

ODDECH CODZIENNY

DAILY BREATH

**Tomasz Ligor^{1,2*}, Joanna Rudnicka^{1,2}, Ileana
Andreea Ratiu^{1,2}, Fernanda Monedeiro², Maciej
Monedeiro-Milanowski², Bogusław Buszewski^{1,2}**

¹*Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.,
ul. Gagarina 7, 87–100 Toruń*


²*Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,
ul. Wileńska 4, 87–100 Toruń*

**e-mail: tligor@umk.pl*

Abstract
Wprowadzenie
1. Skład oddechu
2. Węglowodory
3. Ketony
4. Alkohole
5. Aldehydy
6. Lotne związki siarki
7. Lotne związki organiczne zawierające azot
8. Potencjalne wykorzystanie analiz oddechu do celów medycznych
Uwagi końcowe
Podziękowania
Piśmiennictwo cytowane


Dr hab. Tomasz Ligor, prof. UMK, jest pracownikiem w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky UMK w Toruniu. Zajmuje się problematyką badawczą związaną z chemią analityczną. Głównym obszarem zainteresowań jest chromatografia gazowa i spektrometria mas, lotne związki organiczne, wolatolomika oraz metody przygotowania próbek biologicznych.



 <https://orcid.org/0000-0001-5707-982X>


Dr Joanna Rudnicka w roku 2009 ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W roku 2016 uzyskała stopień doktora nauk chemicznych na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. Obecnie jest zatrudniona na Wydziale Chemii oraz w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu. Specjalność - chromatografia gazowa - spektrometria mas (GC/MS), lotne związki organiczne, biomarkery.



 <https://orcid.org/0000-0001-5550-4001>


Dr Ileana Andreea Rațiu studiowała na Uniwersytecie Babeș-Bolyai w Cluj-Napoca w Rumunii zdobywając tytuł doktora fizyki w 2012 r. Na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu zajmowała się badaniem lotnych markerów bakteryjnych oraz chorób układu oddechowego, nerek i nowotworów. Główne zainteresowania naukowe związane są z detekcją lotnych związków organicznych oraz izolowaniem substancji aktywnych z roślin. W swoich badaniach wykorzystuje spektrometrię mas i spektrometrię ruchliwości jonów.



 <https://orcid.org/0000-0003-2615-684X>


Dr Fernanda Monedeiro w roku 2018 uzyskała stopień doktora nauk chemicznych w Katedrze Chemii Uniwersytetu w Sao Paulo, Brazylia. Obecnie jest zatrudniona w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu. Zainteresowania naukowe związane są z chromatografią gazową i spektrometrią mas (GC/MS), toksykologią, chemią sądową, metaboliką i bioinformatyką.



 <https://orcid.org/0000-0002-8619-5990>


Dr Maciej Monedeiro - Milanowski ukończył studia na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy w roku 2010 oraz uzyskał stopień doktora nauk chemicznych na Wydziale Chemii UMK w Toruniu (2019). Obecnie jest zatrudniony w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu. Specjalizuje się w wykorzystaniu chromatografii gazowej i spektrometrii mas (GC/MS) do oznaczania lotnych związków organicznych o charakterze biomarkerów oraz w badaniach mikrobiologicznych.



 <https://orcid.org/0000-0003-3713-4099>

Prof. zw. dr hab. dr h.c. Bogusław Buszewski, czł. koresp. PAN w roku 1982 ukończył studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Skłodowskiej-Curie w Lublinie. W 1986 r. uzyskał stopień doktora nauk na Słowackim Uniwersytecie Technicznym w Bratysławie, w 1992 r. obronił pracę habilitacyjną, a w 1999 r. uzyskał tytuł profesora nauk chemicznych. Odbył liczne staże naukowe w prestiżowych ośrodkach naukowych. Jest kierownikiem Katedry Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, a także Przewodniczącym Komitetu Chemii Analitycznej PAN, członkiem PAN i EASA. Specjalności – chemia środowiska, fizykochemia powierzchni, chemia analityczna, chromatografia, spektroskopia i inne metody separacyjne (HPLC, GC, CZE), adsorpcja, przygotowanie próbek.



 <https://orcid.org/0000-0002-5482-7500>

ABSTRACT

The odor of human body has facilitated diagnosis for a long time. Sniffing the body, breath, urine and even feces became one of the useful methods in ancient medicine. For centuries, the sweet smell of the breath was associated with diabetes, the fishy smell was associated with liver disease, measles was associated with the smell of feathers, typhoid with the smell of fresh bread, and tuberculosis with stale beer. Hippocrates also linked the smell of the human body and disease, claiming that the smell of a sick person is different from that of a healthy one. He classified the characteristic odors of the body into sweet, musty, fishy and rotten. The father of chemical analysis of breath was Antoine Lavoisier, who found that carbon dioxide is exhaled by guinea pigs. The pioneer of modern breath analysis was Linus Pauling, who in 1971 presented the results of breath studies using gas chromatography (GC), showing the presence of over 200 substances. Exhaled air containing approximately 78% N₂, 17% O₂, 3% CO₂ and up to 6% water vapor. The exact concentrations of individual inorganic gases depend on many factors, mainly physical exercise, cardiac output, and lung ventilation. A mixture of many volatile organic compounds is a much smaller group of substances at concentrations 100 ppm. The substances in the breath can come from human metabolism and enter into the body by inhaled air and food. Volatile organic compounds present in the breath that can be divided into different chemical classes e.g. saturated hydrocarbons (ethane, pentane, aldehydes), unsaturated hydrocarbons (isoprene), ketones (acetone), sulfur-containing compounds (methyl mercaptan, dimethyl sulfide, dimethyl disulphide, carbon disulphide, carbonyl sulphide) and containing nitrogen (amines). Endogenous substances in the breath can be used to track physiological and pathological processes in the body. Chemical analysis of the breath can provide information regarding biochemical processes in the organism and human health. Compared to many medical diagnostic methods, it is painless, non-invasive and safe. Nowadays, the main purpose of breath analysis is to identify volatile organic compounds that can be used as markers of various diseases. Research focused on detection of lung cancer based on specific volatile organic compounds in the exhaled air is carried out in many laboratories. Rapid and non-invasive methods for early detection of lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease is crucial for early diagnosis. This mini review presents background of breath, briefly describes main volatiles, their biochemical origin as well as potential application of exhaled gases analysis.

Keywords: breath analysis, volatile organic compounds, biomarkers, gas chromatography/mass spectrometry

Słowa kluczowe: analiza wydychanego powietrza, lotne związki organiczne, biomarkery, chromatografia gazowa/spektrometria mas

WPROWADZENIE

Już od starożytności zapach wydzielany przez chorych ułatwiał stawianie diagnozy. Wąchanie ciała, oddechu, moczu, a nawet kału stało się jedną z użytecznych metod w dawnej medycynie. Chińscy medycy uważali że choroba powoduje zmianę naturalnej równowagi w organizmie i doprowadza do specyficznego zapachu ciała ludzkiego oraz jego wydzielin. Przez wieki słodki zapach oddechu był związany z cukrzycą, rybi zapach kojarzono z chorobami wątroby, odra była kojarzona z zapachem ptasich piór, dur brzuszny z wonią świeżego chleba, a gruźlica ze zleżałym piwem. Hipokrates również łączył woń ciała ludzkiego i choroby, twierdząc że zapach chorego człowieka jest inny od zapachu zdrowej osoby. Klasyfikował charakterystyczne zapachy ciała jako słodki, stęchły, rybi lub zgniły. Ojcem chemicznej analizy oddechu był Antoine Lavoisier, który stwierdził, że dwutlenek węgla jest wydychany przez świnki morskie. Gaz ten miał powstawać w procesie spalania. W 1857 r. Wilhelm Petters odkrył obecność acetonu w moczu u pacjentów z cukrzycą. W 1897 r. Nebelthau oznaczył w ludzkim oddechu aceton podczas długotrwałego głodu. Inne związki odkryte w ludzkim oddechu to m.in. amoniak i etanol. Pionierem nowoczesnej analizy oddechu był Linus Pauling, który w 1971 r przedstawił wyniki badań oddechu za pomocą chromatografii gazowej (GC) wykazując obecność ponad 200 substancji. Odkrycie to zapoczątkowało badania substancji lotnych w oddechu.

1. SKŁAD ODDECHU

Powietrze wydychane przez człowieka zawiera ok. 78% N₂, 17% O₂, 3 % CO₂ i do 6 % pary wodnej [1]. Dokładne stężenia poszczególnych gazów nieorganicznych zależą od wielu czynników, głównie od wysiłku fizycznego, pojemności minutowej serca i wentylacji płuc. Znacznie mniejszą ilościowo grupę substancji (ok. 100 ppm) stanowi mieszanina wielu lotnych substancji organicznych. Obecnie wykryto ponad tysiąc lotnych związków organicznych. Substancje znajdujące się w oddechu mogą pochodzić z metabolizmu komórkowego oraz dostawać się do organizmu wraz z wdychanym powietrzem oraz pokarmem. W Tab. 1 przedstawiono główne substancje obecne w wydychanym powietrzu.

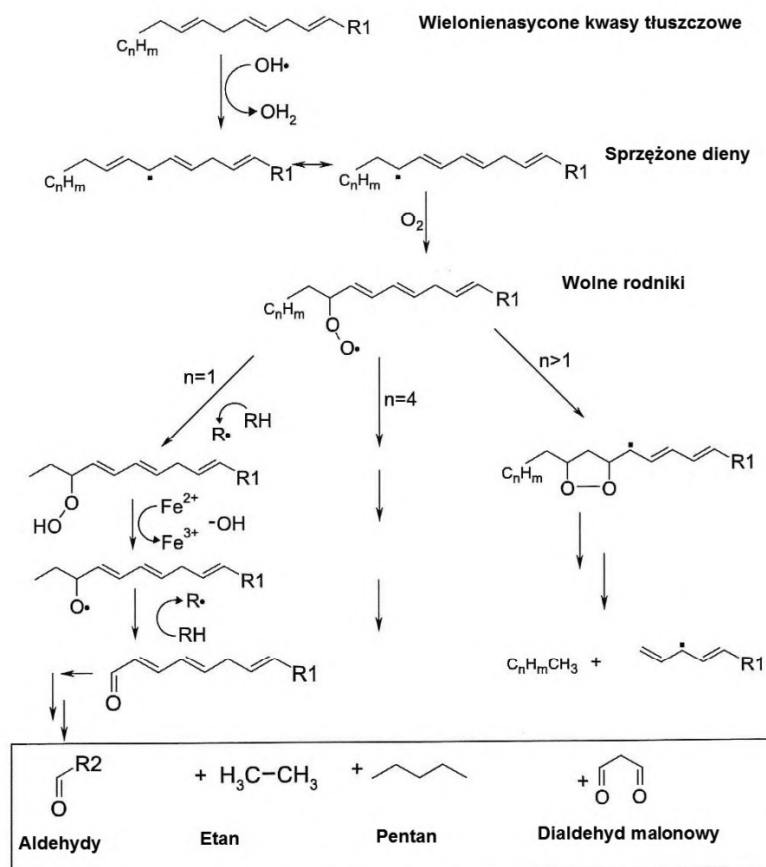
Tabela 1. Substancje zidentyfikowane w oddechu [2]

Table 1. Compounds identified in breath [2]

Substancja	Przybliżony poziom stężenia
Azot, tlen, dwutlenek węgla, para wodna, argon	[%]
Aceton, metan, wodór	Zakres ppm
Izopren, heksan, etan, pentan, etanol, tlenki azotu, amoniak, metyloamina, siarczek dimetylu, aldehyd octowy	Zakres ppb

2. WĘGLOWODORY

Węglowodory alifatyczne znajdujące się w wydychanym powietrzu pochodzą głównie z utleniania kwasów tłuszczowych. W warunkach fizjologicznych istnieje równowaga pomiędzy tworzeniem oraz neutralizacją wolnych rodników. Reaktywne formy tlenu (RFT) powstające w komórkach mogą doprowadzać do utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z wytworzeniem prostych alkanów (etan, pentan). Reakcje mogą zachodzić w błonach komórkowych lub mitochondriach, a w rezultacie tworzone alkany są uwalniane do krwi i trafiają do płuc gdzie są uwalniane do oddechu. Na Rys. 1 przedstawiono powstawanie produktów metabolizmu kwasów tłuszczowych.



Rysunek 1. Utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [2]

Figure 1. Oxidation of polyunsaturated fatty acids [2]

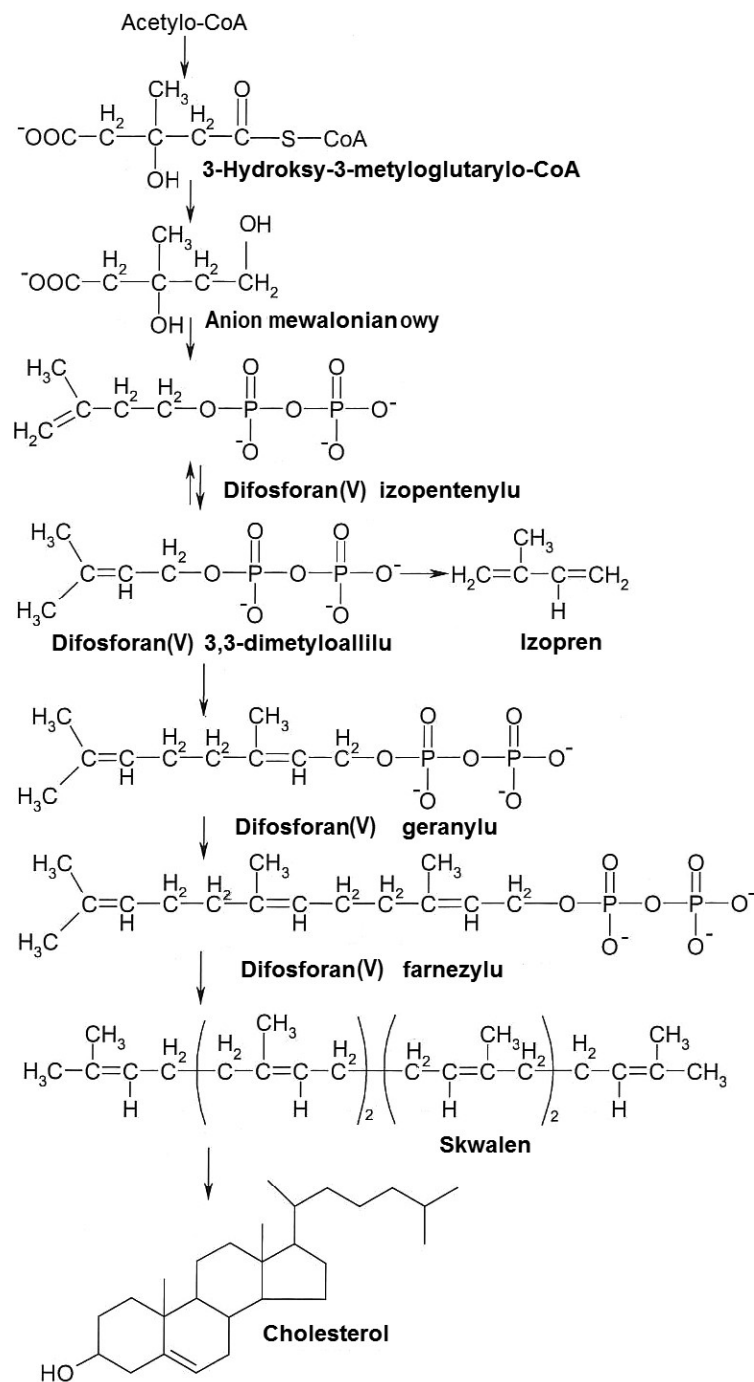
Zatem, głównym źródłem etanu i pentanu w oddechu jest metabolizm kwasów tłuszczowych omega-3 i omega-6. Podwyższone stężenia etanu i pentanu mogą być związane z zaburzeniami komórkowymi procesów oksydacyjno-redukcyjnych. Przyczyną mogą być stres oksydacyjny, zaburzenia metaboliczne, uszkodzeniem komórek. Podwyższony poziom obu węglowodorów koreluje również z innymi wskaźnikami utleniania lipidów, np. dialdehydem malonowym (MDA). Etan i pentan są lipofilne, szybko przenikają do pęcherzyków płucnych, co pozwala wykorzystywać je do monitorowania stresu oksydacyjnego.

Inne węglowodory nasycone, np. C3-C11 mogą również powstawać w rezultacie procesu peroksydacji lipidów. Jak dotąd nie opisano mechanizmu biosyntezy rozgałęzionych węglowodorów w organizmie człowieka. Biosynteza tych substancji w wyniku utleniania kwasów tłuszczowych jest wątpliwa, ze względu na konieczność zapewnienia substratów - odpowiednich wielonienasyconych kwasów tłuszczowych o rozgałęzionym łańcuchu [3]. Alkany takie jak propan czy butan mogą zostać wytworzone w wyniku utleniania protein lub pochodzić z flory jelitowej [4]. Metan obecny w wydychanym powietrzu jest wyłącznie rezultatem metabolizmu bakterii w jelitach.

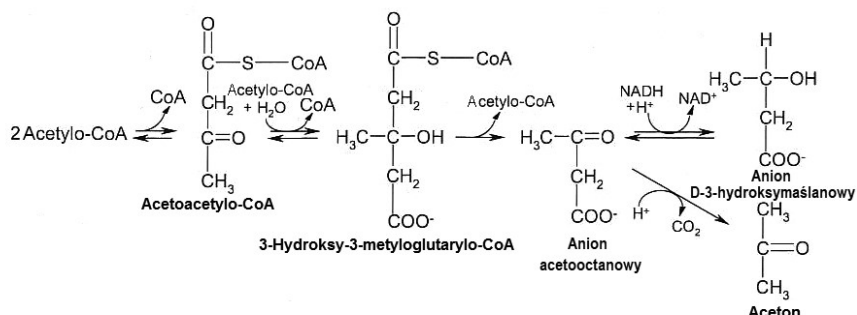
Jednym z głównych lotnych metabolitów powstających w organizmie człowieka jest izopren (2-metylo-1,3-butadien). Substancja ta powstaje jako fizjologiczny produkt uboczny podczas biosyntezy cholesterolu (Rys. 2). Izopren jest zawsze obecny w ludzkim oddechu, a jego stężenia zmienia się nawet przy najmniejszym wysiłku fizycznym oraz zależnie od wieku i płci [5].

3. KETONY

Aceton, podobnie jak izopren, to główny metabolit w ludzkim oddechu. Powstawanie acetonu związane jest z metabolizmem glukozy i procesem lipolizy. Związek ten jest produkowany przez hepatocyty w wyniku dekarboksylacji acetylooctanu (Rys. 3). Podwyższony poziom acetonu i ciał ketonowych (głównie acetooctanu i 3-hydroksymaślanu) we krwi i moczu może pojawiać się u osób z cukrzycą oraz podczas głodówki i w trakcie diety niskowęglowodanowej. Substancje ketonowe są produkowane przez organizm wówczas, gdy do wytworzenia energii zużywane są tłuszcze zamiast glukozy. Z tego powodu acetylo-CoA nie może wejść w cykl kwasów trikarboksylowych ze względu na brak szczawiooctanu, który jest wykorzystywany do syntezy glukozy w szlaku glikoneogenezy. Ciała ketonowe powstają także w wyniku metabolizmu aminokwasów [3].



Rysunek 2. Biosynteza cholesterolu [2]
 Figure 2. Biosynthesis of cholesterol [2]



Rysunek 3. Biosynteza acetonu [2]

Figure 3. Biosynthesis of acetone [2]

4. ALKOHOLE

Obecność alkoholu w oddechu w większości przypadków pochodzi z produktów żywnościowych oraz napojów alkoholowych. Alkohole mogą również pochodzić z metabolizmu węglowodorów. Źródłem obecności śladowych stężeń metanolu i etanolu w wydychanym powietrzu jest flora bakteryjna jelit i jamy ustnej. Natomiast 2-propanol przypuszczalnie powstaje jako produkt enzymatycznej redukcji acetonu [3].

5. ALDEHYDY

Aldehydy są wytwarzane często podczas procesów fizjologicznych. Krótke łańcuchowe aldehydy uważane za substancje cytotoksyczne. Istnieje kilka źródeł obecności aldehydów w organizmie. Głównym źródłem aldehydów jest metabolizm alkoholi. Aldehyd octowy powstaje podczas metabolizmu etanolu pod wpływem dehydrogenazy alkoholowej. W identyczny sposób powstaje formaldehyd po spożyciu alkoholu metylowego. Aldehydy ulegają utlenieniu przez dehydrogenazę aldehydową (ALDH) do kwasów karboksylowych. Inną drogą powstawania aldehydów jest metabolizm z udziałem cytochromu P450. Wodoronadtlenki powstające z oksydacji lipidów ulegają stopniowej redukcji jednoelektronowej. W pierwszym etapie powstaje rodnik alkoksylowy, który następnie ulega reakcji z wytworzeniem ketonu lub aldehydu. Cytochrom P450 może być również odpowiedzialny za tworzenie aldehydów w procesach metabolizmu substancji egzogennych w procesach detoksykacji. Aldehydy mogą dostawać się do organizmu wraz z dymem tytoniowym (formaldehyd, etanal, propanal, butanal, akroleina, aldehyd krotonowy). Przypuszcza się, że cukry są głównym źródłem

formaldehydu w dymie papierosowym, natomiast celuloza może być prekursorem aldehydu octowego w głównym strumieniu dymu papierosowego [4].

6. LOTNE ZWIĄZKI SIARKI

Do tej grupy związków można zaliczyć siarczek dimetylu, disiarczek dimetylu, merkaptan metylu i etylu. Substancje te są głównie odpowiedzialne za charakterystyczną woń oddechu u osób z halitozą. Lotne związki siarki są produkowane przez niektóre bakterie zasiedlające jamę ustną co prowadzi do objawów halitozy. Obecność podwyższonych stężeń siarczku dimetylu, disiarczek dimetylu, merkaptan metylu i siarczku karbonylu obserwuje się u chorych z marskością wątroby. Związki te powstają w wątrobie w wyniku niepełnego metabolizmu metioniny w szlaku transaminacji [3,6]. Merkaptany łatwo utleniają się do odpowiednich siarczków. U zdrowych osób stężenie związków zawierających siarkę we krwi oraz w powietrzu wydychanym występuje na niskim poziomie, natomiast zaburzenia czynności wątroby powodują wzrost ich poziomu oraz specyficzny zapach.

7. LOTNE ZWIĄZKI ORGANICZNE ZAWIERAJĄCE AZOT

Proste aminy alifatyczne (metyloamina, dimetyloamina i trimetyloamina) są odpowiedzialne za charakterystyczny zapach oddechu u pacjentów z niewydolnością nerek o różnym stopniu. Substancje te także mogą być zidentyfikowane w powietrzu wydychanym u osób z chorobami nerek oraz mocznicą [3].

8. POTENCJALNE WYKORZYSTANIE ANALIZ ODDECHU DO CELÓW MEDYCZNYCH

Wydychane powietrze zawiera lotne produkty metabolizmu pochodzące z krwi, które trafiają do płuc i są wydychane z powietrzem. W oddechu obecne są również substancje egzogenne wnikające do organizmu z otoczenia wraz z powietrzem i pokarmem. Substancje endogenne w oddechu są produktami procesów biochemicznych zachodzących w komórkach. Mogą zostać wykorzystane do śledzenia procesów fizjologicznych i patologicznych zachodzących w organizmie.

Ze względu na fakt, że anality występują na śladowym poziomie stężeń ppm-pt (part per million, part per trillion 10^{-6} , 10^{-9}), konieczne jest zastosowanie odpowiednich technik analitycznych oraz metod przygotowania próbek. Obecnie większość grup badawczych stosuje przede wszystkim chromatografię gazową

sprzężoną ze spektrometrią mas (GC/MS) [7], ze względu potencjał identyfikacyjny tej techniki. Jednakże, coraz częściej wykorzystuje się spektrometrię mas w połączeniu z innymi metodami jonizacji, np. z jonizacją w strumieniu wybranych jonów (SIFT-MS) [8], spektrometrię mas z reakcją przeniesienia protonu (PTR-MS) [9] oraz różnego rodzaju sensory [10, 11].

Chemiczna analiza oddechu może dostarczyć wielu informacji o procesach biochemicznych zachodzących w żywym organizmie i stanie zdrowia człowieka. W porównaniu do wielu metod diagnostyki medycznej jest bezbolesna, nieinwazyjna i bezpieczna. Głównym celem analizy oddechu jest zidentyfikowanie lotnych związków organicznych które mogą być użyte jako markery różnych chorób. Większość prowadzonych badań dotyczy wykrywania chorób płuc [12]. Próby wykrywania nowotworów płuc w oparciu o specyficzne lotne związki organiczne obecne w powietrzu wydychanym są prowadzone w wielu ośrodkach [13-16]. Szybkie i nieinwazyjne metody mają szczególne znaczenie do opracowania wczesnego, przesiewowego testu do wykrywania nowotworów płuc. Próbuje się również wykorzystać badania oddechu do wykrywania przewlekłej obturacyjnej choroby płuc [17-19] astmy [20, 21], a także nowotworów piersi [22]. Przegląd literatury dotyczący wykorzystania lotnych związków organicznych jako potencjalnych biomarkerów nowotworów płuc, astmy i przewlekłej obturacyjnej choroby płuc przedstawiono w pracy Ratiu [23].

UWAGI KOŃCOWE

Rozwój współczesnych technik analitycznych, opartych głównie na spektrometrii mas i chromatografii gazowej, pozwolił na określenie składu powietrza wydychanego. W oddechu zidentyfikowano proste gazy nieorganiczne, które pełnią funkcję ważne funkcje fizjologiczne - tlenek węgla oraz tlenki azotu. Substancje te powstają w komórkach układu oddechowego, a w latach 60. XX wieku uważane były za silnie toksyczne dla żywych organizmów. Oddzieloną gałąź badań stanowi kondensat powietrza wydychanego, w którym zidentyfikowano wiele substancji nielotnych - leukotrieny, cytokiny, izoprostany, aminokwasy, oligopeptydy, nitrowane aminokwasy, nadtlenuk wodoru, itp. [24].

O ile pobieranie powietrza wydychanego jest łatwe i nieinwazyjne to oznaczanie analitów w próbce oddechu stanowi poważne wyzwanie. Związane jest to z transportem, przechowywaniem próbek oddechu oraz ekstrakcją lotnych substancji, wzbogacaniem i analizą instrumentalną. Techniki chromatograficzne pozwalają na rozdzielanie poszczególnych składników próbki ale jest to proces czasochłonny, który wymaga dodatkowo etapu wzbogacania próbki. Rozwój technik PTR - MS, SIFT - MS oraz sensorów pozwala na analizy próbek oddechu w czasie rzeczywistym. Zaintereso-

wanie wykorzystaniem analiz oddechu do celów medycznych wciąż nie słabnie. Niestety obecne zastosowanie testów oddechowych w medycynie jest bardzo ograniczone. Do najczęściej wykorzystywanych należą kapnometria (monitorowanie CO₂ w wydychanym powietrzu) stosowana w anestezjologii, analiza tlenków azotu w astmie oraz diagnostyka zakażeń *Helicobacter pylori* na podstawie ¹³CO₂/¹²CO₂. Jednakże najczęściej wykonywanym testem oddechowym pozostaje nadal oznaczanie etanolu w powietrzu wydychanym wśród kierowców.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują Narodowemu Centrum Badań i Rozwoju za finansowanie badań prowadzonych w ramach projektu pt.: „Analiza porównawcza lotnych biomarkerów organicznych w oddechu i moczu wśród mieszkańców Polski i Turcji do oceny chorób układu oddechowego” (POLTUR2/4/2018).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] T. Ligor, M. Ligor, A. Amann, C. Ager, M. Bachler, A. Dzien, B. Buszewski, J. Breath Res., 2008, **2**, 046006.
- [2] T. Ligor, Analityka wydychanego powietrza z zastosowaniem sprzężonych technik chromatograficznych z przeznaczeniem do badań przesiewowych płuc, Wydawnictwo Naukowe UMK, Toruń, 2011.
- [3] W. Miekisch, J.K. Schubert, G.F.E. Noeldge-Schomburg, Clin. Chim. Acta, 2004, **347**, 25.
- [4] M. Hakim, Y. Y. Broza, O. Barash, N. Peled, M. Phillips, A. Amann, H. Haick, Chem. Rev., 2012, **112**, 5949.
- [5] J. King, H. Koc, K. Unterkofler, P. Mochalski, A. Kupferthaler, G. Teschl, S. Teschl, H. Hinterhuber, A. Amann, J. Theoret. Biol., 2010, **267**, 626.
- [6] B. Buszewski, M. Kęsy, T. Ligor, A. Amann, Biomed. Chromatogr. 2007, **21**, 553.
- [7] C. Prado, P. Martin, J.F. Periago, J. Chromatogr. A, 2003, **1011**, 125.
- [8] P. Spanel, P. Rolfe, B. Rajan, D. Smith, Ann. Occup. Hyg. 1996, **40**, 615.
- [9] C. Warneke, J. Kuczynski, A. Hansel, A. Jordan, W. Vogel, W. Lindinger, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 1996, **154**, 61.
- [10] A. D'Amico, G. Pennazza, M. Santonico, E. Martinelli, C. Roscioni, G. Galluccio, R. Paolesse, C. Di Natale, Lung Cancer, 2010, **68**, 170.
- [11] S.M. Chao, Y.J. Kim, G.S. Heo, S.M. Shin, Sensor Actuator B, 2006, **117**, 50.
- [12] F. Monedeiro, M. Monedeiro-Milanowski, I.A. Ratiu, B. Brozek, T. Ligor, B. Buszewski, Molecules, 2021, **26**, 1789.
- [13] M. Phillips, K. Gleeson, J. M. B. Hughes, J. Greenberg, R. N. Cataneo, L. Baker, W. P. McVay, Lancet., 1999, **353**, 1930.
- [14] D. Poli, P. Carbognani, M. Corradi, M. Goldoni, O. Acampa, B. Balbi, L. Bianchi, M. Rusca, A. Mutti, Respiratory Research, 2005, **6**, 71.
- [15] M. Ligor, T. Ligor, A. Bajtarevic, C. Ager, M. Pienz, M. Klieber, H. Denz, M. Fiegl, W. Hilbe, W. Weiss, P. Lukas, H. Jamnig, M. Hackl, B. Buszewski, W. Miekisch, J. Schubert, A. Amann, Clin. Chem. Lab. Med., 2009, **47**, 550.
- [16] J. Rudnicka, T. Kowalkowski, T. Ligor, B. Buszewski, J. Chromatogr. B, 2011, **879**, 3360.

- [17] N. Fens, A.H. Zwinderman, M.P. van der Schee, S.B. de Nijs, E. Dijkers, A.C. Roldaan, D. Cheung, E.H. Bel, P.J. Sterk, , *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2009, **180**, 1076.
- [18] C.O. Phillips, Y. Syed, N. Mac Parthalain, R. Zwigelaar, T.C. Claypole, K.E. Lewis, *J. Breath Res.*, 2012, **6**, 036003.
- [19] M. Cazzola, A. Segreti, R. Capuano, A. Bergamini, E. Martinelli, L. Calzetta, P. Rogliani, C. Ciapriani, J. Ora, R. Paolesse, C. Di Natale, A. D'Amico, *COPD Research and Practice*, 2015, **1**, 7.
- [20] B. Ibrahim, M. Basanta, P. Cadden, D. Singh, D. Douce, A. Woodcock, S. J. Fowler, *Thorax*, 2011, **66**, 804.
- [21] A. Smolinska, E.M.M. Klaassen, J.W. Dallinga, K.D.G. van de Kant, Q. Jobsis, E.J.C. Moonen, O.C.P. van Schayck, E. Dompeling, F.J. van Schooten, *Plos One*, 2014, **9**, 95668.
- [22] M. Phillips, R.N. Cataneo, B.A. Ditkoff, P. Fisher, J. Greenberg, R. Gunawardena, C.S. Kwon, O. Tietje, C. Wong, *Breast Cancer Research and Treatment*, 2006, **99**, 19.
- [23] I. A. Ratiu, T. Ligor, V. Bocos-Bintintan, C.A. Mayhew, B. Buszewski, *J. Clin. Med.*, 2021, **10**, 32.
- [24] M. Janicka, P. Kubica, A. Kot-Wasik, J. Kot, J. Namiesnik, *J. Chromatogr. B*, 2012, **893**, 144.

Praca wpłynęła do Redakcji 12 maja 2021 r.