

5. Clewley JP. The polymerase chain reaction, a review of the practical limitations for human immunodeficiency virus diagnosis. *J Virol Methods* 1989; 25: 179-187.
6. Victor T, Jordaan A, du Toit R, Van Helden PD. Laboratory Experience and guidelines for avoiding false positive polymerase chain reaction results. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993; 31: 531-535.
7. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-67.
8. Mikkers FEP, Everaerts FM, Verheggen TP. High performance zone electrophoresis. *J Chromatogr* 1979; 169: 11-20.
9. Jorgenson JW, Lukacs KD. Zone electrophoresis in open tubular glass capillaries. *Anal Chem* 1981; 53: 1298-1302.
10. Landers JP. Clinical Capillary Electrophoresis. *Clin Chem* 1995; 41/4: 495-509.
11. Righetti PG. Macroporous gels: facts and misfacts. *J Chromatogr A* 1995; 698: 3-17.
12. Huang XC, Quesada MA, Mathies RA. DNA sequencing using capillary array electrophoresis. *Anal Chem* 1992; 64: 2149-2154.
13. Müller O, Foret F, Ruiz-Martinez MC, Karger BL. Practical aspects of ultrafast DNA separations by capillary electrophoresis. 1996; HPCE '96, Orlando, abstract P-230.
14. Kuypers AWHM, Willems PMW, van der Schans MJ, Linssen PCM, Wessels HMC, de Bruijn CHMM, Everaerts FM, Mensink EJB. Detection of point mutations in DNA using capillary electrophoresis in a polymer network. *J Chromatogr Biomed Appl* 1993; 621: 149-156.
15. Khrapko K, Hanekamp JS, Thilly WG, Belenkii A, Foret F, Karger BL. Constant denaturant capillary electrophoresis (CDCE) - a high resolution approach to mutational analysis. *Nucl Acid Res* 1994; 22: 364-369.
16. Kuypers AWHM, Meijerink JPP, Smetsers TFCM, Linssen PCM, Mensink EJB. Quantitative analysis of DNA aberrations amplified by competitive polymerase chain reaction using capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 1994; 660: 271-277.
17. Chen DY, Harke HR, Dovichi NJ. 2-label peak-height encoded DNA sequencing by capillary gel electrophoresis-3 examples. *Nucl Acids Res* 1992; 20: 4873-4880.
18. Cohen AS, Najarian DR, Paulus A, Guttman A, Smith JA, Karger BL. Rapid separation and purification of oligonucleotides by high-performance capillary gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9660-9663.
19. Ulfelder KJ, Schwartz HE, Hall JM, Sunzeri FJ. Restriction fragment length polymorphism analysis of ERBB2 oncogene by capillary electrophoresis. *Anal Biochem* 1992; 200: 260-267.
20. Schwartz HE, Ulfelder KJ, Sunzeri FJ, Busch MP, Brownlee RG. Analysis of DNA restriction fragments and polymerase chain reaction products towards detection of the AIDS (HIV-1) virus in blood. *J Chromatogr* 1991; 559: 267-283.
21. Butler JM, Mccord BR, Jung JM, Allen RO. Rapid analysis of the short tandem repeat HUMTHO1 by capillary electrophoresis. *Biotechniques* 1994; 17: 1062.
22. Wang YW, Ju JY, Carpenter BA, Atherton JM, Sensabaugh GF, Mathies RA. Rapid sizing of short tandem repeat alleles using capillary array electrophoresis and energy-transfer fluorescent primers. *Anal Chem* 1995; 67: 1197-1203.
23. van de Locht LTF, Kuypers AWHM, Verbruggen BW, Linssen PCM, Nováková IRO, Mensink EJB. Semi-automated detection of the factor V mutation by allele specific amplification and capillary electrophoresis. *Thromb Haemos* 1995; 74: 1276-1279.
24. Kuypers AWHM, Linssen PCM, Willems PMW, Mensink EJB. On-line melting of double-stranded DNA for analysis of single-stranded DNA using capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 1996; 675: 205-211.

### Summary

*Automation of molecular diagnostics using capillary electrophoresis. Kuypers AWHM, Linssen PCM and Mensink EJB. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 235-238.*

To assure the reliability of molecular diagnostics adequate quality assessment procedures are necessary. Automation of molecular diagnostics would lead to standardization and higher reproducibility and therefore improve quality. A recent development in the field of automation is the use of capillary electrophoresis (CE) as an analysis method. The number of applications of this technique is growing rapidly. When compared to traditional electrophoresis capillary electrophoresis has many advantages, which makes it very suitable for use in automated and routine molecular diagnostics.

*Key-words: capillary electrophoresis; DNA; PCR; automation; quality control*

*Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 238-244*

## Plasma glutathion S-transferase Alfa1-1 als marker voor leverschade

T.P.J. MULDER<sup>1</sup>, W.H.M. PETERS<sup>1</sup>, E.A.P. STEEGERS<sup>2</sup> en J.B.J.M. JANSEN<sup>1</sup>

Humane lever bevat grote hoeveelheden glutathion S-transferasen van de Alfa klasse (GST-Alfa). De plasmaspiegel van GSTA1-1, het voornaamste isoenzym van Alfa klasse, is waarschijnlijk een gevoelige marker voor levercelschade. Daarom werd een zeer gevoelige en specifieke sandwich ELISA voor GSTA1-1

ontwikkeld. De verdeling van GSTA1-1 in plasma van gezonde controles werd vrijwel normaal na een logaritmische transformatie. Gezonde mannen hadden significant hogere plasma GSTA1-1-spiegels dan gezonde vrouwen. Bij vrouwen werd een significante stijging vastgesteld met toenemende leeftijd, iets wat bij mannen niet werd waargenomen. Patiënten met gastrointestinale aandoeningen die niet gepaard gaan met levercelschade en patiënten met alcoholische levercirrose hadden normale plasma GSTA1-1-niveaus. Patiënten met primaire biliare cirrose, primaire scleroserende cholangitis of chronische hepatitis B hadden significant verhoogde plasma GSTA1-1-niveaus maar de ASAT activiteit was bij

*Afdeling Gastroenterologie<sup>1</sup> en Obstetrie en Gynaecologie<sup>2</sup>, Academisch Ziekenhuis St. Radboud, Nijmegen*

Correspondentie: Dr. T.P.J. Mulder, Afdeling Gastroenterologie, Academisch Ziekenhuis St. Radboud, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.

Ingekomen: 16.01.96

een veel groter deel van deze patiënten verhoogd. Bij 5 van de 11 patiënten met acute afstotingsverschijnselen na een levertransplantatie steeg het plasma GSTA1-1-gehalte één dag eerder dan de ASAT activiteit. Zwangere vrouwen met ernstige pre-eclampsie hadden vaak verhoogde plasma ALAT, ASAT en GSTA1-1-niveaus maar de stijging van GSTA1-1 was in alle gevallen meer uitgesproken. Bij twee zwangere vrouwen met het HELLP syndroom (Haemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets) steeg het plasma GSTA1-1-gehalte enkele uren eerder dan ASAT en ALAT en de relatieve toename van GSTA1-1 was veel groter. Wij concluderen daarom dat meting van het plasma GSTA1-1-gehalte voordelen biedt ten opzichte van meting van de conventionele transaminasen bij acute, maar niet bij chronische leveraandoeningen.

*Trefwoorden: glutathion S-transferase Alfa; leverfunctie test; enzym immunoassay; monoclonaal antilichaam; referentielimieten*

Glutathion S-transferasen (GST's; EC 2.5.1.18) zijn enzymen die de nucleofiele additie van glutathion aan een groot aantal lichaamsvreemde verbindingen katalyseren. Deze zogenaamde fase-2 ontgiftingsreactie is de eerste stap naar de vorming van mercaptuurzuren, verbindingen die meestal minder giftig en beter wateroplosbaar zijn dan de uitgangsstof. Bovendien functioneren GST's ook als intra-cellulaire transporteiwitten voor slecht wateroplosbare verbindingen zoals bilirubine, galzouten, steroïd hormonen en een groot aantal lichaamsvreemde stoffen (1,2). Cytoplasmatische GST's vormen een familie van enzymen die op grond van structurele, fysisch-chemische, enzymatische en immunochemische eigenschappen wordt onderverdeeld in vier klassen: Alfa, Mu, Pi en Theta (3).

GST's bestaan uit dimeren van subeenheden van dezelfde klasse. Van de Alfa klasse zijn twee subeenheden bekend (GSTA1 en GSTA2) waarvoor wordt gecodeerd door verschillende genen (4,5). Beide subeenheden bestaan uit 221 aminozuren waarvan er 210 identiek zijn. Zowel de beide homodimeren (GSTA1-1 en GSTA2-2) als het heterodimeer (GSTA1-2) worden aangetroffen in de lever en zijn enzymatisch actief (5).

Meer dan 2% van het oplosbare eiwit in de lever bestaat uit GST-Alfa (6,7). In geen enkel ander orgaan komt een dergelijk hoge GST-Alfa-concentratie voor (6). Pericentrale hepatocyten bevatten meer GST-activiteit (8) en dus waarschijnlijk ook een hogere GST-Alfa-concentratie dan periportale hepatocyten. De bekende leverenzymen aspartaat-aminotransferase (ASAT, EC 2.6.1.1) en alanine-aminotransferase (ALAT, EC 2.6.1.2) zijn voornamelijk periportaal gelokaliseerd (9). De combinatie van een relatief lage molecuulmassa (52 kD) en een hoge cytoplasmatische concentratie leidt ertoe dat GST-Alfa bij leverschade snel en in grote hoeveelheden in het bloed terecht komt. Bovendien is de halfwaardetijd van GST-Alfa in bloed slechts  $\pm 1$  uur (10), waardoor de plasma GST-Alfa waarde een potentieel betere para-

meter is voor acute leverschade dan ASAT of ALAT met halfwaardetijden in bloed van respectievelijk  $\pm 17$  en  $\pm 47$  uur (9).

Pogingen om de GST-Alfa-activiteit in plasma te meten (11) slaagden slechts gedeeltelijk omdat gevoelige isoenzym-specifieke substraten niet beschikbaar zijn. In de literatuur zijn een aantal radioimmunoassays beschreven (12-15). De toepassing van radioactief gelabeld GST-Alfa, dat slechts enkele weken bruikbaar is, maakt dit soort bepalingen minder geschikt voor routine gebruik. Recent zijn een drietal enzym immunoassays voor plasma GST-Alfa gepubliceerd (16-18) maar geen van deze bepalingen is in de klinische praktijk toegepast. Sinds enige tijd is een commerciële sandwich ELISA voor GST-Alfa beschikbaar (Hepkit; Biotrin, Dublin, Ierland; ref. 19) waarmee een tweetal klinische studies zijn uitgevoerd (20, 21).

Een aantal klinische studies is uitgevoerd m.b.v. de GSTA1-specifieke radioimmunoassay ontwikkeld door Beckett en Hayes (15, 22). Deze auteurs toonden aan dat de plasma GST-Alfa waarde een betere parameter is dan ALAT voor het vaststellen van leverschade na alcoholconsumptie (23), halothaan-anesthesie (24), thyrotoxicosis (25), of paracetamolvergiftiging (26). Bovendien laten hun resultaten zien dat ook bij chronische leveraandoeningen zoals chronisch actieve hepatitis (27) en alcoholische cirrose (28) plasma-GSTA1 minstens even gevoelig is voor het detecteren van leverschade als ALAT.

Alle bovengenoemde bepalingen zijn echter gebaseerd op polyclonale antisera en de kruisreactiviteit van deze antisera met GSTA1-1, GSTA2-2 en GSTA1-2 kan sterk variëren (29). De onderlinge verhouding van deze drie GST-Alfa-isoenzymen kan per individu sterk verschillen (5). Wij hebben daarom ELISA's opgezet op basis van een door ons zelf ontwikkeld GSTA1-1-specifiek monoclonaal antilichaam. Met die bepalingen werden referentielimieten voor GSTA1-1 vastgesteld en werden GSTA1-1-spiegels gemeten in plasmamonsters van patiënten met diverse gastrointestinale aandoeningen.

## MATERIALEN en METHODEN

### Sandwich ELISA

De bepaling van GSTA1-1 werd uitgevoerd zoals recent beschreven (30). In het kort: standaarden en monsters werden geïncubeerd in de putjes van polystyreen microtiter platen, die waren gecoat met een GSTA1-1-specifiek monoclonaal antilichaam. Detectie van het gebonden GSTA1-1 vond plaats door de platen te incuberen met konijn-anti-humaan GST-Alfa-antiserum gevolgd door peroxidase-gelabeld varken-anti-konijn immunoglobuline. De detectielimiet (laagste standaard met een signaal boven het gemiddelde van 5 blanco's in duplo + 3 standaard afwijkingen) van deze bepaling was  $0,04 \mu\text{g/l}$ . Kruisreactiviteit met GSTA1-2 en GSTA2-2 was respectievelijk 7% en 0,1% Kruisreactie met GST-Pi en GST-Mu was minder dan 0,1%. Recovery van aan plasma toegevoegd GSTA1-1 was gemiddeld 94%. Verdunningen van plasma monsters waren parallel aan de

standaardcurve. De gemiddelde binnen- en tussen-bepalings variatie bedroeg respectievelijk 2,5% en 7,3%. Vijf keer invriezen/ontdooien had geen effect op de gemeten plasma GSTA1-1-waarden.

### Patiënten en controles

Bloed werd afgenomen in K<sub>3</sub>EDTA bevattende buizen (Becton Dickinson, Grenoble, Frankrijk). Referentielimieten werden berekend op grond van plasma monsters van 350 bloeddonoren van de Rode Kruis Bloedbank te Nijmegen. Patiënten met chronische darmontstekingen (n=210), gastrointestinale tumoren (n=70), functionele buikklachten (n=31), of chronisch pancreatitis (n=11) en vrouwen in het derde trimester van een ongecompliceerde zwangerschap (n=71) fungeerden als patiënten-controle-populaties.

In het Academisch Ziekenhuis Leiden werd bloed afgenomen bij patiënten met alcoholische levercirrose (ALC: 24 monsters van 24 patiënten), primaire biliëre cirrose (PBC: 150 monsters van 30 patiënten), primaire scleroserende cholangitis (PSC: 26 monsters van 5 patiënten) en chronische hepatitis B (HepB: 79 monsters van 30 patiënten). Mediane tijd tussen bloedafname bij dezelfde patiënt was 7 maanden.

Van 24 patiënten die een levertransplantatie ondergingen in het Academisch Ziekenhuis Dijkzicht te Rotterdam werd, voor zover beschikbaar, 1 monster/dag vanaf dag 1 t/m dag 20 na de transplantatie retrospectief geanalyseerd. In totaal waren van deze transplantatie-patiënten 362 plasma monsters beschikbaar.

Van 21 zwangere vrouwen (mediane zwangerschapsduur 30 weken, spreiding 26-39 weken) met ernstige pré-eclampsie (diastolische bloeddruk > 100 mm Hg, proteïnurie van > 500 mg/dag) die werden opgeno-

men in het Academisch Ziekenhuis St. Radboud, Nijmegen werd een plasma monster geanalyseerd. Acht van deze vrouwen hadden het HELLP syndroom volgens de criteria van Sibai (31) ontwikkeld. Bovendien werden twee zwangeren met het HELLP syndroom gedurende ongeveer 10 dagen na opname vervolgd.

### Diversen

Het eiwitgehalte in zuivere GST-fracties werd bepaald m.b.v. de Bradford eiwitbepaling zoals gemodificeerd door Biorad (Biorad, Munchen, Duitsland) met een runder serum albumine standaardlijn.

Plasma ASAT- en ALAT-activiteit werd gemeten m.b.v. de routine bepaling op de klinisch-chemische laboratoria van de betreffende ziekenhuizen.

Resultaten zijn weergegeven als mediane waarde (spreiding). De significantie van verschillen werd berekend met "Wilcoxon's matched pairs signed rank test". Indien meer dan twee groepen werden vergeleken werd eerst een Kruskal-Wallis analyse uitgevoerd. Statistische berekeningen werden uitgevoerd m.b.v. SPSS/PC+ V 5.01 computer software.

## RESULTATEN en DISCUSSIE

### Bepalingen

De gevoeligheid van de sandwich ELISA (0,04 µg/l) was vergelijkbaar met eerder gepubliceerde bepalingen voor GST-Alfa (12-18, 22). Daardoor konden ook plasma monsters met zeer lage GSTA1-1-gehalten betrouwbaar worden gemeten (30). Alle andere immunoassays voor GST-Alfa, ook de commerciële Hepkit, zijn echter gebaseerd op polyclonale antisera. Beckett en Hayes (29) hebben erop gewezen dat deze polyclonale antisera sterk variëren in hun kruisreactiviteit met GSTA1-1, GSTA1-2 en GSTA2-2. Omdat de verhoudingen tussen deze GST-Alfa-isoenzymen grote intra-individuele verschillen vertonen (5) is het belangrijk om te werken met antilichamen die slechts één isotype herkennen. Bovendien kunnen er problemen ontstaan met de stabiliteit van deze ELISA's omdat de benodigde hoge affiniteits-antilichamen steeds weer opnieuw moeten worden geïsoleerd uit verschillende polyclonale antisera. De specificiteit van onze bepaling wordt verkregen door het gebruik van zeer specifiek monoclonale antilichamen, die in grote hoeveelheden en met identieke eigenschappen kunnen worden geproduceerd.

### Referentielimieten

De plasma GSTA1-1-concentraties in 350 gezonde controles waren niet normaal verdeeld, maar na een log-transformatie werd een vrijwel normale verdeling verkregen. Op die logaritmische schaal werd een gemiddelde waarde van 1,54 µg/l en referentielimieten (gemiddelde ± 2 standaard afwijkingen) van 0,41 en 5,89 µg/l berekend (tabel 1). Beckett et al. (25) beschreven referentielimieten die waren gebaseerd op de meting van GSTA1 in 175 gezonde controles, maar verdere informatie ontbreekt. De referentielimieten van de commerciële Hepkit waren gebaseerd op plasmamonsters van 219 bloeddonoren met een

**Tabel 1.** Plasma glutathion S-transferase A1-1 (GSTA1-1) concentraties in µg/l in gezonde controles onderverdeeld naar leeftijd en geslacht. Het gemiddelde en het referentie-interval (gemiddelde ± 2 standaard deviaties) werden berekend aan de hand van log-getransformeerde data en daarna teruggetransformeerd.

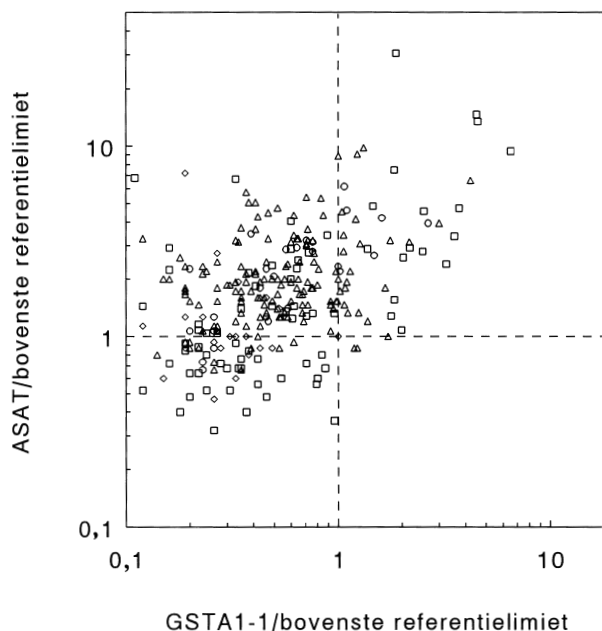
Leeftijdsgroep	Mannen	Vrouwen	Allemaal
20-40 jaar	1,71 (0,44-6,61)	1,12 (0,36-3,60) <sup>a</sup>	1,36 (0,36-5,04) <sup>f</sup>
N	70	83	153
40-60 jaar	2,12 (0,61-8,28)	1,26 (0,33-4,73) <sup>b</sup>	1,65 (0,42-6,50)
N	62	57	118
>60 jaar	1,69 (0,54-6,03)	1,98 (0,47-8,20) <sup>c</sup>	1,81 (0,50-6,55)
N	44	33	77
Alle leeftijden	1,84 (0,50-6,52)	1,29 (0,34-4,90) <sup>d,e</sup>	1,54 (0,41-5,89) <sup>e</sup>
N	175	175	350

a: P<0,0001 vs. mannen 20-40 jaar; b: P<0,0001 vs. mannen 40-60 jaar; c: P<0,01 vs. vrouwen 20-40 en P<0,05 vs. vrouwen 40-60 jaar; d: P<0,0001 vs. mannen, alle leeftijden; e: leeftijd van twee vrouwen was niet bekend; f: P<0,01 vs. beide sexen 40-60 jaar en P<0,01 vs. beide sexen >60 jaar.

leeftijd van 18 tot en met 65 jaar maar ook daar werden geen verdere details vermeld (19). Tiainen en Kahri (18) maten sera van 48 gezonde mannen en 48 gezonde vrouwen en zij beschreven dat de verdeling van de plasma GST-Alfa-concentraties in deze groep pas normaal werd na een log-transformatie. Zij waren ook de eersten, die rapporteerden dat de plasma GST-Alfa-concentratie bij mannen significant hoger was dan bij vrouwen. Onze resultaten met een veel grotere controle-groep bevestigden deze bevinding (tabel 1). Vrouwen in de leeftijdsgroepen 20-40 en 40-60 jaren hadden significant lagere plasma GSTA1-1-waarden dan mannen in die leeftijdsgroepen. Bij vrouwen, maar niet bij mannen, steeg het plasma GSTA1-1-gehalte met de leeftijd. Boven de 60 jaar hadden mannen en vrouwen vergelijkbare plasma GSTA1-1-waarden. Omdat er geen aanwijzingen werden gevonden voor een verhoogde levercelschade bij oudere vrouwen (ALAT en ASAT activiteit zijn vergelijkbaar bij de verschillende leeftijdscategorieën, zie ref. 32) veronderstellen wij dat de hogere plasma GSTA1-1-waarden bij oudere vrouwen het gevolg zijn van toegenomen GSTA1-1-concentraties in de lever, mogelijk onder invloed van hormonale veranderingen die gepaard gaan met de menopauze.

Onze bovenste referentielimiet (5,89 µg/l GSTA1-1) ligt zeer dicht in de buurt van de 4,0 µg/l GSTA1 die Beckett et al. (25) opgaven. Ook de bovenste referentielimiet voor totaal GST-Alfa van Tiainen en Kahri (18) (6,0 µg/l bij vrouwen en 14,0 µg/l bij mannen) en die van de commerciële Hepkit (11,4 µg/l) (19) liggen in dezelfde orde van grootte. Deze goede overeenstemming tussen de verschillende bovenste referentielimieten is opmerkelijk omdat er geen internationale standaarden voor GST's beschikbaar zijn.

Bij patiënten met gastrointestinale afwijkingen die niet gepaard gaan met leverschade vonden wij vergelijkbare plasma GSTA1-1-niveaus als bij gezonde controles (tabel 2). Alleen patiënten met chronisch inflammatoir darmlijden hadden een significant lagere plasma GSTA1-1-concentratie, maar die lage waarde werd zeer waarschijnlijk veroorzaakt door een oververtegenwoordiging van jonge vrouwen (35% jonger dan 40 jaar).



**Figuur 1.** Plasma glutathion S-transferase A1-1 (GSTA1-1) concentratie en aspartaat- aminotransferase (ASAT) activiteit gedeeld door de bovenste referentielimiet in patiënten met diverse chronische leveraandoeningen. Onderbroken lijnen geven de bovenste referentielimiet aan;  $\Delta$ : primaire biliare cirrose;  $\circ$ : primaire scleroserende cholangitis;  $\diamond$ : alcoholische levercirrose;  $\square$ : chronische hepatitis B.

### Chronische leverafwijkingen

Van de monsters van patiënten met PBC (n=150), PSC (n=26), HepB (n=79) en ALC (n=24) bevatten respectievelijk 22 (17%), 7 (27%), 17 (22%) en 1 (4%) een verhoogde GSTA1-1-concentratie. Hoewel dus in slechts 17% van de monsters van patiënten met PBC verhoogde GSTA1-1-waarden werden gevonden, is de verdeling binnen het normale gebied duidelijk anders dan bij gezonde controles (interquartiele range 2,08-4,60 µg/l vergeleken met 0,96-2,32 µg/l voor gezonde controles). In alle vier de groepen met chronische leveraandoeningen kwamen verhogingen in plasma ASAT activiteit zeer frequent voor (respectievelijk in 89%, 88%, 57% and 42% van de monsters van patiënten met PBC, PSC, HepB en ALC). Slechts

**Tabel 2.** Plasma glutathion S-transferase A1-1 (GSTA1-1) waarden in gezonde controles en in patiënten met diverse gastrointestinale aandoeningen niet gerelateerd aan levercelschade

Diagnose	Aantal monsters	GSTA1-1 (µg/l) mediaan (spreiding)	Significantie vs. gezonde controles	Aantal monsters boven de bovenste referentielimiet (%)
Gezonde controles	350	1,52 (0,16-9,12)	–	11 (3,1%)
Functionele buikklasten	31	1,28 (0,24-5,52)	NS	0
Chronisch inflammatoir darmlijden	210	1,28 (0,16-29,76)	P<0,02	10 (4,8%)
Gastro-intestinale tumor	70	1,52 (0,40-10,4)	NS	3 (4,3%)
Chronische pancreatitis	11	1,20 (0,56-8,08)	NS	2 (18%)

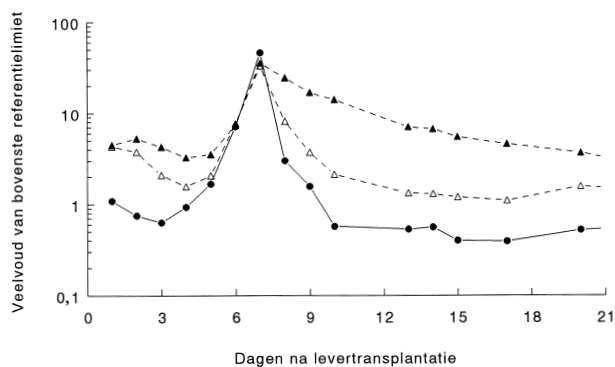
incidenteel was de GSTA1-1-waarde verhoogd bij een normale ASAT activiteit terwijl het omgekeerde zeer frequent voorkwam (figuur 1).

In tegenstelling tot onze resultaten hadden 52% van de patiënten met ALC in de studie van Beckett et al. (28) een verhoogd plasma GSTA1-gehalte. In beide studies hadden ongeveer de helft van de patiënten verhoogde ASAT-waarden waardoor een groot verschil in de mate van levercelschade dus niet voor de hand ligt. Ook in twee oudere studies werden verhoogde GST-Alfa concentraties in bloed van patiënten met levercirrose gemeld (12, 16). Sherman et al. (14) rapporteerden echter normale GST-Alfa-niveaus in een groep van 20 patiënten met ALC. De verschillen tussen de bovengenoemde studies worden vermoedelijk veroorzaakt door de gehanteerde referentielimieten. De bovenste referentielimieten zoals die gebruikt werden in de verschillende studies bedroegen 5,3 (12), 12,0 (14), 2,34 (16), en 4,0 µg/l GST-Alfa (28). Deze waarden waren gebaseerd op respectievelijk 12, 34, 15 en 64 controles. Bovendien werd in geen van de genoemde artikelen de verdeling van GST-Alfa binnen de controle groep beschreven. De gegevens van Tiainen en Kahri (18) en die van ons lieten zien dat de GST-Alfa en GSTA1-1-waarden pas normaal verdeeld waren na een logaritmische transformatie. Dit resulteerde in een hogere bovenste referentielimiet waardoor het aantal patiënten met verhoogde plasma GST-Alfa- en GSTA1-1-waarden sterk afnam.

## Acute leverafwijkingen

### Levertransplantatie

In totaal 24 patiënten werden vervolgd na een levertransplantatie. Alle 18 patiënten waarvan plasma monsters van dag 1, 2 en 3 na transplantatie beschikbaar waren, hadden op dag 1 na levertransplantatie verhoogde ASAT-waarden. Slechts bij 15 van deze 18 patiënten werden tevens verhoogde GSTA1-1-spiegels gevonden. Bij deze 15 patiënten daalde GSTA1-1 significant sneller (mediane daling 74% per dag, spreiding 20-99%) dan ASAT (mediane daling 51% per dag, spreiding 2-94%) na het bereiken van de hoogste waarde ( $p < 0.02$ ) (33). Trull et al. (21) ver-



**Figuur 2.** Longitudinaal verloop van glutathion S-transferase A1-1 (GSTA1-1) concentratie en alanine-aminotransferase (ALAT) en aspartaat-aminotransferase (ASAT) activiteit na levertransplantatie. ●: GSTA1-1; △: ASAT; ▲: ALAT. Op dag 6 en dag 9 werd een afstotingsreactie histologisch bevestigd.

volgden GST-Alfa in bloed bij 58 levertransplantaties. Ook zij rapporteerden een significant snellere daling van GST-Alfa, zowel meteen na transplantatie alsook na behandeling van acute afstotingsreacties. Die snelle daling biedt in twee opzichten voordelen; niet alleen zal een vroege afstoting eerder kunnen worden opgemerkt maar ook kan beter worden vastgesteld wanneer behandeling van de afstoting succesvol is geweest.

In onze studie werden 11 levertransplantatie-patiënten behandeld vanwege acute afstoting. Acht afstotingen (73%) werden voorafgegaan door een stijging (minimaal een factor 2 boven de laatst-laagste waarde) van GSTA1-1, terwijl slechts bij respectievelijk 6 (55%) en 4 (36%) afstotingsreacties een stijging van ASAT en ALAT werd gevonden. Bovendien steeg GSTA1-1 bij 5 van deze 11 afstotingsepisodes tenminste een dag eerder dan ASAT (figuur 2).

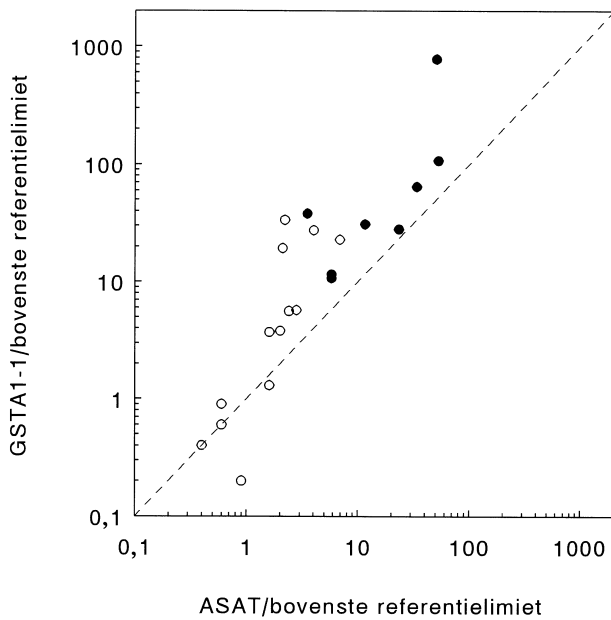
Trull et al. (21) rapporteerden 35 episodes van acute afstoting bij in totaal 58 levertransplantaties. Alle afstotingen werden voorafgegaan door een stijging van GST-Alfa, terwijl ALAT slechts bij 25 afstotingen (71%) steeg. In totaal werden maar liefst 169 van dergelijke plasma GST-Alfa-stijgingen waargenomen. In onze studie steeg GSTA1-1 in totaal 32 keer waarbij in 27 gevallen (84%) ook de ASAT waarde steeg. Een stijging van ASAT ging echter altijd gepaard met een stijging van GSTA1-1. Stijgingen in GSTA1-1 waren bovendien significant groter (mediaan 4 x, spreiding 2-73 x de laatst-laagste waarde) dan stijgingen in ASAT (mediaan 2 x, spreiding 1-21 x de laatst laagste waarde,  $P < 0.01$ ). Slechts 8 (25%) van deze GSTA1-1-stijgingen waren geassocieerd met een afstotingsreactie die aanleiding gaf tot behandeling.

Onze gegevens wijzen erop dat, in overeenstemming met de conclusie van Trull et al. (21), het plasma GST-Alfa-gehalte een zeer gevoelige maar weinig specifieke parameter is voor acute afstotingsreacties bij levertransplantatie patiënten. Waarschijnlijk veroorzaken een groot aantal andere factoren ook levercelschade (b.v. trombose, infectie, medicatie). Toch kan de vroege stijging van het plasma GSTA1-1-gehalte mogelijk van voordeel zijn bij de behandeling van levertransplantatie-patiënten.

### Pre-eclampsie en HELLP-syndroom

Pre-eclampsie en het HELLP-syndroom gaan beide gepaard met levercelschade (31). Bij 71 vrouwen in het derde trimester van een normale zwangerschap werd geen enkele verhoogde plasma GSTA1-1-waarde vastgesteld. Zeventien van de 22 vrouwen (77%) met ernstige pre-eclampsie hadden verhoogde plasma GSTA1-1-concentraties (mediaan 34 x bovenste referentielimiet, spreiding 1-780 x). Alle 17 vrouwen hadden weliswaar ook een verhoogde ASAT activiteit (mediaan 4 x bovenste referentielimiet, spreiding 2-53 x) maar de mediane stijging van GSTA1-1 was bijna een factor 10 hoger (figuur 3).

Twee vrouwen die het HELLP-syndroom ontwikkelden werden gedurende 10 dagen prospectief vervolgd (34). Bij beide was er sprake van een sterke stijging van het plasma GSTA1-1-gehalte gedurende periodes met pijn in de bovenbuik (figuur 4). GSTA1-1 steeg



**Figuur 3.** Plasma GSTA1-1 concentratie en aspartaat-aminotransferase (ASAT) activiteit bij zwangeren met ernstige pre-eclampsie of het HELLP syndroom (Haemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets). Stippellijn geeft aan waar beide waarden relatief even sterk verhoogd zijn (ASAT/bovenste referentielimiet = GSTA1-1/bovenste referentielimiet). ○: pre-eclampsie; ●: HELLP.

enkele uren voordat ASAT of ALAT begonnen te stijgen. Bij het bereiken van de piekwaarde was de relatieve stijging van GSTA1-1 een factor 10 tot 100 hoger dan de toename van ASAT of ALAT. Wanneer de pijn in de bovenbuik afnam, daalde het plasma GSTA1-1-gehalte bovendien sneller.

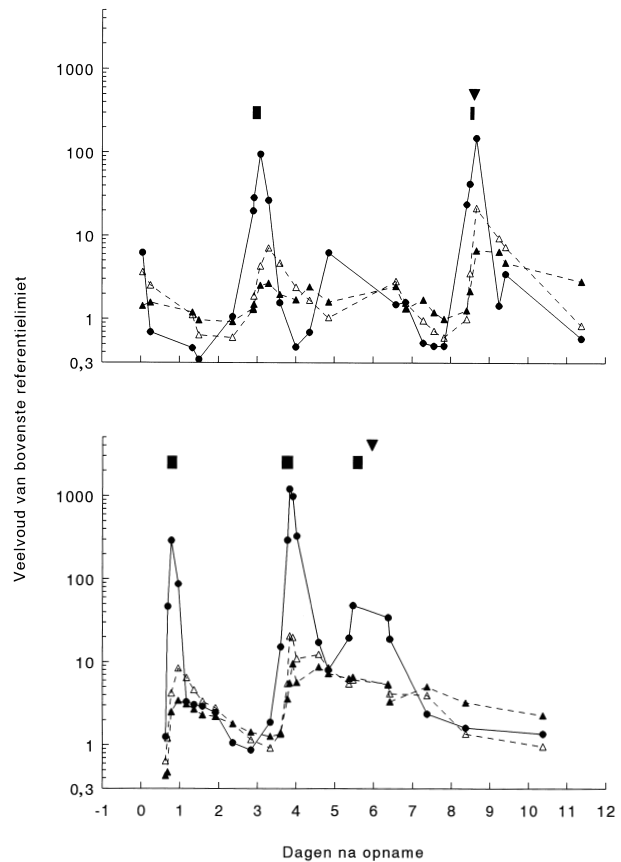
Het plasma GSTA1-1-patroon bij patiënten met het HELLP-syndroom lijkt sterk op dat van patiënten met een ernstige paracetamolvergiftiging (26, 29). Ook bij die patiënten is de stijging van GSTA1 meer uitgesproken dan de toename in ALAT. Bovendien treedt ook de stijging van GSTA1 eerder op en daalt het plasma GSTA1-gehalte veel sneller na succesvolle behandeling.

### Conclusie

GSTA1-1 lekt bij leverschade snel en in grote hoeveelheden naar het bloed. Door de relatief korte plasma halfwaardetijd worden bij chronische leveraandoeningen slechts zelden hoge GSTA1-1-plasma spiegels bereikt. Daardoor is de bepaling van het plasma GSTA1-1-gehalte minder geschikt voor het opsporen en monitoren van patiënten met chronische leveraandoeningen. Vergeleken met ASAT en ALAT heeft bepaling van GSTA1-1 echter duidelijke voordelen bij het vaststellen van actuele leverschade bij patiënten met acute leveraandoeningen.

Wij bedanken patiënten en bloeddonoren voor het afstaan van bloed en Dr. H. Olthuis en zijn medewerkers van De Rode Kruis Bloedbank Nijmegen en de medewerkers van de diverse (poli)klinieken voor het afnemen van de monsters.

Het werk werd mede mogelijk gemaakt door een subsidie van het Koningin Wilhelmina Fonds voor de kankerbestrijding (NUKC 92-33).



**Figuur 4.** Longitudinaal verloop van de plasma GSTA1-1 concentratie en de alanine-aminotransferase (ALAT) en aspartaat-aminotransferase (ASAT) activiteit bij 2 zwangeren (A en B) met het HELLP (Haemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets) syndroom. ●: plasma GSTA1-1; △: ASAT; ▲: ALAT; ▼: keizersnede; ■: Perioden met pijn in de bovenbuik.

### Literatuur

1. Boyer TD, Kenney WC. Preparation, characterization and properties of glutathione S-transferases. In: Zakim D and Vessey DV, eds. Biochemical pharmacology and toxicology, Volume 1. Wiley J and Sons, New York. 1985: 297-363.
2. Mannervik B. The isoenzymes of glutathione S-transferase. In: Meister A ed. Advances in enzymology, Volume 85. Wiley J and Sons, New York. 1985: 357-417.
3. Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, Di Ilio C, Ketterer B et al. Nomenclature for human glutathione S-transferases [letter]. Biochem J 1992; 282: 305-306.
4. Rhoads DM, Zarlengo RP, Tu C-PD. The basic glutathione S-transferases from human livers are products of separate genes. Biochem Biophys Res Commun 1987; 145: 474-487.
5. Hayes JD, Kerr LA, Cronshaw D. Evidence that glutathione S-transferases B<sub>1</sub>B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>B<sub>2</sub> are the products of separate genes and that their expression in human liver is subject to inter-individual variation. Biochem J 1989; 264: 437-45.
6. Corrigan AV, Kirsch RE. Glutathione S-transferase distribution and concentration in human organs. Biochem Int 1988; 16: 443-448.
7. Mulder TPJ, Roelofs HMJ, Peters WHM, Wagenmans MJM, Sier CFM, Verspaget HW. Glutathione S-transferases in liver metastases of colorectal cancer. A comparison with normal liver and primary carcinomas. Carcinogenesis 1994; 15: 2149-2153.

8. El Mouelhi M, Kauffman FC. Sublobular distribution of transferases and hydrolases associated with glucuronide, sulfate and glutathione conjugation in human liver. *Hepatology* 1986; 6: 450-456.
9. Price CP, Alberti KGMM. Biochemical assessment of liver functions. In: Wright R, Alberti KGMM, Karran S, Millward-Sadler GH, eds. *Liver and biliary diseases*. London: WB Saunders 1979: 381-416.
10. Beckett GJ, Dyson EH, Chapman BJ, Templeton AJ, Hayes JD. Plasma glutathione S-transferase measurement by radioimmunoassay: a sensitive index of hepatocellular damage in man. *Clin Chim Acta* 1985; 146: 11-19.
11. Adachi Y, Horii K, Takahashi Y, Tanihata M, Ohba Y, Yamamoto T. Serum glutathione S-transferase activity in liver diseases. *Clin Chim Acta* 1980; 106: 243-255.
12. Tsuru M, Kamisaka K, Hirano M, Kameda H. Quantification of human serum ligandin by radioimmunoassay. *Clin Chim Acta* 1978; 84: 251-253.
13. Ohmi N, Arias IM. Ligandinemia in primaire liver cell cancer in rat and man. *Hepatology* 1981; 1: 316-318.
14. Sherman M, Bass NM, Campbell JAH, Kirsch RE. Radioimmunoassay of human ligandin. *Hepatology* 1983; 3: 162-169.
15. Hayes JD, Gilligan D, Chapman BJ, Beckett GJ. Purification of human hepatic glutathione S-transferases and the development of a radioimmunoassay for their measurement in plasma. *Clin Chim Acta* 1983; 134: 102-121.
16. Hirano K, Miwa T, Adachi T, Sugiura M, Muto Y, Yamada M, Okuno F. Differential determination of cationic and anionic glutathione S-transferases by enzyme immunoassay. *J Pharm Dyn* 1984; 7: 204-211.
17. Hoa X-Y, Castro VM, Bergh J, Sundström B, Mannervik B. Isoenzyme specific quantitative immunoassays for cytosolic glutathione transferases and measurement of the enzymes in blood plasma from cancer patients and in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1225: 223-230.
18. Tiainen P, Karhi KK. Ultrasensitive time-resolved immunofluorometric assay of glutathione transferase Alpha in serum. *Clin Chem* 1994; 40: 184-189.
19. Rees GW, Trull AK, Doyle S. Evaluation of an enzyme-immunometric assay for serum  $\alpha$ -glutathione S-transferase. *Ann Clin Biochem* 1995; 32: 575-583.
20. Murray JM, Rowlands BJ, Trinick TR. Indocyanine green clearance and hepatic function during and after prolonged anaesthesia: comparison of halothane with isoflurane. *Br J Anaesth* 1992; 68: 168-171.
21. Trull AK, Facey SP, Rees GW, Wight DGD, Nobel-Jamieson G, Joughin C, et al. Serum  $\alpha$ -glutathione S-transferase - A sensitive marker of hepatocellular damage associated with acute liver allograft rejection. *Transplantation* 1994; 58: 1345-1351.
22. Beckett GJ, Hayes JD. Development of specific radioimmunoassays for the measurement of human hepatic basic and N/A2b glutathione S-transferase. *Clin Chim Acta* 1984; 141: 267-273.
23. Hayes PC, Hayes JD, Hussey AJ, Bouchier IAD, Beckett GJ. Changes in plasma glutathione S-transferase B<sub>1</sub> concentration after alcohol ingestion in man: a measure of hepatocellular sensitivity to chronic alcohol excess. *Clin Chem Enzyme Comms* 1990; 2: 189-194.
24. Allan LG, Hussey AJ, Howie J, Becket GJ, Smith AF, Hayes JD, Drummond GB. Hepatic glutathione S-transferase release after halothane anaesthesia: open randomized comparison with isoflurane. *Lancet* 1987; i: 771-774.
25. Beckett GJ, Kellett HA, Gow SM, Hussey AJ, Hayes JD, Toft AD. Raised plasma glutathione S-transferase values in hyperthyroidism and in hypothyroid patients receiving thyroxine replacement: evidence for hepatic damage. *Br Med J* 1985; 291: 427-431.
26. Beckett GJ, Chapman BJ, Dyson EH, Hayes JD. Plasma glutathione S-transferase measurement after paracetamol overdose: evidence of early hepatocellular damage. *Gut* 1985; 26: 26-31.
27. Hayes PC, Hussey AJ, Keating J, Bouchier IAD, Williams R, Beckett GJ, Hayes JD. Glutathione S-transferase levels in autoimmune chronic active hepatitis: a more sensitive index of hepatocellular damage than aspartate transaminase. *Clin Chim Acta* 1988; 172: 211-216.
28. Beckett GJ, Hayes PC, Hussey AJ, Bouchier IAD, Hayes JD. Plasma glutathione S-transferase measurements in patients with alcoholic cirrhosis. *Clin Chim Acta* 1987; 169: 85-90.
29. Beckett GJ, Hayes JD. Glutathione S-transferases: biomedical applications. *Adv Clin Chem* 1993; 30: 282-380.
30. Mulder TPJ, Peters WHM, Court DA, Jansen JBMJ. Sandwich ELISA for glutathione S-transferase Alpha-1: plasma levels in controls and in patients with gastrointestinal disorders. *Clin Chem* 1996; 42: 416-419.
31. Sibai BM. The HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets): much ado about nothing? *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 311-316.
32. Baadenhuijsen H, Smit JC. Indirect estimation of clinical chemical reference intervals from total hospital patient data: application of a modified Bhattacharya procedure. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23: 829-839.
33. Aparicio Pages MN, Mulder TPJ, Metselaar HJ, Peters WHM, Tilanus HW. Serum glutathione S-transferase Alpha concentrations following liver transplantation: Comparison with ASAT [abstract]. *Netherl J Med* 1995; 46: A33-A34.
34. Steegers EAP, Mulder TPJ, Bisseling JGA, Delemarre FMC, Peters, WHM. Glutathione S-transferase alpha as marker for hepatocellular damage in pre-eclampsia and HELLP syndrome [letter]. *Lancet* 1995; 345: 1571-1572.

---

## Summary

*Plasma glutathione S-transferase A1-1 as marker for hepatocellular damage. Mulder TPJ, Peters WHM, Steegers EAP and Jansen JBMJ. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 238-244.*

Class Alpha glutathione S-transferases (GST-Alpha) are found in high concentrations in human liver. Plasma levels of GSTA1-1, the most abundant isoform of GST-Alpha, may be a sensitive marker for hepatocellular damage. A sensitive and specific sandwich type ELISA for GSTA1-1 was developed. The distribution of plasma GSTA1-1 concentrations in controls was nearly normalized by logarithmical transformation. Healthy males had significantly higher plasma GSTA1-1 levels than females. In females, but not in males, a significant increase was noted with age. Patients with gastrointestinal disorders not associated with hepatocellular damage and patients with alcoholic liver cirrhosis had normal plasma GSTA1-1 levels. Patients with primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis or chronic hepatitis B had significantly elevated plasma GSTA1-1 levels, but ASAT activities were increased in a much higher proportion of the samples. Acute rejection was observed in 11 patients receiving a liver allograft and in 5 of these patients GSTA1-1 levels started rising one day in advance of ASAT levels. Pregnant women with severe pre-eclampsia often had elevated plasma ALAT, ASAT and GSTA1-1 levels but elevations in GSTA1-1 were always more prominent. In two pregnant women developing the HELLP syndrome (Haemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelets) rises in plasma GSTA1-1 levels preceded that of ASAT and ALAT by several hours and the relative magnitude of the abnormality of GSTA1-1 was much greater. It is concluded that monitoring of plasma GSTA1-1 offers advantages over conventional transaminase measurements as marker for hepatocellular damage in acute but not in chronic hepatic disorders. *Key-words: Glutathione S-transferase Alpha; liver function test; enzyme immunoassay; monoclonal antibody; reference value*