90096-5)
4. Martinez-Lozano Sinues P, Meier L, Berchtold C, Ivanov M, Sievi N, Camen G, et al. Breath analysis in real time by mass

spectrometry in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 2014;87:301-10. <https://doi.org/10.1159/000357785>

5. Gaugg MT, Nussbaumer-Ochsner Y, Bregy L, Engler A, Stebler N, Gaisl T, et al. Real-time breath analysis reveals specific metabolic signatures of COPD exacerbations. *Chest* 2019;156:269-76. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.12.023>

6. Fens N, de Nijs SB, Peters S, Dekker T, Knobel HH, Vink TJ, et al. Exhale air molecular profiling in relation to inflammatory subtype and activity in COPD. *Eur Respir J* 2011;38:1301-9. <https://doi.org/10.1183/09031936.00032911>

7. Martinez-Lozano Sinues P, Landoni E, Miceli R, Dibari VF, Dugo M, Agresti R, et al. Secondary electrospray ionization-mass spectrometry and a novel statistical bioinformatic approach identifies a cancer-related profile in exhaled breath of breast cancer patients: a pilot study. *J Breath Res* 2015;9:031001. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/9/3/031001>

8. Pluska T, Castillo S, Villar-Briones A, Oresic M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 2010;11:395. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>

9. Högman M, Janson C, Lisspers K, Bröms K, Ställberg B, Malinovsk A. Determinants of FENO in COPD with regard to current smoking. *Eur Respir J* 2018;52:PA2019. <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2018.PA2019>



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>