

Limitaciones de la técnica de determinación de peróxido de hidrógeno en el condensado del aire espirado de pacientes con síndrome de distrés respiratorio del adulto

A. Bruhn, L. Liberona, C. Lisboa y G. Borzone

Programa de Doctorado en Ciencias Médicas. Departamento de Enfermedades Respiratorias. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile. Chile.

OBJETIVO: El condensado del aire espirado es una alternativa al lavado broncoalveolar para estudiar marcadores de inflamación y estrés oxidativo en pacientes con síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA). Sin embargo, el estudio del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ofrece resultados variables que no se relacionan con la gravedad del cuadro clínico. El objetivo del presente estudio ha sido identificar las posibles limitaciones de la técnica más utilizada para medir el H_2O_2 en condensado que expliquen esta variabilidad.

PACIENTES Y MÉTODOS: Se analizaron muestras seriadas de condensado de la vía espiratoria del ventilador de 6 pacientes con SDRA mediante la técnica de Gallati (lineal entre 0,3-10 μM , $r = 0,99$; $p < 0,05$) para H_2O_2 .

RESULTADOS: El volumen de condensado se relacionó con la ventilación minuto ($r = 0,96$; $p < 0,05$). En 11 de 23 muestras se obtuvo lectura a 450 nm sin el color característico de la reacción y en algunas se obtuvo también lectura espontánea indicativa de contaminantes. El espectro de absorción de estas muestras no mostró el pico característico del H_2O_2 a 450 nm y el pretratamiento de algunas muestras con catalasa no modificó la absorbancia a 450 nm.

CONCLUSIONES: El método espectrofotométrico frecuentemente empleado para medir el H_2O_2 en condensado es inespecífico en el SDRA por la presencia en las muestras de cantidades variables de contaminantes que determinan falsos positivos.

Palabras clave: *Peróxido de hidrógeno. Síndrome de distrés respiratorio del adulto. Estrés oxidativo. Condensado del aire espirado. Marcadores de inflamación. Técnica de Gallati.*

Introducción

El condensado del aire espirado se ha propuesto como alternativa al lavado broncoalveolar para estudiar

Correspondencia: Dra. G. Borzone.
Departamento de Enfermedades Respiratorias.
Pontificia Universidad Católica de Chile.
Marcoleta, 345, 4.º. Santiago de Chile. Chile.
Correo electrónico: gborzone@med.puc.cl

Recibido: 26-4-2004; aceptado para su publicación: 1-2-2005.

Limitations of the Technique to Determine Hydrogen Peroxide Levels in Exhaled Breath Condensate From Patients With Adult Respiratory Distress Syndrome

OBJECTIVE: Exhaled breath condensate represents an alternative to bronchoalveolar lavage for the analysis of markers of inflammation and oxidative stress in patients with adult respiratory distress syndrome (ARDS). However, analysis of hydrogen peroxide (H_2O_2) yields variable results that do not correlate with severity of the clinical presentation. In an attempt to explain this variability, the aim of the present study was to assess the possible limitations of the most commonly used technique for analyzing H_2O_2 in breath condensate.

PATIENTS AND METHODS: H_2O_2 levels were analyzed using the Gallati technique (linear range between 0.3 and 10 μM , $r=0.99$; $P<.05$) in serial samples of condensate taken from the expiratory tube of a mechanical ventilator in 6 patients with ARDS.

RESULTS: The volume of condensate obtained correlated to minute ventilation ($r=0.96$; $P<.05$). In 11 out of 23 samples, a spectrophotometer reading was obtained at 450 nm despite the absence of the characteristic color of the reaction and in some of these samples a spontaneous reading was obtained that was indicative of contamination. The absorbance spectrum of these samples did not contain the characteristic peak for H_2O_2 at 450 nm and pretreatment of some samples with catalase did not affect the absorbance at 450 nm.

CONCLUSIONS: The spectrophotometric method commonly used to measure H_2O_2 levels in breath condensate lacks specificity in ARDS due to the presence of variable levels of contaminants in the samples, which lead to false positives.

Key words: *Hydrogen peroxide. Adult respiratory distress syndrome. Oxidative stress. Exhaled breath condensate. Inflammatory markers. Gallati technique.*

los fenómenos inflamatorios y los marcadores de estrés oxidativo de la vía respiratoria y el parénquima pulmonar en pacientes con distintas enfermedades respiratorias. Una de estas afecciones es el síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA), en cuya patogenia participan fenómenos inflamatorios que determinan daño pulmonar por radicales libres.

El hallazgo de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el aire espirado de pacientes con SDRA¹ contribuyó a plantear la hipótesis de la participación de radicales li-

bres en la patogenia del aumento de la permeabilidad capilar pulmonar característico del SDRA. Diversos investigadores han especulado que las células inflamatorias activadas secuestradas en el pulmón en esta enfermedad son causantes del estrés oxidativo que se evidencia a través de la presencia de este marcador. A favor de esta hipótesis están también los siguientes hechos: a) los resultados obtenidos utilizando lavado broncoalveolar, que en estos pacientes presenta un alto porcentaje del glutatión en la forma oxidada y de proteínas con modificaciones inducidas por oxidantes, así como títulos elevados de isoprostanos e hipoxantina²⁻⁶, y b) los hallazgos en el plasma de estos pacientes, que contiene productos de peroxidación lipídica y de oxidación de proteínas, concentraciones elevadas de hipoxantina y disminución de algunos antioxidantes como alfa-tocoferol, betacaroteno, selenio y ascorbato⁷⁻¹³.

Si bien las alteraciones en el fluido alveolar se consideran más específicas de daño oxidativo en el pulmón¹⁴, el lavado broncoalveolar no está exento de riesgos en pacientes críticos con SDRA, quienes con frecuencia cursan con inestabilidad hemodinámica y no toleran mediciones repetidas debido al carácter invasivo de la técnica. El análisis del condensado del aire espirado proveería de información similar a la del lavado broncoalveolar, sin sus inconvenientes. Por tratarse de un método simple y no invasivo, permitiría el estudio seriado en búsqueda de relaciones entre los valores de H₂O₂ y los marcadores clínicos, fisiológicos y de alteración del intercambio gaseoso. Sin embargo, las concentraciones de H₂O₂ comunicadas en la bibliografía son muy variables^{1,14-20} y no se relacionan con la evolución clínica de los pacientes con SDRA.

Si bien existen diversas aproximaciones para la determinación del H₂O₂ en el condensado del aire espirado, la técnica más utilizada en muestras provenientes de pacientes con SDRA es la espectrofotométrica de Gallati y Pracht²¹.

Nuestro objetivo ha sido identificar las posibles limitaciones de esta técnica en muestras de condensado de aire espirado de pacientes con SDRA que pudiesen explicar la heterogeneidad de los resultados disponibles en la bibliografía.

Pacientes y métodos

Recogida del condensado

El condensado del aire espirado se obtuvo conectando en serie una manguera teflonada de 100 cm de longitud y 1,2 cm de diámetro interno a la vía espiratoria del ventilador mecánico, después de retirar el filtro que normalmente se utiliza a la salida del tubo endotraqueal. La manguera se mantuvo sumergida en agua hielo durante el tiempo de recogida. Éste osciló entre 30 y 60 min, dependiendo de la ventilación minuto del paciente, para obtener entre 2 y 8 ml de condensado. La muestra se mantuvo en un tubo en hielo hasta su análisis, que se efectuó en un plazo no superior a 60 min.

Técnica para la determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno

Utilizamos la técnica espectrofotométrica de Gallati y Pracht, ampliamente usada en diversos estudios²¹. Consiste en hacer reaccionar durante 30 min 1,25 ml de la muestra de condensado con 0,25 ml de una solución de 3,3',5,5'-tetrametil-

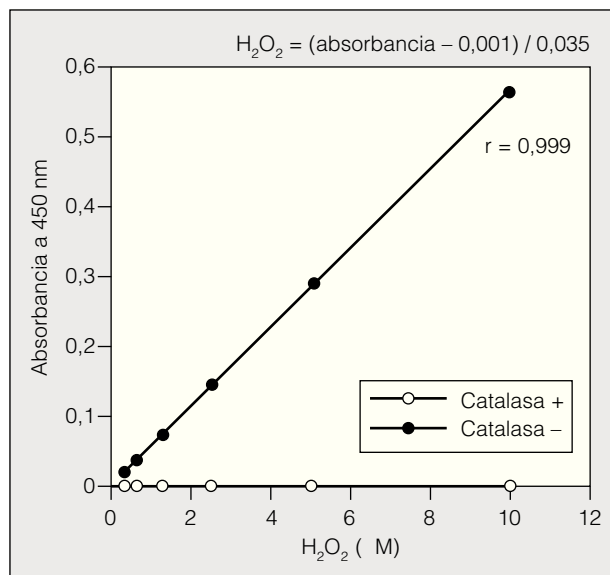


Fig. 1. Curva de calibración con solución estándar de peróxido de hidrógeno (H₂O₂; círculos negros). Los círculos blancos corresponden a soluciones estándar de H₂O₂ pretratadas con catalasa.

benzidina 63 M en presencia de *buffer* citrato de sodio 0,2 M (pH de 3,95) y de la enzima *horseradish* peroxidasa (10 l de solución que contiene 1,25 U/ml). La reacción se detiene con la adición de 50 l de ácido sulfúrico 5N para la determinación espectrofotométrica (450 nm de longitud de onda) de la concentración del producto 3,3',5,5' tetrametil-1,1' difenoquina-4,4' diimina formado. La absorbancia a 450 nm es directamente proporcional a la concentración de H₂O₂ en solución.

Para calcular la concentración de H₂O₂ presente en las muestras utilizamos una curva de calibración generada con diluciones seriadas a partir de una solución comercial de H₂O₂ (Merck) al 30% cada día en que se efectuaron mediciones en muestras de pacientes. La curva de calibración fue lineal y altamente reproducible para el rango 0,31-10 M de H₂O₂ (fig. 1). Para confirmar la especificidad del método se pretrataron algunas muestras y estándares con catalasa.

La estabilidad del H₂O₂ se estudió tanto en la solución estándar comercial como en las muestras congeladas a -80 °C. Los resultados de alícuotas congeladas durante 24 y 48 h a -80 °C se compararon con los de alícuotas recién obtenidas.

Pacientes

Estudiamos a 6 pacientes -5 de ellos varones; edad media (\pm desviación estándar) de 49 \pm 17 años- con diagnóstico de SDRA y conectados a ventilación mecánica en las Unidades de Tratamiento Intensivo Médico y Quirúrgico de nuestro hospital clínico.

El SDRA se definió como la insuficiencia respiratoria aguda que requiere de intubación y ventilación mecánica, acompañada de: a) infiltrados pulmonares difusos bilaterales en la radiografía de tórax; b) presión arterial de oxígeno/fracción inspiratoria de oxígeno de 200 mmHg o inferior, y c) presión de capilar pulmonar de 18 mmHg o menor, o bien ausencia de signos clínicos indicativos de disfunción ventricular izquierda. Los pacientes entraron en el estudio dentro de las primeras 24 h de ventilación mecánica y se les caracterizó utilizando la puntuación de gravedad APACHE II (Acute Physiology Score and Chronic Health Evaluation). Las etiologías del SDRA fueron: neumonía en 4 casos, postoperatorio de cirugía abdominal en un caso y traumatismo torácico en un caso.

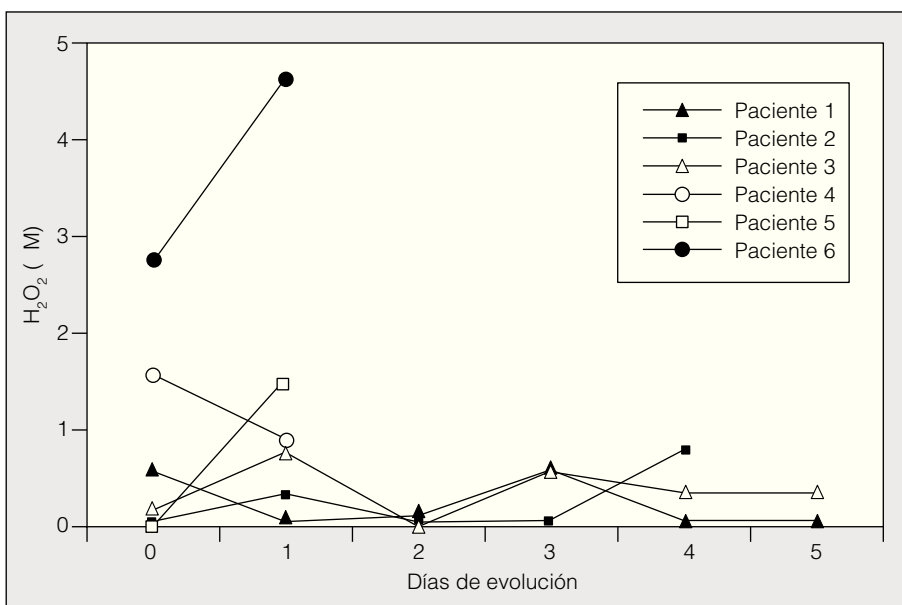


Fig. 2. Evolución temporal de la concentración de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en el aire espirado en los 6 pacientes con síndrome de distrés respiratorio agudo. Cada símbolo corresponde a un paciente. Los pacientes con los valores más altos de H₂O₂ en el aire espirado presentan grandes fluctuaciones de un día a otro.

Como controles estudiamos a 5 pacientes ventilados (4 de ellos mujeres; edad de 31 ± 10 años) y sometidos a cirugía electiva no oncológica bajo anestesia general, sin enfermedad respiratoria y pertenecientes a la categoría I de la clasificación de riesgo de la American Society of Anesthesiology (ASA), con quienes se empleó el mismo sistema de recogida del condensado utilizado para los pacientes con SDRA. Se eligió este tipo de controles ya que en sujetos no intubados es muy difícil obtener muestras de condensado no contaminadas con saliva, la cual constituye una fuente adicional de H₂O₂^{14,15}. Por otra parte, Wilson et al¹⁸ no encontraron relación entre la anestesia general y los cambios en la concentración de H₂O₂ en el condensado del aire exhalado.

Análisis estadístico

Utilizamos la prueba de la t de Student para comparar los resultados de controles y pacientes con SDRA, ANOVA de una vía para el estudio de la estabilidad del H₂O₂ y la determinación del coeficiente de correlación de Spearman para el estudio de la dependencia del volumen de condensado de los niveles de ventilación del paciente. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Estudio de la estabilidad de soluciones estándar de peróxido de hidrógeno a -80°C

Encontramos una disminución progresiva de la concentración de H₂O₂, ya evidente después de 24 h de almacenamiento a -80°C , que se acentuaba a las 48 h (tabla I). Estos resultados obligaron al procesamiento inmediato de las muestras.

Recogida de condensado

La conexión de la manguera teflonada a la vía espiratoria de los pacientes no produjo alteraciones en el patrón ventilatorio. Obtuvimos entre 2 y 8 ml de líquido

transparente. El volumen de este condensado varió de forma lineal de acuerdo con el tiempo de recolección y con la ventilación minuto del paciente ($r = 0,96$; $p < 0,05$).

Concentraciones estimadas de peróxido de hidrógeno

Analizamos 28 muestras de condensado de aire espirado, 23 de los 6 pacientes con diagnóstico de SDRA, en quienes se tomó un número variable de muestras sucesivas a lo largo de la evolución (dependiendo del estado clínico del paciente), y 5 de los sujetos controles. En 3 de los 5 controles y en 3 de los 6 pacientes con SDRA (día 0) no se detectó H₂O₂ con el método empleado. En los casos en que obtuvimos lectura, la concentración de H₂O₂ calculada a partir de la curva estándar fue de $0,36 \pm 0,05$ M en las muestras de controles y de $1,62 \pm 1,1$ M en las de los pacientes con SDRA en el primer día de ventilación mecánica ($p = 0,181$). El estudio de la evolución de los valores de H₂O₂ a lo largo del tiempo en ventilación mecánica mostró una gran variabilidad (fig. 2). Los sujetos con un número reducido de muestras eran pacientes que fallecieron o a quienes se retiró del ventilador mecánico.

TABLA I
Estabilidad de la solución estándar de peróxido de hidrógeno a -80°C

t = 0		24 h		48 h	
M	%	M	%	M	%
0,625	100	$0,35 \pm 0,06^*$	56	$0,28 \pm 0,03^{**}$	45
1,25	100	$0,99 \pm 0,05^*$	79	$0,63 \pm 0,26^{**}$	50
2,5	100	$1,68 \pm 0,02^*$	67	$1,45 \pm 0,09^{**}$	58
5	100	$3,65 \pm 0,64^*$	73	$3,46 \pm 0,07^{**}$	69
10	100	$7,85 \pm 0,22^*$	79	$7,67 \pm 1,10^{**}$	77

* $p < 0,05$ para t = 0 frente a 24 h; ** $p < 0,05$ para t = 0 frente a 48 h.

Especificidad del análisis de peróxido de hidrógeno en las muestras de condensado

De las 23 muestras de los pacientes con SDRA, 11 presentaron, después de la reacción, absorbancia elevada a 450 nm no acompañada del color esperado según el estándar. Varias de estas muestras presentaron absorbancia espontánea a 450 nm (sin reaccionar con los reactivos), lo que era indicativo de la presencia de un contaminante que afectaba la lectura.

Al examinar el espectro de absorción de las muestras, encontramos absorbancias elevadas y variables en el rango de 350-550 nm, sin el pico a 450 nm que es característico del H₂O₂ (fig. 3). Este perfil de absorbancia variable impidió restar la absorbancia de fondo. Por último, el pretratamiento de algunas muestras con catalasa no modificó la absorbancia a 450 nm (0,055 ± 0,058 frente a 0,051 ± 0,051; p = NS).

Discusión

Nuestro estudio pone en evidencia importantes limitaciones de la técnica que se utiliza en la mayoría de los estudios que miden el H₂O₂ en el aire espirado de pacientes con SDRA. La principal limitación que presenta la técnica espectrofotométrica de Gallati para este tipo de muestras radica en la presencia de una absorbancia de fondo que es variable e impide estimar de manera fiable la concentración de H₂O₂ (fig. 3).

En los estudios que miden el H₂O₂ en el aire espirado de pacientes con SDRA^{1,14,15,17-20} son conocidas la variabilidad de los resultados y la falta de correlación con parámetros clínicos y fisiológicos, lo que ha limitado la utilidad clínica de esta determinación. Esto se ha atribuido hasta ahora a diversos factores, entre los que se cuentan: a) cantidades variables de antioxidantes que metabolizan de manera distinta el H₂O₂ en las vías aéreas y el pulmón; b) distintos métodos de recogida y de procesamiento del condensado, y c) heterogeneidad de las enfermedades que se engloban en el diagnóstico de SDRA. A lo anterior habría que agregar que la composición del condensado puede alterarse por las propiedades de los materiales utilizados en los sistemas de recogida, ya que algunos plásticos contribuyen con contaminantes en el rango de lectura de la técnica (observaciones no publicadas). Sin embargo, en nuestro estudio este factor no influyó en la absorbancia de fondo de las muestras, ya que la nebulización de soluciones estándar de H₂O₂ a través del sistema de recogida no mostró dicha absorbancia, lo que permitió una lectura fiable de la concentración de H₂O₂.

El origen de la absorbancia de fondo encontrada en las muestras de nuestro estudio podría estar relacionado con partículas en suspensión y sustancias distintas del H₂O₂ capaces de reaccionar con 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, como ocurre, por ejemplo, con iones cloruro^{14-16,22}. El condensado del aire espirado no sólo contiene vapor de agua y sustancias volátiles, sino que además presenta múltiples solutos no volátiles tales como proteínas, lípidos y electrólitos, los cuales alcanzarían el condensado en forma de partículas de aerosol liberadas desde el fluido respiratorio que recubre la mucosa

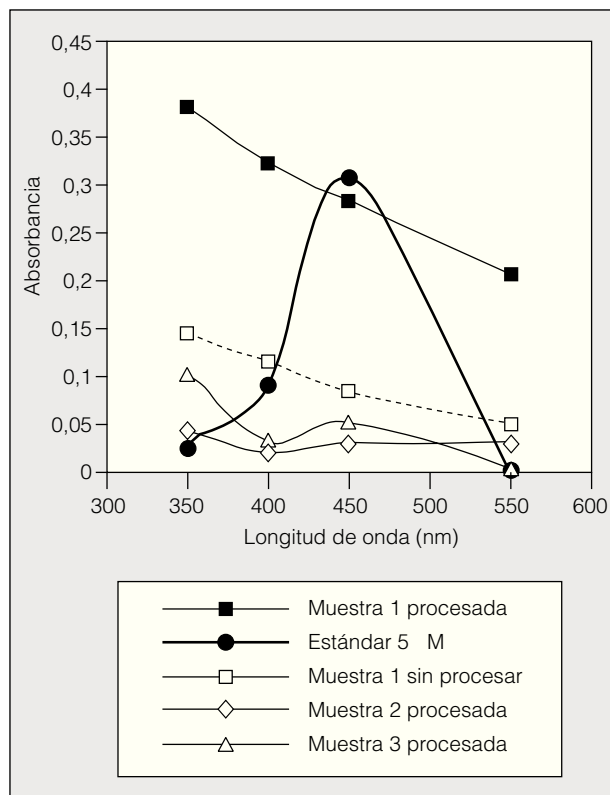


Fig. 3. Espectro de absorción tras procesar una solución estándar de 5 M de peróxido de oxígeno (círculos negros) y 3 muestras de pacientes. Además se presenta el espectro de absorción espontáneo de una muestra sin procesar. Se observa que sólo la solución estándar presenta un pico de absorción a 450 nm.

bronquial y los alveolos^{14-16,22}. Ésta es un área de creciente interés, ya que la cantidad de gotitas con partículas de aerosol es muy variable. En sujetos sanos, mientras ventilan espontáneamente, la cantidad de partículas de aerosol puede fluctuar entre 0,1 y 4 partículas/ml, y el diámetro promedio de estas partículas es de 0,3 μm¹⁴. Esto determina que en sujetos sanos la proporción del volumen del condensado constituido por fluido respiratorio varíe entre el 0,01 y el 2%²². En pacientes conectados a ventilación mecánica esta proporción aumenta, dado que la cantidad de partículas de aerosol formadas en el árbol respiratorio depende de la velocidad del flujo aéreo y de la presencia de turbulencias¹⁴. Especulamos que la absorbancia de fondo variable que presentan las muestras de condensado de pacientes con SDRA está en relación con partículas en suspensión provenientes del fluido respiratorio, las cuales se encuentran en proporción también variable dependiendo de la velocidad del flujo aéreo. Asimismo, consideramos que este fenómeno podría estar presente en otro tipo de afecciones pulmonares con condiciones de turbulencia semejantes.

Diversos estudios han aplicado la técnica de Gallati a muestras de condensado de aire espirado provenientes de pacientes asmáticos, con enfermedad pulmonar obstructiva crónica o fumadores que ventilan espontáneamente^{19,23,24}. Estos estudios no describen absorbancia de

fondo en sus muestras y encuentran que el método de Gallati resulta ser específico para H_2O_2 ¹⁹. Es probable que en dichos estudios la cantidad de partículas en suspensión fuera muy baja en comparación con las muestras de los pacientes mecánicamente ventilados de nuestro estudio. Los intentos por estimar la dilución de las partículas en suspensión²⁶ podrían ayudar a confirmar o descartar esta hipótesis.

A diferencia de otros estudios que han encontrado que el H_2O_2 se mantiene estable durante varios días a -20 o -80 °C^{20,23,25}, en nuestro estudio su concentración disminuyó hasta en un 30% al cabo de 24 h a -80 °C. En 2 de los estudios que describen estabilidad del H_2O_2 a -80 °C la concentración se midió en las mismas muestras^{20,25}. En nuestro estudio, en cambio, la estabilidad del H_2O_2 se estudió en soluciones con concentraciones conocidas y sin absorbancia de fondo. Basándonos en la evidencia encontrada en este estudio, que apunta a que la determinación de H_2O_2 con la técnica de Gallati es muy inespecífica, conjeturamos que quizá en los estudios que describen concentraciones estables de H_2O_2 en muestras de condensado a -80 °C la técnica analítica pudo haber detectado otras sustancias o una suspensión de partículas.

En síntesis, la técnica espectrofotométrica de Gallati presenta limitaciones importantes para su aplicación en muestras de condensado de aire espirado de pacientes con SDRA, debido a la presencia de una absorbancia de fondo variable en un número importante de muestras. Los datos encontrados en nuestro estudio contribuyen a explicar algunas de las fuentes de variabilidad de la medición de H_2O_2 en el condensado del aire espirado en pacientes con SDRA. El uso de técnicas sin absorbancia de fondo que interfiera en las lecturas es requisito indispensable para que los resultados del análisis del condensado del aire espirado refleje los cambios bioquímicos de las vías y espacios aéreos. Nuestros resultados ponen de manifiesto la necesidad de estandarizar los métodos de estudio del condensado del aire espirado para distintas enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baldwin SR, Grum CM, Boxer LA, Simon RH, Ketal LH, Devall LJ. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet*. 1986;1:11-4.
2. Lykens MG, Davis WB, Pacht ER. Antioxidant activity of bronchoalveolar lavage fluid in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Physiol*. 1992;262:169-75.
3. Bunell E, Pacht ER. Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148:1174-8.
4. Lamb NJ, Gutteridge JM, Baker C, Evans TW, Quinlan GJ. Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration and chlorination. *Crit Care Med*. 1999;27:1738-44.
5. Lenz AG, Jorens PG, Meyer B, De Backer W, Van Overveld F, Bossaert L, et al. Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *Eur Respir J*. 1999;13:169-74.
6. Carpenter CT, Price PV, Christman BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest*. 1998;114:1653-9.
7. Takeda K, Shimada J, Amano M, Sakai T, Okada T, Yoshiya I. Plasma lipid peroxides and alpha-tocopherol in critically ill patients. *Crit Care Med*. 1984;12:957-9.
8. Quinlan GJ, Lamb NJ, Tilley R, Evans TW, Gutteridge JM. Plasma hypoxanthine levels in ARDS: implications for oxidative stress, morbidity and mortality. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:479-84.
9. Quinlan GJ, Lamb NJ, Evans TW, Gutteridge JM. Plasma fatty acid changes and increased lipid peroxidation in patients with adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 1996;24:241-6.
10. Richard C, Lemonnier F, Thibault M. Vitamin E deficiency and lipoperoxidation during adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 1990;18:4-9.
11. Quinlan GJ, Evans TW, Gutteridge JM. Linoleic acid and protein thiol changes suggestive of oxidative damage in the plasma of patients with adult respiratory distress syndrome. *Free Radic Res*. 1994;20:299-306.
12. Quinlan GJ, Evans TW, Gutteridge JM. Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. *Free Radic Res*. 1994;20:289-98.
13. Metnitz PG, Bartens C, Fischer M, Fridrich P, Staltzer H, Druml W. Antioxidant status in patients with adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med*. 1999;25:180-5.
14. Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:731-7.
15. Kharitonov S, Barnes P. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:1693-722.
16. Montuschi P, Barnes P. Analysis of exhaled breath condensate for monitoring airway inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23:232-7.
17. Kietzmann D, Kahl R, Muller M. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med*. 1993;19:78-81.
18. Wilson WC, Swetland JF, Benumof JL, Laborde P, Taylor R. General anesthesia and exhaled breath hydrogen peroxide. *Anesthesiology*. 1992;76:703-10.
19. Wilson WC, Laborde PR, Benumof JL, Taylor R, Swetland JF. Reperfusion injury and exhaled hydrogen peroxide. *Anesth Analg*. 1993;77:963-70.
20. Sznajder JI, Fraiman A, Hall JB, Sanders W, Schmidt G, Crawford G, et al. Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest*. 1989;96:606-12.
21. Gallati H, Pracht I. Kinetic studies and optimization of peroxidase activity determination using the substrates H_2O_2 and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1985;23:453-60.
22. Effros RM, Hoagland KW, Boshous M, Castillo D, Foss B, Dunning M, et al. Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:663-9.
23. Antczak A, Nowak D, Shariati B, Król M, Piasecka G, Kurmanowska Z. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur Respir J*. 1997;10:1235-41.
24. Nowak D, Antczak A, Krol M, Pietras T, Shariati B, Bialasiewicz P, et al. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur Respir J*. 1996;9:652-7.
25. Jobsis Q, Raagteep HC, Schellekens SL, Hop WCJ, Hermans PWM, De Jongste JC. Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values. *Eur Respir J*. 1998;12:483-5.
26. Effros RM, Biller J, Foss B, Hoagland K, Dunning M, Castillo D, et al. A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:1500-5.