

α -Glutathione-S-transferasi del siero e danno epatico da alcool

Gabriella Candelieri, Luciano Marchetti, Laura Arcangeli*

Laboratorio analisi chimico-cliniche e microbiologiche, Ospedale G. Salvini, Garbagnate Milanese (MI)

*Laboratorio analisi chimico-cliniche e microbiologiche, Ospedale Caduti Bollatesi, Bollate (MI)

ABSTRACT

Serum α -glutathione-S-transferase and alcoholic liver damage

The analytical performance of an enzyme immunoassay for the measurement of serum α -glutathione-S-transferase (α -GST), and the predictive value of the test and its usefulness in the differential diagnosis between virus induced and alcohol induced chronic active hepatitis, have been evaluated. Serum samples were obtained from 180 patients, including alcohol drinkers with liver disease, non drinkers patients with liver disease, drinkers patients without liver disease, and healthy subjects. The α -GST assay, whose reagents were obtained as a kit, was highly practicable, repeatable and reproducible; the test showed good specificity (95%) but low sensitivity (46-47%). Its a good marker for active liver damage, with significantly higher values in patients with chronic active hepatitis in comparison to those with liver cirrhosis. It is also a good marker of viral chronic active hepatitis in comparison to alcohol induced hepatitis.

RIASSUNTO

Viene valutata l'attendibilità analitica di una metodica immunochimica per la misura della α -glutathione-S-transferasi (α -GST), il suo valore predittivo e l'utilità nella diagnosi differenziale tra epatite cronica attiva da virus e da abuso di alcool. Sono stati analizzati campioni ottenuti da 180 soggetti comprendenti epatopatici etilisti, epatopatici non etilisti, etilisti non epatopatici e soggetti sani. Il metodo, i cui reattivi sono disponibili sotto forma di kit, è di facile esecuzione, dotato di buona ripetibilità e riproducibilità, di elevata specificità (95%) ma di bassa sensibilità 46-47%. L'esame costituisce un indice di danno epatico attivo, con valori significativamente più elevati nei soggetti con epatite cronica attiva rispetto a quelli con cirrosi, e rappresenta un indicatore eziologico di epatite cronica attiva da virus rispetto a quella da alcool.

INTRODUZIONE

L'abuso alcolico causa una patologia progressiva che interessa in modo particolare il fegato (1), dove sono localizzate le vie ossidative dell'etanolo (2,3): qui si formano i prodotti di ossidazione dell'etanolo (acetaldeide, idrogeno e radicali liberi), maggiori responsabili del danno epatico (1).

Si ritiene che il consumo giornaliero di una quantità di etanolo superiore a 80 g nell'uomo e 40 g nella donna per un periodo prolungato, determini l'insorgenza di manifestazioni di epatopatia alcolica, evidenziabile da variazioni di aspartato (AST) e di alanina aminotrasferasi (ALT), fosfatasi alcalina, proteine totali, e γ -glutammina-transferasi (GGT) del siero (1). Altri esami utili alla diagnosi di abuso alcolico sono la determinazione dell'etanolo e della transferrina carboidrato carente (CDT) del siero, nonché della glutathione-S-transferasi (GST, EC 2.5.1.18), enzima che partecipa alla detossicazione e protezione delle cellule dall'azione dei perossidi (4), catalizzando la reazione di coniugazione del glutathione con molecole elettrofile (esogene ed endogene) (5).

La GST è conosciuta anche con il nome di ligandina. Possiede infatti la capacità di legare alcune molecole

mediandone il trasporto dal plasma all'epatocita e da un compartimento epatocellulare all'altro. La GST ha emivita plasmatica di circa 90 minuti (6) e massa molecolare di 50 Kd; ne esistono tre forme che si differenziano per il punto isoelettrico (4): α -GST (punto isoelettrico basico, nell'intervallo 9.0-7.3); Mu-GST (punto isoelettrico neutro, nell'intervallo 6.5-5.5); Pi-GST (punto isoelettrico acido, nell'intervallo 5.3-4.5). Il fegato contiene in modo predominante la forma basica o α -GST (7).

Scopo di questo lavoro è la valutazione analitica di una metodica immunochimica per la misura della α -GST, nonché la valutazione del suo valore predittivo dell' α -GST, per confronto con quello di altri parametri del danno epatico, e della sua utilità nella diagnosi differenziale tra epatite cronica attiva da virus e cirrosi epatica e epatite da abuso di alcool.

MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati 180 campioni di siero di soggetti (135 epatopatici e 45 normali) la cui diagnosi era stabilita sulla base del quadro clinico e della biopsia e/o ecografia epatica. I pazienti sono stati suddivisi in quattro gruppi:

Alcolisti attivi senza segni clinici e biochimici di danno epatico (epatopatia minima).

1) Alcolisti attivi con evidenti segni clinici e biochimici di danno epatico.

2) Non alcolisti con diagnosi bioptica (prove di funzionalità epatica alterate).

3) Soggetti sani, con assenza di segni clinici e biochimici di danno epatico

Sono state eseguite le seguenti determinazioni: ammino transferasi (AST e ALT), fosfatasi alcalina, proteine totali, bilirubina, γ -glutamyl transpeptidasi, glutatione transferasi e marcatori virali.

Tutti gli esami sono stati eseguiti nella mattina del prelievo, eccetto le misure della α -GST, effettuate su aliquote di sieri congelati.

Per la misura dell' α -GST è stato utilizzato il kit "HEP-KIT ALPHA" della ditta BIOTRIN, basato su un metodo immunoenzimatico a sandwich su micropiastra, utilizzando un anticorpo monoclonale.

Per ogni seduta analitica viene allestita una curva di calibrazione (a sei punti) e analizzato un controllo positivo. Le concentrazioni dei campioni vengono interpolate su una curva di calibrazione assorbanza/concentrazione, tenendo conto del fattore di diluizione del siero.

Le caratteristiche dichiarate riportate del metodo sono: valori di riferimento fino a 7.5 μ g/L; sensibilità: 0.25 μ g/L; linearità fino a 40 μ g/L. I campioni sono considerati stabili per 2-3 giorni a 4°C. e fino a 9 mesi se congelati.

Per la valutazione dell'imprecisione sono state utilizzate due miscele di sieri preparati in laboratorio (a valori di α -GST rispettivamente normale ed elevato), analizzati 20 volte nella medesima seduta (imprecisione entro la serie), e quattro volte nella stessa serie per quattro giorni consecutivi (imprecisione tra la serie).

Per la valutazione della linearità sono state analizzate, in un'unica seduta, miscele di due sieri con differenti rapporti di diluizione.

Tabella 1

Imprecisione analitica nella misura di α GST del siero, a due valori di concentrazione

| Materiale | Nella serie | | | Tra le serie | | |
|-----------|--------------------|-----------------------------|--------|--------------------|-----------------------------|--------|
| | Numero di repliche | Media \pm DS (μ g/L) | CV (%) | Numero di repliche | Media \pm DS (μ g/L) | CV (%) |
| Miscela A | 20 | 6,7 \pm 0,3 | 3,2 | 16 | 6,9 \pm 0,4 | 4,6 |
| Miscela B | 20 | 30,0 \pm 2,2 | 7,5 | 16 | 30,8 \pm 0,7 | 9,7 |

Tabella 2

Prova di recupero effettuata su un siero a concentrazione di 5.5mg/L cui sono stati aggiunti volumi crescenti di calibratore

| Volume aggiunto (μ g/L) | Concentrazione misurata (μ g/L) | Recupero (%) |
|------------------------------|--------------------------------------|--------------|
| 20 | 23,8 | 91,5 |
| 10 | 14,6 | 91 |
| 5,0 | 9,5 | 90 |
| 2,5 | 7,8 | 92 |
| 1,25 | 6,6 | 88 |
| | | Media 90,5 |

Per la prova di recupero è stato utilizzato un siero a concentrazione (misurata) di 5,5 μ g/L, cui venivano aggiunti volumi misurati dei calibratori.

La stabilità dei sieri è stata verificata utilizzando un siero a concentrazione di 20 μ g/L, aliquotato e conservato a -20 C° ed analizzato in doppio, ad intervalli regolari, durante un periodo di 50 settimane.

Il materiale di controllo, rappresentato da un siero fornito dalla ditta Biotrin, avente concentrazione media di 9.7 e intervallo di accettabilità da 7.7 a 11.6 μ g/L, è stato analizzato in duplicato per ogni seduta analitica, per un periodo di un anno circa.

L'elaborazione statistica è stata effettuata mediante test non parametrici, con l'utilizzo della regressione lineare, e la elaborazione di curve ROC.

RISULTATI

Precisione

Nella tabella 1 sono riportati i valori medi, la deviazione standard ed i coefficienti di variazione ottenuti per le due miscele come descritto.

Prove di linearità

Dai dati sperimentali è stata ricavata la retta di regressione lineare: $y=2.6x-6$; $R^2=0.9935$, dove la variabile indipendente è costituita dai valori di concentrazione misurati (in μ g/L) e la variabile dipendente dal rapporto di diluizione.

Prove di recupero

I risultati ottenuti mostrano recuperi che variano dall'88% al 92% e un recupero medio del 90,5% (tabella 2).

Prove di stabilità dei campioni

Dalle analisi effettuate in doppio sulle aliquote del siero conservato a -20C° si evidenzia una stabilità dell'analita

entro trenta settimane.

Controllo di Qualità interno

I risultati ottenuti in 30 determinazioni effettuate su di un controllo a concentrazione nota sono stati i seguenti: valore medio: 10.25 µg/L; DS.: 0.87 µg/L; CV%: 0.54%.

Valutazione clinica

La figura I riporta le distribuzioni dell'αGST nei quattro gruppi di soggetti analizzati. I valori di concentrazione degli epatopatici (etilisti e non) sono decisamente più elevati rispetto agli altri due gruppi.

La significatività nelle differenze tra i valori mediani nei tre gruppi nei confronti con i soggetti sani è stata verificata con il test di Wilcoxon per campioni indipendenti.

Mediante analisi della regressione lineare dei valori assunti dagli altri indici di danno epatico (AST, ALT, Proteine totali, Bilirubina, GGT, Fosfatasi alcalina) sui valori di GST nei quattro gruppi, risultano correlazioni statisticamente significative per l'ALT e l'AST nei gruppi degli epatopatici non etilisti ($r=0.39$ $p=0.05$ per AST, $r=0.577$ $p<0.001$ per ALT) e degli epatopatici etilisti ($r=0.53$ $p<0.001$, per AST $r=0.65$ $p<0.001$ per ALT).

Sono stati successivamente raggruppati i valori relativi ai soggetti con epatite cronica attiva (di origine alcolica e virale) e con cirrosi epatica.

I valori di concentrazione di αGST nei due gruppi (epatite e cirrosi) sono riportati nella figura II; la significatività delle differenze tra i valori mediani nei tre gruppi di soggetti è stata verificata con il test di Wilcoxon per cam-

pioni indipendenti (figura II).

Sono stati isolati i soggetti relativi ai casi di epatite attiva, suddividendoli a loro volta in due gruppi: affetti da epatite di origine virale e affetti da epatite alcolica.

Le dispersioni dei valori di concentrazione di αGST dei 2 gruppi sono state riportate nella figura III.

La significatività delle differenze tra i valori mediani di α-GST nei due gruppi e la significatività delle differenze fra i valori mediani di AST e ALT è stata verificata con il test di Wilcoxon per campioni indipendenti (tabella 3).

Per l'elaborazione della curva ROC si è utilizzato come riferimento il gruppo dei soggetti sani; il cut-off utilizzato è stato di 7.5 µg/L.

CONCLUSIONI

L'imprecisione analitica nella serie e tra la serie a due livelli di concentrazione (uno normale e uno patologico) è risultata contenuta ed i CV% ottenuti (tabella 1) sono comparabili a quelli riportati in letteratura (17), utilizzando lo stesso metodo immunoenzimatico ELISA.

La retta di regressione relativa alla valutazione della linearità del metodo analitico ha fornito un buon risultato ($R^2=0.993$), considerando che l'analisi è stata effettuata con tecnica manuale.

I risultati ottenuti dalla misura del materiale di controllo sono nei limiti di accettabilità, rientrando ampiamente entro le 2 D.S. rispetto al valore medio; la variabilità risulta quindi contenuta a conferma dell'accuratezza del metodo.

L'esame mostra una buona specificità ricavata utilizzando come riferimento il gruppo dei soggetti sani (95%)

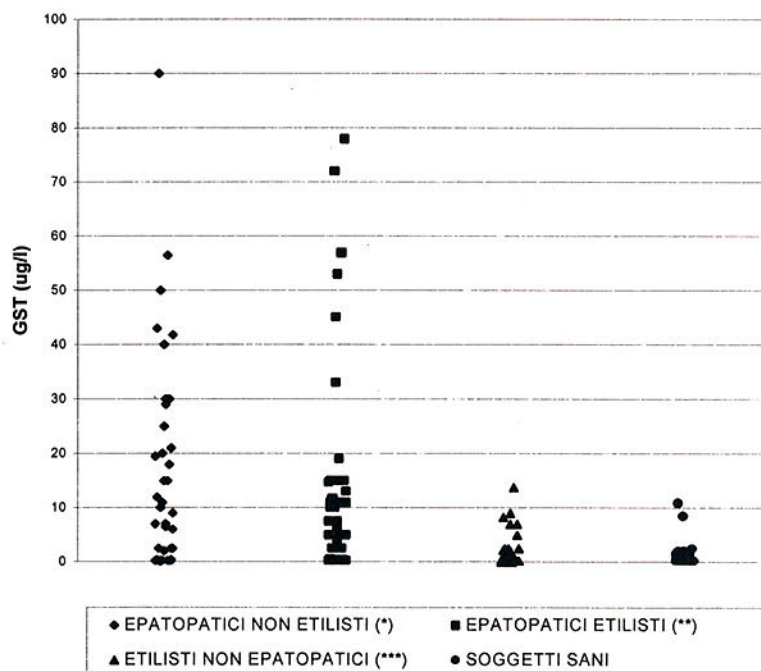


Figura I

Valori di GST osservati nei quattro gruppi di campioni considerati. Significatività delle differenze con il gruppo "soggetti sani": (*) $p=0.004$; (**) $p=0.0016$; (***) $p=0.013$

Tabella 3Valori di α -GST, AST e ALT del siero in due gruppi di epatite cronica attiva di differente eziologia

| Eziologia | α -GST (mg/L) | | AST (U/L) | | ALT (U/L) | |
|-----------|----------------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
| | Mediana | Intervallo | Mediana | Intervallo | Mediana | Intervallo |
| Virale | 30* | 10-90 | 107* | 31-335 | 141\$ | 62-622 |
| Alcolica | 11* | 2-53 | 78# | 25-282 | 68\$ | 37-327 |

Significatività delle differenze (test di Wilcoxon per dati indipendenti): (*) P = 0,001; (#) P = 0,480; (\$) P = 0,04

sono stati rilevati valori medi significativamente più alti rispetto al gruppo di soggetti con epatite alcolica.

Questo conferma la specificità dell' α GST come indicatore di necrosi epatocellulare, anche in virtù del fatto che l' α GST non ha mostrato alcuna correlazione con gli altri indici di protidosintesi e di colestasi.

Confrontando i soggetti con epatite alcolica e virale verso i soggetti con cirrosi, emerge una differenza evidente (figura III). Questa differenza, confermata dall'elaborazione con il test di Wilcoxon ($p < 0.001$), dimostra che l'utilità dell'esame dell' α -GST è legata soprattutto al suo uso come indice di danno epatico attivo rispetto a quello da involuzione cirrotica come rilevato anche da Sherman et al.

Dalla rappresentazione grafica della curva ROC riguardante tre parametri: α GST, ALT e GGT si evidenzia un innalzamento della sensibilità e specificità dell' α GST quando si analizzano i dati relativi ai soli casi di epatite (sia virale sia alcolica) rispetto alla stessa se riferita ai soli soggetti epatopatici (figure IV e V).

Nella suddivisione dei soggetti epatitici cronici in due

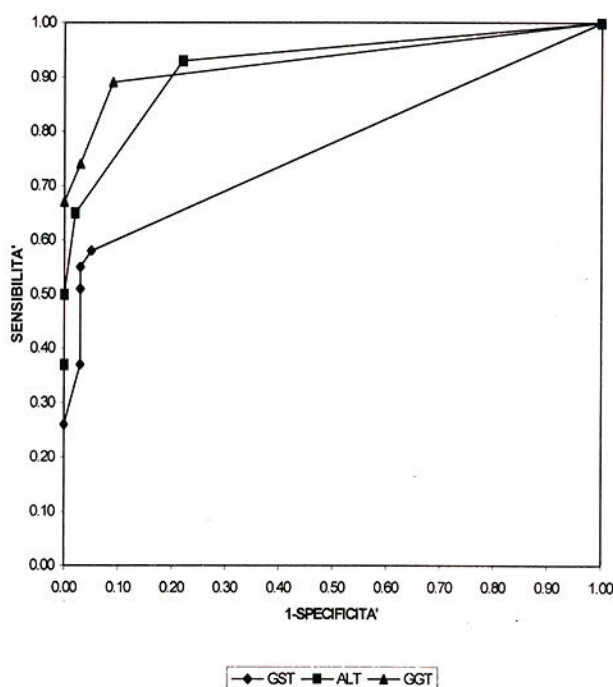
sottogruppi, epatite attiva da virus ed epatite alcolica, si evidenzia una differenza statisticamente significativa ($p < 0.001$) per l' α GST.

Dal confronto dell'attività dell'ALT e AST di tali sottogruppi risultano valori di $p = 0.004$ per l'ALT e non significativo per l'AST. Per questo l' α GST si dimostra indicatore eziologico di epatite cronica attiva da virus sicuramente più valido rispetto all'AST che non supera il limite della significatività statistica; e, come rilevato anche da altri autori, mostra migliore correlazione con il danno istologico rispetto ad AST e ALT (9,11,13,14,17,20).

Questo aspetto è probabilmente dovuto alla breve emivita di questo enzima (1,5h contro le 24h dell'AST) che riflette meglio una condizione di danno epatico da attiva replicazione virale rispetto alle transaminasi, così come dimostrato anche dall'elevazione nel corso di epatite acuta.

La rapidissima clearance della α GST è stata dimostrata ampiamente da Y. Adachi et al. (19), essa sembra dovuta soprattutto all'attività renale.

L' α GST invece non si dimostra un utile indice di danno

**Figura IV**

Curva ROC relativa ai soggetti epatopatici etilisti in confronto ai soggetti sani

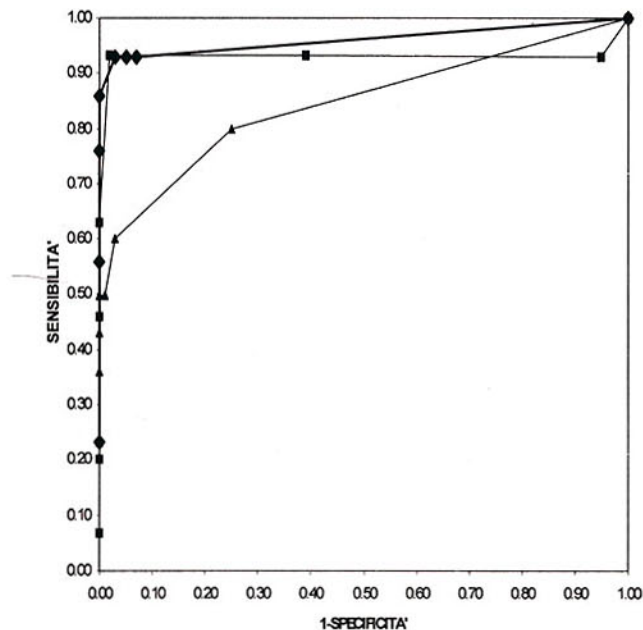


Figura V
Curva ROC relativa ai soggetti con epatite virale ed alcolica in confronto ai soggetti sani

lieve provocato da ingestione da alcool nel caso di soggetti con danno epatico minimo. Dalla comparazione dei dati relativi al gruppo dei soggetti etilisti non epatopatici rispetto ai soggetti sani risulta una differenza ai limiti della significatività statistica, ma non può essere presa in considerazione a causa della sovrapposizione dei dati dei due gruppi.

Quindi la misura dell' α -GST potrebbe essere un indice della suscettibilità del fegato ai danni provocati dall'ingestione di alcool. Questo potrebbe suggerire che negli alcolisti cronici anche l'ingestione di una quantità moderata di alcool possa causare un danno subacuto al fegato.

Studi effettuati su campioni più specifici potrebbero rivelarsi utili a stabilire se il dosaggio dell' α -GST presenti ulteriori vantaggi rispetto ai metodi tradizionali di rilevazione del danno epatico di lieve entità indotto dall'alcool.

In conclusione i risultati ottenuti dai dati analizzati in questo lavoro provano che la misura della concentrazione dell' α -GST nel siero è utile per l'inquadramento clinico di diverse forme acute di danno epatico e fornisce informazioni circa la predisposizione al danno epatico indotto dall'alcool (11).

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Prof. Andrea Mosca per la preziosa collaborazione che ci ha fornito.

BIBLIOGRAFIA

1. Fiaccadori F, Carrara GC, Calzetti C, Elia GF, et al. L'Epatopatia da alcool. *Biochim Clin* 1992; 16: 885-9.
2. Okolicsanyi L, Nassuato G. Aspetti metabolici del danno epatico da alcool. *Biochim Clin* 1992; 16: 881-4.
3. Corti A, Lavalli P. Alcool e metabolismo energetico. *Biochim clin* 1992;16: 822-7.
4. Hayes JDJD, Kerr LA, Cronshaw D. Evidence that Glutathione S-Trasferases B1B2 and B2b2 the products of separate genes and that their expression in human liver is subject to inter-individual variation. *Biochem J* 1989; 264: 437-45.
5. Tianen P, Karhi KK. Ultrasensitive time-resolved immunofluorometric assay of Glutathione transferase Alpha in serum. *Clin Chem* 1994; 40: 184-9.
6. Beckett GJ, Hayes CP, Hussey A, Bouchier AD et al. Plasma glutathione S-trasferase measurements in patients with alcoholic cirrhosis. *Chim Acta* 1987;169: 85-90.
7. Harrison DJ, May L, Hayes PC, Hacquin MM et al. Glutathione S-trasferase in alcoholic liver disease *Pathology* 1983; 3: 909-12.
8. Hayes PC, May L, Hayes JD, Harrison DJ. Glutathione S-trasferases in human liver cancer. *Gut* 1991, 32: 1546-9.
9. Mulder TPJ, Court D, Peters WHM. Variability of Glutathione S-Trasferase a in Human Liver and Plasma. *Chim Chem* 1999; 45: 355-9.
10. Mulder TPJ, Peters WHM, Court D, Jansen JBMJ. Sandwich ELISA for glutathione S-trasferase Alpha 1-1: plasma concentrations in controls and in patients with gastrointestinal disorders. *Chim Chem* 1996; 42: 416-9.
11. Riche PJ, Skowronski L, Abraham P, Leuzinger Y. Blood Glutathione concentrations in a large-scale human study. *Chim Chem*1996; 42: 64-97.
12. Adachi Y, Horii K, Takahashi Y, Tanihata M. et al. Serum Glutathione S-Trasferase activity in liver diseases. *Chim.Acta* 1980 ;106:243-55.
13. Beckett GT, Hayes JD. Plasma Glutathione S-Trasferase and Liver Disease in Man-*Clin. Biochem Nutr* 1987; 2: 1-24.

14. Hayes PC, Hussey AJ, Keating J, Buochier IAD, et al. Glutathione S-transferase levels in autoimmune chronic active hepatitis: a more sensitive Index of hepatocellular damage than aspartate transaminase. *Clin Chim Acta* 1988; 172: 211-6.
15. Tsuru M, Kamisaka K, Hirano M, Kameda H. Quantification of Human Serum Ligandin by radio immunoassay. *Chim Acta* 1978; 84: 251-3.
16. Beckett GJ, Hayes JD. Development of specific radioimmunoassays for the measurement of human basic and N/A2b glutathione S-transferase. *Clin Chim Acta* 1984; 141: 267-73.
17. Sherman M, Bass NM, Campbell JAH, Kirsch RE. Radioimmunoassay of human ligand-Hepatology 1983; 3: 162-9.
18. Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, et al. Nomenclature for human glutathione s-transferases. *Letter Biochem J* 1992; 282: 305-6.
19. Thorburn D, Bird GLA, Spence E, MacSween RNM, et al. α -Glutathione S-transferase levels in chronic hepatitis C.infection and the effect of a-interferon therapy. *Chim Acta* 1996; 253: 171-80.
20. Hannover JB, Borth R, Boutwell H, Broughton MG. Raccomandazioni provvisorie sul controllo di qualità. *Chim Acta* 1975; 63:103-2° parte *Chim Acta* 69: 152-8.
21. Vaubourdolle M, Chazouilleres O, Briaudi, Legendre C, et al. Plasma α -Glutathione S-Trasferase Assessed as a Marker of Liver Damage in Patients with Chronic Hepatitis. *C Clin Chem* 1995; 41/12: 1716-9.
22. Beckett GJ, Hussey AJ, Laing I, Howie AF et al. Measurements of Glutathione S-transferase B1 in Plasma after Birt Asphyxia: an early indication of hepatocellular damage. *Chim Chem* 1989; 35/6: 995-9.
23. Giavarina D, Dorizzi MR. Analisi comparativa dei metodi: valutazione della concordanza clinica e limiti della regressione lineare. *Bioch Clin*1996, 20: 682-5.
24. Franzini M, Besozzi C. Impiego della regressione lineare nel confronto fra metodi:nuove tecniche statistiche parametriche e non parametriche. *Chim Clin*1986; 11: 29-41.
25. Passing H, Bablok A. New biometrical Procedure for testing the Equality Measurements from two different Analytical Methods. *Clin Chem Clin Biochem*1983;709-20.