

Università di Pisa



DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Applicata alla Biomedicina

Tesi di Laurea

**Caratterizzazione della γ -glutammina transferasi circolante
e delle relative frazioni durante il follow-up
post trapianto di fegato**

RELATORI

Dott.ssa Maria Franzini

Prof. Aldo Paolicchi

CANDIDATO

Mario Fantini

Anno Accademico 2013 - 2014

INDICE

Riassunto	5
Abstract	9
Capitolo 1: Introduzione	
1.1 Biochimica della γ -glutamyltransferasi	
1.1.1 Generalità, struttura e localizzazione	13
1.1.2 Espressione genica, biosintesi e processamento della GGT	15
1.1.3 Ruolo della glicosilazione nel processo autocatalitico della GGT umana	16
1.2 Meccanismo d'azione e principali substrati	18
1.3 Funzioni fisiologiche della GGT	
1.3.1 Ruolo antiossidante: sintesi del glutatione	20
1.3.2 Ruolo pro-ossidante	22
1.3.3 Metabolismo del nitrosoglutatione	24
1.3.4 Ruolo detossificante: formazione acidi mercapturici	24
1.3.5 Metabolismo dei leucotrieni	25
1.3.6 Escrezione degli acidi biliari	26
1.3.7 GGT e funzione simil-citochina	26
1.4 GGT plasmatica: caratteristiche strutturali e analitiche	
1.4.1 Variabili pre-analitiche	28
1.4.2 Dosaggio enzimatico per la GGT plasmatica	28
1.4.3 Valori di riferimento per la GGT plasmatica	29
1.4.4 Origine e caratteristiche chimico-fisiche della GGT sierica e delle relative frazioni	30
1.4.5 Metodo per lo studio delle frazioni della GGT sierica	33
1.5 Attività della GGT totale plasmatica e fegato	
1.5.1 Espressione della GGT epatica e attività della GGT plasmatica	38

1.5.2 Pathways molecolari di induzione della GGT	40
1.5.3 Effetti della deficienza della GGT	41
1.6 Associazioni epidemiologiche	
1.6.1 GGT totale e frazioni nel danno epatico	43
1.6.2 GGT totale e frazioni in alcolisti e astemi	44
1.6.3 GGT ed epatocarcinoma	45
1.6.4 GGT e cirrosi	46
1.6.5 Ruolo predittivo della GGT nel post trapianto di fegato	47
1.7 La GGT e la bile	49
Capitolo 2: Obiettivo della tesi	51
Capitolo 3: Materiali e metodi	
3.1 Reagenti	52
3.2 Raccolta campioni	52
3.3 Determinazione delle frazioni plasmatiche della GGT	52
3.4 Quantificazione dell'attività di GGT associata alle frazioni	55
Capitolo 4: Risultati	
4.1 Analisi dei cromatogrammi delle varie frazioni della GGT	57
4.2 Andamento della GGT nel follow up post trapianto di fegato	61
4.3 Correlazione tra frazioni di GGT biliare e plasmatica	66
4.4 Correlazione tra frazioni di GGT plasmatica e variabili cliniche	66
4.5 Correlazione tra frazioni di GGT biliare e variabili cliniche	67
Capitolo 5: Discussione dei risultati ottenuti	69
Capitolo 6: Conclusioni	74
Bibliografia	75

RIASSUNTO

La γ -glutamyltransferasi (GGT) è un enzima evolutivamente conservato, in grado di catalizzare specificamente la scissione del legame γ -glutamilico del glutatione (GSH) ed, inoltre, il trasferimento del gruppo γ -glutamile all'acqua ad amminoacidi o a peptidi (transpeptidazione). La GGT ha un ruolo centrale nel metabolismo del glutatione e nel ciclo del γ -glutamile, che comprende la sintesi e la degradazione del glutatione. L'enzima è localizzato sulla superficie esterna della membrana plasmatica e per tale motivo si ritiene che esso abbia un ruolo chiave nella captazione, da parte delle cellule, dei precursori per la sintesi del glutatione intracellulare. Il dosaggio della GGT, spesso richiesto negli esami di laboratorio di routine, è utilizzato nello screening e nel trattamento delle patologie del fegato e delle vie biliari, in quanto un suo innalzamento è stato osservato in vari disturbi, quali cirrosi, colestasi, steatosi, ma anche in epatopatie virali e in tumori primari e secondari. Le concentrazioni di GGT nel plasma sembrano dipendere principalmente dalla funzionalità del sistema epatobiliare, pur essendo l'enzima riscontrabile nelle membrane cellulari di moltissimi tessuti (tra cui rene, pancreas, milza, cuore); per tal motivo alti livelli di GGT nel sangue sono comunemente associati a tutte le malattie a carico del fegato e delle vie biliari. Nel 1981 Huseby e collaboratori hanno fornito una prova sull'origine prevalentemente epatica della GGT sierica, dimostrando nei loro studi l'identità di caratteristiche chimico-fisiche tra la GGT estratta dal fegato e la GGT sierica. Per quanto nessuno neghi l'importanza del dosaggio sierico della GGT, la sua rilevanza viene attenuata dal fatto che, pur essendo un test particolarmente sensibile, esso è scarsamente specifico, poiché diversi fattori sia genetici, sia ambientali, come ad esempio genere, età, ipertensione, colesterolemia, trigliceridemia, glicemia, impiego di contraccettivi orali, abitudini al fumo ed attività fisica, ne influenzano i valori.

In diversi studi è stata messa in evidenza l'eterogeneità della GGT sierica, difatti sono presenti diverse forme di GGT con caratteristiche chimico-fisiche diverse, non ancora ben definite. Nel laboratorio in cui sono state elaborate le procedure per ottenere i risultati utilizzati nella presente tesi, è stata messa a punto una tecnica che, tramite cromatografia per esclusione molecolare, permette di separare quattro frazioni di GGT plasmatica ed, in modo sensibile e selettivo, di rilevarne l'attività mediante una reazione enzimatica post-colonna. Sono stati identificati tre complessi ad alto peso molecolare dotati di attività enzimatica e sono stati denominati in base al rispettivo peso molecolare, pertanto si hanno le frazioni: big-GGT (b-GGT; 2000 KDa), medium-GGT (m-GGT; 940 KDa), small-GGT (s-GGT; 140

KDa); la quarta frazione identificata, free-GGT (f-GGT; 70 KDa), ha un peso molecolare compatibile con l'enzima libero. L'elaborazione della tecnica mira ad approfondire lo studio della natura dei complessi coinvolti nel trasporto della GGT nel plasma e nella bile. I dati ottenuti su plasma, relativi alle caratteristiche chimico-fisiche, alla suscettibilità a detergenti e all'azione proteolitica della papaina, fanno ipotizzare che la b-GGT possa essere inclusa in microvescicole di membrana (dette esosomi), che la m-GGT e la s-GGT presentino, invece, un comportamento compatibile con la presenza in micelle di acidi biliari, ed infine, che la f-GGT sia una forma solubile dell'enzima, priva del peptide idrofobico N-terminale.

Negli ultimi tempi è emerso che la ricerca e l'analisi delle frazioni della GGT costituiscono un utile biomarcatore per la diagnosi della steatosi epatica non-alcol correlata (NAFLD), in cui si riscontra un aumento di GGT sierica dovuta all'aumento della frazioni di b-GGT e in minor misura di s-GGT. La frazione s-GGT, invece, mostra un prominente incremento in soggetti affetti da epatocarcinoma (CHC) ed epatite virale (HCV), in questi ultimi non si registra un concomitante aumento significativo della frazione b-GGT, con conseguente diminuzione del rapporto b-GGT/s-GGT (b/s). La s-GGT sembra pertanto essere un buon biomarcatore di danno epatocellulare e colestatico, difatti è associata positivamente con le transaminasi AST e ALT, la bilirubina e la fosfatasi alcalina; per cui la frazione dell's-GGT e il rapporto b/s risultano essere altamente specifiche per la diagnosi differenziale tra NAFLD e CHC. In soggetti alcolisti sottoposti ad un periodo di astinenza, il rapporto b/s è stato un sensibile biomarcatore per il danno epatico persistente; in aggiunta, i livelli di m-GGT ed s-GGT sono rimasti costantemente elevati rispetto al valore di GGT totale e delle frazioni b-GGT e f-GGT. Pertanto, l'analisi delle singole frazioni può essere utilizzata per il monitoraggio di soggetti alcolisti in astinenza, rispetto ai valori di GGT totale. Ne consegue che la giusta interpretazione del valore prognostico ed anche del valore diagnostico di ciascuna frazione della GGT, possa migliorare ed anche facilitare la comprensione dei meccanismi patogenetici delle malattie associate all'incremento del suddetto enzima.

Il proposito di tale elaborato è lo studio delle frazioni di GGT in campioni di plasma, prelevato da pazienti sottoposti a trapianto ortotopico di fegato (OLT). I risultati ottenuti dall'analisi delle frazioni di GGT nei campioni di plasma, sono stati confrontati con i risultati dell'analisi delle frazioni di GGT in campioni di bile, appartenenti, sia i campioni di bile che di plasma, agli stessi pazienti sottoposti ad OLT. Nello stesso laboratorio, in tempi precedenti, sono state effettuate le analisi sui campioni di bile, prelevati dai pazienti nel post trapianto grazie ad un drenaggio (Tubo di Kehr) posizionato nel coledoco, con lo scopo di

facilitare contemporaneamente il deflusso della bile ed un'ottima cicatrizzazione del coledoco stesso in questi pazienti, pertanto, la raccolta dei campioni di bile è una procedura totalmente non invasiva. I campioni di bile e di plasma del nostro gruppo di pazienti sottoposti a OLT, sono stati prelevati, in corso di ricovero, nelle prime due settimane post operatorie, durante il follow-up precoce nel post trapianto di fegato.

Il periodo peri-operatorio nel trapianto di fegato è senza dubbio il momento più critico per la buona riuscita dell'intervento stesso. Le variabili che possono influire positivamente o negativamente sono molteplici e possono interagire tra loro in maniera non facilmente prevedibile. Dall'1 al 5% degli organi trapiantati sono soggetti a disfunzione primaria (Primary Non Function, PNF) e sino al 20% hanno una ripresa ritardata (Delayed Graft Function, GDF). Nel primo caso il decesso del ricevente è inevitabile in assenza di un ritrapianto, nel secondo il rischio di morbidità e mortalità è estremamente più elevato. Questi fenomeni sono frequentemente riconducibili a danni da ischemia e riperfusione dell'organo, processi inevitabili che avvengono durante le procedure di prelievo dell'organo dal donatore e nel successivo trapianto. Un monitoraggio attento della funzione d'organo nel periodo intra-, peri-, e post-operatorio è fondamentale per ottimizzare la ripresa del trapianto, permettendo di intervenire con tempestività e appropriatezza nelle diverse situazioni cliniche. L'analisi dei biomarcatori come indici di funzione epatica e delle frazioni di GGT si può ipotizzare possa contribuire a valutare il danno subito dall'organo trapiantato.

Le analisi effettuate mediante cromatografia per esclusione molecolare hanno dimostrato che il profilo di eluizione della GGT sierica risulta costante per le frazioni b-GGT ed f-GGT, mentre risulta variabile per le frazioni f-GGT ed s-GGT.

In questo elaborato sono stati utilizzati i campioni di plasma raccolti da pazienti sottoposti a OLT, i prelievi sono stati effettuati durante i primi 15 giorni post trapianto. I valori medi di GGT plasmatica totale nei primi 15 giorni presentano un'alta variabilità interindividuale con un picco al settimo giorno con un valore medio maggiore di 230U/L e successivamente tali valori tendono lentamente a diminuire. Anche per le frazioni b-GGT ed m-GGT possiamo notare un picco al settimo giorno, con successiva tendenza a diminuire nei giorni seguenti. Per le frazioni s-GGT ed f-GGT non è stato possibile delineare uno schema temporale che possa dare una visione d'insieme dell'andamento dell'attività media delle suddette frazioni nei primi 15 giorni post trapianto.

I risultati, derivanti dall'analisi dei suddetti campioni, sono stati confrontati con i risultati ottenuti dall'analisi di campioni di bile prelevati anch'essi nello stesso arco temporale ed anch'essi aventi come oggetto l'indagine delle varie frazioni di GGT,

dapprima osservando l'andamento di entrambe le forme, biliare e plasmatica, e dopo analizzando i valori medi mediante programma informatico. Non è presente correlazione tra gli andamenti della GGT biliare e plasmatica.

In conclusione, i dati raccolti dall'analisi delle frazioni plasmatiche di GGT, confrontati con i dati forniti dall'analisi delle frazioni biliari dell'enzima, in pazienti sottoposti a trapianto di fegato, sono stati incrociati con i dati emato-chimici di ogni paziente. L'analisi di correlazione ha mostrato correlazione significativa tra l'attività della GGT totale plasmatica e delle relative frazioni plasmatiche con la bilirubina totale, le frazioni b-GGT ed m-GGT con valore positivo, mentre per le frazioni s-GGT ed f-GGT con valore negativo. L'analisi ha mostrato ulteriore correlazione significativa con i valori di ALP per tutte le frazioni di GGT e con i valori relativi a monociti, eosinofili e basofili per le frazioni b-GGT ed m-GGT.

Non è emersa alcuna correlazione tra i valori di GGT totale biliare e i valori emato-chimici dei pazienti; tale risultato è stato ottenuto anche per l'analisi di correlazione tra i valori della frazione b-GGT e i valori emato-chimici dei pazienti.

Il lavoro svolto nella seguente tesi indica come il significato della GGT circolante non possa essere circoscritto solamente ad un ruolo di indicatore di danno epatico, ma i dati raccolti suggeriscono che lo studio sul suo significato diagnostico debba essere ampliato e l'analisi delle sue frazioni potrebbe essere un valido strumento per raggiungere tale obiettivo.

Abstract

The γ -glutamyltransferase (GGT) is an evolutionary conserved enzyme that specifically catalyses the cleavage of the γ -glutamyl bond of glutathione (GSH) and the transfer of the γ -glutamyl group to water (hydrolysis), amino acids, or peptides (transpeptidation). GGT has a central role in GSH metabolism and in the γ -glutamyl cycle, which includes synthesis and degradation of GSH. The enzyme is localized on the external surface of the plasma membrane and for this reason it is believed that it has a key-role in the uptake of precursors of intracellular glutathione synthesis. The determination of GGT activity is used in screening and treatment of diseases of the liver and biliary tract, as its elevation is observed in various disorders, such as cirrhosis, cholestasis, steatosis, but also in viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. Concentrations of GGT in plasma seem to depend primarily on the functionality of hepatobiliary system, although the enzyme found in the cell membranes of many tissues (including kidney, pancreas, spleen, heart); for this reason, high levels of GGT in the blood are commonly associated with all diseases of liver and biliary tract. Seric GGT is reported to have a mainly hepatic origin, as suggested by Huseby and coworkers' studies, carried out since 1981, in which it has been demonstrated that seric GGT shows the same chemical-physical features of that extracted from liver. As no one denies the importance of dosing serum GGT, its relevance is decreased by the fact that, despite being a very sensitive test, it is poorly specific, since various factors including genetic, and environmental, such as gender, age, hypertension, cholesterol, triglycerides, glucose, use of oral contraceptives, smoking habits and physical activity, influence values.

In different studies has been paid attention on the heterogeneity of the GGT serum, in fact there are several forms of GGT with different physico-chemical characteristics, not yet well defined. In the laboratory where this thesis was conducted, a new technique was performed, in order to separate four fractions of plasma GGT through molecular size exclusion chromatography, and to register a selective and sensitive activity through a post-column enzymatic reaction. Thus, three complexes have been identified – named big-GGT (b-GGT; PM=2000 kDa), medium-GGT (m-GGT; PM=940 kDa), small-GGT (s-GGT; PM=140 kDa) – with a molecular weight compatible with the free enzyme. The aim of this technique is to deepen the study of the nature of complexes which are responsible of the GGT transport in the plasma. Data reached up to now (chemical-physical features, susceptibility to detergents and papain proteolytic action) sustain three hypothesis: first, in b-GGT the protein could be included within micro-vesicles (esosomas); second, m-GGT and s-GGT should show a

behavior compatible with the presence of bile acids and GGT micelles; third, f-GGT should be made by a form of soluble GGT, without N-terminal hydrophobic peptide of heavy chain.

Recently showed that the research and analysis of the fractions of GGT is a good biomarker for the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which is characterized by an increase of total serum GGT, caused by the proportional increase of the fractions b and s-GGT. Unlike b-GGT, the s-GGT fraction shows a prominent increase in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and chronic viral hepatitis C (CHC); in the latter, however, a significant increase of the fraction b-GGT is not recorded. Thus, s-GGT seems to be a good biomarker of hepatocellular damage. For this reason, s-GGT and b/s ratio result to be highly specific for the differential diagnosis of both NAFLD and CHC. In alcoholic subjects, after a period of abstinence, the b/s ratio seemed to be a sensible biomarker of persistent hepatic damage; moreover, m-GGT and s-GGT levels always remained high, compared to both the total value of GGT and the b-GGT and f-GGT fractions. Thus, the analysis of the single fractions could be better than the total GGT, as a marker of alcohol abstinence monitoring. A right interpretation of both diagnostic and prognostic values in each GGT fraction could improve its use and help the pathogenesis of diseases connected to its increase.

The purpose of this laboratory is the study of fractions of GGT in plasma samples collected from patients undergoing liver transplantation. The results obtained from the analysis of the fractions of GGT in plasma samples, were compared with the results of the analysis of the fractions of GGT in samples of bile, belonging, both the samples of bile that of plasma, the same patients subjected to OLT. In the same laboratory, in earlier times, the analyzes were performed on the samples of bile, in patients subjected to liver transplant: during transplant, a drainage (Kehr Tube) is set in the patient's choledochus, for an easier bile flow and for a good healing of the bile duct. As a consequence, the collection of bile samples results as a totally non-invasive test. Samples of bile and plasma of our group of patients undergoing OLT were taken, in the course of hospitalization, the first two weeks post-operative, during follow-up in the early post-liver transplant.

The perioperative period in liver transplantation is undoubtedly the most critical for the success of the intervention. The variables that can affect positively or negatively are many and can interact with each other in a non-predictable. 1 to 5% of transplanted organs are subject to primary non-function, and up to 20% have a delayed function graphs. In the first case the death of the recipient is inevitable in the absence of a retransplantation, in accordance with the risk of morbidity and mortality is extremely higher. These phenomena

are frequently attributable to damage from ischemia and reperfusion of the organ, inevitable processes that occur during the sampling procedures and subsequent transplantation. Careful monitoring of organ function during intra-, peri- and post-operative is critical to optimize the recovery of the transplant, allowing to intervene promptly and appropriateness in different clinical situations. Analysis of biomarker as indices of liver function and the fractions of GGT can be expected to contribute to assessed the damage of the transplanted organ.

The analysis, based on molecular exclusion chromatography, showed that the elution profile of GGT is constant for the fractions b-GGT and f-GGT, while it is variable for the fractions s-GGT and m-GGT.

In this paper we used the plasma samples collected from patients undergoing OLT, withdrawals were made during the first 15 days post-transplant. The average values of GGT total plasma in the first 15 days have a high inter-individual variability with a peak on the seventh day with an average value greater than 230 U/L and subsequently these values tend to decline slowly. Even for the fractions m-GGT and b-GGT we see a peak on the seventh day, with a subsequent tendency to decrease in the following days. For fractions f-GGT and s-GGT was not possible to outline a timing pattern that would give an overview of the activity trend of these fractions in the first 15 days post-transplant.

The results, derived from the analysis of these samples were compared with the results obtained from the analysis of samples of bile also taken in the same period of time and also having as object the investigation of the virus fractions of GGT, first observing the performance of both forms, bile and plasma, and after analyzing the mean values averaged computer program. There is no correlation between the trends of GGT bile and plasma.

In the end, the data collected from the analysis of the fractions on plasma GGT, compared with the data provided by the analysis of the fractions biliary enzyme, in patients undergoing liver transplantation, were crossed with haematological data of each patient.

Correlation analysis showed significant correlation between the activity of GGT total plasma and plasma fractions relative to the total bilirubin, fractions b-GGT and m-GGT with a positive value, while for the fractions f-GGT and s-GGT with a negative value. The analysis further showed significant correlation with the values of ALP for all the fractions of GGT and with the values relating to monocytes, eosinophils and basophils for the fractions b-GGT and m-GGT.

There was no correlation between the values of GGT total biliary and values in haematological patients; this result was also obtained for analysis of correlation between the values of the fraction b-GGT and values in haematological patients.

The work carried out in the following scriptshows how the significance of circulating GGT can not be limited only to a role of indicator of liver damage, but the data suggest that the study on its diagnostic significance must be expanded and the analysis of its fractions could be a valuable tool to achieve this objective.

Capitolo 1: Introduzione

1.1 Biochimica della γ -glutamyltransferasi

1.1.1 Generalità, struttura e localizzazione

La γ -glutamyltransferasi (GGT) è un enzima largamente diffuso e conservato nel mondo vivente, difatti lo ritroviamo nei batteri (Suzuki et al., 1986; Okada et al., 2006), nelle piante (Martin et al., 2000) ed in tutto il Regno Animale. Conservato anche nei mammiferi, la GGT è una glicoproteina di membrana di tipo II, con struttura dimerica e sintetizzata da un unico propeptide (Curthoys et al., 1979) prima di raggiungere la membrana plasmatica (Barouki et al., 1984; Finidori et al., 1984). Il propeptide viene scisso in 2 subunità, una pesante (HSU 55-62 KDa, 380 amminoacidi) ed una leggera (LSU 20-30 KDa, 189 amminoacidi) tenute insieme da legami non covalenti. La subunità leggera presenta un dominio carbossi-terminale con attività catalitica, tale subunità è unita alla porzione pesante mediante interazioni elettrostatiche (Tate et al., 1981). La porzione ammino-terminale della catena pesante, invece, presenta un dominio idrofobico che consente l'inserzione dell'enzima sul lato esterno della membrana cellulare, in tal modo sia la subunità leggera che quella pesante risultano esposte nell'ambiente extracellulare (Finidori et al., 1984).

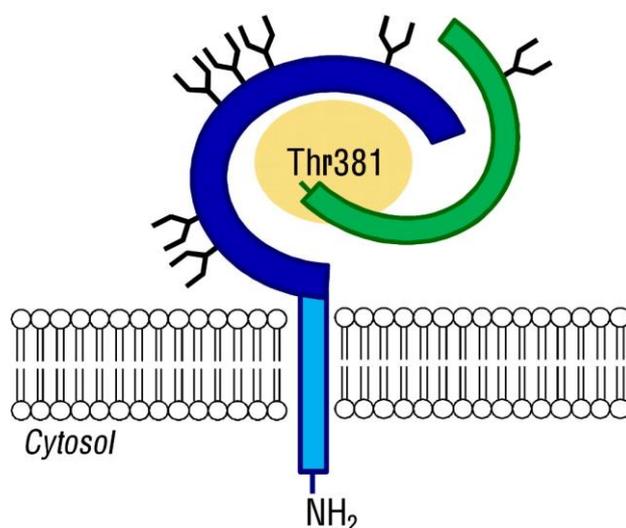


Figura 1.1 Rappresentazione schematica della GGT umana inserita nella membrana plasmatica.

L'enzima ha un ruolo centrale nel metabolismo del GSH e nel ciclo del γ -glutamile, che include la sintesi e la degradazione del glutatione (Meister et al., 1995). In questo tripeptide, l'acido glutammico e la cisteina sono legati da un particolare legame peptidico nel quale il gruppo carbossilico sul carbonio γ dell'acido glutammico lega il gruppo amminico sul

carbonio α della cisteina. Il legame γ -glutamilico rende il glutatione resistente alla peptidasi, ma non alla GGT, che è in grado di idrolizzare tale legame e di trasferire l'acido glutammico ad un altro accettore (amminoacido o dipeptide). Il GSH è il più abbondante substrato per la GGT, ma non è il solo: attualmente tutti i composti γ -glutamilici sono substrati per l'enzima, per esempio: GSH coniugato a xenobiotici, leucotriene C₄ (Withfield et al., 2001), S-nitrosoglutatione (Hogg et al., 1997).

L'enzima agisce su substrati extracellulari ed in condizioni denaturanti è stato dimostrato che la catena leggera può avere attività proteasica, acquisendo la capacità di digerire la catena pesante (Gardell et al., 1979). In vivo, comunque, tale attività proteasica pare essere mascherata dalla catena pesante.

Nei mammiferi, inoltre, è stata dimostrata la presenza della GGT sulla membrana di tutte le cellule, con localizzazione preferenziale nei tessuti correlati con attività secretorie e di assorbimento (Hanigan et al., 1996). Nel rene, in particolare, è stata osservata la più alta attività di GGT, con localizzazione sulla superficie luminale delle cellule del tubulo contorto prossimale, al contrario, le cellule del tubulo distale e dei glomeruli risultano essere prive dell'enzima.

Nel fegato, l'attività della GGT è presente a livello delle cellule epiteliali delle vie biliari extraepatiche e dei canalicoli epatici. Nel pancreas, invece, sono le cellule acinose a presentare la maggiore attività di GGT. Inoltre, anche altri tipi di cellule presentano attività di GGT, difatti possiamo trovarla nelle cellule delle ghiandole sudoripare, delle ghiandole sottomandibolari, dei dotti galattofori, dell'epitelio bronchiale, dell'epididimo, delle vescicole seminali ed anche della prostata.

L'attività della GGT è stata individuata anche sulla membrana e nei granuli intracitoplasmatici delle piastrine, sulla membrana dei granulociti e dei linfociti, il cui aumento di attività è considerato un marcatore di differenziazione e trasformazione neoplastica (Khalaf et al., 1987; Grisk et al., 1993; Sener et al., 2005). A livello celebrale, l'attività della GGT sembrerebbe contribuire alla funzionalità della barriera emato-encefalica, favorendo il metabolismo dei leucotrieni e la detossificazione degli xenobiotici (Zhang et al., 1997; Garcion et al., 1999).

L'attività della GGT è presente anche nel siero, probabilmente rilasciata dalle membrane cellulari dei parenchimi dei vari organi, riflettendo le modificazioni quantitative della produzione, del rilascio e della rimozione dell'enzima circolante (Huseby et al., 1993).

1.1.2 Espressione genica, biosintesi e processamento della GGT

La γ -glutamyltransferasi (GGT) risulta essere distribuita sia nel regno vegetale, sia nei batteri, sia in tutti i membri del regno animale, partendo dal nematode *Ascaris Suum* sino a giungere all'uomo: l'espressione genica riflette la complessa organizzazione tra le diverse specie ed in particolare nell'uomo, la variabilità fenotipica è funzione dell'organo d'origine e/o del tipo cellulare preso in considerazione (Chikhi et al., 1999)

Nel genoma umano si può ricondurre alla GGT una famiglia multigenica che include almeno sette geni (Courtay et al., 1994) mappati sul cromosoma 22 nella regione 22q11.1-q11.2 vicino ai loci BCR (breakpoint cluster region) e IG- λ (Bulle et al., 1987; Collins et al., 1997). Sequenze correlate, probabilmente pseudogeni, sono state identificate sui cromosomi 18, 19, 20 (Figlewicz et al., 1993). I cloni, rappresentanti tutti e sette i possibili geni, sono stati identificati in una libreria genomica umana costruita con DNA estratto da una linea cellulare di linfoblasti cariotipicamente normali. Questo ha escluso la possibilità che questi sette tipi di cloni genomici siano alleli di un singolo gene altamente polimorfico (Courtay et al., 1994). È molto probabile che i multipli geni umani per la GGT siano il prodotto di duplicazioni verificatisi nella regione 22q11 del DNA, regione instabile associata a difetti alla nascita (Scambler, 1993). Tra i geni della GGT duplicati, solo il gene di tipo I (*ggt1*) ha espressione ubiquitaria, dando origine ad una proteina completa e funzionale. Degli altri sei geni, almeno quattro sono trascritti in mRNA codificanti eventualmente per peptidi, in gran parte costituiti da subunità grandi o piccole, ma non è stata ancora identificata la relativa proteina (Courtay et al., 1994). Ad esclusione del gene di tipo I, sul quale è riposta la maggiore attenzione, i restanti geni non sono stati sino ad ora ben caratterizzati nella struttura e soprattutto nell'espressione.

Il gene *ggt1* comprende una sequenza di 32Kb e include venti esoni. Tra di essi, dodici codificano per la sequenza amminoacidica della GGT, con i primi sette codificanti per la subunità pesante, l'ottavo esone codificante per l'estremità carbossilica della subunità pesante e per l'estremità amminica della subunità leggera, mentre i rimanenti quattro esoni codificanti per la restante parte della subunità leggera. L'mRNA della GGT è trascritto in un unico polipeptide di 560 amminoacidi, la sequenza idrofobica all'estremità amminica consente alla proteina di essere traslocata nel lume del reticolo endoplasmatico, dove per un processo di autoidrolisi vengono generate le due subunità della GGT (Kinlough et al., 2005). Il processo autocatalitico è catalizzato dall'amminoacido treonina (Thr) che forma la nuova estremità N-terminale della subunità leggera e rappresenta l'amminoacido che favorisce la

scissione del legame ammidico situato tra il gruppo carbossile, in posizione γ dell'acido glutammico, e un'ammina (Inoue et al., 2000; Kinlough et al., 2005).

Una nuova super famiglia di proteine, raggruppate sotto il nome di “idrolasi nucleofilo N-terminale” (idrolasi-nNt), sono state individuate nel 1995 da Branningan e dai suoi collaboratori (Branningan et al., 1995). I membri di questa famiglia sono caratterizzati da una struttura $\alpha\beta\alpha$ del core nel sito catalitico e tutte le idrolasi nucleofilo N-terminale sono trascritte e tradotte in un unico propeptide convertito ad enzima attivo per proteolisi autocatalitica senza perdita di amminoacidi. Questo processo autocatalitico rende disponibile l'amminoacido nucleofilo N-terminale, tronina (Thr) o serina (Ser), che catalizza l'idrolisi del legame amminico. Appartengono a questa superfamiglia la penicillina G amilasi, il proteosoma, la glutammina PRPP amidotransferasi (GAT), l'aspartilglucosamidasi e l'L-amminopeptidasi-D-Ala-esterasi/amidasi (Oinonen et al., 2000).

La GGT appartiene anch'essa a questa superfamiglia per le sue diverse caratteristiche: dapprima, l'mRNA completo trascritto dal gene *ggt1* è tradotto in un unico propeptide, traslocato nel reticolo endoplasmatico dove per proteolisi si generano due subunità (Kinlough et al., 2005); il processo è autocatalitico e catalizzato dall'amminoacido Thr che costituisce la nuova estremità N-terminale. Tale amminoacido, così come quelli coinvolti nel legame enzima-substrato sono conservati nella sequenza della GGT in tutta la filogenesi (Okada et al., 2006; Kinlough et al., 2005; Boanca et al., 2006). Il processo di autocatalisi e il ruolo della Thr N-terminale della subunità leggera sono stati confermati per l'enzima di *Escherichia coli* (Inoue et al., 2000; Suzuki et al., 2002), del ratto (Kinlough et al., 2005), di *Helicobacter pylori* (Boanca et al., 2006) e dell'uomo (Inoue et al., 2000).

Inoltre, l'enzima GGT catalizza la scissione del legame ammidico presente tra il gruppo carbossile in posizione γ dell'acido glutammico e un'ammina (le caratteristiche catalitiche e le principali funzioni fisiologiche della GGT saranno discusse nei paragrafi successivi). Un'ulteriore caratteristica, che pone la GGT nella superfamiglia delle “idrolasi nucleofilo N-terminale” (idrolasi-nNt), è stata la scoperta, attraverso l'analisi strutturale del cristallo della proteina GGT purificata da *E.coli*, da *H.pylori* e dall'uomo, della composizione del suo core catalitico avente struttura $\alpha\beta\alpha$ (Okada et al., 2006; Boanca et al., 2006; West et al., 2013).

1.1.3 Ruolo della glicosilazione nel processo autocatalitico della GGT umana

La GGT presenta un pattern eterogeneo di glicosilazione che varia in modo tessuto-specifico, tuttavia il ruolo che l'N-glicosilazione svolge nel modulare la maturazione

funzionale e il comportamento cinetico dell'enzima deve essere tuttora pienamente accertato. Seguendo la sequenza primaria, la GGT umana possiede sette potenziali siti di glicosilazione (sequenza consenso Asn-X-Ser/Thr, X≠Pro): sei nella subunità pesante (Asn95, Asn120, Asn230, Asn266, Asn266, Asn297, Asn344) e uno nella subunità piccola (Asn511) (Sakamuro et al., 1988; Castonguay et al., 2007). È stato confermato che tutti questi siti siano glicosilati nel rene umano e nel tessuto epatico, ed è stata definita la struttura dei glicani per le GGT specifiche per questi due tessuti. È interessante notare che il fegato sintetizza una serie di N-glicani sul polipeptide GGT che sono completamente distinti da quelli sintetizzati dal rene (West et al., 2011).

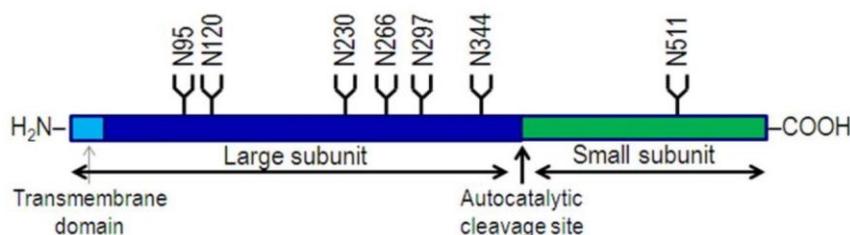


Figura 1.2 Rappresentazione schematica del propeptide della GGT umana e i suoi sette siti di N-glicosilazione. Sono indicati le posizioni del dominio transmembrana (TM), i siti consenso di N-glicosilazione (N) e il sito di clivaggio del propeptide.

Sebbene le variazioni delle caratteristiche compositive degli stessi glicani abbiano dimostrato una modulazione nella cinetica di reazione dell'eterodimero maturo, poco è noto per quanto riguarda l'impatto della glicosilazione sull'integrità strutturale e sul clivaggio autocatalitico dell'enzima nascente (Meredith 1991). Una prima intuizione si ha negli studi di West e collaboratori (2011) eseguiti su wild-type o sul gene umano mutato della GGT espresso nella linea cellulare HEK293 (human embryonic kidney). Gli Autori degli studi hanno dimostrato che la perdita di un singolo sito di N-glicosilazione è funzionalmente tollerata, anche se la mutazione Asn95Gln determina una marcata diminuzione dell'efficienza autoproteolitica del propeptide. Tuttavia, ciascuno dei singoli siti mutanti ha presentato una ridotta stabilità termica rispetto al wild-type GGT. Una mutagenesi combinata di tutti i siti di N-glicosilazione ha mostrato l'accumulo della forma inattiva del propeptide dell'enzima. Inoltre, è stato dimostrato che la glicosilazione co-traduzionale è l'evento critico che regola il corretto ripiegamento e la successiva scissione del propeptide nascente in enzima attivo. Infatti, la deglicosilazione enzimatica della forma matura del wild-type GGT non influisce sostanzialmente sia sul comportamento cinetico che sulla stabilità termica dell'enzima umano completamente processato (West et al., 2011).

1.2 Meccanismo d'azione della GGT e principali substrati fisiologici

La GGT, in particolare, catalizza la scissione del legame γ -glutamilico tra il gruppo carbossile in posizione γ dell'acido glutammico e un'ammina, ed il successivo trasferimento dell'acido glutammico su un accettore. La reazione catalizzata dalla GGT segue un meccanismo definito "a ping-pong" (Keillor et al., 2005): nello stadio di acilazione il gruppo γ -glutamilico della molecola substrato è trasferito sul gruppo OH della Thr N-terminale della catena leggera e così viene liberata l'ammina. L'intermedio acil-enzima lega una molecola accettore ed in seguito, nel successivo stadio di deacilazione, l'acido glutammico viene trasferito sul gruppo amminico dell'accettore con la formazione di un nuovo legame γ -glutamilico. Tale processo rappresenta una reazione di transpeptidazione.

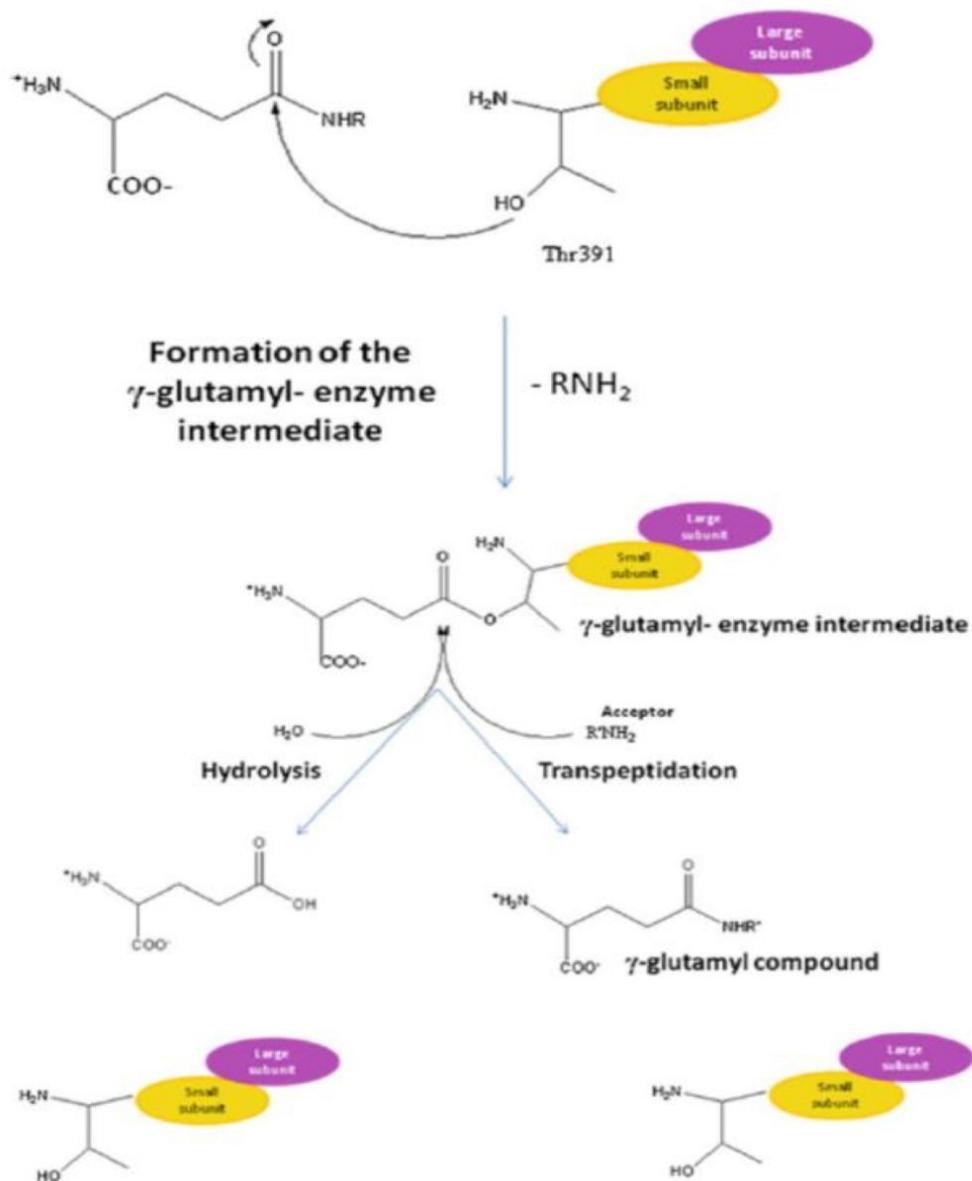


Figura 1.3 Meccanismo d'azione della GGT.

In mancanza di un accettore l'acil-enzima può reagire anche con una molecola di acqua con la liberazione di acido glutammico con una reazione di idrolisi. In questo genere di reazione la GGT è altamente specifica per il tipo di legame, mentre è aspecifica per il substrato, questo perché solo la posizione γ -glutamilica è critica per il legame con l'enzima GGT; pertanto, tutti i γ -glutamilcomposti sono possibili substrati per la GGT. I principali substrati fisiologici della GGT sono il glutatione o γ -glutamil-cisteinglicina (GSH), il leucotriene C4 (coniugato del GSH), i coniugati del glutatione prodotti dalla GSH-transferasi e il nitrosoglutatione. La GGT riconosce solo gli L-amminoacidi (Cis, Met, Gln, Glu) o i dipeptidi amminoacilglicina (CisGly, MetGly, GlnGly, CysGly, GlyGly) come molecola accettore.

1.3 Funzioni fisiologiche della GGT

Le funzioni fisiologiche, che vedono il coinvolgimento dell'enzima GGT, sono molteplici, come si vedrà nei paragrafi successivi.

1.3.1 Ruolo antiossidante: sintesi del glutathione

Il glutathione è profondamente coinvolto nel mantenimento del normale stato redox della cellula (Pompella et al., 2003). La stabilità della concentrazione intracellulare del glutathione è fondamentale per la sopravvivenza della cellula (Meister, 1995), poiché il GSH ha importanti funzioni biologiche, tra cui la coniugazione di composti elettrofili, le reazioni di interscambio tiolico e l'azione scavenger di radicali liberi. È inoltre cofattore di enzimi con funzione antiossidante, come la GSH-perossidasi, la deiscorbato reduttasi GSH-dipendente. Il glutathione è un tripeptide ubiquitario presente in piante, microrganismi ed in tutti i tessuti dei mammiferi. È composto da acido glutammico, cisteina e glicina (γ -glutamyl-cysteinyl-glicina); presenta tra i residui di acido glutammico e di cisteina un particolare tipo di legame, non si tratta di un normale legame peptidico, ma di un legame γ -glutamminico: difatti il gruppo carbossilico (-COOH) sul carbonio γ dell'acido glutammico è legato al gruppo amminico (-NH₂) sul carbonio α della cisteina.

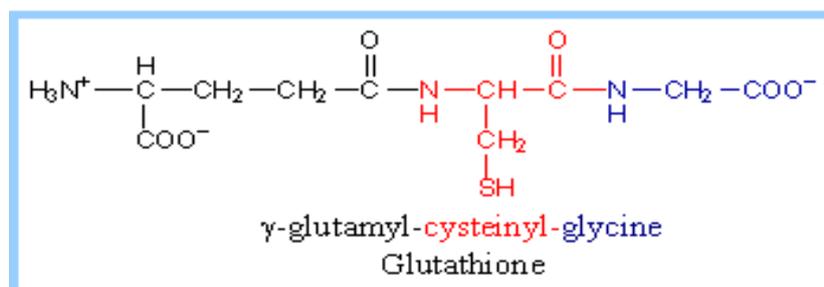


Figura 1.4 Rappresentazione della struttura del glutathione. Il GSH rappresenta circa l'80% dei tioli non proteici a basso peso molecolare presenti nella cellula ed è distribuito in tre compartimenti: il 90% circa è dislocato nel citosol, il 10% nei mitocondri ed una residua percentuale nel reticolo endoplasmatico (Lu 1999).

Il livello intracellulare di GSH dipende dall'equilibrio esistente tra il suo consumo e la sua sintesi, quest'ultima regolata dalla disponibilità dei tre amminoacidi precursori (Glu, Cys, Gly). La GGT catalizza la prima reazione della degradazione del GSH extracellulare, rendendo così possibile l'assorbimento separato dei tre amminoacidi costituenti da parte della cellula (ciclo del γ -glutamile).

L'enzima GGT trasporta il gruppo glutammico del glutatione su accettori amminoacidici o dipeptidi. In questa fase, i γ -glutamil-amminoacidi e i γ -glutamil-dipeptidi sono trasportati all'interno della cellula, dove diventano substrato dell'enzima γ -glutamil-ciclotransferasi che li divide nei corrispondenti amminoacidi e in 5-oxoprolina, che può essere trasformata in glutammato e utilizzata per la sintesi del glutatione intracellulare.

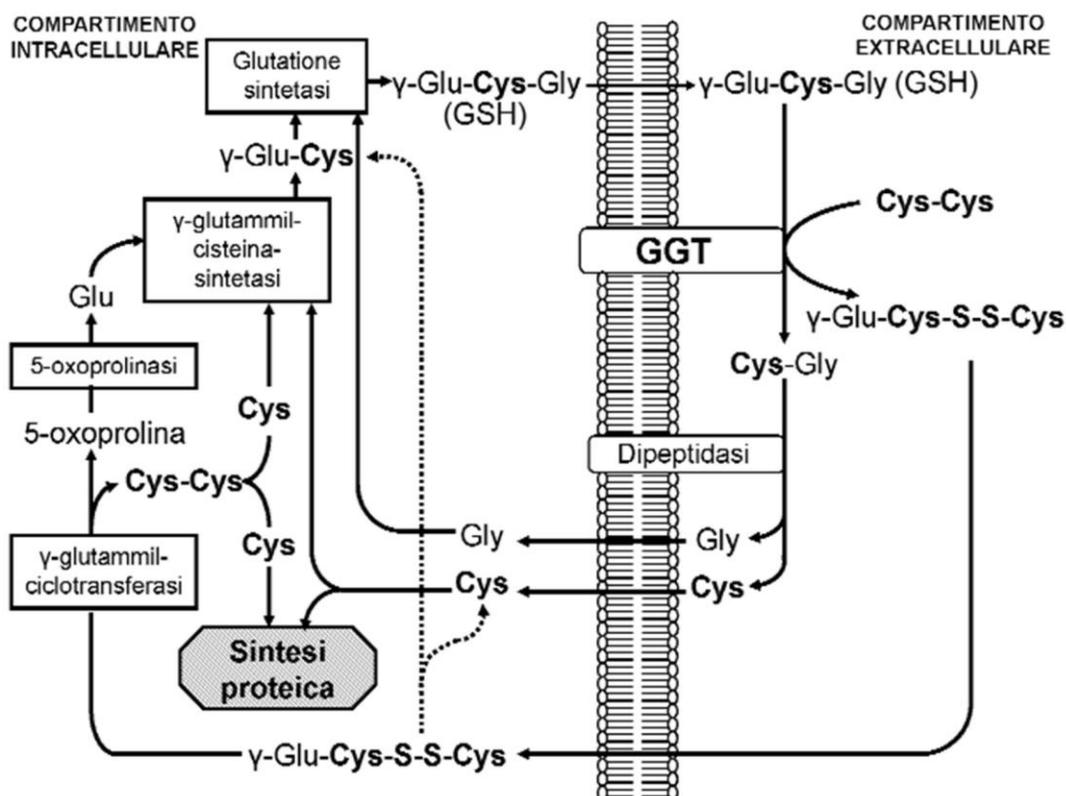


Figura 1.5 Ciclo γ -glutamile: degradazione del GSH extracellulare e sua re-sintesi intracellulare. La GGT promuove anche il recupero di Cys sia degradando GSH che usando L-Cis come accettore della reazione di transpeptidazione.

La reazione catalizzata dall'enzima GGT permette la liberazione del dipeptide cistenilglicina (Cys-Gly) che viene idrolizzato dalle dipeptidasi di membrana a cisteina (Cys) e glicina (Gly), le quali possono essere usate per la sintesi del glutatione dopo essere state trasportate all'interno delle cellule (Griffith et al., 1979; Tate et al., 1981). L'enzima γ -glutamilttransferasi avrebbe un ruolo protettivo nei confronti del danno ossidativo intracellulare (Hanigan et al., 1985; Hanigan 1998) poiché è considerato un enzima ancillare dei sistemi antiossidanti basati sul glutatione.

Un'altra fondamentale funzione del glutatione è rappresentata dallo stoccaggio e trasporto della cisteina (Cys), che sarebbe altamente instabile nell'ambiente extracellulare poiché si auto-ossiderebbe a cistina (Cis), favorendo la formazione di specie reattive

dell'ossigeno (Lu, 1999). La GGT permette quindi il recupero della cisteina degradando il glutatione a CysGly. La cistina, inoltre, è l'accettore migliore per la reazione di transpeptidazione, ma anche il tripeptide γ -GluCis contribuisce al recupero della cisteina (Lu 1999; Zhang et al., 2005).

La GGT agisce insieme ad altri enzimi di membrana capaci di idrolizzare il legame peptidico della CysGly nella funzione di recupero degli amminoacidi che costituiscono il glutatione o nella funzione di utilizzo dello stesso come sorgente di cisteina. Probabilmente le di peptidasi coinvolte sono l'amminopeptidasi-N (ApN, CD13) e la "membrane bound dipeptidase" (MBD). L'enzima ApN è specifico per la forma ridotta di CysGly, a sua volta inibitore della MBD, per la quale risulta essere un ottimo substrato la forma ossidata cistinil-bis-glicina (Kozak et al., 1982). Il tiolo appartenente alla CysGly ha un'alta reattività, pertanto è possibile che si ossidi velocemente a livello extracellulare, ragion per cui la MBD potrebbe avere un ruolo importante nel metabolismo del glutatione.

Sono stati effettuati degli studi sul topo (Habib et al., 1996) riguardanti la co-espressione tissutale della MDB e della GGT; sono stati individuati alti livelli di attività per entrambi gli enzimi nell'epitelio del tubulo renale e dell'intestino tenue, mentre in altri tessuti (polmone, vescicole seminali, fegato fetale) l'espressione risulta discordante. Nel rene e nell'intestino è possibile che la GGT e la MBD siano coinvolte nel metabolismo del glutatione extracellulare, mentre in altri tessuti potrebbero essere coinvolti in processi metabolici indipendenti.

1.3.2 Ruolo pro-ossidante

La GGT, in presenza di metalli di transizione, come ferro (Fe^{3+}) e rame (Cu^{2+}), favorisce la formazione di specie reattive per l'ossigeno (ROS) nell'ambiente extracellulare. L'equilibrio tra l'azione antiossidante e quella pro-ossidante dipende dalla disponibilità degli ioni metallici e in particolare dello ione ferrico (Fe^{3+}). Gli effetti pro-ossidanti dell'azione della GGT sono dovuti all'elevata reattività del gruppo tiolico (-SH) della CysGly, presente come anione tiolato ($-\text{S}^-$) a pH fisiologico. L'anione tiolato è in grado di ridurre lo ione ferrico (Fe^{3+}) in ione ferroso (Fe^{2+}) formando il radicale tiile ($\text{S}\cdot$) della CysGly. Lo ione ferroso (Fe^{2+}) riduce l'ossigeno molecolare a ione superossido ($\text{O}_2\cdot^-$), convertito successivamente dall'enzima superossido dismutasi a perossido di idrogeno (H_2O_2). Quest'ultimo e l'anione superossido possono generare radicali ossidrilici in presenza dello ione ferrico (Fe^{3+}) libero (reazione di Fenton) o chelato all'ADP (reazione di Haber Weiss). Tali radicali ossidrilici possono innescare reazioni a catena dando origine al fenomeno

della perossidazione lipidica (Zalit et al., 1996). Tali fenomeni si verificano all'esterno della cellula, fuori dall'azione dei sistemi di difesa antiossidanti situati all'interno della cellula, ma, naturalmente, le conseguenze di quest'azione pro-ossidante si ripercuotono sulla cellula stessa.

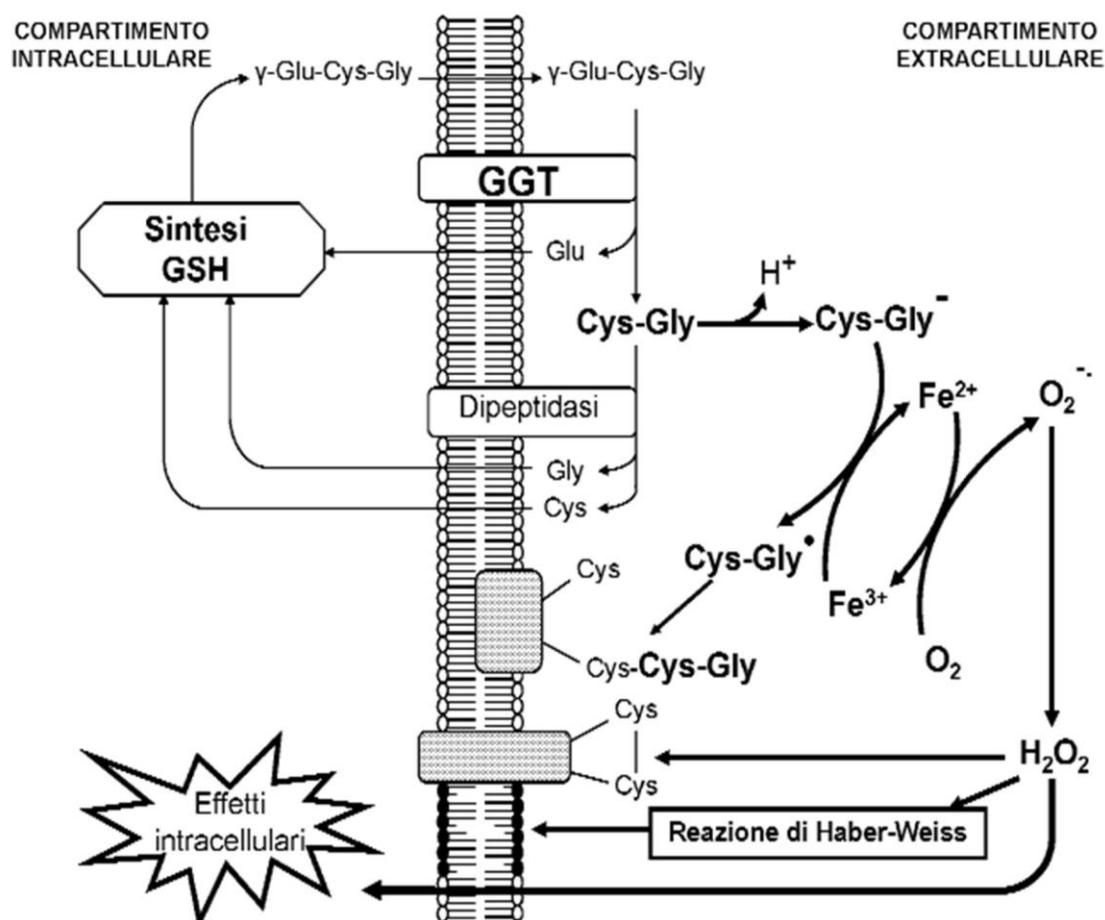


Figura 1.6 Reazioni pro-ossidanti GGT-dipendenti in presenza di Fe^{III} . I principali obiettivi del radicale tiolo Cys-Gly e delle specie reattive dell'ossigeno sono le molecole sulla superficie di membrana (proteine e lipidi di membrana) e proteine intracellulari sensibili allo stato redox della cellula (ad esempio NF- κ B, AP1) (Franzini et al., 2009).

Le reazioni pro-ossidanti dipendenti dall'attività della GGT, sono state osservate anche in presenza di sorgenti fisiologiche di ferro, come transferrina e ferritina, ed il potere riducente della CysGly è tale da promuovere il rilascio dello ione ferrico (Fe^{3+}) dalle proteine di accumulo, sostenendo così la formazione di ROS (Stark et al., 1993; Drozd et al., 1998). Lo ione rameico (Cu^{2+}) e la cerulo plasmina possono partecipare a questi eventi mediando il trasferimento degli elettroni dal gruppo tiolico allo ione ferrico (Fe^{3+}) (Glass et al., 1997). La produzione di una quantità eccessiva di ROS, nel catabolismo del glutatione, può causare mutazioni genetiche (Stark et al., 1987) o dare inizio al fenomeno della perossidazione

lipidica. In aggiunta, occorre ricordare che i ROS possono svolgere la funzione di secondi messaggeri a basse concentrazioni (Genestra, 2007) e possono modulare molti aspetti del metabolismo cellulare. A tal proposito, è stato dimostrato che le reazioni pro-ossidanti conseguenti all'attività di GGT sono responsabili dell'ossidazione dei tioli esposti sulla superficie della membrana cellulare per azione del perossido d'idrogeno (Dominici et al., 2003) o a causa della formazione di ponti disolfuro con il radicale tiile della CysGly (Corti et al., 2005). Le reazioni pro-ossidanti rappresentano uno stimolo pro-apoptotico per la linea cellulare dell'ovaio A2780, ma anche anti-apoptotico per la linea cellulare di linfoma istiocitario U937 (Dominici et al., 2003); inoltre le suddette reazioni promuovono il legame con il DNA dei fattori di trascrizione NF-kB e AP1 (Dominici et al., 2003) ed attivano le Tyr-fosfatasi, mentre inibiscono l'attività delle Ser/Thr-fosfatasi (Dominici et al., 2003; Pieri et al., 2003).

1.3.3 Metabolismo del nitrosoglutatione

Un importante mediatore di diverse funzioni biologiche è il monossido di azoto (NO), in grado di regolare il tono vascolare agendo come vasodilatatore, di inibire l'aggregazione piastrinica, di agire come neurotrasmettitore ed in quanto radicale può svolgere la funzione di pro-ossidante con relativa azione citotossica o di anti-ossidante. L'emivita del monossido di azoto è di pochi millisecondi, pertanto i suoi effetti diretti si osservano nel sito di formazione della molecola. Tuttavia, il monossido di azoto può essere stabilizzato e trasportato reagendo con gruppi tiolici di proteine, come albumina ed emoglobina, o con tioli a basso peso molecolare, come CysGly, Cys ed omocisteina, in modo da formare con essi i nistrotioli (RSNO) (Giustarini et al., 2003). In particolare, il nitrosoglutatione (GSNO) ha numerose attività farmacologiche simili a quelle del monossido di azoto libero (Zeng et al., 2001; Rassaf et al., 2002).

Il nitrosoglutatione è substrato dell'enzima GGT, infatti è stato dimostrato in vitro che in presenza di GlyGly come accettore della reazione di transpeptidazione, la GGT catalizza la trasformazione del nitrosoglutatione in nitrosocistenil-glicina (CCG-SNO), che in presenza di ioni metallici di transizione si dissocia spontaneamente in Cys-Gly e NO (Hogg et al., 1997). Essendo il nitrosoglutatione un trasportatore del monossido di azoto, l'azione dell'enzima GGT potrebbe permetterne l'utilizzo favorendo la dissociazione del nitrosoglutatione stesso ed i vasi sanguigni potrebbero esserne i probabili bersagli poiché la GGT è espressa dalle cellule endoteliali.

1.3.4 Ruolo detossificante: formazione di acidi mercapturici

La GGT è uno degli enzimi coinvolti nella sintesi degli acidi mercapturici a partire da coniugati del glutatione, intervenendo anche nei processi di detossificazione. Gli xenobiotici elettrofili vengono coniugati, grazie all'azione della glutatione-S-transferasi (enzima citosolico), con il gruppo sulfidrilico del GSH. I coniugati vengono successivamente escreti mediante trasportatori specifici.

Nell'ambiente extracellulare la GGT rimuove l'acido glutammico dal coniugato glutammico, che viene indirizzato nella via di formazione degli acidi mercapturici. Questi ultimi vengono in seguito escreti dal sistema tubulare del rene e dal sistema duttale del fegato. Tali sistemi presentano un'elevata attività di GGT, che permette di eliminare gli acidi mercapturici nelle urine e nella bile durante i normali processi digestivi (Hinchman et al., 1998; Kearns et al., 1998).

1.3.5 Metabolismo dei leucotrieni

I leucotrieni (LTs) appartengono ad una classe di mediatori lipidici attivi nel processo infiammatorio, derivanti dal turnover dell'acido arachidonico per azione dell'enzima lipossigenasi. I leucotrieni sono sintetizzati e rilasciati dalle cellule dei tessuti sottoposti a stimolo infiammatorio. Tale classe di molecole comprende il diidrossieicosatetranolato (LTB₄) e i cistinil-leucotrieni (LTC₄, LTD₄, LTE₄) che rappresentano composti biologicamente attivi, conosciuti come "sostanze della risposta lenta all'anafilassi". Il leucotriene A₄ (LTA₄) è il precursore del LTB₄ e dei cisteinil-leucotrieni. Il leucotriene C₄ (LTC₄) è coniugato con una molecola di GSH e viene convertito in leucotriene D₄ (LTD₄) (glicilcisteinil-LT) per attività enzimatica della GGT. La successiva idrolisi del residuo di Gly porta alla formazione del leucotriene E₄ (LTE₄) (cisteinil-LT) (Lewis et al. 1990). I leucotrieni C₄ e D₄ si legano a specifici recettori presenti sulle cellule muscolari lisce causando prolungata broncocostrizione (Anderson et al., 1982; Bernstrom e Hammarstrom 1982).

Recentemente è stato posto sotto osservazione il metabolismo del cisteinil-LT in tre pazienti con deficit di GGT (Mayatepek et al., 2004). I pazienti mostravano un profilo anormale di LT nelle urine e nel plasma, con un aumento delle concentrazioni di LTC₄ e l'assenza di LTD₄ e di LTE₄, mentre la sintesi di LTB₄ non mostrava alterazioni. La carenza di GGT pertanto può essere considerata come un errore congenito della sintesi del cisteinil-LT. Il deficit di sintesi del LTC₄ si è scoperto essere associato ad una sindrome dello sviluppo fetale, che include grave ipotonia muscolare, ritardo psicomotorio, ritardo

della crescita e microcefalia (Mayatepek et al., 1998). Diversi disturbi neurologici sono anche associati a deficit di GGT; pertanto Mayatepek et al. (2004) ha proposto che il difetto metabolico relativo al LT sia l'eccessiva concentrazione del LTC₄ o più probabilmente il deficit del LTD₄ e del LTE₄, che possono contribuire ad alcuni o anche a tutti i sintomi osservati.

1.3.6 Escrezione degli acidi biliari

L'attività epatica di GGT è regolata dagli acidi biliari liberi e coniugati. Gli acidi biliari liberi (colato, chenodesossicolato, desossicolato) favoriscono l'attività enzimatica della GGT con conseguente aumento delle reazioni di idrolisi e di transpeptidazione del GSH, fondamentali per il rifornimento di amminoacidi utili per i processi di coniugazione.

Gli acidi biliari coniugati con la glicina e la taurina favoriscono la reazione di idrolisi a livello dei dotti biliari, ma inibiscono quella di transpeptidazione con un meccanismo a feedback negativo, in tal modo si riduce la disponibilità degli amminoacidi necessari per la sintesi dei coniugati (Abbot et al., 1983).

1.3.7 GGT e funzione simil-citochina

Recentemente è stata proposta una nuova ed importante funzione per la GGT. Niida e collaboratori (2004) hanno dimostrato che l'aggiunta di proteine GGT a colture di midollo osseo di topo, è in grado di indurre efficacemente la formazione degli osteoclasti. Lo stesso risultato è stato ottenuto dopo inibizione dell'attività enzimatica attraverso acivicin, ma non in presenza di un anticorpo specifico per la GGT che non influenza la sua attività enzimatica. Inoltre, è stato dimostrato che sia la forma nativa che inattiva di GGT stimolano l'espressione dell'mRNA e della proteina del recettore attivatore di NF-κB ligando (RANKL) da parte di cellule stromali del midollo osseo. Pertanto la GGT sembra possedere una funzione biologica simil-citochina indipendentemente dalla sua attività enzimatica.

Un successivo studio ha mostrato che l'escrezione urinaria di GGT varia in parallelo con appurati marcatori biochimici del riassorbimento osseo (come deossipiridinolina e collagene di tipo I N-telopeptide), sia in modelli animali che in soggetti umani (Asaba et al., 2006).

Lo studio della struttura del cristallo della GGT umana ha mostrato la presenza di due ponti disolfuro intramolecolari, tra la Cys-50 e la Cys-74 e tra la Cys-192 e la Cys-196. Il ponte disolfuro Cys-50/Cys-74 è inaccessibile al solvente poiché è sepolto 10 Å sotto la superficie della subunità pesante. Il ponte disolfuro Cys-192/Cys-196, invece, risulta in parte esposto sulla superficie molecolare (West et al., 2013).

È interessante notare come la Cys-192 e 196 siano disposte in un motivo CX3C che risulta essere associato a diversi significati biologici: dapprima, si tratta di un motivo identificativo per una classe di chemochine (Bazan et al., 1997), di cui l'unico membro conosciuto è la fractalchina/neuroactina (Stievano et al., 2004); inoltre, è un elemento essenziale nel coordinare il ripiegamento di diverse proteine nel lievito (Balatri et al., 2003); infine, è essenziale per il funzionamento della proteina A2.5L del virus *Vaccinia*, una tiolo ossidoreduttasi che controlla la formazione di disolfuri in proteine di membrana virale (Senkevich et al., 2002). Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per comprendere la funzione connessa alla proteina GGT.

1.4 GGT plasmatica: caratteristiche strutturali e analitiche

1.4.1 Variabili pre-analitiche

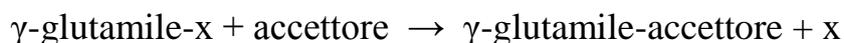
L'enzima può essere determinato quasi indifferentemente nel plasma con litio-eparina e siero (Arbeitsgruppe et al., 2002). Tuttavia, il tipo di campione preferito, anche per l'esecuzione della procedura di riferimento, è il siero. L'analisi comparativa di siero e plasma con litio-eparina in 77 pazienti ha mostrato un valore medio del rapporto plasma/siero vicino a 0,9 e una distribuzione non simmetrica dei valori di tale rapporto (Dominici R et al., 2004). Nella pratica, l'attività di GGT viene misurata su plasma con litio-eparina. Non è raccomandato l'uso di altri anticoagulanti (EDTA, citrato).

Mentre nel sangue a temperatura ambiente l'enzima non è molto stabile e si osserva un abbassamento significativo della sua attività in 24 ore, nel plasma e nel siero l'enzima risulta stabile per molti anni a -20°C, e per sette giorni a 4-8°C o a 20-25°C (Heins et al., 1995). Numerose variabili biologiche pre-analitiche possono influenzare i livelli d'attività della GGT nel sangue (Whitfield, 2001). Tra queste si annoverano la gravidanza, l'etnia, il fumo di tabacco, l'uso di contraccettivi orali. Anche età e sesso hanno un marcato effetto sui livelli di attività di GGT nel sangue.

1.4.2 Dosaggio enzimatico per la GGT plasmatica

Rispetto alla misurazione dell'attività di altri enzimi nel sangue per scopi medici, la GGT occupa una posizione favorevole, poiché è stato allestito per la sua misurazione in solo tipo di dosaggio, che è quello attualmente utilizzato in ciascuna piattaforma automatizzata.

In termini generali, la reazione catalizzata dalla GGT è data da:



Come “donatore” di γ -glutamile (γ -glutamile-x) sono stati impiegati diversi substrati sintetici (Fossati et al., 1986), tra i quali la γ -glutamyl-p-nitroanilide ha incontrato parere favorevole, comportandosi da substrato cromogenico e permettendo così una misurazione spettrofotometrica diretta e continua dell'andamento della reazione. Nel dosaggio automatizzato viene preferenzialmente utilizzata una sua forma carbossilata, L- γ -glutamyl-3-carbossi-4-nitroanilide, che risulta essere più solubile, consentendo di lavorare a concentrazioni vicine alla saturazione. Come “accettore” di gamma-glutamile, tra i diversi

amminoacidi e peptidi, è stato scelto la glicilglicina, che ha una buona capacità tampone per l'attività enzimatica a valori di pH ottimali.

La Federazione Internazionale di Chimica Clinica (IFCC) ha definito le procedure di riferimento per l'analisi della GGT sierica, prima nel 1983 (Shaw et al., 1983) e successivamente nel 2002; i riferimenti sono riportati in tabella 1.1. Questo metodo può essere applicato a diversi modelli di analizzatore automatico, in tal modo i valori misurati possono essere facilmente riconducibili al metodo di riferimento.

Tabella 1.1 Caratteristiche del metodo (standard) di riferimento per la determinazione della GGT sierica in accordo con l'IFCC (Shumann et al., 2002)

Componenti	Concentrazioni*	Condizioni dosaggio
GlyGly	150 mmol/L	T:37.0 ± 0.1. λ: 410 ± 1nm
pH	7.70 ± 0.05	Δλ: 2nm
L-glutamyl-3-carbossi-4-nitroanilide	6 mmol/L	Cammino ottico: 1cm
Volume campione/miscela di reazione	0.0909 (1/11)	Tempo di incubazione: 180s Tempo d'attesa: 60s Range di misurazione: 180s N° di letture: 6

*Nella miscela di reazione finale

1.4.3 Valori di riferimento per la GGT plasmatica

I valori di riferimento per la GGT sierica sono modulati da diverse variabili pre-analitiche, tra cui età e sesso, pertanto dovrebbero essere formulati separatamente per i due sessi e per classi di età, tuttavia nei laboratori comunemente si utilizza un unico range di riferimento. I valori di riferimento per numerosi analiti plasmatici sono stati ricavati dall'analisi retrospettiva di un grande database (n = 61.246), quelli per la GGT risultano essere: 1-34 U/L per le donne e 1-45 U/L per gli uomini (Grossi et al., 2005). Da questo database è stata calcolata la variazione del limite superiore di riferimento (URL) per la GGT secondo i gruppi di età (da 2 a 87 anni di età, ampiezza delle classi 5 anni) e il sesso (figura 1.6), che è molto simile a quella già riportata (Whitfield, 2001).

A livello pratico, le variazioni dipendenti dall'età, come quelle osservate per la GGT, non sono facilmente gestibili. Inoltre, la divisione di tutto il range di età in classi di ampiezza uniforme non è considerato il metodo migliore per calcolare i valori di riferimento, piuttosto dovrebbero essere identificate suddivisioni sulla base delle rilevazioni statistiche di

popolazioni sub-gaussiane all'interno della popolazione complessiva (Gellerstedt, 2006; Gellerstedt, 2007). In alternativa, l'età può essere considerata una variabile continua (come è) e l'equazione della curva di regressione che meglio si adatta ai punti sperimentali (URL/età) può essere utilizzata per calcolare l'URL di ogni età.

I livelli nei neonati superano di 6-7 volte il limite superiore del range di riferimento per gli adulti, il livello nei neonati declina al livello negli adulti intorno ai sette mesi di vita (Cabrera-Abreu, Green, 2002).

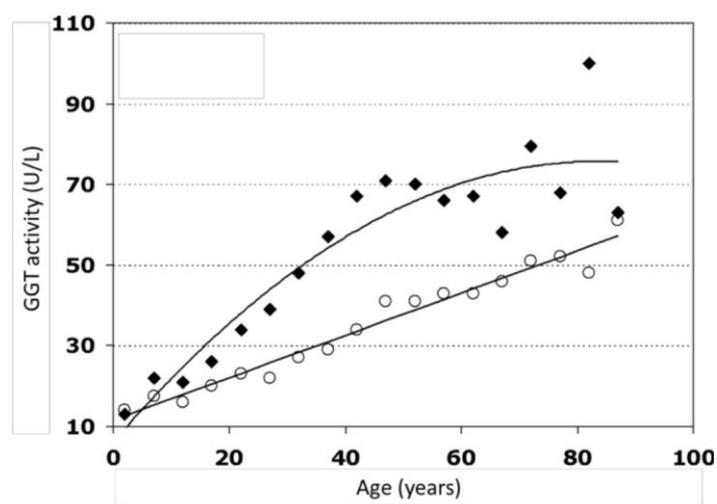


Figura 1.6 *Variazione in base all'età del limite superiore di riferimento per la GGT sierica. L'URL per la GGT sierica negli uomini (rombi neri) e le donne (cerchi bianchi). Le curve di interpolazione hanno le seguenti equazioni:*

<i>donne</i>	$y = 0.5248x + 11.564; r^2 = 0.9646$
<i>uomini</i>	$y = -0.01x^2 + 1.6712x + 6.149; r^2 = 0.8533$

1.4.4 Origine e caratteristiche chimico-fisiche della GGT sierica e delle relative frazioni

Come per le concentrazioni di tutte le componenti del sangue, anche la concentrazione omeostatica della GGT nel sangue è il risultato di un equilibrio dinamico tra il suo rilascio e al sua rimozione dal plasma. Nonostante il suo uso clinico e diagnostico frequente, le conoscenze sull'origine tissutale, sui meccanismi di secrezione e la rimozione dalla circolazione della GGT plasmatica sono frammentarie.

Huseby e collaboratori nel 1981 hanno condotto studi per capire quale fosse l'origine della GGT sierica, suggerendo che quest'ultima pare essere di origine epatica (la GGT è espressa a livello dei canalicoli e dei dotti biliari, figura 1.7 e figura 1.8). Inoltre in tali studi è emerso che la GGT presente nel siero mostra stesse caratteristiche della GGT estratta dal fegato per quel che riguarda il PM, il contenuto di residui di acido sialico ed il grado di

glicosilazione. Tali parametri risultano essere diversi rispetto a quelli della GGT purificata dalle urine, dal rene e dal pancreas (Huseby et al., 1981).

La GGT plasmatica può essere suddivisa in due frazioni, una idrofila ed una idrofoba, che differiscono per carica, dimensioni e densità (Huseby, 1978; Huseby, 1982; Selvaraj et al., 1984). La frazione idrofoba è costituita dall'enzima GGT associato a complessi molecolari, la cui struttura deve ancora essere definita in dettaglio. La componente idrofila comprende una forma solubile dell'enzima GGT mancante del peptide N-terminale lipofilo. La frazione idrofila della GGT plasmatica rappresenta il 60-70% circa dell'attività totale in soggetti normali, ma solo il 15-30% in pazienti con malattia epatica, a causa dell'aumento della componente idrofobica (Huseby, 1982; Selvaraj et al., 1984).

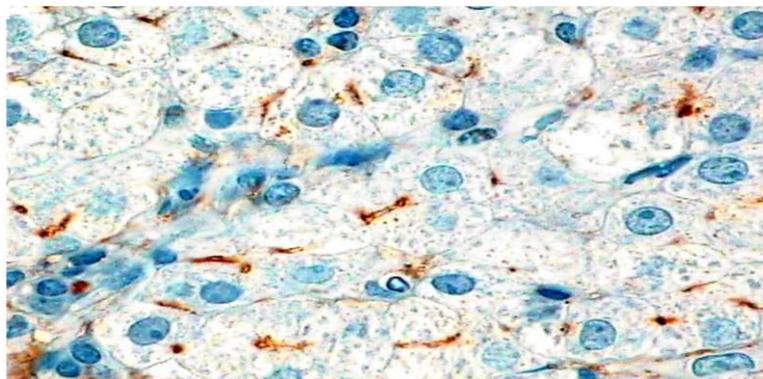


Figura 1.7 Immunolocalizzazione della GGT (colorazione rosso-bruno) a livello dei canalicoli biliari (Paolicchi et al., 2005)

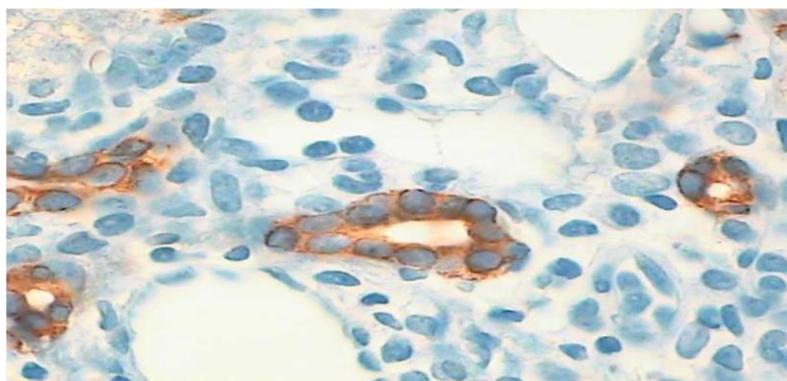


Figura 1.8 Immunolocalizzazione della GGT (colorazione rosso-bruno) a livello dei dotti biliari (Paolicchi et al., 2005)

In uno studio condotto da Franzini e collaboratori nel 2012, è stata valutata l'associazione delle lipoproteine plasmatiche con le frazioni di GGT, evidenziando un'inaspettata complessità per le frazioni della GGT sierica. Sebbene ognuna delle procedure di

separazione utilizzate (cromatografia, ultracentrifugazione, precipitazione selettiva con polianioni) abbia mostrato un discreto grado di analogia tra il comportamento delle tre forme di GGT con maggiore peso molecolare (b-GGT, m-GGT, s-GGT) e le lipoproteine circolanti VLDL, LDL, HDL, nessuna delle precedenti tre frazioni ha rivelato un comportamento esattamente identico a quello delle lipoproteine corrispondenti per peso molecolare. Pertanto, tali risultati mettono in dubbio il concetto, sino ad ora accettato, secondo il quale le lipoproteine circolanti siano il veicolo per la GGT.

Mediante l'analisi delle proprietà fisiche (dimensione, densità, condizioni di sedimentazione mediante centrifugazione) e della sensibilità delle frazioni plasmatiche di GGT alla proteasi papaina e al detergente acido desossicolico, è stato possibile approfondire lo studio sulla caratterizzazione delle frazioni. Da tale studio è emersa una diversa struttura e una possibile diversa origine per le varie frazioni.

La frazione b-GGT ha mostrato avere un peso molecolare corrispondente alle VLDL, ma densità corrispondente alle HDL, caratteristiche analoghe rispettivamente alla dimensione e alla densità degli esosomi. La b-GGT si comporta come l'enzima inserito nella membrana plasmatica, poiché risulta sensibile all'azione della papaina solo dopo trattamento con detergenti ed è recuperata con gli esosomi dal plasma. L'osservazione al microscopio elettronico della preparazioni di esosomi ottenuti dal plasma, ha permesso di verificare l'effettiva presenza di microvescicole di membrana con dimensione compresa tra 20 e 50 nm, tipica degli esosomi. La presenza della proteina GGT su parte di essi è stata confermata mediante immunogold. Tali risultati hanno confermato l'ipotesi che la frazione b-GGT potesse essere parte integrante degli esosomi o di microparticelle, ossia vescicole di membrana secrete nell'ambiente extracellulare mediante meccanismi attivi e regolati. Le vescicole di membrana rilasciate nell'ambiente extracellulare sono particolarmente arricchite in *raft* di colesterolo in associazione con la tetraspanina CD81, una proteina normalmente presente anche negli esosomi o nelle microparticelle. Studi recenti hanno mostrato un possibile rilascio di esosomi nella bile da parte degli epatociti e dei colangiociti (Masyuk et al., 2010) ed inoltre che gli esosomi rilasciati dagli epatociti interagiscono con le ciglia primarie dei colangiociti regolandone i meccanismi intracellulari e la proliferazione. Questo conferma l'importanza degli esosomi come meccanismo di segnalazione intercellulare. È stato osservato, inoltre, che la frazione b-GGT viene rilasciata nel mezzo di coltura da cellule umane di origine non epatica, come cellule di melanoma, di carcinoma della prostata e del normale epitelio bronchiale, con conseguente ipotesi che la GGT possa derivare in parte da membrane cellulari di origine epatica.

In taluni pazienti affetti da tumore è stato rilevato un profilo di eluizione delle frazioni di GGT anomalo, caratterizzato dalla presenza di una pre-b-GGT con PM maggiore della frazione b-GGT. Le caratteristiche del complesso macromolecolare relativo alla pre-b-GGT sembrano essere compatibili con l'ipotesi che sia costituito da microparticelle. A tale ipotesi occorre aggiungere che le cellule tumorali rilasciano esosomi e microparticelle nell'ambiente extracellulare e che i pathways oncogenetici sono in grado di guidare la produzione di microvescicole oppure di stimolarne la sintesi da parte delle cellule tumorali.

Pertanto, la b-GGT potrebbe originare da membrane ricche in GGT sia di origine epatica che extraepatica. Avrebbe così un'origine tissutale diversa rispetto alle altre frazioni ed il meccanismo di secrezione della GGT tessuto-specifico spiegherebbe le diversità strutturali e di carica superficiale di b-GGT rispetto a m-GGT e s-GGT.

Le frazioni m-GGT ed s-GGT riguardano la proteina completa del peptide idrofobico N-terminale che ne rende possibile l'associazione con i trasportatori plasmatici. Entrambe le frazioni hanno mostrato un comportamento compatibile con la presenza in esse di micelle costituite da acidi biliari e GGT. Al contrario di quanto osservato per la b-GGT, non è stato possibile individuare una sorgente di m-GGT e s-GGT, anche se quest'ultima è stata ricavata in seguito ad una serie di modifiche della frazione b-GGT in diverse condizioni sperimentali (mediante trattamento del plasma con acido desossicolico).

Infine, la frazione f-GGT corrisponde alla forma libera dell'enzima priva del peptide idrofobico N-terminale ed è la frazione più rappresentata nel plasma dei soggetti sani.

È emerso che le forme di GGT ad alto peso molecolare presentano una diversa carica superficiale ed affinità per il substrato γ -glutammina-7-amido-4-metilcumarina (GluAMC) (substrato fluorescente specifico per la GGT) rispetto alla forma libera f-GGT, questo potrebbe esser dovuto ai trasportatori plasmatici dell'enzima GGT in grado di influenzarne la cinetica enzimatica e/o ai meccanismi di rilascio e rimozione dal circolo.

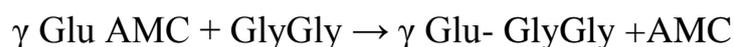
La GGT sierica, pertanto, è un insieme eterogeneo di complessi o frazioni solo in parte caratterizzati nella struttura e nella composizione, per i quali è ancora sconosciuto il meccanismo di rilascio in circolo.

1.4.5 Metodo per lo studio delle frazioni della GGT sierica

La GGT è presente nel siero come parte integrante di diversi complessi molecolari, con specifiche e distinte caratteristiche chimico-fisiche; alcune di esse sono state associate a patologie specifiche come ittero intra ed extraepatico, carcinoma epatocellulare, cirrosi ed epatopatie di origine alcolica. Sfortunatamente, la bassa specificità e sensibilità delle diverse

procedure adottate fin ad ora per separare e individuare le forme multiple di GGT nel siero, ha permesso la valutazione delle frazioni di GGT solo in soggetti con elevati valori di GGT superiori ai valori limite dell'intervallo di riferimento, generando risultati conflittuali riguardo il numero e il significato biologico assunto dalle varie frazioni di GGT nelle differenti patologie in cui sono presenti.

Per migliorare il grado di specificità della determinazione della GGT è stato creato e brevettato (Paolicchi et al., US8486650-B2) un nuovo metodo per la separazione e la quantificazione delle frazioni di GGT plasmatica (Franzini et al., 2008). Secondo tale tecnica, la determinazione dell'attività frazionale della GGT viene eseguita con un sistema FPLC (fast protein liquid chromatography) utilizzando una colonna cromatografica ad esclusione molecolare (Superose 6HR 10/300 GL, GE Healthcare) che permette di separare le componenti plasmatiche esclusivamente in base al PM in un intervallo compreso tra 5000 e 5 kDa. Per poter determinare in continuo l'attività dell'enzima GGT, attraverso una connessione a T, all'eluato è aggiunta continuamente una soluzione contenente γ -glutammina-7-amido-4-metilcumarina (GluAMC), substrato fluorescente specifico per la GGT, che con la rimozione enzimatica del γ -glutammina, libera il prodotto fluorescente amminometilcumarina (AMC). La miscelazione dell'eluato della colonna con il substrato della GGT si verifica all'interno di una spira posta in un bagnetto termostato a 37 °C. L'accettore della reazione di transpeptidazione è incluso nella fase mobile, la presenza dell'enzima è registrata per mezzo della liberazione del composto fluorescente amminometilcumarina (AMC) secondo la reazione di seguito riportata:



Il prodotto AMC viene rilevato per mezzo di un fluorimetro operante ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 380 nm e di emissione di 440 nm. Le condizioni di reazione sono tali per cui il limite di rilevazione dell'attività è di 0,5 U/L; l'area sottesa ai picchi è proporzionale all'attività frazionale di GGT e l'area totale sottesa al cromatogramma, con volume di eluizione tra 10 e 25 ml, è proporzionale all'attività della GGT totale.

L'attività totale della GGT plasmatica, espressa in U/L, è calcolata sulla base di una curva di calibrazione ottenuta analizzando campioni di plasma con attività nota della GGT totale. L'area totale e frazionale della GGT viene calcolata con l'ausilio di un programma informatico (MATLAB Version 7 MathWorks, Inc.) per risolvere la sovrapposizione dei picchi (figura 1.9). La costruzione della curva dei quattro picchi cromatografici della GGT è condotta con un non-lineare algoritmo di minimizzazione dei minimi quadrati usando

quattro curve Gaussianhe modificate esponenzialmente (EMG); sono stati fissati limiti superiori e inferiori per l'ampiezza, la larghezza, la posizione e l'asimmetria della curva per ciascun picco. Il principale svantaggio per tale metodo è il tempo richiesto per una determinazione, 50 minuti, ma la reazione enzimatica post-colonna rende la determinazione delle frazioni plasmatiche della GGT veloce, più sensibile e riproducibile rispetto ai metodi utilizzati precedentemente.

Il nuovo metodo ha permesso di identificare e quantificare nei soggetti sani (HS) quattro frazioni di GGT: big-GGT (b-GGT) 2000 KDa, medium-GGT (m-GGT) 940 KDa, small-GGT (s-GGT) 140 KDa e free-GGT (f-GGT) 70 KDa. Il peso molecolare delle singole frazioni è indipendente dai livelli di GGT associati ad esse e ciò fa pensare all'esistenza di un'interazione specifica tra l'enzima ed i diversi trasportatori anziché un assorbimento casuale in circolo sanguigno, perciò è possibile che esistano pathways specifici di secrezione e rimozione per ogni frazione. Il profilo di eluizione dell'attività della GGT è caratterizzato dalla presenza di un cromatogramma a quattro picchi con volume di eluizione di 10-14 ml, 14-18 ml, 18-21 ml, 22-26 ml, corrispondenti alle frazioni plasmatiche di b-GGT, m-GGT, s-GGT e f-GGT rispettivamente. L'attività di ogni frazione è proporzionale all'area del picco corrispondente (figura 1.9).

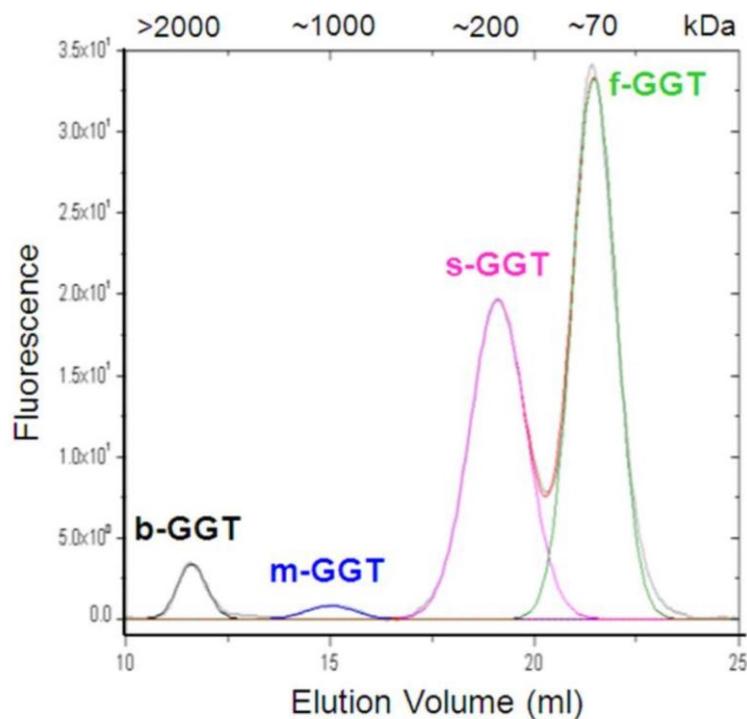


Figura 1.9 Cromatogramma a quattro picchi del profilo di eluizione delle quattro frazioni della GGT da soggetti sani. Le quattro gaussiane corrispondenti alle frazioni di GGT sono evidenziate con linee di colore diverso (Franzini et al., 2008)

Dall'analisi dell'andamento dell'attività delle quattro frazioni in funzione dell'attività totale dell'enzima emerge che, in soggetti sani di entrambi i sessi, la f-GGT è la frazione più rappresentata a bassi valori di attività della GGT totale (superiore al 75%), mentre l'aumento della GGT totale dipende principalmente da un incremento delle frazioni b-GGT ed s-GGT, con un decremento della frazione f-GGT che scende al 20% (Franzini et al., 2008) (tabella 1.2) (figura 1.10).

Tabella 1.2 Attività della GGT totale e delle sue frazioni in una popolazione sana di 200 soggetti (Franzini et al. 2008)

	Uomini (n=100)	Donne (n=100)	P
GGT totale	25.3 (12.3-60.5)	14.4 (8.4-20.9)	<0.001
b-GGT	2.4 (0.7-10.7)	1.1 (0.4-5.2)	<0.0001
m-GGT	1.0 (0.2-3.3)	0.5 (0.2-1.2)	<0.0001
s-GGT	9.2 (2.8-33.7)	3.9 (1.5-11.6)	<0.0001
f-GGT	13.2 (8.3-19.6)	8.9 (5.9-12.5)	<0.0001

I dati sono valori di attività espresso in U/L e rappresentano: media, 5° percentile e 95° percentile. Il test-T di Student è applicato su dati trasformati con la funzione ln.

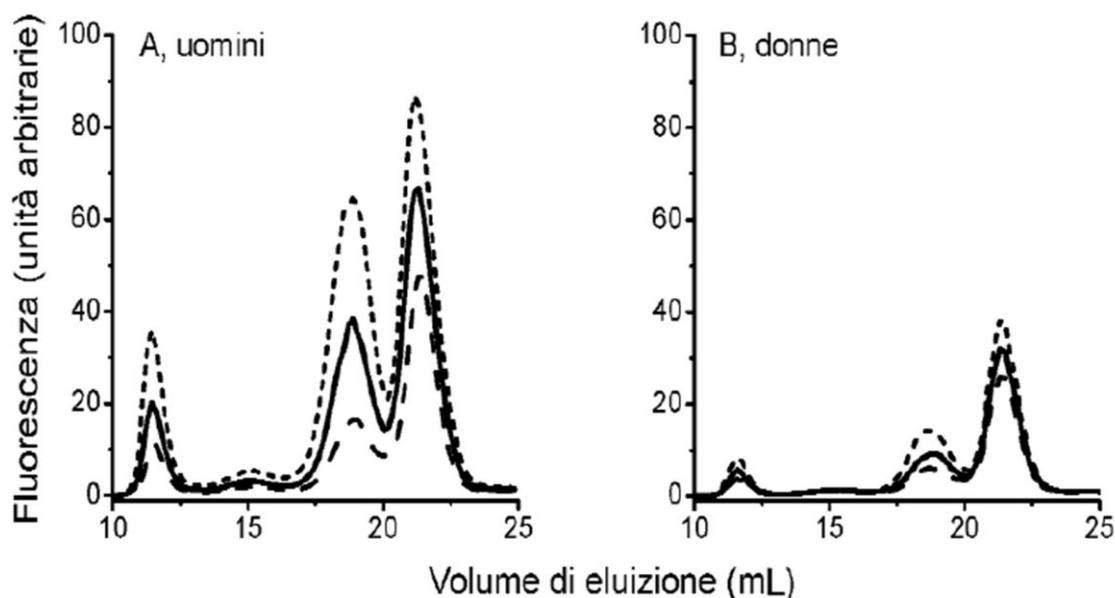


Figura 1.10 Profili di eluizione delle frazioni plasmatiche di GGT in una popolazione di soggetti sani A-uomini (n=100), B-donne (n=100). I cromatogrammi rappresentano l'andamento del 25° (linea tratteggiata), del 50° (linea continua) e del 75° (linea punteggiata) percentile del segnale fluorescente registrato ad ogni volume di eluizione (Franzini et al., 2008).

Lo studio delle frazioni di GGT plasmatica continua ad essere di notevole interesse sia per un miglior utilizzo diagnostico e prognostico, sia per una più chiara comprensione della patogenesi delle malattie associate all'enzima. Questo, pertanto, sarà possibile solo utilizzando un metodo riproducibile e standardizzato per misurare le frazioni plasmatiche della GGT.

1.5 Attività della GGT totale plasmatica e fegato

L'enzima GGT è stato scoperto ed adoperato in clinica già a partire dagli anni 1960 come test di funzionalità epatica o come saggio dell'attività enzimatica nel fegato. Prime documentazioni raccolte da Szczeklik e collaboratori (1961) hanno riportato una serie di valori medi in differenti tipi di disfunzioni epatiche ed hanno mostrato diversi casi in cui i livelli di GGT sierica si sono modificati nel corso del tempo rispetto ai valori di altri enzimi epatici che invece sono rimasti pressoché invariati. È un test molto sensibile, sebbene sia difficile nella maggior parte dei pazienti con patologie epatiche andare a ricercare le cause fisiopatologiche di base ed il loro grado di correlazione con la GGT. Il problema maggiore sta però nella poca specificità che il test ha, data la moltitudine di patologie o di altre condizioni presenti (pancreatite, diabete, obesità, esercizio fisico, eccessivo consumo di alcol, uso di droghe che promuovono l'attività enzimatica) che possono indurre un aumento dei valori di GGT.

1.5.1 Espressione della GGT epatica e attività della GGT plasmatica

Le modalità con cui le malattie epatiche portano ad un aumento della GGT plasmatica non sono ben compresi. Nei lavori sperimentali sono stati utilizzati per lo più ratti, che hanno, non solo dei valori 20 volte più bassi di attività della GGT epatica e plasmatica rispetto agli esseri umani (Teshke et al., 1983), ma anche un'organizzazione e un'espressione genetica differente (Chikhi et al., 1999).

Il rapporto tra GGT plasmatica ed epatica è stata studiata da molti autori. Un metodo sensibile per la rilevazione dell'attività di GGT in campioni prelevati con agobiopsia è stato sviluppato da Satoh e colleghi (1980), i quali hanno trovato in 57 pazienti, con varietà di malattie epatiche, valori possibilmente elevati di GGT plasmatica o epatica, o di entrambe o di nessuna. Tra i pazienti con valori di GGT plasmatica ed epatica elevati, i livelli più alti sono stati trovati in epatiti alcoliche o indotte dall'uso di droghe rispetto all'epatiti virali ed in questo gruppo di pazienti la GGT plasmatica ha mostrato un più grande incremento al di sopra della norma (approssimativamente di circa sei volte) rispetto alla GGT epatica (circa tre volte).

In un altro studio, avente come oggetto l'uomo, che ha incluso pazienti con diversi tipi di malattie epatiche (Selinger et al., 1982), solo il gruppo con malattia epatica alcolica ha mostrato un valore medio di GGT epatica aumentato significativamente al di sopra della norma, anche se tutti i tipi di malattia hanno mostrato un aumento dei livelli plasmatici (tabella 1.3).

Tabella 1.3 Attività della GGT epatica e plasmatica in pazienti sottoposti a biopsia percutanea epatica (Selinger et al., 1982).

	N	GGT epatica*	GGT plasmatica**
Fegato normale	22	33.5 ± 3.4	32 ± 7
Malattia epatica alcolica	20	70.2 ± 5.2	216 ± 47
Cirrosi biliare primitiva	30	37.9 ± 3.2	274 ± 80
Epatite persistente	11	35.5 ± 4.0	56 ± 21
Epatite cronica attiva e cirrosi post-necrotica	16	47.5 ± 5.0	107 ± 38
Steatosi epatica non alcolica	11	41.6 ± 4.6	43 ± 9

I valori sono espressi come media ± SEM. L'attività di GGT epatica è stata valutata sui tessuti omogenati. *(U/g proteina) **(U/L)

Nei singoli pazienti con malattia epatica alcolica la GGT epatica è risultata all'incirca raddoppiata, invece la GGT plasmatica è aumentata di circa sette volte. Nei singoli pazienti la correlazione tra l'attività della GGT plasmatica ed epatica è stata scarsa e non significativa. Questo ha portato a due conclusioni. Innanzitutto, la GGT epatica è aumentata in alcuni tipi di malattia epatica e l'incremento nel plasma della GGT non è semplicemente dovuto al rilascio dell'enzima da parte di cellule danneggiate. La sequenza di eventi, dallo stimolo originale all'incremento dell'espressione del gene o al diminuito esaurimento della proteina, non è stata completamente esplorata. Poiché la GGT sierica aumenta maggiormente rispetto alla GGT epatica, è probabile che l'enzima espresso sulla superficie cellulare sia rilasciato più facilmente del solito ed è stato suggerito che questo sia il risultato dell'azione sulla membrana cellulare di acidi biliari. In secondo luogo, l'induzione della GGT appare in qualche misura specifica per i disturbi correlati all'alcol, sebbene non si possa escludere la possibilità che i livelli quasi normali nel tessuto epatico in altri tipi di malattia siano una conseguenza della più rapida perdita di GGT, nuovamente sintetizzata, dalla superficie cellulare.

Nel fegato, durante infezione cronica da HCV, la localizzazione istopatologica della GGT è stata studiata da Paolicchi e collaboratori (2005). In tutte le biopsie la GGT è stata rilevata nei canalicoli biliari, in corrispondenza del polo sinusoidale degli epatociti e delle cellule endoteliali delle vene centro lobulari. Il citoplasma dell'epatocita è risultato negativo in pazienti con bassa attività di GGT, mentre è risultato positivo in cellule sparse ottenute da biopsie di pazienti con moderatamente elevata attività di GGT sierica (45-60 mU/mL) e approssimativamente la metà degli epatociti sono stati diffusamente colorati in un paziente con la più alta attività di GGT sierica (174 mU/mL). Lo smascheramento antigenico ha

consentito di identificare la proteina GGT anche in cellule infiammatorie sparse nel parenchima epatico.

Pertanto, epatociti, cellule biliari e cellule infiammatorie contribuiscono all'aumento della GGT epatica durante l'infezione cronica da HCV, mentre l'aumento della GGT plasmatica sembra dipendere dall'aumentata espressione della proteina all'interno degli epatociti. In ogni caso non si sa nulla sui meccanismi di secrezione della GGT epatica o biliare.

1.5.2 Pathways molecolari di induzione della GGT

Le prime pubblicazioni che mostrano la comparsa di foci GGT-positivi in animali da laboratorio esposti a sostanze chimiche cancerogene, hanno per primi suggerito l'ipotesi che la GGT fosse un marker precoce di trasformazione neoplastica (Whitfield, 2001; Pompella et al., 2006). I meccanismi fattori della maggiore espressione di GGT indotta da agenti cancerogeni, sono rimasti però sconosciuti.

Diversi studi hanno dimostrato come la GGT sia up-regolata in diversi tipi cellulari dopo esposizione acuta a stress ossidativo (Kugelman et al., 1994; Knickelbein et al., 1996; Liu RM et al., 1998; Borud et al., 2000; Mikkelsen et al., 2002) ed il coinvolgimento dell'attivatore del(i) fattore(i) di trascrizione della proteina-1-like (AP-1) (Daubeuf et al., 2004), o sono stati suggeriti pathways che coinvolgono l'EpRE/Nrf2 (electrophile response element/nuclear factor erythroid 2-related factor 2) attraverso l'attivazione della chinasi regolata da segnali extracellulari (ERK) e della p38 proteina chinasi attivata da mitogeni (MAPK) (Zhang et al., 2006).

È stato recentemente proposto il coinvolgimento di una via di trasduzione ras-dipendente (Roomi et al., 2006), ed in effetti, un collegamento tra espressione di GGT e l'attivazione dei pathways Ras-MAPK è stato dimostrato in cellule tumorali a seguito dell'irradiazione con raggi gamma (Pankiv et al., 2006), come anche a seguito dell'esposizione a stress ossidativo (Pandur et al., 2007). Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono state implicate nel processo di cancerogenesi, e contemporaneamente, la regolazione redox di molti geni in risposta a elettrofili/ROS sembra modulare l'espressione di GGT; questo potrebbe spiegare l'aumento dell'espressione di GGT descritto nei tumori.

È interessante notare, come sia stata dimostrata l'induzione della trascrizione dell'mRNA della GGT anche da parte di citochine, compreso il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) (Daubeuf et al., 2001) e l'interferone (IFN) alfa e beta (Bouman et al., 2002); la prova di questo è stata la dimostrazione che il TNF- α è in grado di indurre l'espressione della GGT attraverso un processo di segnalazione dipendente dal fattore nucleare-kB (NF-kB), dal

fattore di trascrizione Sp1 (specificity protein 1) e il reclutamento dell'RNA polimerasi II al promotore della GGT (Reuter et al., 2009). Questi risultati sembrano connettere l'infiammazione all'espressione di GGT, non solo come risposta allo stress ossidativo collegato all'infiammazione, ma, altresì, come l'effetto di specifiche citochine infiammatorie. Da questo punto di vista, quindi, il significato biologico dell'aumento dell'espressione della GGT potrebbe essere duplice, in primo luogo un meccanismo di difesa contro lo stress ossidativo ed in secondo luogo un meccanismo di regolazione, possibilmente attraverso il metabolismo dei leucotrieni GGT-mediato e GSNO.

1.5.3 Effetti della deficienza della GGT

Wright e collaboratori (1980) hanno condotto uno studio sperimentale in cui sono stati caratterizzati un piccolo numero di pazienti con deficienza dell'enzima GGT, mentre con l'ausilio dell'ingegneria genetica hanno creato un topo con modificazioni a livello del gene codificante per la GGT. Come per altri difetti genici, il manifestarsi della deficienza dell'enzima, ha fornito informazioni sulla normale funzione prodotta dal gene. La deficienza umana di GGT è rara e solo in cinque pazienti è stata diagnosticata. La storia familiare di essi suggerisce una trasmissione ereditaria di tipo recessivo. La deficienza enzimatica in questi è stata associata a disturbi mentali, ma questo potrebbe essere una semplice conseguenza della selezione di pazienti recanti disturbi congeniti del metabolismo; un caso su cinque invece non manifesta problemi mentali. Nell'uomo, la deficienza di GGT è compatibile con la vita, a differenza di quanto accade in topi, resi omozigoti *knochoout* per il gene codificante l'enzima, che presentano ritardo nello sviluppo e morte precoce. Non è ancora chiaro perché gli effetti della deficienza di GGT siano meno gravi nell'uomo rispetto ai topi.

Le caratteristiche biochimiche, sia nell'uomo che nel topo, rispecchiano in particolar modo il ruolo che la GGT ha nel metabolismo del glutatione. Le urine dei pazienti contengono grandi quantità di peptidi glutatione-coniugati mostrando che la GGT gioca un ruolo importante nel riassorbimento del glutatione e/o dei suoi amminoacidi costituenti derivanti dal filtrato glomerulare (Harding et al., 1997). In topi GGT-deficienti si registrano elevati livelli di glutatione extracellulare (e urinario) ma basse concentrazioni nei tessuti inclusi fegato e pancreas. Anche le concentrazioni plasmatiche di cisteina in questi topi sono basse, coerentemente col fatto che glutatione e GGT normalmente sono le maggiori sorgenti di questo amminoacido nei fluidi extracellulari (Habib et al., 2000). La rilevazione dei livelli di mRNA nel fegato dei topi con alterata espressione genica per la GGT mostra un

incremento d'espressione di gamma-glutamylcisteina sintetasi, glutatione sintetasi e cistationasi (enzimi che normalmente portano alla sintesi di glutatione e di cisteina da metionina) ed un decremento d'espressione di due proteine coinvolte nella farmaco resistenza multipla (che trasportano il glutatione nella bile), (Jean et al., 1999). Queste variazioni sono collegate con la regolazione dell'attività di questi enzimi e proteine da parte dei livelli di concentrazione di tiolo epatico, che è risultato essere nei topi con deficienza di GGT circa 1/3 dei normali livelli presenti nei topi *wild-type*.

Questi topi mancanti dell'enzima GGT mostrano inoltre un incremento dello stress ossidativo nel fegato e differenze nella distribuzione di mercurio inorganico ed escrezione di metilmercurio (Ballatori et al., 1998), conseguentemente ad una perdita di glutatione nei tessuti e nelle cellule implicate con deficienza dei normali sistemi antiossidanti che portano a mutazioni con danni al DNA ed accumulo dello stesso nelle cellule (Rojas et al., 2000). Analisi biochimiche sul fegato di topi GGT-deficienti mostrano deplezione di glutatione mitocondriale, che diventa sempre più severa in parallelo con il peggioramento delle condizioni di salute dell'animale, con associate alterazioni delle normali funzioni mitocondriali che portano a deficit della produzione di ATP (Will et al., 2000). La somministrazione di N-acetilcisteina in animali omozigoti-deficienti permette di invertire il ritardo nella crescita, promuovendola, di migliorare il colore del pelo, curare l'infertilità e molte delle reazioni biochimiche precedentemente alterate. Inoltre, mediante un integrazione alimentare con glutatione o con sola cisteina, si può ripristinare ed incrementare la disponibilità di cisteina stessa (Kumar et al., 2000).

1.6 Associazioni epidemiologiche

1.6.1 GGT totale e frazioni nel danno epatico

Nella steatopatia non alcolica (NASH), una malattia epatica associata a diabete e obesità ma che mostra anche alcune caratteristiche comuni con le disfunzioni epatiche alcol derivate i livelli di GGT aumentano nella maggioranza dei pazienti affetti da questa condizione, ma essa non è d'uso diagnostico (Fletcher et al., 1991). Il principale interesse in relazione alla GGT è che la NASH presenta le stesse manifestazioni delle degenerazioni epatiche d'origine alcolica e questo potrebbe rappresentare una condizione estrema dell'associazione epidemiologica tra GGT ed obesità, insulino-resistenza, diabete e fegato steatosico (Laurin et al., 1996). Una ricerca effettuata da Hickam e collaboratori (1994) sulla GGT rileva come essa sia un utile indicatore di rigetto di trapianto del fegato, anche se la singola misura dei suoi valori risulta insufficiente.

Studi più dettagliati effettuati per approfondire la natura, l'origine tissutale ed il destino metabolico delle frazioni delle GGT, renderanno possibile una maggiore conoscenza del loro meccanismo d'azione ed il loro coinvolgimento nelle diverse patologie. Tali dati, infatti, confrontati con i risultati ottenuti sullo studio delle frazioni di GGT, in quadri clinici ben definiti, rappresenteranno le basi per definire il ruolo delle frazioni di GGT come specifici biomarcatori di patologie epatiche, metaboliche e cardiovascolari. Notevole importanza assumono in particolare le frazioni b-GGT ed s-GGT come biomarcatori di screening diagnostico preventivo, per l'analisi differenziale di due grandi patologie epatiche, la steatosi epatica non alcolica (NAFLD) e l'epatite virale C (CHC). Si è visto come in soggetti affetti da NAFLD l'incremento della GGT totale è dovuto maggiormente ad incremento delle frazioni b-GGT, mentre nei soggetti con CHC predomina la frazione s-GGT. Ciò suggerisce come b-GGT svolga un ruolo prognostico più specifico e sensibile per la diagnosi della NAFLD a differenza della frazione s-GGT che risulta più efficace per la diagnosi di pazienti affetti da CHC ed il rapporto delle frazioni b/s mostra grande specificità e risulta particolarmente utile per la diagnosi differenziale tra NAFLD e CHC (Tabella 1.4). (Franzini et al., 2012).

Tabella 1.4 Attività della GGT totale e delle sue frazioni in pazienti con steatosi epatica non alcolica (NAFLD), epatite cronica C (CHC) e in soggetti sani (HS) (Franzini et al., 2012)

	NAFLD (n=90)	CHC (n=45)	HS (n=70)
GGT totale	39.4 (20.0-82.0)	41.5 (21.9-84.5)	18.4 (13.2-24.9)
b-GGT	5.1 (2.5-14.9)	2.1 (1.2-5.3)	1.7 (1.0-2.4)
m-GGT	1.7 (0.6-3.7)	1.2 (0.4-3.7)	0.6 (0.4-0.9)
s-GGT	14.9 (5.9-43.5)	22.9 (10.0-59.6)	4.7 (2.9-8.9)
f-GGT	14.2 (10.3-18.6)	13.8 (9.3-16.9)	9.9 (8.4-12.2)
b/s ratio	0.37 (0.24-0.51)	0.10 (0.07-0.15)	0.32 (0.22-0.48)

I dati presentati sono valori di attività espressi in U/L e rappresentano media 25° 75° percentile.

1.6.2 GGT totale e frazioni in alcolisti e astemi

In un recente studio condotto da Franzini e collaboratori su 51 soggetti, di cui 27 alcolisti e 24 con storia di dipendenza da alcol, ma astemi da almeno un mese, è stato evidenziato, nel secondo gruppo, l'abbassamento dei valori plasmatici totali di GGT e delle frazioni b-GGT e f-GGT. Al contrario i livelli di m-GGT e s-GGT sono rimasti persistentemente elevati, oltre a un rapporto inferiore b/s rispetto ai controlli (Tabella 1.5). Questo risultato conferma il rapporto b/s come biomarcatore sensibile di danno epatico persistente, indipendentemente dai livelli di GGT totale. In aggiunta, i differenti livelli delle frazioni di GGT ottenuti dai soggetti sottoposti ad un periodo d'astinenza da alcol suggeriscono come l'analisi delle singole frazioni potrebbe essere considerata un marker migliore per il monitoraggio d'astinenza da alcol rispetto ai valori di GGT totale (Franzini et al., 2013).

Tabella 1.5 Attività della GGT totale e delle singole frazioni in pazienti con storia di dipendenza da alcol ma astemi da almeno un mese (B), alcolisti (A) e relativi controlli (C) (Franzini et al., 2013).

	Controlli (C) (n=27)	Alcolisti (A) (n=27)	Astemi (B) (n=24)
GGT totale	23.9 (15.1-32.0)	133.0 (50.1-287.0)	37.5 (19.4-84.8)
b-GGT	2.4 (1.4-4.5)	7.5 (3.2-21.0)	2.8 (1.3-7.6)
m-GGT	1.0 (0.5-1.5)	5.2 (2.8-19.0)	2.1 (0.8-4.5)
s-GGT	7.3 (3.6-12.4)	95.7 (30.1-207.8)	15.3 (8.1-58.5)
f-GGT	13.7 (9.9-16.9)	22.7 (15.4-26.7)	14.4 (9.0-18.8)
b/s ratio	0.35 (0.29-0.53)	0.10 (0.07-0.15)	0.16 (0.10-0.24)

I dati presentati sono valori di attività espressi in U/L e rappresentano media 25° 75° percentile.

1.6.3 GGT ed epatocarcinoma

Come già descritto, la regione 5'-UTR del gene I per la GGT è espressa in maniera tessuto specifica, mentre la sequenza codificante non cambia. Nel caso di carcinoma epatocellulare (HCC) nell'uomo ci sono molti studi che suggeriscono una correlazione tra il cambiamento dell'espressione della GGT e lo sviluppo del tumore. In particolare è stata analizzata l'espressione dell'mRNA I per la GGT in tessuto epatico affetto da carcinoma e questa analisi è stata poi confrontata con quella condotta su tessuto epatico normale e su tessuto danneggiato, ma non da tumore (Tsutsumi et al., 1996). Nel fegato normale e in quello danneggiato, non da tumore, è stato identificato l'mRNA con la sequenza 5'-UTR identica a quella del messaggero estratto dal fegato fetale (Pawlak et al., 1990); raramente è stato trovato l'mRNA con la sequenza 5'-UTR specifica di quello estratto dalla placenta (Rajpert-De Meyts et al., 1988). Nel tessuto tumorale, invece, prevale l'mRNA con il 5'-UTR caratteristico delle cellule HepG2 (Goodspeed et al., 1989), questo tipo di mRNA è stato trovato anche nel tessuto epatico normale che svilupperà l'HCC. Probabilmente il cambiamento di espressione genetica avviene nello stadio preneoplastico, pertanto la presenza dell'mRNA tipico delle cellule HepG2 può essere considerata un marcatore precoce dello sviluppo della malattia (Tsutsumi et al., 1996).

Altri studi su pazienti con HCC hanno dimostrato che il gene I per la GGT subisce un cambiamento dello stato di metilazione nella regione 5'-UTR rispetto i campioni di tessuto sano (Yao et al., 2000).

Questi dati sembrano avvalorare l'ipotesi che il passaggio dalla condizione fisiologica a quella di malignità sia accompagnato da una sequenza di eventi che causa il cambiamento dello stato di metilazione e dell'espressione del gene GGT-I. È interessante notare che le isoforme di GGT descritte nel HCC non differiscono nella sequenza amminoacidica, ma solo nello stato di glicosilazione. Non è ancora noto come un cambiamento nella regione non tradotta dell'mRNA possa riflettersi sulle modificazioni post-traduzionali subite dalla proteina (Whitfield, 2001).

L'espressione di GGT è considerata un marcatore di progressione neoplastica, oltre che nella cancerogenesi chimica nel fegato, anche in altri modelli sperimentali (Warren et al., 1993; Hanigan, 1998) come la pelle dei roditori (Tennenbaum et al., 1993) e la tasca buccale del criceto (Zhang e Mock, 1987), inoltre la comparsa di comportamento metastatico in cellule epiteliali dopo transfezione con l'oncogene *ras* si accompagna all'espressione di GGT (Braun et al., 1987; Li e Lieberman, 1989). Infine sono state trovate metastasi con una maggiore attività di GGT rispetto il tumore primario (Prezioso et al., 1993). A livello

molecolare è interessante ricordare che nell'uomo il gene per la GGT è localizzato sul braccio lungo (q) del cromosoma 22, tra le bande 11.1 ed 11.2 (Bulle et al., 1987), all'interno di una regione di alta instabilità associata a varie malattie tra cui alcune leucemie mieloidi acute e croniche (è la zona coinvolta nella formazione del cromosoma Filadelfia) ed al linfoma di Burkitt (Heisterkamp e Groffen, 1988), ciò accresce l'idea che esista un'intima correlazione tra incremento della GGT e crescita neoplastica.

1.6.4 GGT e cirrosi

In uno studio del 2014, condotto da Franzini e collaboratori, sono stati valutati i livelli plasmatici di GGT totale e delle relative frazioni in un gruppo di pazienti con cirrosi epatica sviluppatasi come conseguenza di diverse malattie a carico del fegato. Per tale studio sono stati arruolati 264 pazienti e sono stati suddivisi in base all'eziologia delle malattie epatiche, per cui pazienti colpiti da cirrosi metabolica (MET), con cirrosi alcolica (ALC), con cirrosi virale a causa di HCV e/o infezione da HBV (VIR), con carcinoma epatocellulare (HCC) in una cornice di cirrosi di origine virale. Il gruppo di studio di pazienti cirrotici ha mostrato dall'analisi dei parametri emato-chimici maggiori livelli di AST (aspartato aminotransferasi), ALT (alanina aminotransferasi), ALP (fosfatasi alcalina), BIL (bilirubina totale), LDH (lattato deidrogenasi), INR (international normalized ratio) e TRG (trigliceridi), e minori livelli di ALB (albumina sierica), CHOL (colesterolo totale) e piastrine rispetto agli individui del gruppo sano rappresentante i controlli. I livelli di GGT totale e delle relative frazioni sono risultati più alti nei pazienti cirrotici, mostrando un maggiore aumento per la s-GGT, frazione più abbondante nei pazienti cirrotici. Questi, suddivisi in quattro sottogruppi in base alla causa di cirrosi (MET, ALC, VIR, HCC), hanno mostrato un profilo di eluizione della s-GGT più ampio rispetto al corrispettivo degli individui sani e consistente in due componenti gaussiane definite matematicamente e denominate s1-GGT ed s2-GGT. Tale doppio profilo non è stato osservato nei controlli sani. Nei pazienti VIR sia la b-GGT che il rapporto b-GGT/s-GGT sono inferiori rispetto ai pazienti MET, mentre i pazienti HCC hanno mostrato valori più alti di b-GGT, m-GGT ed s1GGT rispetto al gruppo VIR. Nei quattro gruppi il rapporto b-GGT/s-GGT è risultato essere più basso rispetto ai controlli e non correlato alla GGT totale, all'eziologia della cirrosi o alla presenza di HCC.

I risultati dell'analisi di correlazione tra i valori di GGT e i valori emato-chimici, derivanti dagli esami di laboratorio, hanno mostrato correlazione positiva tra le frazioni di GGT e i valori TRG e CHOL. Inoltre, b-GGT ha mostrato una correlazione positiva con

ALB e FBG ed una correlazione negativa con INR , ma nessuna correlazione con AST, ALT, ALP, BIL e LDH. La frazione s2-GGT ha mostrato una correlazione positiva statisticamente significativa con AST, ALT, LDH, ALP e BIL, negativa con ALB e nessuna correlazione con INR e FBG. Le due componenti di s-GGT – s1-GGT ed s2-GGT – mostrano comportamenti indipendenti per alcune variabili (come ALB, INR, FBG) e comportamenti talvolta opposti per altre (BIL, LDH). Il rapporto b-GGT/s-GGT ha mostrato correlazione negativa per lo più con gli indici di danno epatocellulare (AST, ALT), o positiva con marker di funzionalità degli epatociti (ALB, FBG), rispettivamente conseguenti a un aumento di s-GGT o b-GGT.

In tale studio si dimostra che il rapporto b-GGT/s-GGT ha un'elevata sensibilità e specificità per la cirrosi, indipendentemente dai livelli di GGT totale e delle sue frazioni. I dati suggeriscono che il rapporto b-GGT/s-GGT possa essere un biomarker specifico per il riarrangiamento strutturale del fegato. Per quanto riguarda le singole frazioni di GGT, si sottolinea che b-GGT è un marker della funzionalità epatica e, al contrario, s-GGT, in particolare la componente s2-GGT, si comporta come marker di danno cellulare e colestasi, mostrando correlazione positiva con AST, ALT, LDH, ALP e BIL, e negativa con ALB.

Poiché non si è ancora individuato il ruolo principale della GGT nel metabolismo epatico, nel suddetto studio si suggerisce che solo dopo il chiarimento dei meccanismi che portano alla sintesi e al rilascio delle frazioni di GGT si potrà comprendere in maniera ottimale il legame tra GGT, sue frazioni e fisiopatologia epatica, spiegando così le correlazioni e i risultati ottenuti in questo studio. Pertanto, ulteriori ricerche sulla natura e il ruolo biologico delle frazioni di GGT saranno estremamente importanti per contribuire all'utilizzo di questi biomarker per la diagnosi e la prognosi delle malattie del fegato.

1.6.5 Ruolo predittivo della GGT nel post trapianto di fegato

Schneider e collaboratori (2011), in un recente studio, hanno sviluppato un semplice algoritmo predittivo per l'esito del trapianto ortotopico di fegato, basato su tre parametri analizzati di routine in tutti i laboratori di analisi: AST (aspartato amino-transferasi), bilirubina e GGT. L'obiettivo, in tale studio, è stato quello di fornire un algoritmo con parametri non alterabili dall'intervento medico, affidabile e prontamente disponibile. Anche se il trapianto di fegato è divenuto di routine per il trattamento di malattie epatiche altrimenti incurabili, tale procedura è ancora associata a morbidità e mortalità. La perdita dell'organo trapiantato o la morte dell'individuo sottoposto a trapianto possono verificarsi nel 20% dei pazienti all'interno del primo anno di vita dopo il trapianto. Pertanto, una stretta

sorveglianza dei pazienti nel periodo post operatorio è obbligatoria per migliorare gli esiti del trapianto di fegato. Le ragioni di esiti avversi sono molteplici e includono complicanze biliari e arteriose, infezioni e sepsi, emorragia e rigetto cellulare acuto, molte delle quali sono potenzialmente trattabili se riconosciute in maniera tempestiva.

È qui che si inserisce l'obiettivo di tale studio, ossia quello di mettere a punto un algoritmo predittivo e un indicatore di prognosi affidabile nel più breve tempo possibile.

I pazienti, inclusi in questo studio, sono stati 269, tutti sottoposti a trapianto ortotopico di fegato, con dati di laboratorio completi e disponibili, omogenei per quanto riguarda età, sesso e ragione del trapianto. Sono stati analizzati i valori di AST e di bilirubina nei primi sette giorni dal trapianto ed il valore di GGT al settimo giorno del post trapianto. I risultati hanno mostrato una correlazione nei primi giorni post trapianto tra alti valori di AST e di bilirubina con esiti negativi del trapianto di fegato, mentre hanno mostrato una correlazione tra alti valori di GGT ed esiti positivi del trapianto. Pertanto, nell'algoritmo proposto, alti valori di GGT e concomitanti bassi valori di bilirubina e di AST nei primi giorni post trapianto risultano essere predittivi di un buon esito per il trapianto di fegato. I dati sono stati ottenuti in un unico centro di chirurgia per il trapianto di fegato, pertanto devono essere ancora verificati in altri centri per il trapianto d'organo; tuttavia, gli Autori del suddetto articolo, promuovono l'utilizzo di tale metodo per l'identificazione dei pazienti a rischio nel post trapianto di fegato ed indicano come tale algoritmo, garantito da un'indagine approfondita, possa costituire una "red flag" per i medici che si occupano di trapianto di fegato.

Infine, non è ancora ben chiaro quale sia il meccanismo che lega l'aumento della GGT nei primi giorni post trapianto all'esito positivo del trapianto di fegato. Dalla letteratura, si conosce che durante la rigenerazione epatica dopo epatectomia parziale nei ratti (Kitten, Ferry, 1998), l'aumento della GGT ha mostrato cinetiche simili a quelle osservate nel presente studio; inoltre, lo stesso risultato si è ottenuto nel recupero da necrosi epatica tossica negli uomini (Horn et al., 1999). Pertanto, come indicato da Schneider e collaboratori, una probabile spiegazione per l'aumento sproporzionato di GGT nei pazienti durante i primi giorni post trapianto che hanno mostrato esito favorevole al trapianto, non è da ricondurre al danno epatico, che porta a perdita dell'organo trapiantato o morte, ma piuttosto ad una rigenerazione degli epatociti (Eisenbach et al., 2009), indicando un trapianto ben riuscito. Tuttavia, ulteriori studi dovranno obbligatoriamente essere effettuati per fornire maggiori informazioni e delucidazioni sull'argomento preso in esame dal suddetto studio.

1.7 La GGT e la bile

Nel 1963 era già nota la presenza dell'attività della GGT nella bile, ed è stata ritrovata con valori più elevati rispetto a quella presente nel siero (Szewczuk et al., 1963). Fu supposto che la GGT biliare originasse dalle cellule epatiche e dalle cellule del tratto biliare mediante un processo di estrazione dalla membrana plasmatica ad opera degli acidi biliari.

Nel 1978 Huseby e collaboratori, caratterizzarono la GGT presente in campioni di origine umana di siero, fegato (omogenato del tessuto) e bile determinando la densità, dimensione, mobilità elettroforetica, grado di idrofobicità/idrofilicità. In tutti e tre i tipi di campione furono individuate forme multiple di GGT, distinte per dimensione e densità, inoltre fu dimostrato che parte dell'attività di GGT presentava caratteristiche di idrofobicità. Quest'ultima quota di attività di GGT risultava anche sensibile al trattamento con detergenti e proteasi (papaina) a seguito del quale si otteneva una nuova forma di GGT che presentava le stesse caratteristiche di dimensione e densità della proteina idrofila già presente nei campioni. Gli Autori, perciò, conclusero che l'eterogeneità dell'enzima visualizzata sia con le tecniche cromatografiche sia con l'elettroforesi non era dovuta alla presenza di veri e propri isoenzimi, ma piuttosto alla presenza di complessi macromolecolari di natura lipoproteica ai quali era associata la proteina GGT completa del peptide di inserzione in membrana. Mentre la porzione idrofila di GGT, presente nei campioni analizzati, sarebbe costituita dalla stessa proteina GGT presente nei suddetti complessi, ma priva del peptide idrofobico di inserzione in membrana.

Wenham e collaboratori (1981), confermarono gli studi precedenti, identificando nella bile umana quattro forme di GGT che differivano per mobilità elettroforetica, massa molecolare e densità.

Anche in questo lavoro fu ipotizzato che le diverse forme di GGT fossero dovute all'associazione dell'enzima con diverse componenti lipidiche o lipoproteiche. Infatti, fu dimostrato che trattando la GGT biliare con n-butanolo, per estrarre la componente lipidica, si generava una sola forma di GGT con caratteristiche diverse dalle quattro forme descritte nella bile non trattata. In uno studio successivo, Wenham e collaboratori (1985) supposero che nella bile la forma di GGT ad alto peso molecolare fosse costituita da GGT associata a frammenti di membrana. Quest'ultima affermazione era supportata anche da studi precedenti che avevano dimostrato che alcuni enzimi biliari sono rilasciati associati a vescicole di membrana (De Broe et al., 1975).

Nelle patologie epatiche, quali ad esempio la colestasi, si osserva un forte aumento della GGT nel siero conseguente all'aumento della quota di GGT idrofobica con comparsa di

complessi ad elevato peso molecolare (Huseby et al., 1982). Fu ipotizzato che l'aumento della forma ad alto peso molecolare fosse determinata da una maggiore espressione dell'enzima GGT a livello del polo canalicolare della membrana degli epatociti, con conseguente aumento della sua concentrazione nella bile. L'aumento degli enzimi biliari porterebbe al loro successivo passaggio nel plasma dove potrebbero contribuire alla forma di GGT ad alto peso molecolare osservata nei pazienti con disfunzione epatica (Wenham et al., 1981).

Capitolo 2: Obiettivo della tesi

L'argomento della presente tesi si inserisce in un più ampio studio dal titolo "Analisi delle frazioni di GGT su siero e bile in corso di follow-up post trapianto di fegato". Tale studio, non sponsorizzato da ditte farmaceutiche, è di tipo monocentrico, osservazionale e prospettico, eseguito su una coorte di soggetti sottoposta a trapianto di fegato presso la U.O. di Chirurgia Epatica e Trapianti di Fegato dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana (AOUP).

Lo studio ha avuto inizio nel gennaio del 2014 ed è tuttora in corso, prevede l'arruolamento di 100 soggetti sottoposti a trapianto ortotopico di fegato, per un follow-up complessivo di 12 mesi post trapianto.

L'obiettivo principale di questo studio è l'analisi dell'andamento delle frazioni di GGT su campioni di siero prelevati da pazienti sottoposti a trapianto di fegato durante il follow-up post trapianto. L'obiettivo secondario dello studio è l'identificazione di pattern specifici delle frazioni di GGT in campioni di siero e di bile dei suddetti pazienti in associazione a specifiche complicanze post trapianto.

La presente tesi analizza l'andamento della GGT totale e delle frazioni di GGT su campioni di siero nei primi 15 giorni post trapianto di fegato, con un numero di pazienti totale di 29, utilizzando per l'analisi un sistema FPLC, presente presso la Fondazione Gabriele Monasterio di Pisa, e quantificando l'attività enzimatica della GGT e delle frazioni tramite una reazione post colonna.

I dati raccolti sono, successivamente, analizzati con metodi statistici volti a determinare la correlazione dell'attività delle frazioni di GGT plasmatica con l'attività delle frazioni di GGT biliare, precedentemente ottenuti nello stesso laboratorio in un altro lavoro di tesi.

Successivamente, i dati relativi alle frazioni di GGT plasmatica e di GGT biliare sono analizzati, anch'essi, con metodi statistici volti a determinare la correlazione, nei 15 giorni post trapianto, con i parametri emato-chimici di ogni paziente. I parametri emato-chimici sono stati forniti dall'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana.

Capitolo 3: Materiali e metodi

3.1 Reagenti

La γ -Glutamyl-7-amido-4-metilcumarina (γ GluAMC,G7261), la glicilglicina (GlyGly, G1002), il sodio fosfato monobasico e dibasico, l'EDTA, la papaina e l'acivicina sono stati acquistati dalla ditta Sigma Aldrich (Italia).

La colonna Superose-6 per la cromatografia ad esclusione molecolare e il kit di proteine a peso molecolare noto per la calibrazione della colonna (MWGF 1000, destrano blu, tiro globulina, apoferritina, β -amilasi, albumina di siero bovino, anidrasi carbonica) sono stati acquistati dalla ditta GE Healthcare Europe (Italia).

3.2 Raccolta dei campioni

La raccolta dei campioni di siero è stata effettuata dal personale infermieristico dell'U.O. di Chirurgia Epatica e del Trapianto di Fegato e dell'Unità di Terapia Intensiva Post-Chirurgica e Trapianti di Fegato "P. Kaiserli", Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana. I campioni di siero sono stati conservati a -20°C e analizzati entro 5 giorni dal prelievo.

A garanzia dell'anonimato dei soggetti reclutati nello studio, tutti i campioni raccolti sono stati contrassegnati con un codice identificativo assegnato al soggetto al momento dell'arruolamento.

I pazienti sono stati sottoposti a prelievi seriatati di campioni per l'analisi delle frazioni di GGT plasmatica seguendo il calendario del follow up precoce, ossia in corso di ricovero i campioni sono stati prelevati nelle prime due settimane post operatorie.

3.3 Determinazione delle frazioni plasmatiche della GGT

La determinazione dell'attività totale della GGT e delle sue frazioni è stata eseguita su campioni di bile mediante l'impiego di un sistema FPLC (*fast protein liquid chromatography*, AKTA purifier, GE Healthcare) dotato di una colonna cromatografica per esclusione molecolare (Superose-6 HR 10/300 GL, GE Healthcare Europe) ed un rilevatore spettrofluorimetrico (Jasco FP-2020, Jasco Europe, Lecco, Italy) (figura 1.11).

La cromatografia per esclusione molecolare sfrutta le proprietà di setaccio molecolare proprie di composti organici polimerici che, mediante legami crociati, formano una rete tridimensionale di pori a dimensione controllata che conferisce loro le proprietà di un gel. Questa colonna di particelle di gel e il volume incluso in esse rappresenta la fase stazionaria attraverso la quale fluisce la fase mobile. Le molecole più grosse saranno completamente escluse dai pori e quindi passeranno attraverso gli interstizi del gel eluendo per prime dalla

colonna nella quale è impaccato il gel. Le molecole più piccole, invece, si distribuiranno tra la fase mobile all'interno e all'esterno del gel stesso e saranno trattenute per un volume di fase mobile proporzionale al peso molecolare del soluto stesso. La relazione tra il volume di eluizione e la massa molecolare delle proteine si determina calibrando ogni colonna per cromatografia ad esclusione molecolare con proteine a peso molecolare noto, essendo il log della massa molecolare inversamente proporzionale al volume di eluizione.



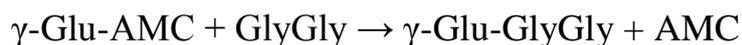
Figura 1.11 Sistema FPLC dotato di una colonna cromatografica per esclusione molecolare ed un rilevatore spettro fluorimetrico.

Il metodo cromatografico per la separazione delle frazioni di GGT prevede un'eluizione isocratica, al flusso di 0.5 mL/min, con un tampone di sodio fosfato 0.1 mol/L (pH 7.4) contenente NaCl 0.2 mol/L, 0.1 mmol/L di EDTA e 4.5 mmol/L di GlyGly come accettore della reazione di transpeptidazione catalizzata dalla GGT. I campioni di plasma sono filtrati mediante un filtro 0.45- μ m PVDF (Millipore) prima dell'iniezione. Ogni iniezione è stata eseguita con 0.02 ml di campione filtrato.

Per poter determinare in continuo l'attività di GGT a valle della colonna, attraverso una connessione a T (figura 1.12), all'eluato del gel di filtrazione è stata continuamente aggiunta una soluzione contenente il substrato fluorescente per la GGT, gamma-glutamyl-7-amido-4-methylcoumarin (γ GluAMC), rilasciata al flusso di 0.1 mL/min. La miscelazione dell'eluato della colonna con il substrato della GGT (γ GluAMC 0.030 mmol/L) avviene in una spira con un volume di 2.6 ml (PFA, 2.6 mL) corrispondente ad un'incubazione di circa 4.5 minuti, posta in un bagnetto termostatico a 37 C°.

La soluzione substrato di γ GluAMC è preparata giornalmente diluendo 25 volte la soluzione madre (4.5 mmol/L in EtOH 40% v/v e NaOH 0.005 N, conservata a -20°C) con tampone Tris-HCL 0.25mol/L a pH 8.5 (temperatura ambiente).

Poiché l'acceptore della reazione catalizzata dalla GGT è incluso nella fase mobile, la presenza dell'enzima è visualizzata attraverso la liberazione del composto fluorescente amminometilcumarina (AMC) secondo la reazione:



Il prodotto AMC è rilevato tramite un fluorimetro operante ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 380 nm e di emissione di 440 nm. L'intensità di fluorescenza del segnale è espressa in unità arbitrarie di fluorescenza e l'area sotto i picchi è proporzionale all'attività di GGT (figura 1.13) (Franzini et al., 2008).

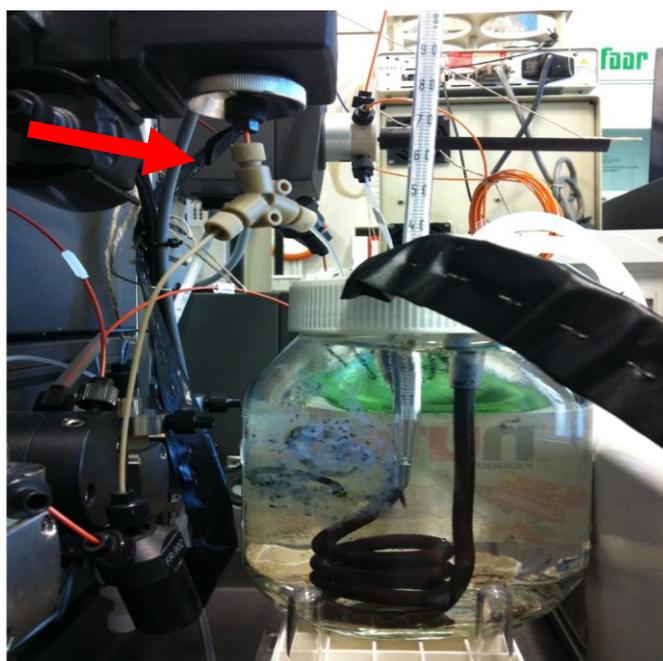


Figura 1.12 Particolare della connessione a T (indicata dalla freccia rossa) presente in uscita dalla colonna cromatografica e della spira PFA con un volume di 2.4 ml corrispondente ad un'incubazione di circa 4 minuti, posta in un bagnetto termostatico a 37°C .

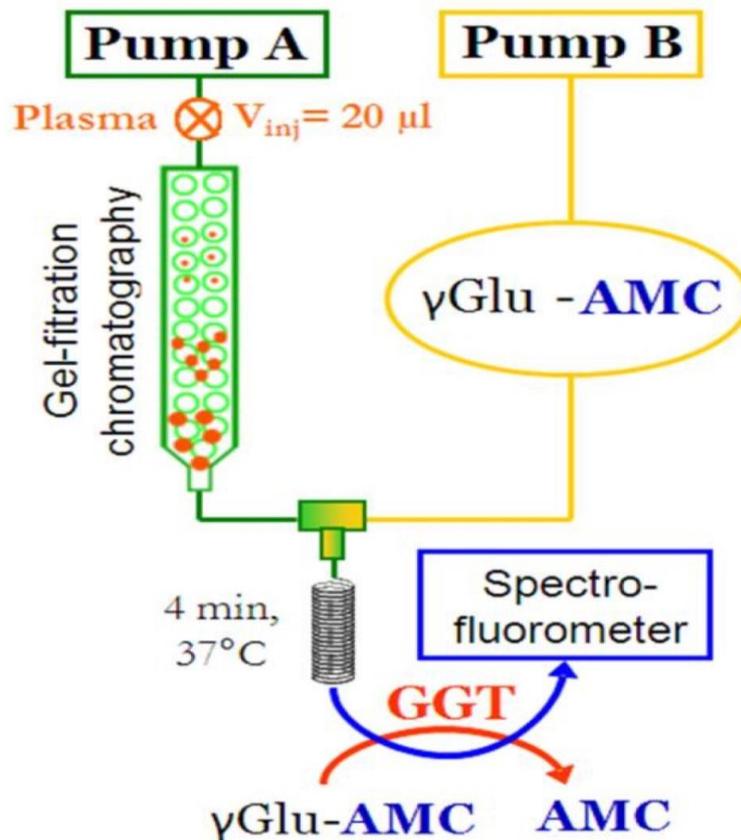


Figura 1.13 Schema delle componenti dello strumento per la separazione e la determinazione dell'attività totale di GGT e delle relative frazioni.

3.4 Quantificazione dell'attività di GGT associata alle frazioni

L'area dei picchi di attività di GGT è stata calcolata con l'aiuto del software MATLAB (Version 7 MathWorks, Inc.). Il programma permette di descrivere ogni picco con una curva Gaussiana modificata esponenzialmente; per ogni curva sono stati definiti gli intervalli di variazione dell'altezza, della larghezza a metà altezza, della posizione e della asimmetria. L'area è stata calcolata utilizzando un algoritmo non lineare di minimizzazione dei minimi quadrati.

La conversione dell'area in attività di GGT, espressa in U/L, è stata calcolata sulla base di una curva di calibrazione costruita utilizzando campioni di plasma con attività totale di GGT nota (standard). La retta è stata costruita mettendo sull'ascisse i dati relativi all'attività di GGT dei campioni standard e sull'ordinate i dati relativi all'area sottesa al cromatogramma ottenuto dall'analisi di tali campioni mediante gel di filtrazione. Una volta controllato che il punto con coordinate (0,0) appartiene agli intervalli di confidenza del 95% dei valori di intercetta su entrambi gli assi, è stata calcolata la retta di regressione lineare passante per (0,0) con equazione: $y = ax$ (ovvero area = pendenza x attività U/L). Il valore di attività

espresso in U/L delle frazioni di GGT è quindi stato ottenuto dividendo l'area della frazione per il valore della pendenza della retta di calibrazione passante per zero (Figura 1.14).

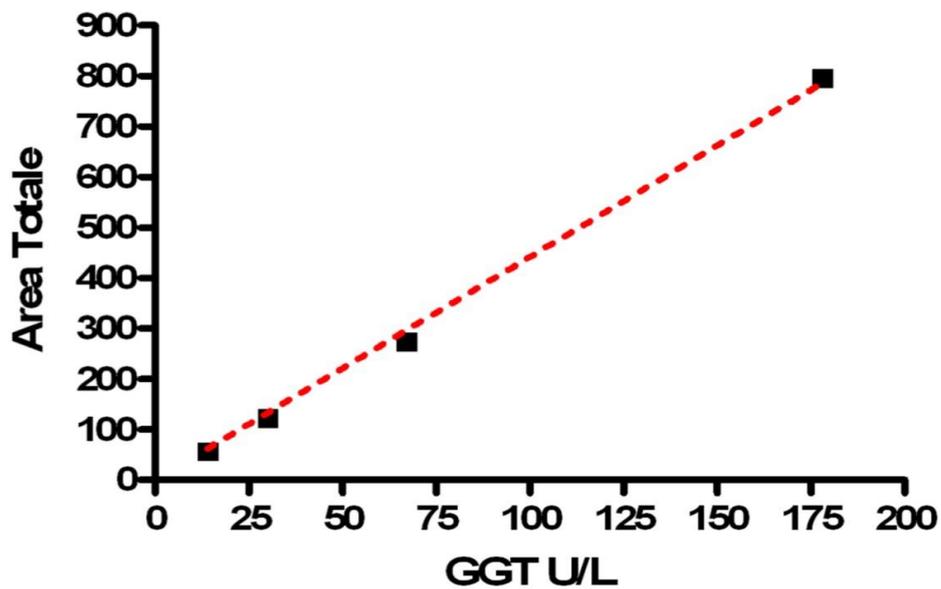


Figura 1.14 Curva di calibrazione costruita utilizzando campioni di plasma con attività totale di GGT nota (standard).

Capitolo 4: Risultati

4.1 Analisi dei cromatogrammi delle varie frazioni della GGT

Confrontando i profili di eluizione dell'attività plasmatica di GGT in 29 pazienti sottoposti a trapianto di fegato, sono state osservate delle analogie con i risultati menzionati nel paragrafo 1.6.4 relativo agli studi effettuati da Franzini e collaboratori (2014) sulle frazioni circolanti di GGT in pazienti affetti da cirrosi.

In particolare, dai cromatogrammi, da me analizzati, relativi alle frazioni di GGT plasmatica riguardanti i 29 pazienti sottoposti a trapianto di fegato, si osserva che il volume di eluizione delle frazioni b-GGT ed f-GGT è costante, mentre quello relativo ad m-GGT ed s-GGT risulta essere variabile. Nello specifico, si evince dai cromatogrammi che il volume di eluizione a cui compare la frazione s-GGT tende a diminuire quando ci si allontana dal giorno del trapianto di fegato e, di conseguenza, tende ad acquisire un maggiore peso molecolare. Tale comportamento della frazione di s-GGT plasmatica fa supporre che s-GGT non sia costituita da un unico complesso molecolare, ma che sia altresì costituita da diversi complessi, che nel corso dei giorni post trapianto possono formarsi e pertanto mostrare nell'analisi dei cromatogrammi un cambiamento nella larghezza, nella simmetria e nel picco relativo alla frazione s-GGT. Di seguito sono illustrati dei cromatogrammi esplicitivi di pazienti, identificati con codici, sottoposti a trapianto di fegato durante i primi 15 giorni post trapianto.

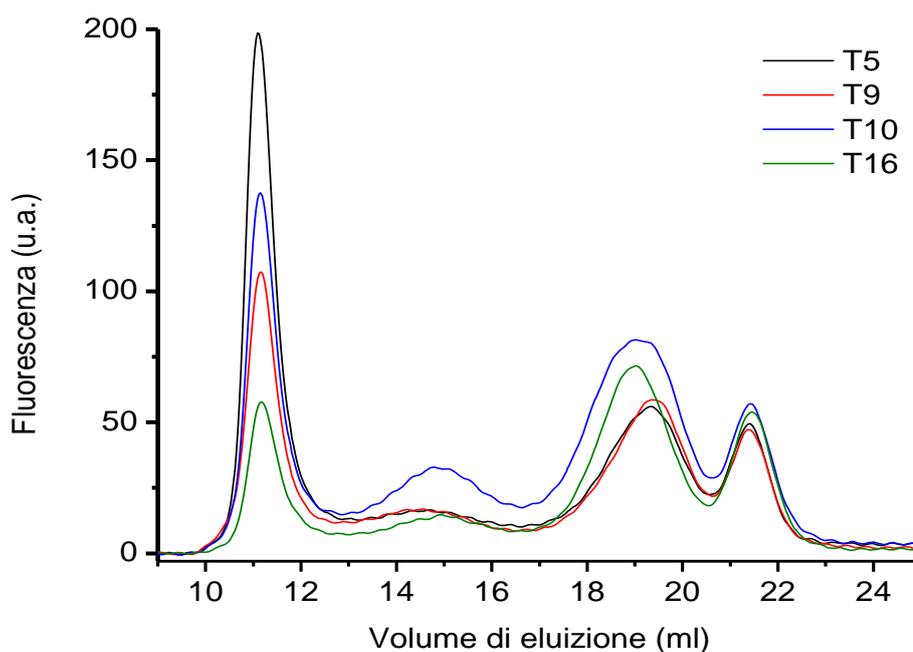


Figura 1.15 Profilo di eluizione dell'attività delle frazioni plasmatiche di GGT del paziente 01M.

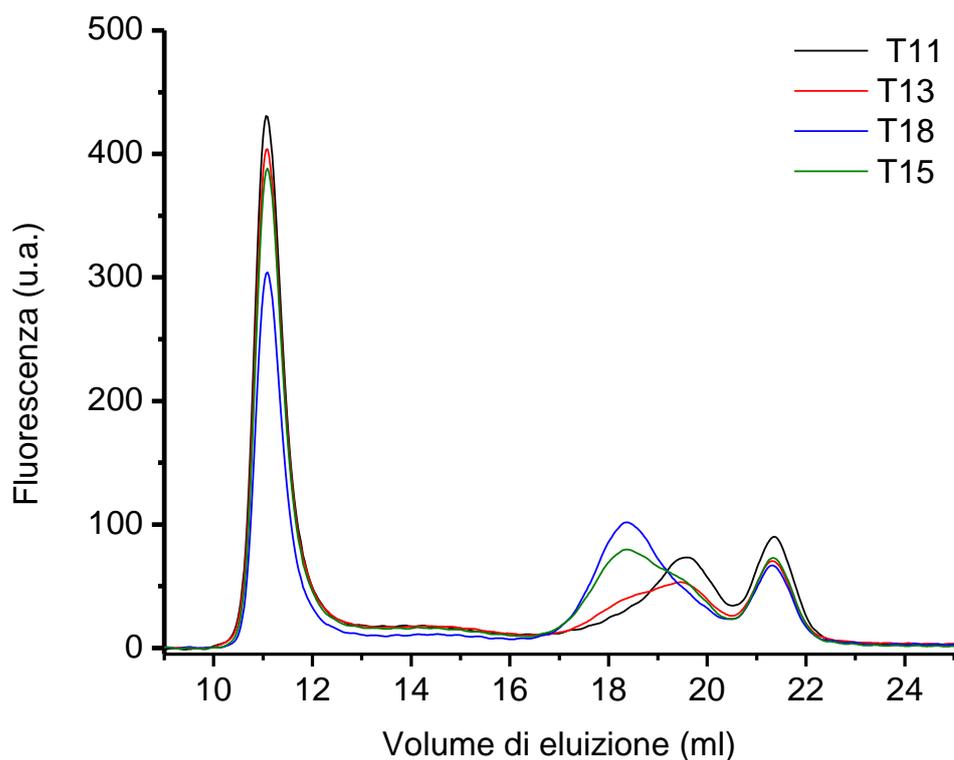


Figura 1.16 *Profilo di eluizione dell'attività delle frazioni plasmatiche di GGT del paziente 02M.*

Come possiamo notare dai cromatogrammi illustrati nella figura 1.15 e 1.16, il volume di eluizione delle frazioni b-GGT ed f-GGT rimane invariato, mentre il profilo della frazione s-GGT appare spostarsi verso sinistra in concomitanza con l'aumentare dei giorni post trapianto, ossia verso un volume di eluizione minore e peso molecolare maggiore. Si osserva inoltre un cambiamento della larghezza e del picco di eluizione corrispondente a s-GGT.

Osservando i cromatogrammi illustrati nella figura 1.17 e 1.18 si confermano i risultati ottenuti da Franzini e collaboratori (2014) per la frazione s-GGT: possiamo notare come in entrambi i cromatogrammi, il profilo di eluizione di colore rosso subisca una deviazione (indicata dalla freccia) che fa pensare alla presenza di due o più componenti gaussiane relative alla s-GGT. Questo è, pertanto, un indice della presenza di diversi complessi aventi peso molecolare simile alla s-GGT e che eluiscono nel suo stesso intervallo di volume di eluizione. I cromatogrammi evidenziati dal colore rosso (T8 e T11) risultano essere intermedi ai cromatogrammi indicati dal nero (T7 e T10) e blu (T13 e T16) indicando che nel corso dei giorni post trapianto il complesso relativo alla s-GGT si stabilizza su valori standard e simili nei vari cromatogrammi.

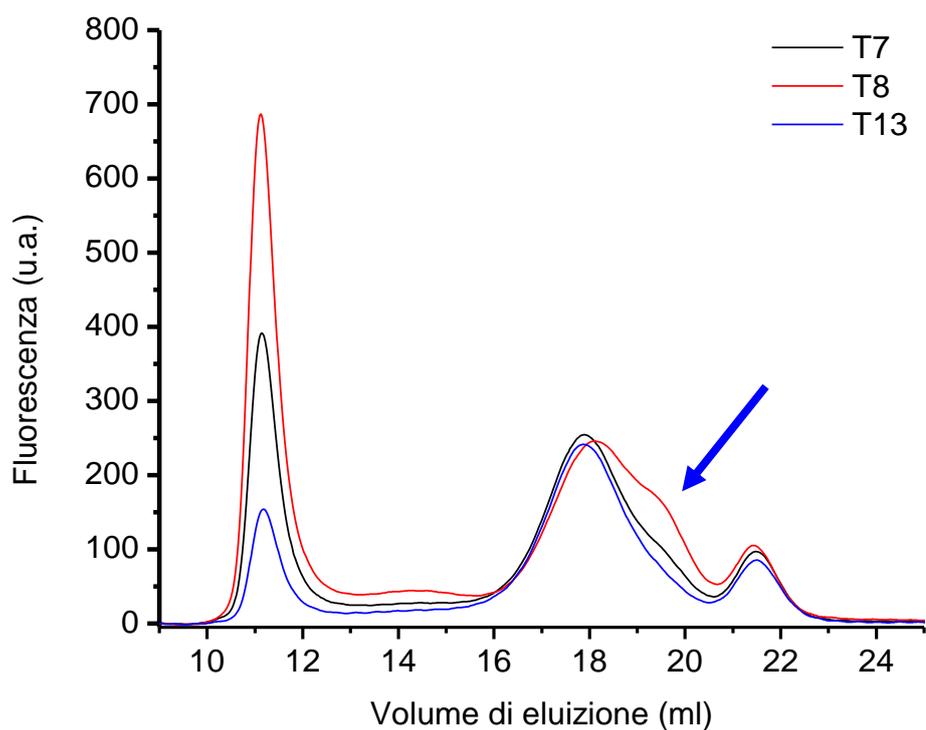


Figura 1.17 Profilo di eluizione dell'attività delle frazioni plasmatiche di GGT del paziente 03M.

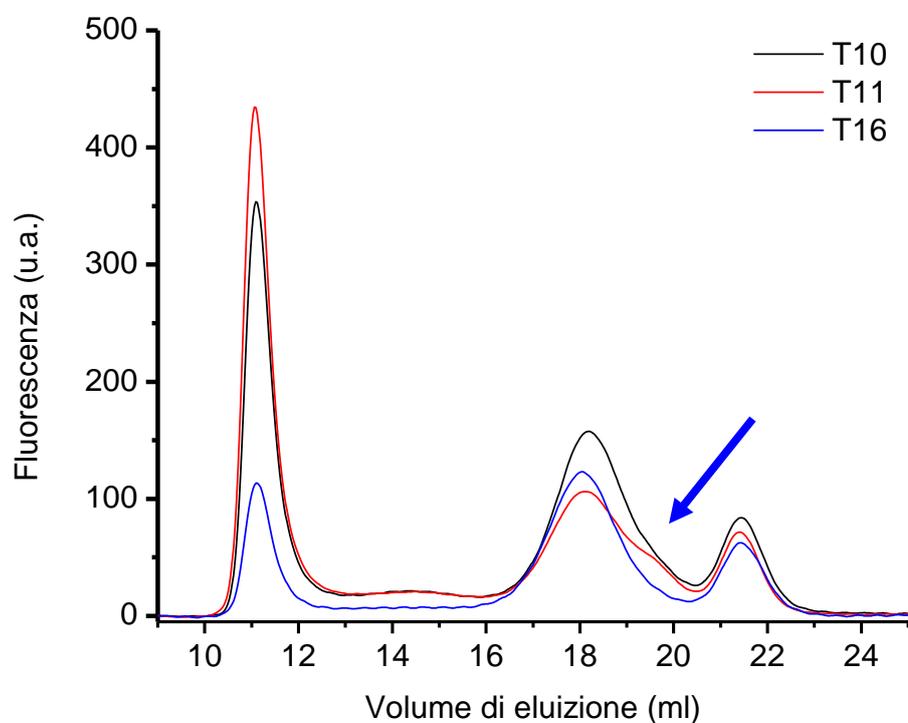


Figura 1.18 Profilo di eluizione dell'attività delle frazioni plasmatiche di GGT del paziente 04M.

Per descrivere la variabilità del volume di eluizione di s-GGT, invece di utilizzare il volume di eluizione della frazione stessa, è stata utilizzata la differenza tra i volumi di eluizione delle frazioni f-GGT ed s-GGT [Vel.(f-s)]. Si è scelto di utilizzare come riferimento la frazione f-GGT, invece di b-GGT, perché la prima è sempre rappresentata anche nei soggetti sani con bassa attività totale di GGT (Franzini et al., 2014).

Possiamo osservare visivamente dall'istogramma in figura 1.19, come il [Vel.(f-s)] tende ad aumentare nei 15 giorni post trapianto. Inoltre, l'analisi della varianza, mediante ANOVA ad una via, utilizzando i dati di [Vel.(f-s)] nei primi 15 giorni post trapianto di fegato, mostra un andamento lineare significativo con $P < 0.05$.

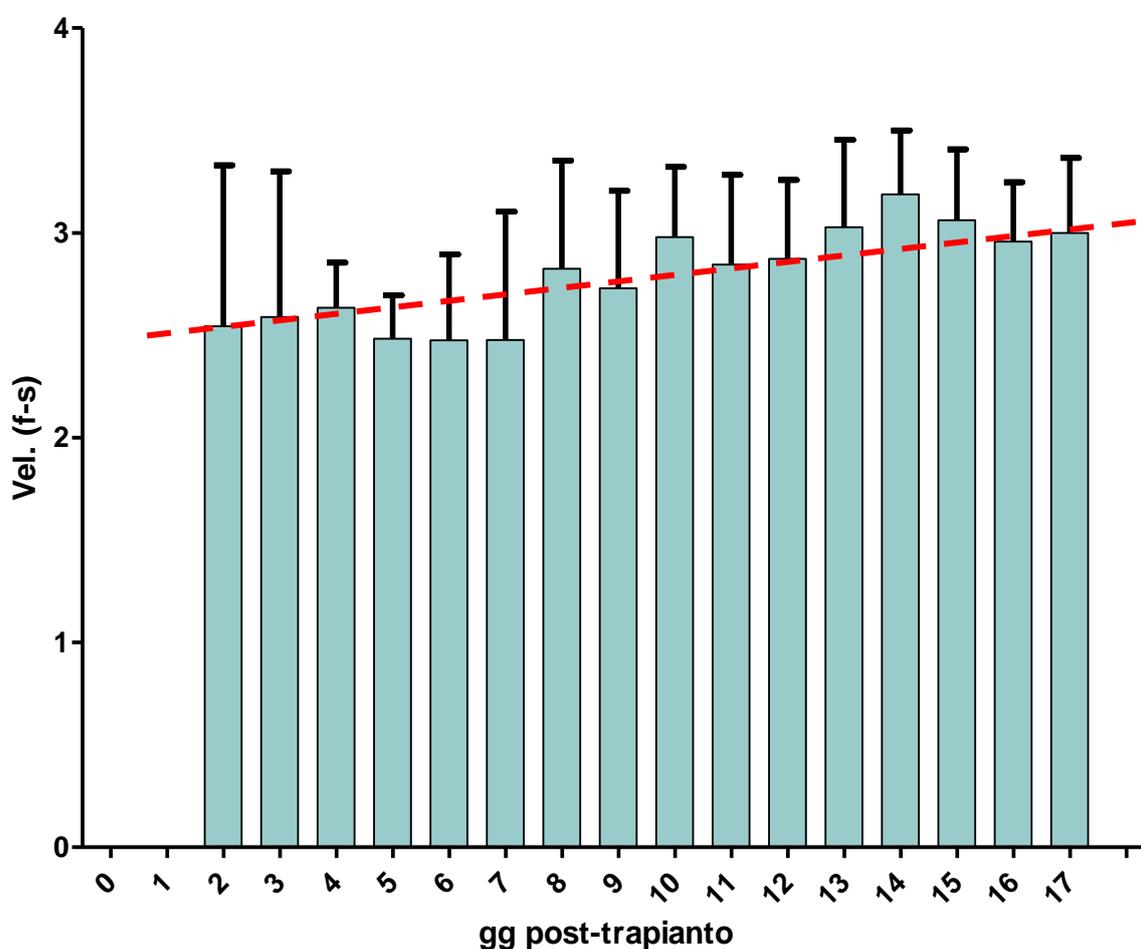


Figura 1.19 Istogramma avente sull'asse delle ascisse la differenza tra i volumi di eluizione delle frazioni f-GGT ed s-GGT e sull'asse delle ordinate i giorni post trapianto di fegato.

4.2 Andamento della GGT nel follow up post trapianto di fegato

Sono stati analizzati i profili di eluizione della GGT plasmatica di 29 pazienti sottoposti a trapianto di fegato, al fine di valutare l'andamento dei valori di GGT dei valori di GGT totale e delle singole frazioni.

I valori medi di GGT totale plasmatica nei primi 15 giorni presentano un'alta variabilità interindividuale con un picco al settimo giorno con un valore medio maggiore di 230 U/L (figura 1.20). Successivamente al settimo giorno i valori medi di GGT totale plasmatica tendono lentamente a diminuire mantenendosi sino al 16° giorno su valori medi maggiori di 150 U/L e arrivando il 17° a valori medi di poco superiori ai 100 U/L.

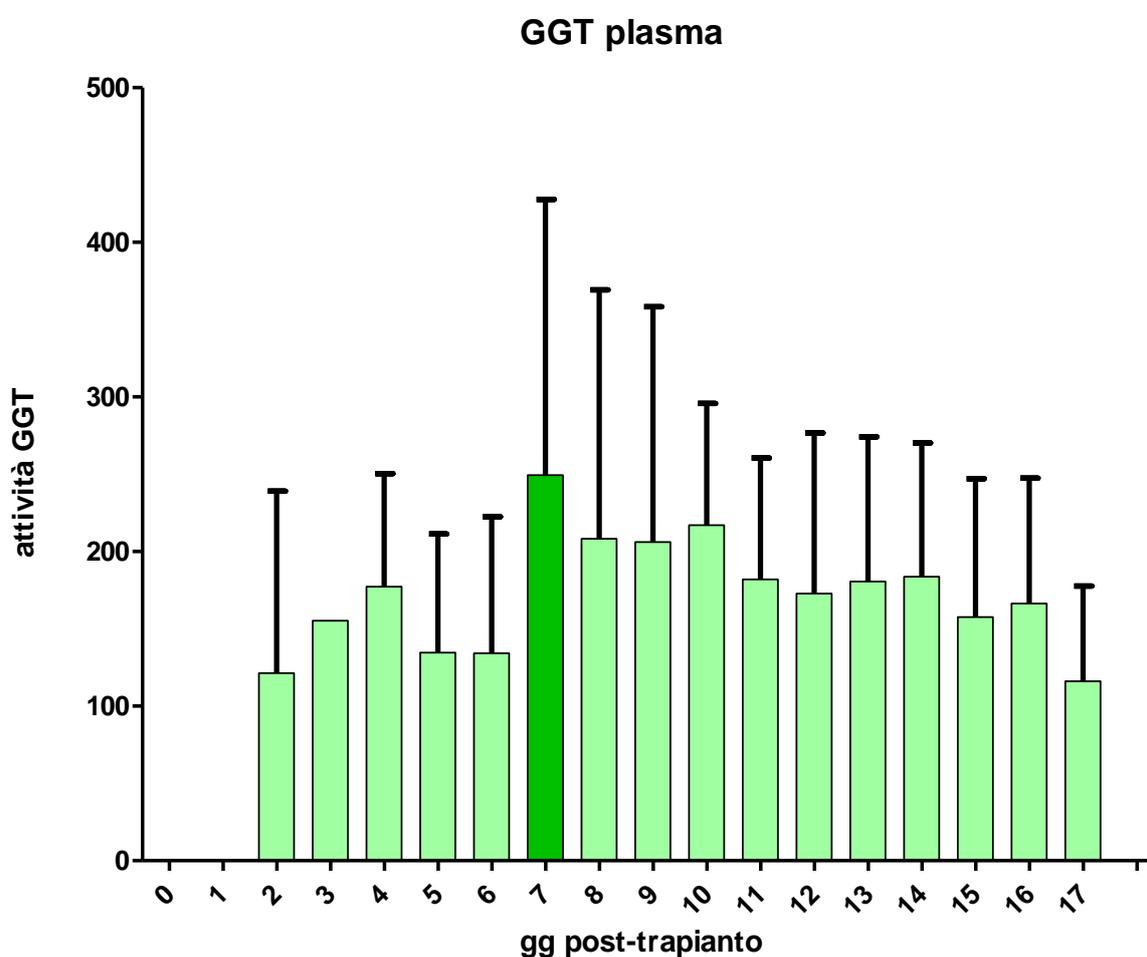


Figura 1.20 Nel grafico è riportata la media dell'attività totale di GGT plasmatica dei pazienti sottoposti a trapianto di fegato nei primi 15 giorni post trapianto.

Il profilo di eluizione di tutti i pazienti è principalmente caratterizzato dalla presenza della frazione b-GGT (figura 1.21), che raggiunge il massimo di attività al 7° giorno post trapianto con attività media superiore ai 130 U/L. Nei giorni successivi al 7° giorno la frazione b-GGT tende lentamente a diminuire mantenendosi sino al 12° giorno post trapianto su valori medi superiori ai 60 U/L per poi scendere al di sotto nei giorni successivi.

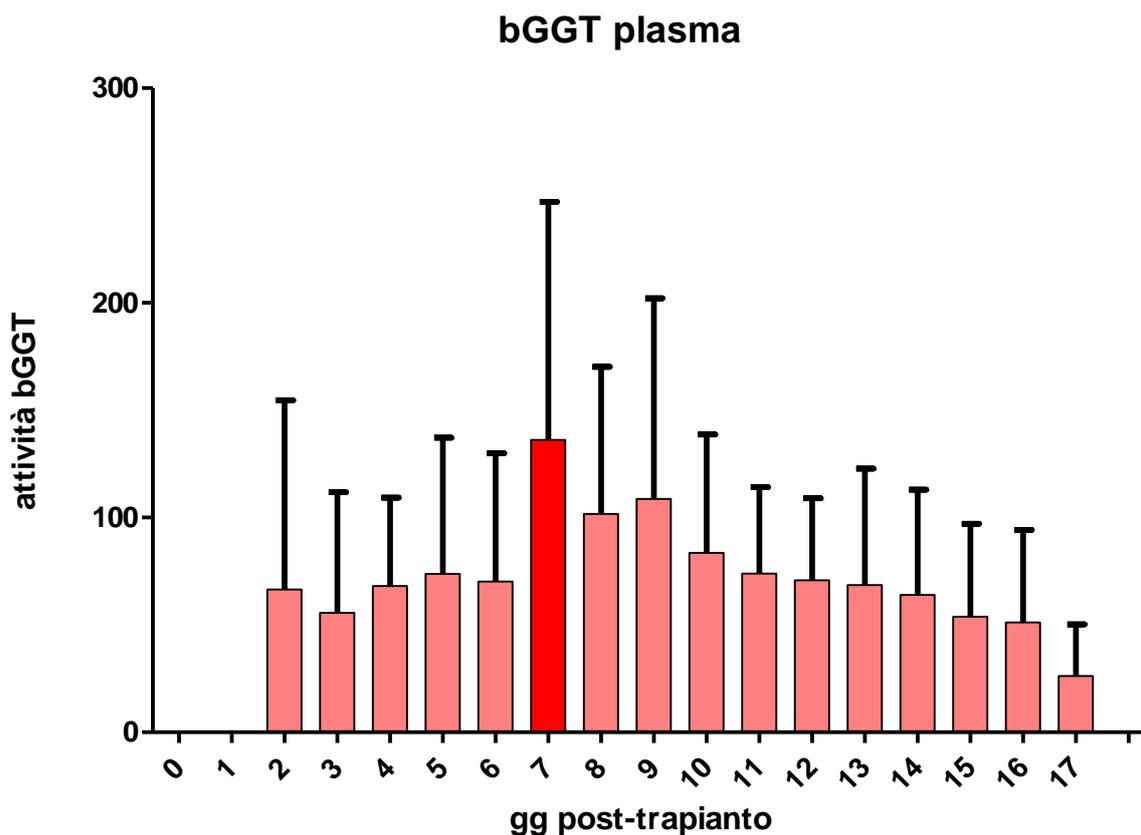


Figura 1.21 Nel grafico è riportata la media dell'attività di b-GGT plasmatica dei pazienti sottoposti a trapianto di fegato durante i primi 15 giorni post trapianto.

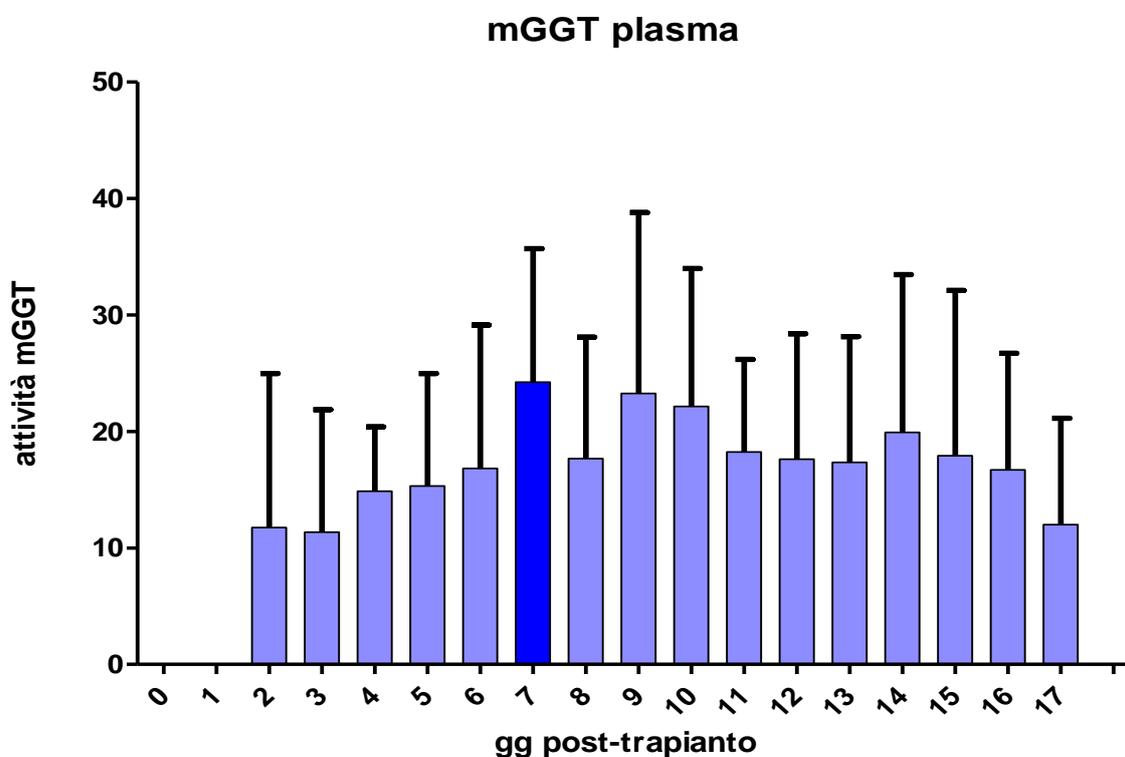


Figura 1.22 Nel grafico è riportata la media dell'attività di m-GGT plasmatica dei pazienti sottoposti a trapianto di fegato durante i primi 15 giorni post trapianto.

L'andamento dei valori medi dell'attività di m-GGT plasmatica (figura 1.22) mostra, anch'esso, il massimo di attività al 7° giorno post trapianto con attività media superiore ai 20 U/L. Nei giorni successivi al 7° giorno la frazione m-GGT tende a diminuire con valori medi inferiori ai 20 U/L. Occorre scrivere che l'attività media della m-GGT è di molto inferiore all'attività media della b-GGT, come si può osservare dal confronto degli istogrammi relativi alla b-GGT (figura 1.21) e alla m-GGT (figura 1.22).

Sono stati analizzati, inoltre, i valori medi dell'attività di s-GGT plasmatica (figura 1.23) e di f-GGT plasmatica (figura 1.24). Per quanto riguarda la s-GGT plasmatica, dall'andamento dei valori medi nei primi 15 giorni post trapianto si può notare un picco al 10° giorno, che emerge rispetto agli altri valori medi di attività. Successivamente, il valore tende a diminuire, ma la presenza nei primi nove giorni di un andamento altalenante non permette una descrizione temporale lineare dell'andamento della s-GGT plasmatica.

In aggiunta, non è stato possibile delineare uno schema temporale che possa darci una visione d'insieme dell'andamento dell'attività media della frazioni plasmatica f-GGT nei primi 15 giorni post trapianto. Difatti, dal grafico in figura 1.24, possiamo notare come i valori medi della f-GGT plasmatica non seguano un cammino lineare, potendone constatare la presenza e l'attività media nella maggior parte dei primi 15 giorni post trapianto superiore ai 15 U/L.

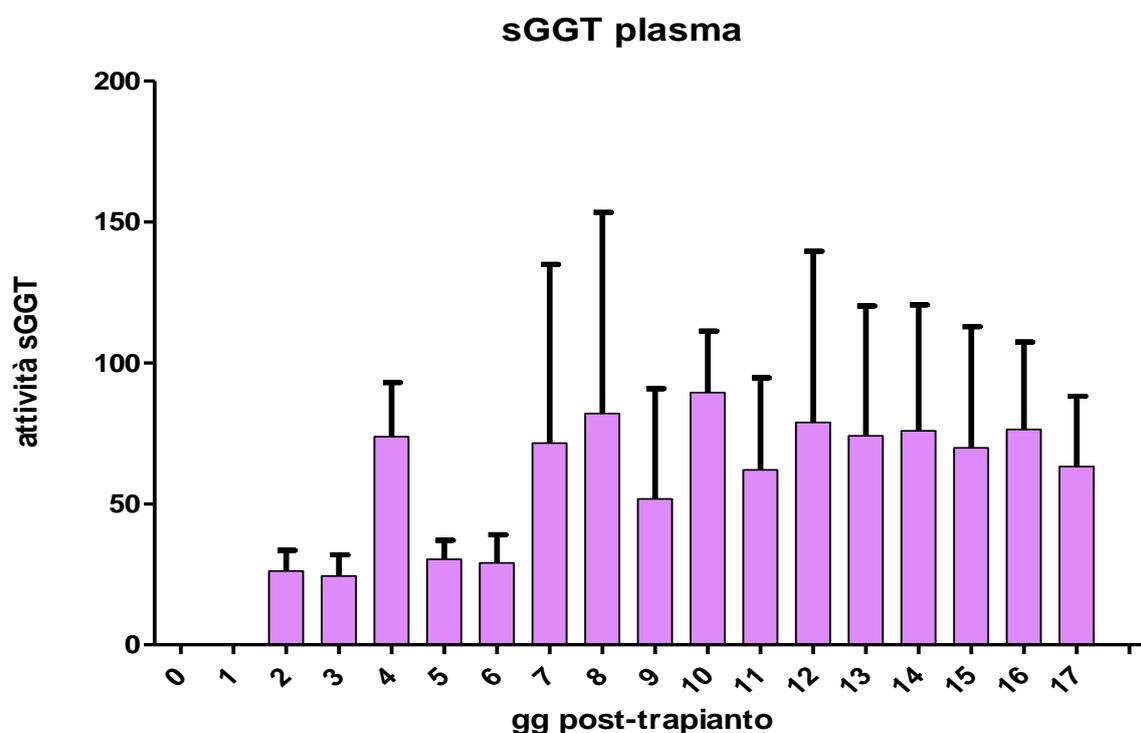


Figura 1.23 Nel grafico è riportata la media dell'attività di s-GGT plasmatica dei pazienti sottoposti a trapianto di fegato durante i primi 15 giorni post trapianto.

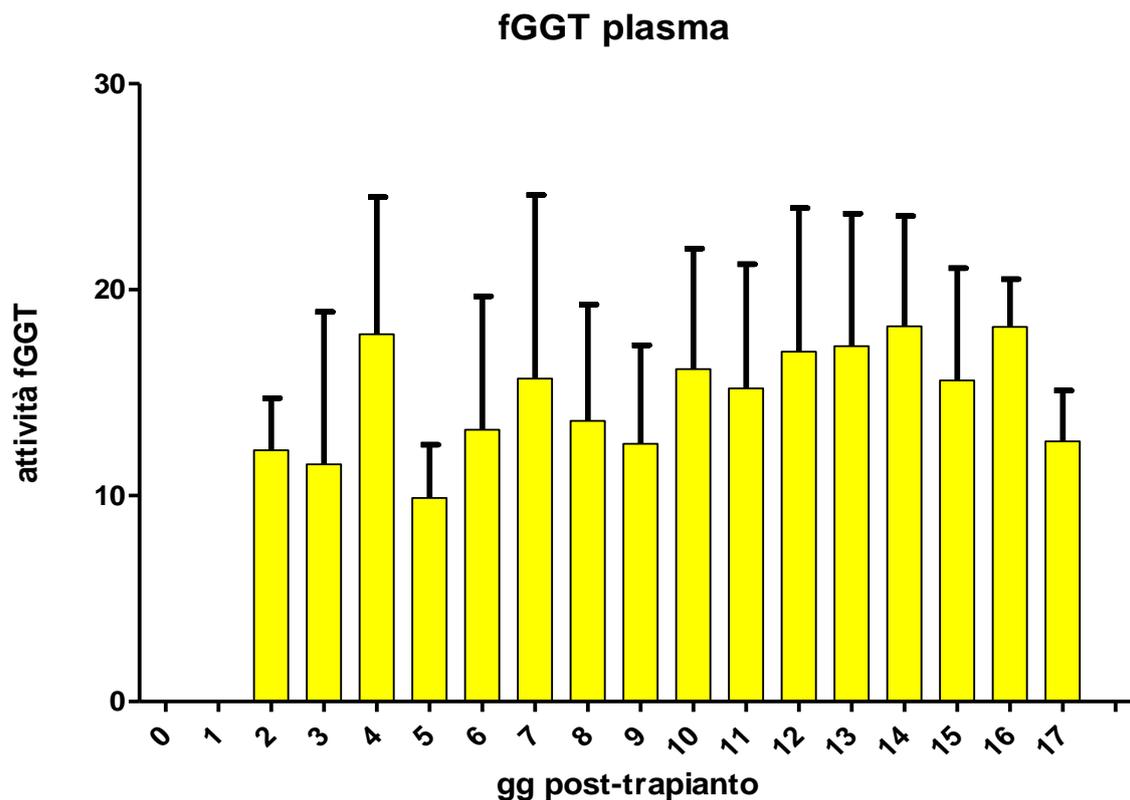


Figura 1.24 Nel grafico è riportata la media dell'attività di f-GGT plasmatica dei pazienti sottoposti a trapianto di fegato durante i primi 15 giorni post trapianto.

Successivamente, i valori medi dell'attività della GGT totale plasmatica (figura 1.20) sono stati confrontati con i valori medi dell'attività della GGT totale biliare (figura 1.25), dapprima osservando l'andamento di entrambe, dopo analizzando i valori mediante un programma informatico di statistica, come si vedrà di seguito. Dai grafici possiamo osservare come non vi siano similarità nei due andamenti, difatti rispetto all'andamento dei valori medi dell'attività della GGT totale plasmatica (figura 1.20), descritto in precedenza, i valori medi della GGT totale biliare nei primi 15 giorni presentano un'elevata variabilità interindividuale con picchi di attività intorno al 4°/5° giorno (attività media >2000 U/L). Inoltre, i valori medi dell'attività della frazione b-GGT plasmatica (figura 1.21) sono stati confrontati con i valori medi dell'attività della frazione della b-GGT biliare (figura 1.26). Dai grafici possiamo osservare come non vi sia correlazione tra i due andamenti, infatti, rispetto all'andamento dei valori medi della b-GGT plasmatica (figura 1.21), descritto in precedenza, i valori medi della b-GGT biliare nei primi 15 giorni presentano un massimo di attività al 4° giorno post trapianto con attività media di 1300 U/L. Nei giorni successivi, la frazione b-GGT si mantiene intorno a valori medi di circa 400 U/L non mostrando andamenti discendenti o ascendenti lineari.

GGT TOTALE

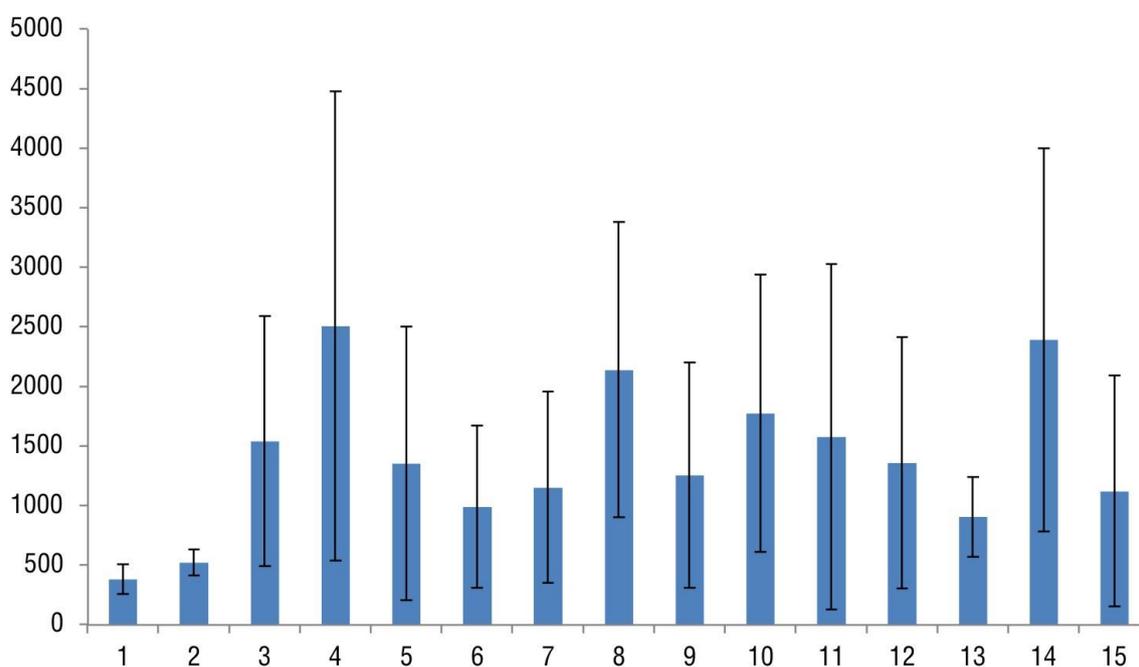


Figura 1.25 Nel grafico è riportata la media dell'attività totale di GGT biliare dei pazienti sottoposti a trapianto di fegato durante i primi 15 giorni post trapianto.

b-GGT

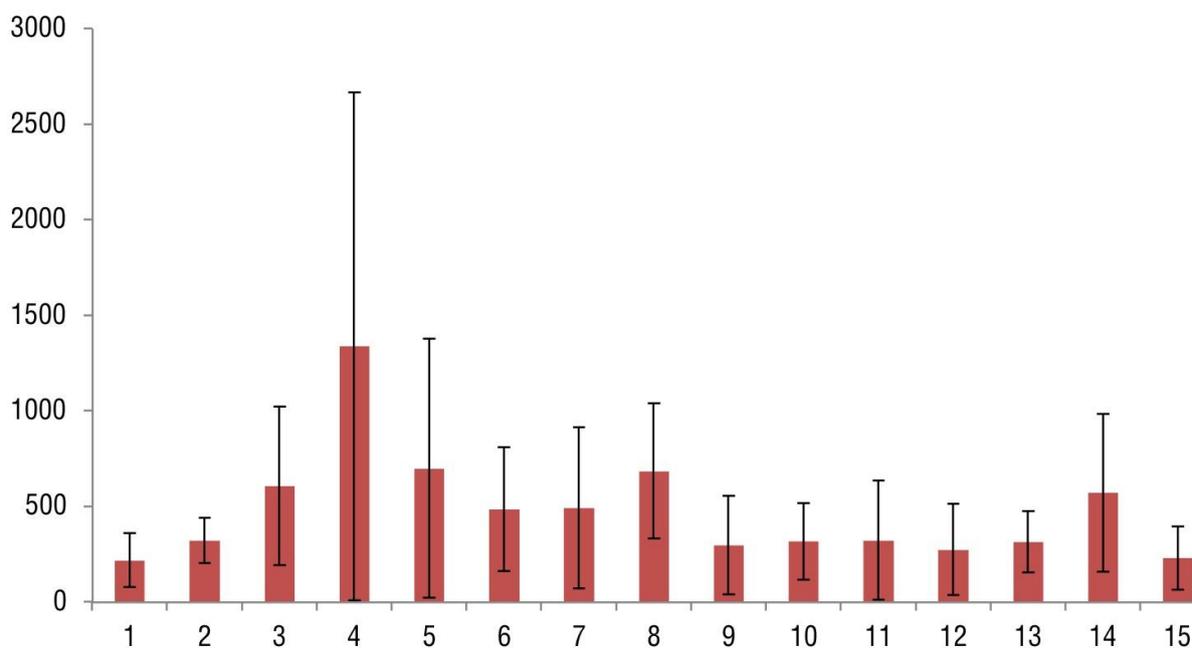


Figura 1.26 Nel grafico è riportata la media dell'attività di b-GGT biliare dei pazienti sottoposti a trapianto di fegato durante i primi 15 giorni post trapianto.

4.3 Correlazione tra frazioni di GGT biliare e plasmatica

Utilizzando il programma informatico di statistica GRAPHPAD PRISM, sono stati correlati i dati ottenuti dall'analisi dell'attività di GGT totale plasmatica, delle frazioni plasmatiche di b-GGT, m-GGT, s-GGT ed f-GGT con i valori ottenuti dall'analisi dell'attività totale della GGT biliare e delle frazioni di b-GGT ed f-GGT biliari, precedentemente ricavati nello stesso laboratorio. In statistica per correlazione si intende una relazione tra due variabili statistiche tale che a ciascun valore della prima variabile corrisponda con una "certa regolarità" un valore della seconda. Non si tratta necessariamente di un rapporto di causa-effetto, ma semplicemente della tendenza di una variabile a variare in funzione dell'altra.

Pertanto, l'analisi di correlazione tra la GGT totale biliare e la GGT totale plasmatica e le sue relative frazioni non ha mostrato correlazione tra le variabili.

L'analisi di correlazione tra la frazione b-GGT biliare e la GGT totale plasmatica e le sue relative frazioni non ha mostrato correlazione tra le variabili.

L'analisi di correlazione tra la frazione f-GGT biliare e la GGT totale plasmatica e le sue relative frazioni non ha mostrato correlazione tra le variabili, eccezion fatta per la frazione s-GGT plasmatica con cui pare mostrare una correlazione significativa con un valore r Spearman di 0.4176.

4.4 Correlazione tra frazioni di GGT plasmatica e variabili cliniche

Utilizzando il programma informatico di statistica GRAPHPAD PRISM, sono stati correlati i dati ottenuti dall'analisi dell'attività di GGT totale plasmatica, delle frazioni plasmatiche di b-GGT, m-GGT, s-GGT ed f-GGT con i valori dell'esame emocrometrico dei 29 pazienti, effettuato dall'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, secondo le procedure dei laboratori di analisi chimico-cliniche, utilizzando analizzatori automatici.

L'analisi di correlazione ha mostrato correlazione significativa tra l'attività della GGT totale plasmatica e delle relative frazioni plasmatiche con la bilirubina totale, indice di funzionalità epatica: rispettivamente con un valore di r pari a 0.26 per la GGT totale plasmatica, un valore di r pari a 0.41 per la frazione b-GGT plasmatica e un valore di r pari a 0.39 per la frazione m-GGT plasmatica. Le frazioni s-GGT ed f-GGT plasmatiche, invece, hanno mostrato una correlazione negativa con la bilirubina totale, ossia variando una variabile un senso l'altra varia in senso inverso, con un valore di r rispettivamente di -0.31 e -0.35.

Inoltre, l'analisi di correlazione ha mostrato correlazione significativa con la fosfatasi alcalina (ALP), indice di citolisi epatica: con un valore di r pari a 0.83 per la GGT totale plasmatica, un valore di r pari a 0.85 per la frazione b-GGT plasmatica, un valore di r pari a 0.86 per la frazione di m-GGT plasmatica, un valore di r pari a 0.54 per la s-GGT ed un valore di r pari a 0.31 per la f-GGT.

L'analisi di correlazione ha mostrato, in aggiunta, una correlazione tra l'attività della GGT totale plasmatica e delle frazioni b-GGT ed m-GGT plasmatiche e i valori forniti dall'esame emocromo-citometrico relativi a monociti, eosinofili e basofili, indici di una risposta del sistema immunitario, con un valore medio di r pari a 0,33.

4.5 Correlazione tra frazioni di GGT biliare e variabili cliniche

Come scritto nel precedente paragrafo, utilizzando il programma informatico di statistica GRAPHPAD PRISM, sono stati correlati i dati ottenuti dall'analisi dell'attività di GGT totale biliare e delle frazioni di b-GGT ed f-GGT biliari con i valori dell'esame emocromocitometrico dei 29 pazienti, effettuato dall'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, secondo le procedure dei laboratori di analisi chimico-cliniche, utilizzando analizzatori automatici.

Dall'analisi di correlazione non è emersa alcuna correlazione tra i valori di GGT totale biliare e i valori dell'esame emocromocitometrico; tale risultato si è ottenuto anche per l'analisi di correlazione tra i valori della frazione b-GGT biliare e i valori dell'esame emocromocitometrico.

Risultati differenti sono stati, invece, ottenuti per l'analisi di correlazione tra la f-GGT biliare e i valori dell'esame emocromocitometrico: in particolare si osserva una correlazione negativa tra i valori di f-GGT biliare e la bilirubina totale e diretta e le proteine totali, con valori di r rispettivamente -0.52, -0.54 e -0.68. Inoltre, si osserva una correlazione positiva con i valori relativi all'emoglobina, con r pari a 0.37 e una correlazione negativa con i valori relativi ai basofili, con r pari a -0.48.

Tabella 1.6 Coefficienti di correlazione di Spearman

	Frazioni plasmatiche						Frazioni biliari		
	GGT tot	b-GGT	m-GGT	s-GGT	f-GGT	Veluiz (f-s)	GGT tot	b-GGT	f-GGT
Glucosio, mg/dl	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	-0.35	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Creatinina, mg/dl	<i>n.s.</i>	0.26	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	-0.48
AST, U/L	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
ALT, U/L	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
LDH, U/L	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Bilirubina Tot, mg/dl	0.26	0.41	0.39	-0.31	-0.35	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	-0.52
Bilirubina Dir, mg/dl	<i>n.s.</i>	0.52	0.50	<i>n.s.</i>	-0.27	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	-0.54
ALP, U/L	0.83	0.85	0.86	0.54	0.31	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Proteine Tot, g/dl	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	-0.68
INR	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Fibrinogeno, mg/dl	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Albumina, g/dl	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Emoglobina, mg/dl	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	0.37
Piastrine, 10 ³ /μl	0.30	<i>n.s.</i>	0.25	0.36	0.26	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Leucociti, 10 ³ /μl	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Neutrofili, 10 ³ /μl	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Linfociti, 10 ³ /μl	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Monociti, 10 ³ /μl	<i>n.s.</i>	0.25	0.28	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	-0.25	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Eosinofili, 10 ³ /μl	0.33	0.39	0.39	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Basofili, 10 ³ /μl	0.35	0.33	0.36	0.25	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	-0.48
Tacrolimus	-0.32	-0.45	-0.36	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Ciclosporina	-0.52	-0.48	-0.39	-0.50	-0.39	<i>n.s.</i>	-0.37	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
GGT tot plasma							<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
bGGT plasma							<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
mGGT plasma							<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
sGGT plasma							<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
fGGT plasma							<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

(*n.s.*: correlazione non significativa)

5. Discussione dei risultati ottenuti

Il periodo peri-operatorio nel trapianto di fegato è senza dubbio il momento più critico per la buona riuscita dell'intervento stesso, perciò un monitoraggio attento della funzione d'organo nel periodo intra-, peri- e post-operatorio è fondamentale per ottimizzare la ripresa del trapianto, permettendo di intervenire con tempestività e appropriatezza nelle diverse situazioni cliniche. Le variabili che possono influire positivamente o negativamente sono molteplici e possono interagire tra loro in maniera non facilmente prevedibile, ad oggi non sono stati ancora individuati dei validi marcatori di rigetto o tolleranza dell'organo trapiantato (Germani et al. 2015).

L'incremento sierico della GGT è presente in molteplici condizioni patologiche del fegato e delle vie biliari, perciò è comunemente interpretato come indice di disfunzione epatica. Inoltre, occorre considerare che l'enzima GGT nel fegato è espresso sulla porzione di membrana degli epatociti che delimitano i canalicoli biliari e sulla superficie dei coloangiociti che rivestono i dotti biliari, ovvero le strutture che sono primariamente interessate dal processo di rigetto dell'organo trapiantato.

Inoltre l'analisi cromatografica delle frazioni plasmatiche, in una coorte di pazienti con cirrosi epatica in stadio terminale della GGT, ha messo in evidenza che la frazione b-GGT è un indice di funzionalità epatica, infatti correla positivamente con l'albumina sierica, il fibrinogeno, la conta piastrinica e negativamente con l'INR; la frazione s-GGT invece si comporta come un marcatore di danno epatocellulare e colestatico, infatti è associata positivamente con le transaminasi AST e ALT, con la lattico deidrogenasi, la fosfatasi alcalina e la bilirubina. In base a tali risultati, si è ipotizzato che l'analisi delle frazioni plasmatiche di GGT possa contribuire a valutare la ripresa funzionale dell'organo trapiantato.

Nel primo periodo post chirurgico in soggetti sottoposti a trapianto di fegato, osservando le figure 1.15, 1.16, 1.17 e 1.18, sono presenti maggiormente le frazioni di b-GGT, di s-GGT ed f-GGT, con aumento dell'attività enzimatica con il passare dei giorni dall'intervento chirurgico. È possibile confrontare l'attività media delle frazioni della GGT plasmatica in pazienti post trapianto con l'attività media delle frazioni della GGT in soggetti affetti da malattie epatiche in presenza di cirrosi (Franzini et al., 2014). È importante notare come le due situazioni, rispettivamente la condizione del soggetto nel post trapianto e la condizione del soggetto con cirrosi, siano temporalmente consequenziali, in quanto i soggetti con cirrosi esaminati erano in lista d'attesa per il trapianto. Richiamando i risultati ottenuti da Franzini e collaborati (2014), è noto che nei pazienti con cirrosi la frazione b-GGT risulta essere quasi

del tutto assente (figura 1.27), mentre la frazione prevalente è la s-GGT, con la frazione f-GGT che si mantiene costante in entrambe le situazioni prima citate.

È noto che la caratteristica più evidente della cirrosi è il sovvertimento della struttura del fegato con fibrosi e rigenerazione sotto forma di noduli, con un continuo processo di danno e riparazione che porta un disordine architetturale a livello dei lobi epatici, inficiando la normale funzionalità del fegato. Tenendo ciò presente, data la stessa forma dei profili di eluizione del soggetto con cirrosi e del soggetto nel post trapianto per la frazione s-GGT, ma estremamente differente per la frazione b-GGT, si può ipotizzare che il fegato con cirrosi non sia in grado di sintetizzare b-GGT, o quantomeno, di rilasciare b-GGT, probabilmente per la perdita della normale architettura del tessuto e quindi dei rapporti anatomici normalmente esistenti tra gli epatociti, i sinusoidi, i canalicoli e i dotti biliari.

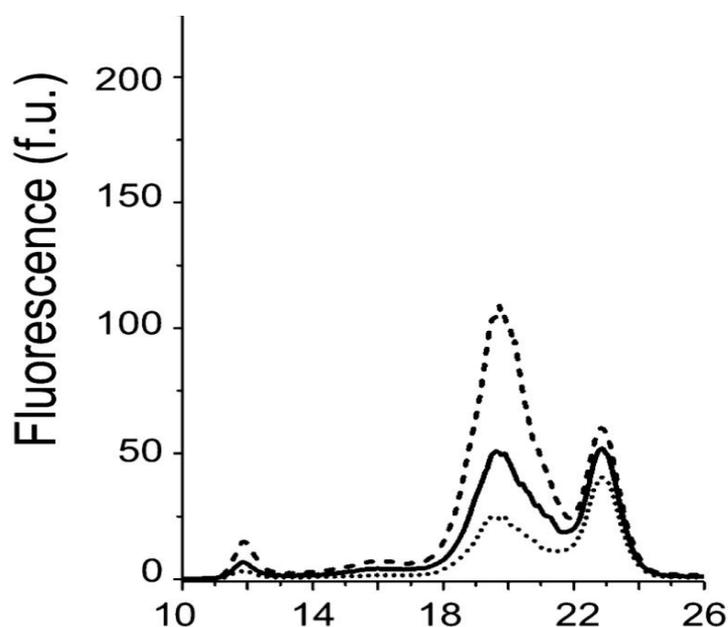


Figura 1.27 Profilo di eluizione dell'attività media delle frazioni plasmatiche di GGT in soggetti con cirrosi epatica.

Come riportato nel paragrafo 4.1, figura 1.17 e 1.18, si nota nei cromatogrammi dei pazienti nel periodo dei primi 15 giorni post trapianto di fegato, la presenza di una “spalla” nel profilo di eluizione della frazione s-GGT. Tale aspetto è presente nella quasi totalità dei pazienti durante i giorni relativi alla seconda settimana post trapianto, successivamente a tale periodo questa particolarità non è più riscontrabile. Utilizzando i dati presenti nello studio di Franzini e collaboratori (2014), possiamo confrontare, nuovamente, il profilo di eluizione dell'attività media delle frazioni della GGT nel soggetto cirrotico (figura 1.28) con il profilo di eluizione dell'attività delle frazioni della GGT nel periodo post trapianto di fegato del

soggetto sottoposto a trapianto. Si può notare dalla figura 1.28, come nel soggetto con cirrosi vi sia la presenza di una “spalla” nel profilo di eluizione della frazione s-GGT simile al profilo di eluizione del soggetto nel post trapianto. Nel soggetto con cirrosi tale particolarità nel profilo di eluizione della frazione s-GGT è persistente (Franzini et al., 2014), al contrario di quanto visto precedentemente per il soggetto nel post trapianto, in cui il profilo relativo alla s-GGT si stabilizza su valori standard e simili nei vari cromatogrammi. La cosiddetta “spalla” nel profilo di eluizione della s-GGT è stata associata alla presenza di due o più componenti gaussiane relative a diversi complessi aventi peso molecolare simile alla s-GGT ed eluenti nel suo stesso intervallo di volume di eluizione. Pertanto, si può ipotizzare che nel fegato cirrotico persistano i complessi molecolari associati alla s-GGT, mentre nel fegato trapiantato tali complessi si manifestino per un breve periodo, con prevalenza dei complessi a più basso peso molecolare, e successivamente scompaiano, con prevalenza dei complessi a più alto peso molecolare. Alla luce di ciò, occorre dire che non si sa ancora molto sulle caratteristiche della s-GGT e delle sue ipotizzate componenti e che ulteriori studi dovranno ancora indagare e fornire nuove evidenze su tale aspetto.

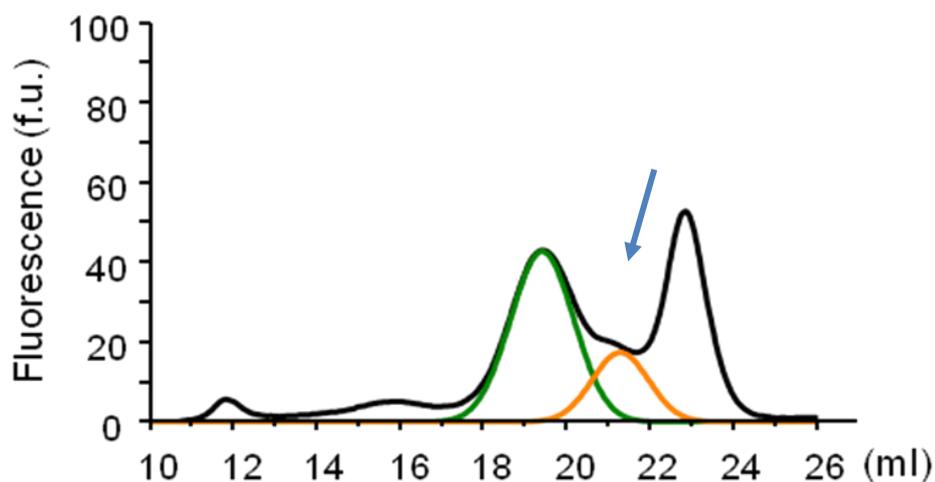


Figura 1.28 Profilo di eluizione dell'attività delle frazioni plasmatiche di GGT in un soggetto con cirrosi (Franzini et al., 2014). È indicata dalla freccia la “spalla” nel profilo di eluizione della s-GGT ed in verde e in arancione le due gaussiane relative alla presenza di complessi molecolari con diverso peso molecolare.

Analizzando l'andamento dell'attività media della GGT plasmatica e delle relative frazioni nel follow-up post trapianto di fegato, come mostrato nelle figure 1.20, 1.21 e 1.22, notiamo la presenza di un picco al settimo giorno per la GGT totale, per la b-GGT ed m-GGT. Tale risultato concorda con i dati presenti in uno studio di Schneider e collaboratori (2011),

riassunto nel precedente paragrafo 1.6.5, in cui alti valori di attività della GGT plasmatica al settimo giorno post trapianto sono correlati ad un esito positivo per il trapianto. In tale studio, gli Autori propongono che l'aumento della GGT non sia da imputarsi ad un danno epatico che porterebbe alla perdita dell'organo trapiantato, ma piuttosto ad una rigenerazione degli epatociti stessi. Tale ipotesi si basa sull'osservazione di modelli animali (Kitten, Ferry, 1998) in cui è stato dimostrato che il processo di rigenerazione degli epatociti, in seguito ad epatectomia parziale, è associato ad un innalzamento dell'espressione di GGT. Tuttavia questo non è un fenomeno che si osserva normalmente nel fegato trapiantato, mentre è frequente la rigenerazione dell'epitelio delle vie biliari. I colangiociti che rivestono i dotti biliari esprimono normalmente l'enzima GGT sulla membrana, mentre non è noto come cambi tale espressione durante la rigenerazione.

I dati raccolti in questa tesi non permettono ancora di chiarire l'origine del picco di GGT al settimo giorno post trapianto, ma sicuramente aggiungono una tessera al puzzle.

A differenza di quanto osservato nei pazienti con cirrosi in attesa di trapianto, ma anche in pazienti con epatite cronica virale o alcolica, nell'immediato post trapianto non si evidenzia né una correlazione tra la frazione b-GGT e gli indici di funzione sintetica né tra la frazione s-GGT e gli indici di citolisi. Perciò possiamo affermare che in questa particolare condizione l'innalzamento della GGT plasmatica non va interpretata come indice di danno epatico ed infatti il suo incremento precoce è associato al buon esito del trapianto.

Si osserva invece una correlazione positiva tra le frazioni b-GGT ed m-GGT e i livelli plasmatici di bilirubina diretta e di fosfatasi alcalina. La normalizzazione dei valori plasmatici di bilirubina diretta e di fosfatasi alcalina nella prima settimana post trapianto è un indice di corretta funzionalità dell'albero biliare epatico. Perfino nella prima settimana post trapianto può verificarsi una condizione, detta ittero funzionale, in cui si assiste ad un repentino picco di bilirubina diretta plasmatica, che altrettanto rapidamente si risolve tornando a valori normali, in assenza di movimento degli altri indicatori di funzionalità epatica (ad es. transaminasi e fosfatasi alcalina). L'ittero funzionale è giustappunto indice della ripresa della funzione biliare del fegato trapiantato, ovviamente deve essere una condizione transiente, nel caso contrario si associerà a danno epatico. In questo quadro, quindi, possiamo interpretare l'incremento delle frazioni b-GGT e m-GGT come un indicatore di ripresa funzionale del polo biliare degli epatociti e delle vie biliari maggiori.

Questo studio ha permesso per la prima volta anche di confrontare la quota di GGT presente nel plasma e con quella presente nelle bile, che sicuramente rappresenta un compartimento nel quale l'enzima è rilasciato direttamente. Si pensa che la GGT plasmatica

sia prevalentemente di origine epatica in base a studi nei quali sono state confrontate le caratteristiche chimico fisiche della GGT purificata da diversi tessuti e concludendo che per dimensione, carica e glicosilazione la GGT plasmatica è analoga a quella purificata dal fegato (Huseby et al., 1981). Tuttavia il meccanismo di secrezione della GGT epatica in circolo non è noto. Considerato che nel fegato la GGT è principalmente espressa nei canalicoli e dotti biliari, una possibilità è che il fegato rilasci la GGT nella bile e da qui l'enzima passi nel plasma.

L'analisi di correlazione tra i valori di GGT biliare e plasmatica (tabella 1.6), però, non ha messo in evidenza associazioni statisticamente significative, suggerendo che non ci sia interazione tra i due compartimenti. Dal punto di vista dell'andamento dell'attività di GGT nella bile nel post-trapianto è interessante notare che il picco di attività si ha al quarto giorno, precedendo quello sierico. Abbiamo ipotizzato che l'attività di GGT plasmatica sia un indice della ripresa della funzionalità biliare, pertanto il picco di GGT nella bile potrebbe rappresentare l'indice diretto, per questo precoce, del ristabilirsi di tale funzione. Il fatto che il picco di GGT biliare preceda quello plasmatico suggerisce che la prima possa contribuire alla quota di enzima circolante e che passaggio tra i due compartimenti non sia immediato ma più lento della velocità di secrezione dell'enzima nella bile. La mancata correlazione tra la GGT plasmatica e biliare non nega con certezza che esista una connessione tra i due compartimenti, il risultato osservato potrebbe essere influenzato ad esempio da un diverso equilibrio tra sintesi e rimozione del complesso con attività di GGT nei due fluidi biologici.

6. Conclusioni

Il lavoro svolto nella presente tesi indica come il significato clinico della GGT circolante non possa essere circoscritto solamente ad un ruolo di indicatore di danno epatico, anzi, i dati di questa tesi propongono che la GGT plasmatica, in particolare le frazioni b-GGT e m-GGT, nelle prime due settimane post-trapianto, siano un indice specifico di ripresa della funzione biliare del fegato. Interpretazione sostenuta dal confronto tra l'andamento delle frazioni e gli altri indici umorali e l'andamento clinico tipico nelle prime due settimane post trapianto.

Per la prima volta è stato possibile anche analizzare e confrontare l'andamento della GGT biliare; quest'ultima si è dimostrata essere un indicatore precoce di ripresa della funzione biliare precedendo il picco plasmatico di b-GGT, infatti la bile rappresenta il secreto primario e diretto dell'organo.

Da questo punto di vista, gli indici di attività della GGT e delle sue frazioni plasmatiche o biliari potrebbero essere quindi utilizzati come valori prognostici e predittivi per quanto riguarda gli esiti del trapianto di fegato.

I dati raccolti in questa tesi ripropongono anche il quesito su come la GGT e le sue frazioni siano secrete in circolo e su quale sia la relazione tra la GGT biliare e plasmatica.

Sicuramente studi futuri andrebbero dedicati proprio ad approfondire i meccanismi alla base della secrezione della GGT plasmatica e della GGT biliare e dell'omeostasi dell'enzima nei due fluidi per poter comprendere quindi la genesi delle frazioni plasmatiche di GGT, ovvero in quale compartimento cellulare e tissutale sono prodotte. Queste conoscenze, sono d'altra parte, necessarie per delineare, in modo completo, il significato delle diagnostico e prognostico delle frazioni di GGT.

Bibliografia

Abbott WA, Meister A. 1983 Modulation of gamma-glutamyl transpeptidase activity by bile acids. *J Biol Chem.* 258(10): 6193-7.

Anderson ME, Allison RD, Meister A. 1982 Interconversion of leukotrienes catalyzed by purified gamma-glutamyl transpeptidase: concomitant formation of leukotriene D4 and gamma-glutamyl amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA*; 79:1088-91.

Arbeitsgruppe Preanalytik der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und der Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin. Die Qualität diagnostischer Proben. 2002.

Asaba Y, Hiramatsu K, Matsui Y, Harada A, Nimura Y, Katagiri N, Kobayashi T, Takewaka T, Ito M, Niida S, Ikeda K. Urinary gamma-glutamyltransferase (GGT) as a potential marker of bone resorption. *Bone.* 2006;39:1276-1282.

Balatri E, Banci L, Bertini I, Cantini F, Ciofi-Baffoni S. Solution structure of Sco1: a thioredoxin-like protein involved in cytochrome c oxidase assembly. *Structure.* 2003;11:1431-1443.

Ballatori N, Wang W, Lieberman MW. 1998 Accelerated methylmercury elimination in gammaglutamyl transpeptidase-deficient mice. *Am J Pathol.* 152: 1049–55.

Battezzati PM, Podda M, Bruno S. 1992 Factors predicting early response to treatment with recombinant interferon Alpha 2° in chronic non-A, non-B hepatitis. Preliminary report of longterm trial. *Ital J Gastroenterol.* 24: 481-4.

Barouki R, Finidori J, Chobert MN, Aggerbeck M, Laperche Y, Hanoune J. 1984 Biosynthesis and processing of gamma-glutamyl transpeptidase in hepatoma tissue culture cells. *J Biol Chem.*; 259(12): 7970-4.

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997;385:640-644.

Bernstrom K, Hammarstrom S. 1982 A novel leukotriene formed by transpeptidation of leukotriene E. *Biochem Biophys Res Commun.* 109:800-4.

Boanca G, Sand A, Barycki JJ. 2006 Uncoupling the enzymatic and autoprocessing activities of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase. *J Biol Chem.* 281:19029-37.

Borud O, Mortensen B, Mikkelsen IM, Leroy P, Wellman M, Huseby NE. Regulation of gammaglutamyltransferase in cisplatin-resistant and -sensitive colon carcinoma cells after acute cisplatin and oxidative stress exposures. *Int J Cancer.* 2000;88:464-468.

Bouman L, Sanceau J, Rouillard D, Bauvois B. Gamma-glutamyl transpeptidase expression in Ewing's sarcoma cells: up-regulation by interferons. *Biochem J.* 2002;364:719-724.

Brannigan JA, Dodson G, Duggleby HJ, Moody PC, Smith JL, Tomchick DR, Murzin AG. 1995 Protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature*; 378: 416-9.

Braun L., Goyette M., Yaswen P., Thompson N.L., Fausto N. 1987 Growth in culture and tumorigenicity after transfection with the ras oncogene of liver epithelial cells from carcinogen-treated rats. *Cancer Res* 47(15): 4116-24.

Bulle F, Mattei MG, Siegrist S, Pawlak A, Passage E, Chobert MN, Laperche Y, Guellaen G. 1987 Assignment of the human gamma-glutamyl transferase gene to the long arm of chromosome 22. *Hum Genet.* 76: 283-6.

Cabrera-Abreu JC, Green A. Gamma-glutamyltransferase: value of its measurement in paediatrics. *Ann Clin Biochem.* 2002;39(Pt 1):22–25.

Castonguay R, Halim D, Morin M, Furtos A, Lherbet C, Bonneil E, Thibault P, Keillor JW. Kinetic characterization and identification of the acylation and glycosylation sites of recombinant human gamma-glutamyltranspeptidase. *Biochemistry.* 2007;46(43):12253-12262.

Chikhi N, Holic N, Guellaen G. 1999 Gamma-glutamyl transpeptidase gene organization and expression: a comparative analysis in rat, mouse, pig and human species. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 122:367-80.

Collins JE, Mungall A.J, Badcock KL, Fay JM, Dunham I. 1997 The organization of the gamma-glutamyl transferase genes and other low copy repeats in human chromosome 22q11 [published erratum appears in *Genome Res* 1997; 7: 942]. *Genome Res.* 7: 522-31.

Corti A, Paolicchi A, Franzini M. 2005 The S-thiolating activity of membrane gamma glutamyltransferase: formation of cysteinyl-glycine mixed disulfides with cellular proteins and in the cell microenvironment. *Antiox Redox Signall*; 7:911-18.

Courtay C, Heisterkamp N, Siest G, Groffen J. 1994 Expression of multiple gamma-glutamyltransferase genes in man. *Biochem J.* 297: 503-8.

Curthoys NP, Hughey RP. 1979 Characterization and physiological functions of rat renal Gamma-Glutamyl transpeptidase. *Enzyme.*; 24(6): 383-403. Review.

Daubeuf S, Accaoui MJ, Pettersen I, Huseby NE, Visvikis A, Galteau MM. Differential regulation of gamma-glutamyltransferase mRNAs in four human tumour cell lines. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1568:67-73.

Daubeuf S, Duvoix A, Wellman-Rousseau M, Diederich M, Visvikis A. Phorbol ester regulation of the human gamma-glutamyltransferase gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313(2):300-307.

De Broe ME, Borgers M, Wieme RJ. 1975 The separation and characterization of liver plasma membrane fragments circulating in the blood of patients with cholestasis. *Clin Chim Acta.* 24;59(3):369-72.

Dominici R, Infusino I, Valente C, Moraschinelli I, Franzini C. Plasma or serum samples: measurements of cardiac troponin T and other analytes compared. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:945-951.

Dominici S, Paolicchi A, Lorenzini E. 2003 Gammaglutamyltransferase-dependent prooxidant reactions: a factor in multiple processes. *Biofactors*; 17:187-98.

Drozd R, Parmentier C, Hachad H. 1998 Gammaglutamyltransferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. *Free Radic Biol Med*.25:786-92.

Elawdi HA, Franzini M, Paolicchi A, Emdin M, Fornaciari I, Fierabracci V, De Simone P, Carrai P, Filippini F. 2014 Circulating gamma-glutamyltransferase fractions in cirrosi. *Liver International*. 9: volume 2.

Eisenbach C, Encke J, Merle U, Gotthardt D, Weiss KH, Schneider L, Latanowicz S, Spiegel M, Engelmann G, Stremmel W, Büchler MW, Schmidt J, Weigand MA, Sauer P. 2009 An early increase in gamma glutamyltranspeptidase and low aspartate aminotransferasi peak values are associated with superior outcomes after orthotopic liver transplantation. *Transplantation proceedings*. Vol.41(5): 1727-1730.

Figlewicz DA, Delattre O, Guellaen G, Krizus A, Thomas G, Zucman J, Rouleau GA. 1993 Mapping of human gamma-glutamyl transpeptidase genes on chromosome 22 and other human autosomes. *Genomics*. 17: 299-305.

Finidori J, Laperche Y, Haguenaer-Tsapis R, Barouki R, Guellaen G, Hanoune J. 1984 In vitro biosynthesis and membrane insertion of gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem*. 259: 4687-90.

Franzini M, Bramanti E, Ottaviano V. 2008 A High Performance Gel Filtration Chromatography Method for γ -Glutamyltransferase Fraction Analysis, *Anal Biochem*. 374:1-6.

Franzini M, Corti A, Mammini C. 2009 Glutammiltransferasi: biochimica clinica e fisiopatologia umana. *Biochim Clin*. 33:1-7.

Franzini.M, Fornaciari.I, Fierabracci.V, Elawadi.H, Bolognesi.M, Maltinti.S, Ricchiuti.A, De Bortoli.N, Marchi.S, Pompella.A, Passino.C, Emdin.M , Paolicchi.A “Accuracy of b-GGT fraction for the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease” *Liver int*.2012,32:629-34.

Franzini M; Fornaciari I; Vico T; Moncini M; Cellesi V; Meini M; Emdin M; Paolicchi A. 2013 High-sensitivity gamma-glutamyltransferase fraction pattern in alcohol addicts and abstainers. *Drug and alcohol dependance*. 127: 239-242.

Fornaciari I, Clerico A, Emdin M, Paolicchi A, Franzini M. 2012 Forme molecolari della yglutammiltrasferasi: caratteristiche e biogenesi. *Biochimica clinica*. 36:112-20.

Fossati P, Melzi d'Eril GV, Tarenghi G, Prencipe L, Berti G. A kinetic colorimetric assay of gammaglutamyltransferase. *Clin Chem* 1986;32:1581-1584.

Garcion E, Sindji L, Leblondel G. 1999 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of gammaglutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. *J Neurochem*; 73:859-66.

Gardell SJ, Tate SS. 1979 Latent proteinase activity of Gamma-Glutamyl transpeptidase light subunity. *J Biol Chem Jun 25*; 254(12): 4942-5.

Germani G, Rodriguez-Castro K, Russo FP, Senzolo M, Zanetto A, Ferrarese A, Burra P. Markers of acute rejection and graft acceptance in liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2015;21(4):1061-1068.

Glass GA, Stark AA. 1997 Promotion of glutathione-gamma-glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation by copper and ceruloplasmin: the requirement for iron and the effects of antioxidants and antioxidant enzymes. *Environ Mol Mutagen*. 29:73-80.

Gellerstedt M, Hyltoft Petersen P. Partitioning reference values for several subpopulations using cluster analysis. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1026-1032.

Gellerstedt M. Partitioning reference values of several Gaussian subpopulations with unequal prevalence – a procedure with computer program support. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1258-1263.

Genestra M. 2007 Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*. 19:1807-19.

Giustarini D, Milzani A, Colombo R. 2003 Nitric oxide and S-nitrosothiols in human blood. *Clin Chim Acta*. 330:85-98.

Goodspeed D.C., Dunn T.J., Miller C.D., Pitot H.C. 1989 Human gammaglutamyl transpeptidase cDNA: comparison of hepatoma and kidney mRNA in the human and rat. *Gene* 76(1): 1-9.

Griffith OW, Meister A. 1979 Translocation of intracellular glutathione to membranebound γ -glutamyltranspeptidase as a discrete step in the γ -glutamyl cycle: glutathionuria after inhibition of transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 76:268-72.

Grisk O, Kuster U, Ansorge S. 1993 The activity of gammaglutamyl transpeptidase (gamma-GT) in populations of mononuclear cells from human peripheral blood. *Biol Chem Hoppe Seyler*; 374:287-90.

Grossi E, Colombo R, Cavuto S, Franzini C. The REALAB project: a new method for the formulation of reference intervals based on current data. *Clin Chem*. 2005;51(7):1232-1240.

Habib GM, Barrios R, Shi ZZ. 1996 Four distinct membrane-bound dipeptidase RNAs are differentially expressed and show discordant regulation with gammaglutamyl transpeptidase. *J Biol Chem*. 271:16273-80.

Habib GM, Shi ZZ, Ou CN. 2000 Altered gene expression in the liver of gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Hepatology*; 32: 556–62.

Hanigan MH, Frierson HF Jr. 1996 Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *J Histochem Cytochem*; 44:1101-8.

Hanigan MH. 1998 Gamma-Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. *Chem Biol Interact*. 111-112: 333-42.

Hanigan MH, Pitot HC 1985 Gamma-glutamyl transpeptidase's role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*; 6:165-72.

Harding CO, Williams P, Wagner E. 1997 Mice with genetic gamma-glutamyl transpeptidase deficiency exhibit glutathionuria, severe growth failure, reduced life spans, and infertility. *J Biol Chem*. 272: 12560-7.

Heins M, Heil W, Withold W. 1995 Storage of serum or whole blood samples: Effect of time and temperature on 22 serum analytes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 33:231-6.

Heisterkamp N., Groffen J. 1988 Duplication of the bcr and gamma-glutamyl transpeptidase genes. *Nucleic Acids Res* 16(16): 8045-56.

Hinchman CA, Rebbeor JF, Ballatori N. 1998 Efficient hepatic uptake and concentrative biliary excretion of a mercapturic acid. *Am J Physiol*. 275:G612-9.

Hogg N, Singh RJ, Konorev E. 1997 S-Nitrosoglutathione as a substrate for gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochem J*. 323:477-81.

Horn KD, Wax P, Schneider SM, et al. 1999 Biomarkers of liver regeneration allow early prediction of hepatic recovery after acute necrosis. *Am J Clin Pathol* 112:351.

Huseby NE. 1978 Multiple forms of gamma-glutamyltransferase in normal human liver, bile and serum. *Biochim Biophys Acta*. 522:354-62.

Huseby NE. 1981 Separation and characterization of human gamma-glutamyltransferases. *Clin Chim Acta*. 111:39-45.

Huseby NE. 1982 Multiple forms of serum gamma-glutamyltransferase. Association of the enzyme with lipoproteins. *Clin Chim Acta*. 124:103-12.

Huseby NE, Ingebretsen OC. 1993 The level of gamma-glutamyltransferase in serum, effect of carbohydrate heterogeneity on clearance rate. *Scand J Clin Lab Invest*; 215:S93-100.

Inoue M, Hiratake J, Suzuki H. 2000 Identification of catalytic nucleophile of *Escherichia coli* gamma-glutamyltranspeptidase by gamma-monofluorophosphono derivative of glutamic acid: N-terminal thr-391 in small subunit is the nucleophile. *Biochemistry*; 39:7764-71.

Jean JC, Harding CO, Oakes SM. 1999 gamma-Glutamyl transferase (GGT) deficiency in the GGTenu1 mouse results from a single point mutation that leads to a stop codon in the first coding exon of GGT mRNA. *Mutagenesis*; 14: 31-6.

Kearns PR, Hall AG. 1998 Glutathione and the response of malignant cells to chemotherapy. *Drug Discovery Today*; 3:113-21.

Keillor JW, Castonguay R, Lherbet C. 2005 Gamma-glutamyl transpeptidase substrate specificity and catalytic mechanism. *Methods Enzymol.* 401: 449-67.

Khalaf MR, Hayhoe FG. 1987 Cytochemistry of γ - glutamyltransferase in haemic cells and malignancies. *Histochem J*; 19:385-95.

Kinlough CL, Poland PA, Bruns JB. 2005 Gammaglutamyltranspeptidase: disulfide bridges, propeptide cleavage, and activation in the endoplasmic reticulum. *Methods Enzymol.* 401:426-49.

Kitten O, Ferry N. 1998 Mature hepatocytes actively divide and express gamma-glutamyl transpeptidase after D-galactosamine liver injury. *Liver* 18:398.

Knickelbein RG, Ingbar DH, Seres T, Snow K, Johnston RB, Jr, Fayemi O, Gumkowski F, Jamieson JD, Warshaw JB. Hyperoxia enhances expression of gamma-glutamyl transpeptidase and increases protein S-glutathiolation in rat lung. *Am J Physiol.* 1996;270:L115-L122.

Kozak EM, Tate SS. 1982 Glutathione-degrading enzymes of microvillus membranes. *J Biol Chem.* 257:6322-7.

Kugelman A, Choy HA, Liu R, Shi MM, Gozal E, Forman HJ. Gamma-glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;11:586-592.

Kumar TR, Wiseman AL, Kala G. 2000 Reproductive defects in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Endocrinology*; 141: 4270–4277.

Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. 1990 Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med.* 323:645-55.

Li Y.C., Lieberman M.W. 1989 Two genes associated with liver cancer are regulated by different mechanisms in rasT24 transformed liver epithelial cells. *Oncogene* 4(6): 795-98.

Liu RM, Shi MM, Giulivi C, Forman HJ. Quinones increase gamma-glutamyl transpeptidase expression by multiple mechanisms in rat lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1998;274:330-336.

Lu SC 1999 Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *Faseb J.* 13:1169-83.

Martin MN, Slovin JP. 2000 Purified gamma-glutamyl transpeptidases from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates. *Plant Physiol.*122:1417-26.

Masyuk AI, Huang BQ, Ward CJ. 2010 Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 299:G990-9.

Mayatepek E, Flock B. Leukotriene C4-synthesis deficiency: a new inborn error of metabolism linked to a fatal developmental syndrome. *Lancet*. 1998;352:1514-1517.

Mayatepek E, Okun JG, Meissner T, Assmann B, Hammond J, Zschocke J, Lehmann WD. Synthesis and metabolism of leukotrienes in gamma-glutamyl transpeptidase deficiency. *J Lipid Res*. 2004;45:900-904.

Meister A. 1988 Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*. 263:17205-8.

Meister A. 1995 Glutathione metabolism. *Methods Enzymol*. 251: 3-7.

Meredith MJ. Variations in gamma-glutamyl transpeptidase glycosylation and kinetic parameters in cultured liver cells. *Biochem Int*. 1991;25(2):321-330.

Mikkelsen IM, Huseby NE, Visvikis A, Moens U. Activation of the gamma-glutamyltransferase promoter 2 in the rat colon carcinoma cell line CC531 by histone deacetylase inhibitors is mediated through the Sp1-binding motif. *Biochem Pharmacol*. 2002;64:307-315.

Niida S, Kawahara M, Ishizuka Y, Ikeda Y, Kondo T, Hibi T, Suzuki Y, Ikeda K, Taniguchi N. Gamma-glutamyltranspeptidase stimulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression independent of its enzymatic activity and serves as a pathological bone-resorbing factor. *J Biol Chem*. 2004;279:5752-5756.

Oinonen C, Rouvinen J. 2000 Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein Sci*. 9: 2329-37.

Okada T, Suzuki H, Wada K. 2006 Crystal structures of gamma-glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli*, a key enzyme in glutathione metabolism, and its reaction intermediate. *Proc Natl Acad Sci USA*;103:6471-6.

Pandur S, Pankiv S, Johannessen M, Moens U, Huseby NE. Gamma-glutamyltransferase is upregulated after oxidative stress through the Ras signal transduction pathway in rat colon carcinoma cells. *Free Radic Res*. 2007;41(12):1376-1384.

Pankiv S, Møller S, Bjørkøy G, Moens U, Huseby NE. Radiation-induced up-regulation of gamma-glutamyltransferase in colon carcinoma cells is mediated through the Ras signal transduction pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760:151-157.

Paolicchi A, Marchi S, Petrucci S, Ciancia S, Malvakli, Pompella A. 2005 Gamma-glutamyltransferase in fine-needle liver biopsies of subjects with chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*. 12:269-273.

Paolicchi A, Pompella A, Franzini M, Barsacchi R, Emdin M, Bramanti E. Method of detecting serum gamma-glutamyltransferase (GGT) isoforms in a sample of biological fluid. (WO2009/001290; US8486650-B2; EP2167678-A2).

Pawlak A., Cohen E.H., Octave J.N., Schweickhardt R., Wu S.J., Bulle F., Chikhi N., Baik J.H., Siegrist S., Guellaen G. 1990 An alternatively processed mRNA specific for gammaglutamyl transpeptidase in human tissues. *J Biol Chem* 265(6):3256-62.

Pieri L, Dominici S, Del Bello B. 2003 Redox modulation of protein kinase/phosphatase balance in melanoma cells: the role of endogenous and gamma-glutamyltransferase dependent H₂O₂ production. *Biochim Biophys Acta*; 1621:76-83.

Pompella A, De Tata V, Paolicchi A, Zunino F. Expression of gamma-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(3):231-238.

Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:1499-1503.

Prezioso J.A., Wang N., Duty L., Bloomer W.D., Gorelik E. 1993 Enhancement of pulmonary metastasis formation and gamma-glutamyltranspeptidase activity in B16 melanoma induced by differentiation in vitro. *Clin Exp Metastasis* 11(3):263-74.

Rajpert-De Meyts E., Heisterkamp N., Groffen J. 1988 Cloning and nucleotide sequence of human gamma-glutamyl transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(23): 8840-44.

Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M. 2002 Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical study on the fate of NO in human blood. *Circ Res.* 91:470-7.

Reuter S, Schnekenburger M, Cristofanon S, Buck I, Teiten MH, Daubeuf S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Visvikis A, Diederich M. Tumor necrosis factor alpha induces gammaglutamyltransferase expression via nuclear factor-kappaB in cooperation with Sp1. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(3):397-411.

Rojas E, Valverde M, Kala SV. 2000 Accumulation of DNA damage in the organs of mice deficient in gamma-glutamyltranspeptidase. *Mutat Res.* 14; 447: 305–16.

Roomi MW, Gaal K, Yuan QX, French BA, Fu P, Bardag-Gorce F, French SW: Preneoplastic liver cell foci expansion induced by thioacetamide toxicity in drug-primed mice. *Exp Mol Pathol.* 2006;81(1):8-14.

Sakamuro D, Yamazoe M, Matsuda Y, Kangawa K, Taniguchi N, Matsuo H, Yoshikawa H, Ogasawara N. The primary structure of human gamma-glutamyl transpeptidase. *Gene.* 1988;73:1-9.

Satoh T, Takenaga M, Kitagawa H, Itoh S. Microassay of gamma-glutamyl transpeptidase in needle biopsies of human liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1980;30:151–161.

Scambler PJ. Deletions of human chromosome 22 and associated birth defects. *Curr Opin Genet Dev.* 1993;3:432-437.

Schneider L, Latanowicz S, Spiegel M, Stremmel W, Büchler MW, Schmidt J, Eisenbach C. 2011 Prospective validation of a simple laboratory score to predict outcome after orthotopic liver transplantation. *Transplantation Proceedings.* Vol.43(5): 1747-1750.

Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Féraud G, Ferrero CA, Franck PF, Gella FJ, Hoelzel W, Jørgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kristiansen N, Lessinger JM, Linsinger TP, Misaki H, Panteghini M, Pauwels J, Schiele F, Schimmel HG, Weidemann G, Siekmann L; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:734-738.

Selinger MJ, Matloff DS, Kaplan MM. gamma-Glutamyl transpeptidase activity in liver disease: serum elevation is independent of hepatic GGTP activity. *Clin Chim Acta.* 1982;125:283-290.

Selvaraj P, Rolston DD, Balasubramanian KA. Separation of hydrophobic and hydrophilic forms of gamma-glutamyltransferase from human serum by hydrophobic chromatography on phenyl-Sepharose CL-4B: studies on normal sera and sera of patients with liver disease. *Clin Chim Acta.* 1984;138:141-149.

Sener A, Yardimci T. 2005 Activity determination, kinetic analyses and isoenzyme identification of gamma-glutamyltransferase in human neutrophils. *J Biochem Mol Biol;* 38:343-9.

Senkevich TG, White CL, Weisberg A, Granek JA, Wolffe EJ, Koonin EV, Moss B. Expression of the vaccinia virus A2.5L redox protein is required for virion morphogenesis. *Virology.* 2002;300:296-303.

Shaw LM, Stromme JH, London JL, Theodorsen L. IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 4. IFCC method for gamma-glutamyltransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:633-646.

Stark AA, Zeiger E, Pagano DA. 1987 Glutathione mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA100: dependence on a single enzyme, gamma-glutamyltranspeptidase. *Mutat Res.* 177:45-52.

Stievano L, Piovan E, Amadori A. C and CX3C chemokines: cell sources and physiopathological implications. *Crit Rev Immunol.* 2004;24:205-228.

Suzuki H, Kumagai H, Tochikura T. 1986 Gamma-glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12: Purification and properties. *J Bacteriol;*168:1325-31.

Suzuki H, Kumagai H. 2002 Autocatalytic processing of gamma-glutamyltranspeptidase. *J Biol Chem.* 277: 43536-43.

Szczeklik E, Orlowski M, Szewczuk A. 1961 Serum gammaglutamyl transpeptidase activity in liver disease. *Gastroenterology*. 41:353-9.

Szczeklik. 1961 Activity of serum gamma-glutamylotranspeptidase as a new enzymatic test in liver diseases. Comparison with other enzymatic tests. *Pol.Tyc.Lek*. 16:503-10.

Tate SS, Meister A. 1981 Gamma-glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. *Mol Cell Biochem*.39:357-68.

Tennenbaum T., Weiner A.K., Belanger A.J., Glick A.B., Hennings H., Yuspa S.H. 1993 The suprabasal expression of alpha 6 beta 4 integrin is associated with a high risk for malignant progression in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* 53(20):4803-10.

Teschke R, Neufeind M, Nishimura M, Strohmeyer G. Hepatic gamma-glutamyltransferase activity in alcoholic fatty liver: comparison with other liver enzymes in man and rats. *Gut*. 1983;24:625-630.

Tsutsumi M., Sakamuro D., Takada A., Zang S.C., Furukawa T., Taniguchi N. 1996 Detection of a unique gamma-glutamyl transpeptidase messenger RNA species closely related to the development of hepatocellular carcinoma in humans: a new candidate for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 23(5):1093-97.

Warren B.S., Naylor M.F., Winberg L.D., Yoshimi N., Volpe J.P., Gimenez-Conti I, Slaga T.J. 1993 Induction and inhibition of tumor progression. *Proc Soc Exp Biol Med* 202(1): 9-15.

Wenham P.R., Horn D.B., Smith A.F. 1981 γ -Glutamyltransferases in bile and sera from patients with extrahepatic biliary obstruction. *Clin Chem*. 27:469-31.

Wenham PR, Horn DB, Smith AF. 1985 Multiple forms of gamma glutamyltransferase: a clinical study. *Clin Chem*. 31:569-73.

West MB, Chen Y, Wickham S, Heroux A, Cahill K, Hanigan MH, Mooers BH. 2013 Novel insights into eukaryotic γ -glutamyltranspeptidase 1 from the crystal structure of the glutamate-bound human enzyme. *J Biol Chem*. Nov 1;288(44):31902-13.

West MB, Wickham S, Quinalty LM, Pavlovicz RE, Li C, Hanigan MH. Autocatalytic cleavage of human gamma-glutamyl transpeptidase is highly dependent on N-glycosylation at asparagine 95. *J Biol Chem*. 2011;286(33):28876-28888.

Whitfield JB. 2001 Gamma glutamyl transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 38:263-355.

Will Y, Fischer KA, Horton RA. 2000 Gamma-glutamyltranspeptidase-deficient knockout mice as a model to study the relationship between glutathione status, mitochondrial function, and cellular function. *Hepatology*; 32: 740-9.

Wright EC, Stern J, Ersser R. 1980 Glutathionuria: gamma-glutamyl transpeptidase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2: 3-7.

Yao D, Jiang D, Huang Z, Lu J, Tao Q, Yu Z, Meng X. 2000 Abnormal expression of hepatoma specific gamma-glutamyltransferase and alteration of gamma-glutamyltransferase gene methylation status in patientes with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 88:761-69.

Zalit I, Glass GA, Stark AA. 1996 The role of chelators in the catalysis of glutathionegamma glutamyl transpeptidasedependent lipid peroxidation by transition metals. *Biochem Mol Biol Int.* 40:1123-33.

Zhang L., Mock D. 1987 Gamma-glutamyl transpeptidase activity during carcinogenesis of hamster buccal pouch epithelium. *Carcinogenesis* 8(7): 977-81.

Zhang HF, Ong WY, Leong SK. 1997 Species differences in the localization of gammaglutamyl transpeptidase immunopositive cells at the blood-brain interface. *J Hirnforsch;* 38:323-30.

Zhang H, Forman HJ, Choi J. 2005 Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. *Methods Enzymol.* 401:468-83.

Zhang H, Liu H, Iles KE, Liu RM, Postlethwait EM, Laperche Y, Forman HJ. 4-Hydroxynonenal induces rat gamma-glutamyl transpeptidase through mitogen-activated protein kinase-mediated electrophile response element/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol.*2006;34(2):174-181.

Zeng H, Spencer NY, Hogg N. 2001 Metabolism of S-nitrosoglutathione by endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281:H432-9.