

# Methodische und klinische Aspekte der Bestimmung von Glutathion im induzierten Sputum bei bronchopulmonalen Erkrankungen

Jutta Beier

*Methodical and Clinical Aspects of the Determination of Glutathion in Induced Sputum in Bronchopulmonary Diseases*

Preisarbeit



## Einleitung

Die Bedeutung nicht-invasiver Verfahren zur diagnostischen und wissenschaftlichen Analyse zellulärer und löslicher Bestandteile des unteren Respirationstraktes hat in den letzten Jahren kontinuierlich zugenommen [1]. Die Methode des induzierten Sputums ist insbesondere bei entzündlichen

Atemwegserkrankungen wie Asthma bronchiale oder chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) etabliert und weit verbreitet [2, 3]. Mit der vermehrten Anwendung der Methode stellen sich jedoch zunehmend auch Fragen nach technischen Details, Validität und Reproduzierbarkeit der Methode. Diese Fragen sind insbesondere für die Bestimmung löslicher Mediatoren im Sputum nur unzureichend untersucht. Glutathion (GSH) ist ein pulmonaler Marker für oxidativen Stress und bei unterschiedlichen Erkrankungen wie idiopathischer Lungenfibrose (IPF) und COPD von pathogenetischer Bedeutung [4–6]. Die Bestimmung von GSH in respiratorischen Sekreten wird bislang durch die invasive Methode der Probengewinnung mittels bronchoalveolärer Lavage (BAL) limitiert [7]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Möglichkeit der Quantifizierung von GSH im induzierten Sputum methodisch zu untersuchen.

## Methodik

### Patienten/Probanden

Es wurden 14 Patienten bzw. freiwillige Probanden in die Untersuchung aufgenommen.

### Sputuminduktion

Die Sputuminduktion erfolgte nach einem etablierten Protokoll [8]. Eventuelle Modifikationen ergaben sich aus den Erfordernissen der Studie (s. u.).

### Einfluss der Sputumprobenverarbeitung

Dithiotreitol (DTT) wird in den gültigen Standardprotokollen der Sputumverarbeitung als Probenhomogenisator in Konzentrationen von 0,1–0,05% zugegeben. Um den Einfluss von DTT auf die GSH-Bestimmung zu beurteilen, wurden die Proben mit verschiedenen Konzentrationen von DTT oder PBS vorbehandelt.

### Stabilität von GSH, Einfluss von Temperatur und Zeit

Um die Stabilität von GSH im induzierten Sputum zu evaluieren, wurden Proben direkt nach Verarbeitung aliquotiert und gekühlt (4 °C) oder bei Raumtemperatur (20 °C) über einen Zeitraum von 24 h auf ihre GSH-Konzentration überprüft.

### Validierung der GSH-Recovery mittels Spiking-Experimenten

Um die Recovery von GSH aus dem induzierten Sputum zu evaluieren, wurden Sputumproben aliquotiert und mit definierten

## Institutsangaben

Schwerpunkt Pneumologie, III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

## Anmerkung

Die Autorin ist Preisträgerin des Doktorandenpreises 2002 der Deutschen Lungenstiftung; beste klinische Arbeit

## Danksagung

Für die Mithilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit gilt mein besonderer Dank meinem Kollegen Dr. Kai-Michael Beeh. Des Weiteren möchte ich in diesem Zusammenhang Herrn Dr. med. Oliver Kornmann und meinen Chef Prof. Dr. med. Roland Buhl, erwähnen.

## Korrespondenzadresse

Dr. med. Jutta Beier · Schwerpunkt Pneumologie · III. Medizinische Klinik und Poliklinik · 55101 Mainz · E-mail: j.beier@3-med.klinik.uni-mainz.de

## Bibliografie

Pneumologie 2003; 57: 101–103 © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 0934-8387

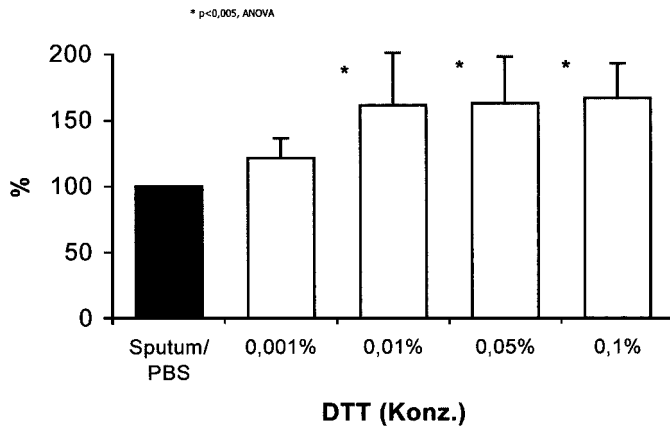


Abb. 1 Einfluss von DTT auf die gemessenen GSH-Werte in Relation zu den tatsächlichen GSH-Werten im induzierten Sputum.

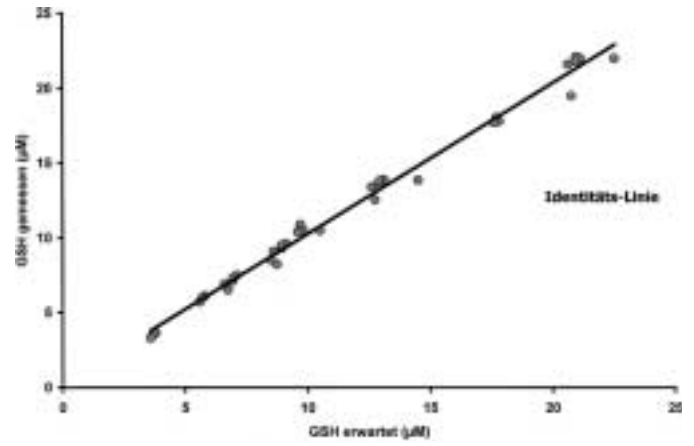


Abb. 2 Korrelation zwischen erwartetem und gemessenem GSH nach Spiking von Sputumproben mit 4, 8, 16 und 32  $\mu\text{M}$  GSH (n = 9).

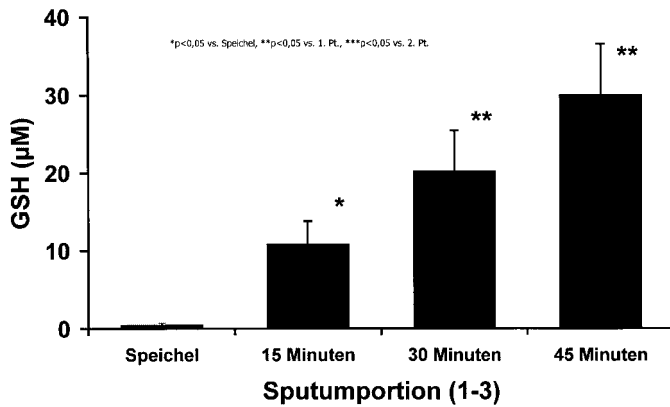


Abb. 3 Einfluss der Induktionszeit auf die GSH-Konzentration im induzierten Sputum.

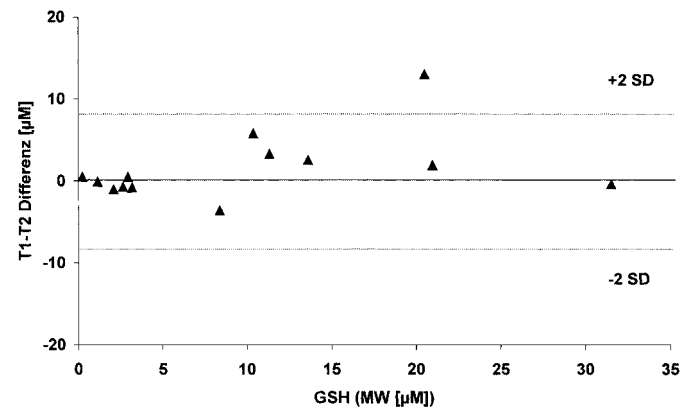


Abb. 4 Reproduzierbarkeit von Sputum-GSH: Die individuellen Mittelwerte sind gegen die Differenzen zwischen Zeitpunkt 1 (T1) und 2 (T2) aufgetragen. Die gestrichelten Linien geben die 2fache Standardabweichung der mittleren Differenzen der zwei Messzeitpunkte an (n = 12).

GSH-Konzentrationen „gespikt“ (32, 16, 8, 4, 0  $\mu\text{M}$ ). Die kalkulierten Messwerte („tatsächliches“, endogenes GSH + Spiking-Konzentration) wurden gegen die tatsächlich gemessenen Werte grafisch aufgetragen und korreliert.

#### Einfluss der Induktionsdauer

Hierzu wurde GSH fraktioniert nach Sputumportion (15, 30 und 45 Minuten Induktionsdauer) im Überstand bestimmt.

#### Reproduzierbarkeit

Die intraindividuelle Reproduzierbarkeit von GSH im induzierten Sputum wurde bei 12 Patienten zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (0 und 72 h) unter gleichen Bedingungen (Tageszeit, Nahrungskarenz in den 8 h vor der Messung, kein respiratorischer Infekt, Nikotinkarenz) bestimmt.

#### Ergebnisse und Diskussion

GSH war bei nahezu allen Probanden und Patienten im Sputum nachweisbar. Die Verwendung von DTT zur Probenverarbeitung stellte eine relevante Störgröße dar, da sie zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der gemessenen GSH-Werte führte

(Abb. 1). GSH war im Sputum bei Raumtemperatur bzw. 4 °C lediglich über 2–4 Stunden stabil, danach fielen die gemessenen Werte deutlich ab. Demgegenüber fand sich eine hervorragende Übereinstimmung der Messwerte nach Einfrieren der Probe (R native/gefrorene Probe 0,97). In Spiking-Experimenten lag die mittlere GSH-Recovery bei  $102 \pm 5\%$ , womit die Validität der Messung bestätigt werden konnte (Abb. 2). Mit steigender Induktionsdauer konnte eine quantitative Erhöhung der GSH-Werte von der 1. bis zur 3. Portion beobachtet werden (Abb. 3). Somit konnte für GSH ein Konzentrationsgradient vom oberen zum unteren Respirationstrakt gezeigt werden. Die intraindividuelle Reproduzierbarkeit wiederholter GSH-Messungen war mit einer intra-Gruppen-Korrelation der Messwerte von  $R_i = 0,89$  exzellent (Abb. 4).

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig ausführlich methodische Aspekte der Bestimmung von GSH im induzierten Sputum. Die Methode ist bei Beachtung standardisierter Protokolle valide und gut reproduzierbar. Darüber hinaus konnte die klinische Relevanz der beschriebenen Methode in einer kürzlich publizierten Untersuchung bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose untermauert werden. Hier fand sich ein ausgeprägter GSH-Mangel im induzierten Sputum bei betroffenen Patienten

gegenüber Gesunden [9]. Interessanterweise decken sich die Befunde mit Resultaten aus BAL-Studien [10], wodurch das große Potenzial der Methode in der nicht-invasiven Überwachung bronchopulmonaler Erkrankungen erkennbar wird.

## Literatur

- <sup>1</sup> Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 308–317
- <sup>2</sup> Pizzichini E, Pizzichini MM, Kidney JC et al. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *Eur Respir J* 1998; 11: 828–834
- <sup>3</sup> Brightling CE, Monterio W, Green RH et al. Induced sputum and other outcome measures in chronic obstructive pulmonary disease: safety and repeatability. *Respir Med* 2001; 95: 1999–2002
- <sup>4</sup> MacNee W. Chronic obstructive pulmonary disease from science to the clinic: the role of glutathione in oxidant-antioxidant balance. *Monaldi Arch Chest Dis* 1997; 52: 479–485
- <sup>5</sup> MacNee W. Oxidants/antioxidants and chronic obstructive pulmonary disease: pathogenesis to therapy. *Novartis Found Symp* 2001; 234: 169–185
- <sup>6</sup> MacNee W, Rahman I. Oxidants/antioxidants in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 1995; 50: 553–558
- <sup>7</sup> Kelly FJ, Buhl R, Sanström T. Measurement of antioxidants, oxidants and oxidation products in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir Rev* 1999; 9: 93–98
- <sup>8</sup> Pizzichini MMM, Popov TA, Efthimiadis A et al. Spontaneous and induced sputum to measure indices of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 866–869
- <sup>9</sup> Beeh KM, Beier J, Haas IC et al. Glutathione deficiency of the lower respiratory tract in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2002; 19: 1119–1123
- <sup>10</sup> Cantin AM, Hubbard RC, Crystal RG. Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 370–372