

Astım ve KOAH'ta Ekspiryum Havasında Karbon Monoksit Ölçümünün Önemi

Mesut Bıçak, Metin Özkan, İsmail Yüksekol, Ergün Tozkoparan, Arzu Balkan, Kudret Ekiz, Necmettin Demirci
Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz AD, Ankara

ÖZET

Karbon monoksit (CO) gazı, ekspiryum havasında saptanabilir ve hava yolu inflamasyonunun ya da hava yolu aşırı duyarlılığının bir göstergesi olabilir. Bu gazın akciğer fizyolojisi ve hastalıklarındaki rolü konusunda son yıllarda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. CO'nun hava yollarında endojen olarak sentezlendiği ve inflamatuvar hava yolu hastalıklarında artabileceği tezinden yola çıkarak, astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) olan hastalarda inhale steroid tedavisi öncesi ve tedavinin birinci ayının sonunda ekspire edilen CO (eCO) ölçümleri yaptık. Sigara içen ve içmeyen sağlıklı bireyler kontrol grubu olarak alındı. Sigara içen sağlıklı grupta eCO değerleri tüm gruplara göre yüksekti (eCO ppm; sigara içen sağlıklı, 9.5 ± 2.5 ; sigara içmeyen sağlıklı, 2.1 ± 0.4 ; astım, 5.5 ± 1.2 ; astım atağı, 5.2 ± 0.7 ; KOAH, 5.1 ± 0.8 ; $p < 0.05$). Astımlılarda (akut atak grubu dahil) ve KOAH'lılarda tedavi öncesi değerler sağlıklı sigara içmeyen bireylere göre anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.05$). Bir ay süreyle uygulanan inhale steroid tedavisinden sonra KOAH'lı hastalarda anlamlı değişiklik olmazken (eCO ppm; 5.1 ± 0.8 ve 4.8 ± 0.6 ; $p < 0.277$), astımlı gruplarda anlamlı düşüşler oldu (eCO ppm; astım, 5.5 ± 1.2 ve 2.4 ± 0.5 ; $p < 0.001$ ve astım atağı, 5.2 ± 0.7 ve 2.5 ± 0.4 ; $p < 0.001$). Sonuç olarak, CO'nun astım ve KOAH gibi inflamatuvar hava yolu hastalıklarının tanısında ve tedavisinin izlenmesinde invazif olmayan bir yöntem olarak kullanılabileceği düşünüldü.

Anahtar sözcükler: karbon monoksit, KOAH, astım

Toraks Dergisi, 2003;4(3):231-235

ABSTRACT

Importance of Measuring Exhaled Carbon Monoxide in Asthma and COPD

Carbon monoxide (CO) can be detected in the exhaled breath and has been proposed as a marker of airway inflammation or reactivity. Several studies have been done recently to investigate the role of this gas in lung physiology and diseases.

As it has been hypothesized that CO is produced within the human airways and may increase in the inflammatory airway diseases, we measured exhaled CO (eCO) in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary diseases (COPD) before and after a one-month inhaled steroid therapy. Smoker and non-smoker healthy individuals were taken as control groups. In the healthy smoker group concentration of eCO was higher than the other groups (eCO ppm; healthy smokers, 9.5 ± 2.5 ; healthy non-smokers, 2.1 ± 0.4 ; asthma, 5.5 ± 1.2 ; asthma attack, 5.2 ± 0.7 ; COPD, 5.1 ± 0.8 ; $p < 0.05$). The patients with asthma (including attack group) and COPD had higher eCO levels than the healthy non-smoker group before the corticosteroid therapy ($p < 0.05$). Although there was no significant change in eCO in patients with COPD after a one-month corticosteroid therapy (eCO ppm; 5.1 ± 0.8 and 4.8 ± 0.6 $p < 0.277$), there was a significant decrease in both asthma groups (eCO ppm; asthma 5.5 ± 1.2 and 2.4 ± 0.5 $p < 0.001$ and asthma attack 5.2 ± 0.7 and 2.5 ± 0.4 $p < 0.001$).

In conclusion we suggest that eCO measurements may be used as a noninvasive tool in the diagnosis and the follow-up of therapy in the inflammatory airway diseases such as asthma and COPD.

Key words: carbon monoxide, COPD, asthma

Yazışma adresi: Yard. Doç. Dr. Metin Özkan
GATA Göğüs Hastalıkları AD
06018, Etilik, Ankara
Tel: (0312) 304 4412
Faks: (0312) 304 2010
E-posta: mozkan@gata.edu.tr

GİRİŞ VE AMAÇ

Ekspiryum havasında karbon monoksit (eCO) ölçümü, sigara alışkanlığının saptanması ve karbon monoksit zehirlenmesinde tanı amacıyla kullanılmaktaydı [1,2]. Son yıllar-

da CO'nun endojen olarak sentezlenebilen ve akciğer fizyolojisinde ve hastalıklarında önemli rol oynayan bir gaz olduğu gösterilmiştir [3-7]. CO, hem'in hemoksijenazla (HO), biliverdin ve CO'ya parçalanması sonucu oluşur [3,4]. Hemoksijenazın 2 temel izoformu saptanmıştır. Bunlardan HO-2 devamlı fakat az miktarda sentezlenir. HO-1, diğer adıyla indüklenebilen HO ise pulmoner vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde bulunur. Ağır metaller, inflamatuvar mediyatörler ve düşük dansiteli lipoproteinlerce uyarılma sonucu aşırı miktarda sentezlenir [7,8]. Bu noktadan hareketle astım, KOAH ve bronşektazi gibi hava yolu hastalıklarının tanısında eCO ölçümünün önemi çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [9-12]. Biz de bu çalışmada astımlı ve KOAH'lı hastaların hava yollarında CO sentezinin sağlıklı bireylerden daha fazla olduğunu ve eCO ölçümünün hastalığın tanısında ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanılabileceğini göstermeyi hedefledik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma grupları

Çalışmaya 20 astım (9'u kadın, ortalama yaş, 39±13), 20 stabil KOAH (3'ü kadın, ortalama yaş 66±6) ve 20 astım atağı (12'si kadın, ortalama yaş 38±12) olgusu alındı. Kontrol grubu olarak 20 sağlıklı sigara içmeyen (9'u kadın, ortalama yaş 38±7) ve 20 sağlıklı sigara içen (10'u kadın, ortalama yaş 42±17) birey alındı. Hasta özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

KOAH'lı bütün hastalar sigarayı en az 6 ay önce bırakmış, klinik olarak stabil ve son 8 hafta içinde steroid tedavisi almamış hastalardı.

Hastaların KOAH tanıları Toraks Derneği'nin KOAH Uzlaş Raporu'na göre konuldu [13]. Buna göre kronik öksürük, balgam çıkarma, nefes darlığı ve hışırtılı solunum (wheezing) yakınmalarıyla birlikte solunum fonksiyon testlerinde FEV₁'i beklenenin %80'inden ve FEV₁/FVC'si ise beklenenin %70'inden düşük olan ve reversibilite testi negatif saptanan hastalar KOAH olarak kabul edildi.

Astım grubu sigara kullanmayan, kliniğimize başvurduğunda çeşitli nedenlerle steroid tedavisi almayan ve son 2 hafta içinde astım atağı geçirmemiş hastalar arasından seçildi. Hastaların tanıları, Toraks Derneği'nin Astım Uzlaş Raporu'nda [14] belirtildiği gibi öncelikle öyküyle (aralıklı hışırtılı solunum, öksürük ve göğüste sıkışma hissi yakınmalarının olması veya atopi ya da pozitif deri testi öyküsü) konuldu ve erken reversibilite testiyle desteklendi (Tablo 1). Bu gruptaki hastalar özellikle başvuru sırasında steroid kullanmayan hastalardan seçildiği için FEV₁ değerleri akut atak geçirenlerinkine benzer düzeyde saptandı. Yeterli tedavi almayan ve/veya herhangi bir tetikleyici etkene maruz kalan hastalarda astım semptomlarının kısa süre içinde ortaya çıkması atak olarak kabul edildi [14]. Akut atak geçiren 20 astım hastasının hiçbiri sigara kullanmıyordu ve atak öncesinde durumları stabildi. Hastalar atak öncesinde düzenli tedavi uygulamıyorlardı.

Ekspiryum havasında karbon monoksit ölçümü

Bütün hastalara bazal solunum fonksiyon testleri ve erken reversibilite testi yapıldı. Solunum fonksiyon testleri

Tablo 1. Hasta özellikleri					
	Sağlıklı sigara (-)	Sağlıklı sigara (+)	KOAH	Astım	Astım atağı
Yaş (yıl)	38±7	42±17	66±6*	39±13	38±12
Cinsiyet (K/E)	9/11	10/10	3/17	9/11	12/8
Sigara (paket/yıl)	-	20.4±9.3	-	-	-
Uygulanan tedavi (hasta sayısı)					
İnhale steroid	-	-	-	-	9**
Teofilin	-	-	2	-	-
Beta-2 agonist	-	-	-	3	11
FEV ₁ (% beklenen)	107±13	100±13	53±11*	63±15*	61±9*
Bronkodilatör (2 puf salbutamol) sonrası FEV ₁	-	-	56±10	74±14	73±8

*p<0.05, KOAH'lı hastaların yaş ortalaması diğer gruplara göre daha yüksekti. FEV₁ değerleri KOAH ve iki astım grubunda sağlıklı gruplara göre anlamlı olarak düşüktü. **Bu hastalar düzensiz olarak inhale steroid kullanıyorlardı.

ile aynı gün içinde eCO ölçüldü. Ölçüm için "Portable Bedfond Mini Smokerlyzer" cihazı kullanıldı. Ekshale CO ölçümünde burun bir mandalla kapalı iken derin bir inspirasyon yapıp, 15 saniye kadar nefes tutulduktan sonra bir ağızlık yoluyla cihaz içine ekspirasyon yapıldı. Ekspirasyon hızı cihazın çıkardığı bir sese göre ayarlandı (çok hızlı veya yavaş üflendiğinde bu ses çıkmadığından işlem tekrarlandı). Bir aylık inhale steroid tedavisinden sonra solunum fonksiyon testleri ve eCO değerleri ölçülerek kaydedildi.

İstatistiksel analizler

Sonuçların değerlendirilmesinde "Statistical Package for the Social Sciences Program" (SPSS 10.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanıldı. Gruplar arasında yaş, FEV₁, tedavi öncesi ve sonrası eCO değerlerinin karşılaştırılmasında ANOVA ve post hoc Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Hasta gruplarının FEV₁ değerleri ile tedavi öncesi eCO değerleri arasındaki ilişkinin analizinde ise "Pearson korelasyon" yönteminden yararlandı. Sonuçlar, ortalama±SS (Standart sapma) olarak verildi.

BULGULAR

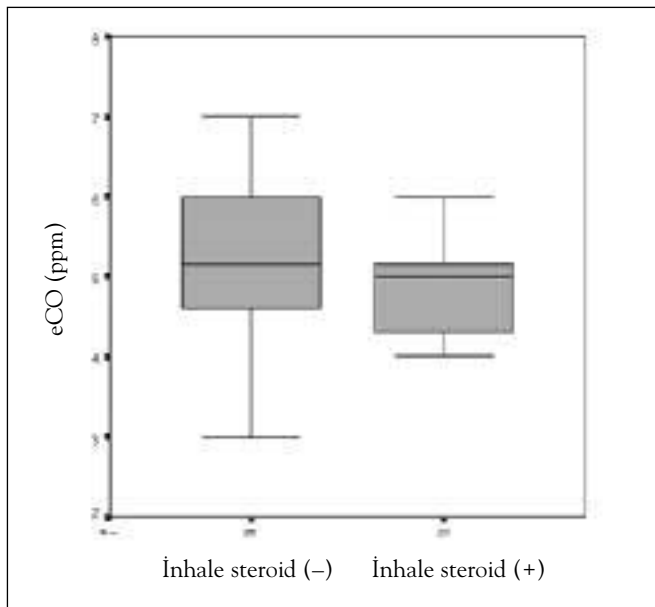
Sigara içen sağlıklı kontrol grubunda eCO değerleri sigara içmeyenlere göre anlamlı derecede yüksek saptandı (eCO ppm; 9.5±2.5, 2.1±0.4, p<0.001). KOAH, astım ve astım atağı çalışma gruplarındaki hastalarda eCO, sigara içmeyen sağlıklı gruba göre daha yüksek bulundu [sırasıyla eCO ppm; 5.1±0.8, 5.5±1.2, 5.2±0.7 ve 2.1±0.4, (p<0.05), (Tablo II)]. Bu üç hastalık grubundaki eCO artışları paraleldi ve aralarında istatistiksel olarak fark yoktu. Sigara içen sağlıklı kontrol grubundaki eCO değerleri; KOAH, astım ve astım atağındaki bütün çalışma grubu hastalarından daha yüksek bulundu [sırasıyla eCO ppm; 9.5±2.5, 5.1±0.8, 5.5±1.2 ve 5.2±0.7 (p<0.05)

Bir aylık inhale steroid (budesonid 0.8 mg/gün) tedavisinden sonra astım ve astım atağındaki hastalarda eCO değerlerinde anlamlı düşüş olurken, KOAH'lı hastalardaki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 1,2,3).

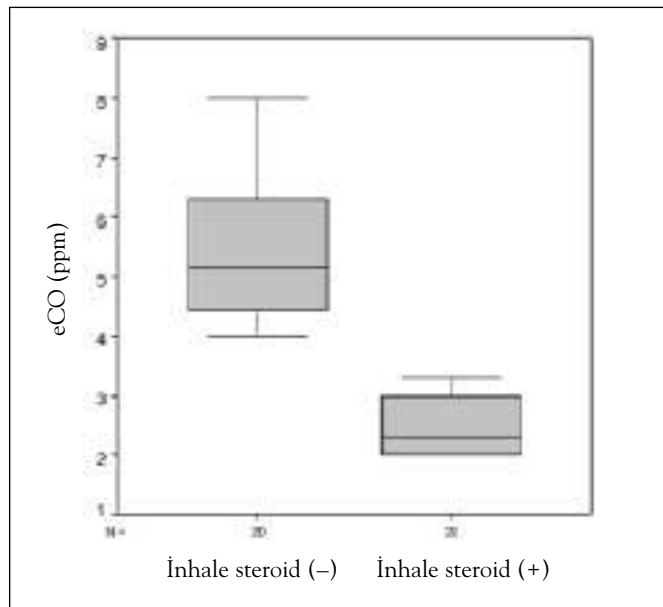
Gerek tedavi öncesinde gerekse tedavi sonrasında eCO ile FEV₁ değerleri arasında negatif bir korelasyon olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı değildi.

	KOAH	Astım	Astım atağı	Kontrol	
				Sigara içmeyen	Sigara içen
Tedavi öncesi eCO	5.1±0.8	5.5±1.2	5.2±0.7	2.1±0.4	9.5±2.5
Tedavi sonrası eCO	4.8±0.6	2.4±0.5	2.5±0.4	-	-

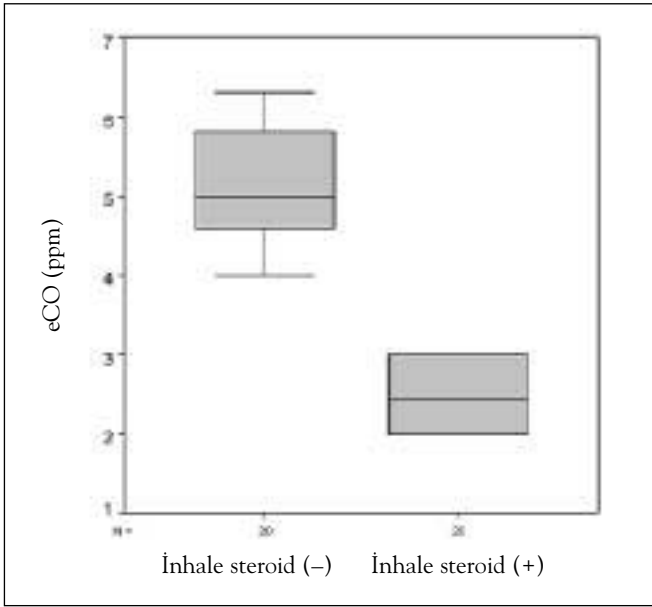
Sigara içen sağlıklı grupta eCO değeri; tüm gruplardan anlamlı derecede yüksekti (p<0.05). Astım ve astım atağı gruplarında tedavi sonrası eCO düşüşü oldukça anlamlı (p<0.001) bulunurken, KOAH grubunda anlamlı değildi (p<0.277).



Şekil 1. KOAH'lı hastalarda tedavi öncesi ve 1 aylık inhale steroid tedavisi sonundaki ortalama eCO değerleri (p<0.277).



Şekil 2. Astımlı hastalarda tedavi öncesi ve 1 aylık inhale steroid tedavisi sonundaki ortalama eCO değerleri (p<0.001).



Şekil 3. Astım atağı olan hastalarda tedavi öncesi ve 1 aylık inhale steroid tedavisi sonundaki ortalama eCO değerleri ($p < 0.001$).

TARTIŞMA

Oksidatif stres ateroskleroz, karsinogenezis ve kronik inflamatuvar hastalıkların (bronşiyal astım, KOAH, romatoid artrit, psöriazis vb.) patogenezinden sorumlu tutulmaktadır [5,15,16]. Oksidatif stresten, süperoksit, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi serbest oksijen radikallerinin immün ve inflamatuvar hücrelerden aşırı salımı sorumludur. Serbest oksijen radikalleri hücre içi protein, nükleik asit, DNA ve membran lipidlerini oksitleyerek hücre hasarına neden olur. İnflamasyona bağlı oluşan serbest radikaller, ekstrasellüler doku komponentleri olan kollajen ve hiyalüronik asidi harap ederek organlarda yapısal değişikliklere neden olurlar [15,16].

Organizmalar bu zararlı oksidanları detoksifiye etmek için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri geliştirirler. Bunlar, katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, ferritin, transferrin, askorbik asit, bilirubin gibi yapılardır. Bunlardan biri de HO'dur. Bu enzim NADPH ve moleküler oksijen kullanarak molekülün karbonuna bağlanarak biliverdin, serbest demir ve CO üretir. Biliverdin daha sonra bilirubine dönüşür [17]. Bilirubin kendi başına antioksidandır. Hücre membran lipidlerinin peroksidasyonunu engeller. CO guanil siklazı aktive ederek nitrik oksit (NO) gibi vazomotor tonusu düzenler [7,18]. Düz kaslarda gevşeme ve damarlarda vazodilatasyon yapar. Ayrıca hatırlama, koklama ve barsak motilitésinin düzenlenmesinde nörotransmitter olarak görev yaptığı düşünülmektedir [9].

Ekzojen CO kaynaklarının başında sigara tüketimi ve CO zehirlenmeleri gelir. Sigara içicilerinde ekshale CO değerleri çok yüksek saptanır [1,9,17]. Endojen CO artışı birçok kronik akciğer hastalığında (bronşiyal astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, bronşektazi, kistik fibrozis) görülür [1,6,9,10-12,17]. Pulmoner vasküler endotel ve alveoler makrofajlarda bulunan HO enzimi, sitokinler, endotoksinler, nitrik oksit, hipoksi ve serbest oksijen radikallerinin uyarılması sonucu artmış CO sentezine neden olur [4,17].

Bu çalışmada steroid kullanmayan astımlı hastalarda eCO düzeyi yüksek saptanmıştır. Gerek sigara içmeyen sağlıklı bireylerde ve gerekse sigara içmeyen astımlı grupta ekspiryum havasında CO saptanması bu gazın endojen olarak sentezlendiğinin bir göstergesidir. Astımlı grupta daha yüksek olması ve steroid tedavisiyle normal düzeylere gerilemesi ise bu yüksekliğin astımdaki hava yolu inflamasyonuna bağlı olduğunu desteklemektedir. Tümör nekroz faktörü, interlökin-6, interlökin-1 gibi astmatik inflamasyondan sorumlu birçok sitokin hayvan ve insan dokularında HO-1 salımından sorumlu bulunmuştur [9,19]. Steroid tedavisi muhtemelen hem sitokinlerin salımını hem de HO-1 aktivitesini inhibe ederek eCO değerlerini düşürmektedir. Aynı durum astım atağı ile gelen hastalarımızda da saptanmış olup, eCO ölçümünün tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanılabilecek çok basit ve invazif olmayan bir yöntem olduğunu düşündürmektedir. Atakla gelen astımlı hastaların dışında, steroid kullanmayan astımlılarda eCO'nun yüksek saptanmasının diğer bir önemi ise bu hastalarda semptom olmadan da hava yolu inflamasyonunun bulunabileceğini göstermesidir. Beta agonistlerce baskılanan semptomların altında yatan kronik inflamasyonun sonuçta geri dönüşümü olmayan yeniden yapılanmaya (remodelling) gideceği düşünülürse, bu tür hastalarda inflamasyonun erken dönemde saptanıp tedavi edilmesinin önemi daha iyi anlaşılacaktır.

KOAH'lı hastalarda hava yolu inflamasyonunun majör komponenti oksidatif streştir [20]. Bu çalışmada KOAH'lı sigarayı bırakmış hastalar da hava yolu inflamasyonu ve oksidatif stresi saptamak amacıyla incelendi. Bu grupta da eCO değerleri astım ve astım atağındaki olgulardaki gibi sağlıklı sigara içmeyenlere göre anlamlı derecede yüksekti. Benzer bir çalışmada, bizim çalışmamızdaki gibi en az 6 aydır sigara içmeyen KOAH'lı hastalarda saptanan eCO yüksekliği, bu hastalardaki artmış oksidatif strese bağlı olabilir şeklinde yorumlanmıştır [12]. Bu ve bizim çalışmamızda KOAH grubundaki hastalarda steroid tedavisinden sonra eCO'da anlamlı düşüş olmamıştır. Bunun nedeni, Keatings ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmada da saptadıkları gibi steroidin nötrofilik inflamasyona karşı etkili olmaması

olabilir [21]. Bu durumda eCO ölçümünün KOAH'taki hava yolu inflamasyonunun değerlendirilmesinde kullanılmayacağı sonucuna vardık.

Sonuç olarak, astımlı hastaların uygun tedavisi için hava yolu inflamasyonunun monitörizasyonu gerekir. Semptomların izlenmesi bronkodilatör tedavi kullanımı nedeniyle yanıltıcı olabilir. Bronş biyopsisi, bronşiyal lavaj ve indüklenmiş balgam ile hava yolu inflamasyonu değerlendirilebilir, ancak bunlar invazif girişimlerdir. Üstelik yaşlılarda, ciddi hastalık durumlarında ve çocuklarda bu yöntemleri uygulamak kolay değildir. Ekspiryum havasında CO ölçümü ciddi hava yolu sınırlaması olsa dahi kolaylıkla uygulanabilir. En önemli dezavantajı sigara kullanımından önemli oranda etkilenmesidir.

Astımlı ve KOAH'lı hastalarda tedavi başarısızlığının önemli nedenlerinden biri hastaların sigara içmesidir. Bu nedenle eCO ölçümünün önemli olabileceği diğer kullanım alanı, doktorlardan gelecek tepkiler nedeniyle sigara içtiğini gizleyen hastaların saptanmasıdır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada eCO'nun 6 ppm üzerinde saptanması eşik değer olarak belirlenmiştir [22]. Bunu saptamanın avantajı, tedavide kullanılan ilaçlar yetersiz bulunarak, ilaç ve dozlarında gereksiz değişiklikler yapılmamasıdır.

KAYNAKLAR

- Middleton ET, Morice AH. Breath carbon monoxide as an indication of smoking habit. *Chest*. 2000;117:758-763.
- Ilano AL, Raffin TA. Management of carbon monoxide poisoning. *Chest*. 1990;97:165-169.
- Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;15:9-19.
- Donnelly LE, Barnes PJ. Expression of heme oxygenase in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;24:295-303.
- Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress. *Thorax*. 1998;53:668-72.
- Lim S, Groneberg D, Fischer A, Oates T, Caramori G, Mattos W, Adcock I, Barnes PJ, Chung KF. Expression of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and asthmatic airways: effect of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1912-18.
- Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med*. 2000;6:422-428.
- Foresti R, Motterlini R. The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free Radic Res* 1999;31:459-475.
- Zayasu K, Sekizawa K, Okinaga S, et al. Exhaled Carbon Monoxide in Exhaled Air of Asthmatic Patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:1140-1143.
- Özkan M, Laskowski D, Erzurum S, Dweik RA. High levels of carbon monoxide (CO) in exhaled breath in patients with chronic beryllium disease. *Chest*. 2000;118:253S.
- Yamaya M, Hosoda M, Ishizuka S, et al. Relation between exhaled carbon monoxide levels and clinical severity of asthma. *Clinical & Experimental Allergy*. 2001;31:417-422.
- Montuschi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled Carbon Monoxide and Nitric Oxide in COPD. *Chest*. 2001;120:496-501.
- Toraks Derneği. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Tanı ve Tedavi Rehberi. *Toraks Dergisi*. 2000;1.
- Toraks Derneği. Ulusal Astım Tanı ve Tedavi Rehberi. *Toraks Dergisi* 2000;1 (Ek 1).
- Halliwel B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Hemostasis* 1993;23:118-26.
- Rahman I, Madison D, Donaldson K et al. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:1055-1060.
- Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163:693-1722.
- Stocker R, Yamamoto, Y, McDonagh AF, et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987; 235:1043-6.
- Khatir S, Özkan M, McCarthy K, Laskowski D, Hamel J, Dweik RA, Erzurum SC. Alterations in Exhaled Gas Profile During Allergen-induced Asthmatic Response. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 2001;164:1844-1848.
- Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:341-357.
- Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, et al. Effects of inhaled and oral glucocorticoids in inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:542-548.
- Middleton ET, Morice AH. Breath Carbon Monoxide as an Indication of Smoking Habit. *Chest*. 2000;117:758-763.