

Università degli studi di Pisa



DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea Magistrale in  
BIOLOGIA APPLICATA ALLA BIOMEDICINA

TESI DI LAUREA

**Variazioni delle frazioni plasmatiche  
dell'enzima gamma glutamiltransferasi  
in pazienti obesi sottoposti a chirurgia bariatrica**

RELATORI

Prof. Aldo Paolicchi

Dott.ssa Monica Nannipieri

CANDIDATO

Veronica Musetti

Anno accademico 2014/2015

# Indice

Abbreviazioni .....	3
Riassunto .....	4
Abstract .....	9
Capitolo 1: Introduzione .....	13
1.1 Biochimica della Gamma-Glutamiltransferasi .....	13
1.1.1 Struttura e localizzazione .....	13
1.1.2 Famiglia genica, biosintesi e glicosilazione .....	15
1.1.3 Meccanismo di reazione .....	19
1.1.4 Funzioni fisiologiche della GGT .....	20
1.1.4.1 Ruolo antiossidante: sintesi del glutatione .....	20
1.1.4.2 Ruolo pro-ossidante: produzione di ROS nell'ambiente extracellulare .....	23
1.1.4.3 Formazione di acidi mercapturici .....	25
1.1.4.4 Metabolismo dei leucotrieni .....	25
1.1.4.5 Metabolismo del nitrosoglutatione .....	26
1.1.4.6 La proteina GGT e il rimodellamento osseo .....	27
1.1.5 Effetti della mancanza di GGT .....	28
1.2 La GGT nel sangue: caratteristiche analitiche e strutturali .....	29
1.2.1 Variabili pre-analitiche .....	29
1.2.2 Metodologia di misura .....	29
1.2.3 Valori di riferimento della GGT sierica .....	30
1.2.4 Frazioni GGT plasmatica: origine e variabilità biologica .....	32
1.2.5 Separazione e quantificazione delle forme molecolari della GGT .....	36
1.3 Attività della GGT sierica e fegato .....	40
1.3.1 Relazione tra espressione di GGT epatica ed attività di GGT plasmatica .....	40
1.3.2 Induzione della GGT epatica .....	43
1.4 GGT sierica: associazioni epidemiologiche e cliniche .....	45

1.4.1 GGT e steatosi epatica non alcolica .....	45
1.4.2 GGT e disturbi metabolici: sindrome metabolica .....	46
1.4.2.1 GGT e obesità .....	47
1.4.2.2 GGT e pressione arteriosa .....	47
1.4.2.3 GGT e dislipidemia .....	47
1.4.3 GGT e disturbi metabolici: insulino-resistenza e diabete di tipo 2 .....	48
1.5 Valutazione del metabolismo glucidico .....	51
Capitolo 2: Scopo della tesi .....	55
Capitolo 3: Materiali e metodi .....	56
3.1 Scelta dei soggetti e disegno dello studio .....	56
3.2 Reagenti .....	58
3.3 Determinazione delle frazioni plasmatiche della GGT .....	58
3.4 Quantificazione dell'attività di GGT associata alle frazioni .....	60
3.5 Metodi statistici .....	61
Capitolo 4: Analisi dei risultati .....	64
4.1 Analisi dei parametri epatici, lipidici e del metabolismo glucidico in pazienti diabetici prima e dopo l'intervento di chirurgia bariatrica .....	64
4.2 Analisi dell'attività delle frazioni di GGT .....	69
4.3 Analisi delle transaminasi in base al grado di steatosi .....	77
4.4 Confronto tra pazienti con diabete in remissione e pazienti ancora diabetici .....	79
4.5 Analisi di correlazione tra l'attività di GGT totale e delle sue frazioni e i valori delle variabili cliniche .....	82
Capitolo 5: Discussione dei risultati .....	84
Riferimenti bibliografici .....	88
Ringraziamenti .....	103

## Abbreviazioni

ALT	Alanina aminotransferasi
AMC	Amminometilcumarina
AST	Aspartato aminotransferasi
BMI	Indice di massa corporea
CHC	Epatite cronica C
Cys	Cisteina
CysGly	Cisteinilglicina
GGT	Gamma glutamiltransferasi
GlyGly	Glicilglicina
GSH	Glutatione
GSNO	Nitrosoglutatione
HbA1c	Emoglobina glicata
NAFLD	Steatosi epatica non alcolica
OGTT	Test di tolleranza al glucosio
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
T2D	Diabete di tipo 2
Thr	Treonina
yGluAMC	y-glutammi-7-amido-4-metilcumarina

## Riassunto

In una grande percentuale di pazienti con obesità patologica, la chirurgia bariatrica permette di ottenere una notevole riduzione del rischio di sviluppare patologie associate al sovrappeso e all'obesità. In particolare nell'arco di un anno dall'intervento chirurgico, in parallelo alla perdita di peso, si osserva un notevole miglioramento del metabolismo glucidico con riduzione o addirittura remissione del diabete di tipo II (T2D). In questi pazienti si osserva, inoltre, un miglioramento generale della funzionalità epatica e la conseguente riduzione dei livelli di steatosi.

L'attività dell'enzima gamma-glutamilttransferasi (GGT) nel plasma è principalmente di origine epatica, in quanto GGT sierica e GGT epatica presentano le stesse caratteristiche chimico fisiche (stesso peso molecolare, tipo di glicosilazione e contenuto di acido sialico) e medesime caratteristiche cinetiche. Pertanto, già a partire dagli anni '60, si è pensato che l'attività dell'enzima GGT nel siero potesse rappresentare un indice sensibile, tuttavia aspecifico, di disfunzione epatica.

Inoltre l'attività di GGT nel siero è aumentata nei soggetti con T2D rispetto a un gruppo sano di controllo. Da numerosi studi è emersa l'associazione tra l'attività di GGT e l'indice di massa corporea in relazione all'insorgenza del T2D. In particolare il rischio di comparsa della patologia è maggiore all'aumentare dei livelli sierici di GGT, sempre all'interno del normale intervallo fisiologico, e questa associazione diventa più forte all'aumentare dei valori dell'indice di massa corporea.

Tramite la cromatografia ad esclusione molecolare sono state distinte e quantificate quattro frazioni di GGT plasmatiche: big-GGT (b-GGT, 2000 kDa), medium-GGT (m-GGT, 1000 kDa), small-GGT (s-GGT, 250 kDa) e free-GGT (f-GGT, 70 kDa). In particolare la frazione b-GGT è stata ritrovata legata alle membrane cellulari di microvescicole, come gli esosomi, poiché la dimensione e la densità degli esosomi corrisponde alla dimensione e densità della b-GGT. Per quanto riguarda la biogenesi delle altre frazioni, m-GGT e s-GGT, si pensa che derivino direttamente da progressive modificazioni della b-GGT, dopo che quest'ultima viene rilasciata nel compartimento extracellulare. In particolare è emerso che la m-GGT e la s-GGT sono formate da micelle di acidi biliari. La frazione f-GGT è invece la porzione solubile, mancante del peptide N-terminale lipofilo, e probabilmente deriva direttamente dalle frazioni m-GGT e s-GGT in seguito a taglio proteolitico.

Studi recenti hanno dimostrato che la frazione b-GGT è aumentata in pazienti affetti da steatosi epatica, ora considerata la manifestazione epatica della sindrome metabolica, associata ad insulino-resistenza, T2D, dislipidemia e ad un aumentato rischio di malattie cardiovascolari. La frazione s-GGT invece aumenta prevalentemente nei soggetti con danno epatico, infatti è la frazione che mostra la correlazione maggiore con le transaminasi, in particolare le ALT, quindi la sua attività è superiore negli individui con epatopatie virali o alcoliche. La frazione f-GGT è la maggiormente rappresentata nei soggetti sani, mentre per m-GGT non è ancora stato possibile ipotizzare un significato diagnostico.

Gli scopi di questo studio sono determinare le frazioni circolanti dell'enzima GGT in pazienti obesi prima e dopo l'intervento di chirurgia bariatrica e l'analisi delle loro variazioni in relazione al cambiamento di peso e dei parametri descrittivi del metabolismo glucidico.

A partire da una sieroteca, e dal rispettivo database, sono stati individuati 29 pazienti obesi e diabetici sottoposti ad intervento di chirurgia bariatrica. Prima dell'operazione questi soggetti erano stati ricoverati per un periodo di otto giorni presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, durante il quale avevano svolto analisi e test clinici, ripetuti successivamente a 15 giorni e ad un anno dall'intervento. Per ogni paziente sono stati identificati 3 aliquote di plasma corrispondenti alle date pre-intervento (T0), 15 (T15) e 365 (T365) giorni dopo. Questi campioni, anonimizzati, sono stati analizzati tramite cromatografia ad esclusione molecolare seguita da un'iniezione post colonna di un substrato fluorescente specifico per la GGT (gamma-glutamyl-7-amido-4-methylcoumarina). La separazione delle molecole avviene sulla base della loro forma e dimensione molecolare. La miscelazione dell'eluato, uscente dalla colonna, e il substrato specifico per la GGT, avviene in una spira di volume 2.6 ml che corrisponde ad un periodo di incubazione di 4 minuti a 37°. Le quattro frazioni di GGT plasmatiche sono state rivelate tramite uno spettrofluorimetro, operante ad una lunghezza d'onda eccitazione di 380 nm e di emissione di 440 nm. Per quantificare l'attività della GGT totale e delle sue frazioni è stato utilizzato un programma informatico (MATLAB Version 7 MathWorks, Inc) per risolvere la sovrapposizione dei picchi del cromatogramma risultante.

Un anno dopo l'intervento chirurgico i pazienti hanno presentato una significativa riduzione dell'indice di massa corporea [mediana (25°-75° percentile); T0: 41.98 (37.62-47.96) kg·m<sup>-2</sup>; T365: 29.73 (26.99-33.71) kg·m<sup>-2</sup>; P < 0.0001], passando da una

condizione di obesità grave a quella di sovrappeso, in parallelo con il significativo miglioramento dei parametri epatici (ALT, AST), lipidici (colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi) e relativi al metabolismo glucidico (glicemia a digiuno, emoglobina glicata, insulinemia basale, sensibilità al glucosio delle cellule  $\beta$ , clearance dell'insulina, OGIS 120). Per quanto riguarda i dati di GGT, tutti i pazienti presentavano valori di GGT totale moderatamente elevati [22.13 (16.34-35.03) U/L] e significativamente più elevati rispetto a quelli determinati un anno dopo l'intervento [12.97 (10.73-17.25) U/L;  $P < 0.0001$ ]. Anche i livelli di tutte le frazioni sono risultati significativamente più bassi ( $P < 0.0001$ ) a un anno dall'intervento chirurgico: la frazione b-GGT si riduce mediamente del 60% [T0: 2.95 (2.10-6.76) U/L; T365: 1.18 (0.86-1.55) U/L;  $P < 0.0001$ ], mentre le altre frazioni del 27% circa.

Nei primi 15 giorni post-intervento si osserva un incremento degli enzimi alanina e aspartato transaminasi così come delle frazioni b-GGT e s-GGT, dovuto al fatto che dopo l'intervento i pazienti devono seguire una dieta ipocalorica (1200 kcal) per 30 giorni. Perciò nell'immediata post-operazione il fegato deve metabolizzare una quantità insolitamente elevata di acidi grassi che ne peggiora momentaneamente la funzionalità e il grado di steatosi.

Dopo la suddivisione dei 29 pazienti sottoposti ad intervento di chirurgia bariatrica in tre gruppi in base alla diagnosi di steatosi (senza steatosi S0, steatosi S1, steatoepatite S2), effettuata prima dell'intervento, sono emersi gli aumentati valori sia delle transaminasi, in particolare le ALT, sia dell'attività di GGT, in particolare b-GGT, in coloro che avevano una diagnosi di steatosi e steatoepatite [S1: ALT: 26.00 (17.00-23.00) U/L, b-GGT: 2.70 (1.88-5.81) U/L; S2: ALT: 38.50 (21.50-53.00) U/L, b-GGT: 6.15 (2.90-8.84) U/L] rispetto al gruppo senza steatosi [ALT: 14.50 U/L, b-GGT: 1.87 U/L].

Analizzando i cromatogrammi dei profili di attività delle singole frazioni di GGT di tre pazienti caratterizzati da una diversa diagnosi di steatosi, ottenuti analizzando campioni di siero prelevati prima dell'intervento, dopo 15 giorni e dopo un anno, si osserva che i volumi a cui eluiscono le singole frazioni di GGT rimangono costanti nel tempo, quindi non ci sono modificazioni nel peso molecolare delle singole frazioni a seguito dell'intervento di chirurgia bariatrica. Ciò che varia notevolmente, anche in base al grado di steatosi, sono l'altezza e l'ampiezza del picco delle singole frazioni, indice di una maggiore o minore attività di GGT. In particolare si può notare che, prima

dell'intervento, l'area sottesa al profilo di eluizione di b-GGT sia tanto maggiore quanto maggiore è il grado di steatosi.

Dei 29 pazienti che hanno subito l'intervento di chirurgia bariatrica, 11 non hanno avuto remissione del T2D ad un anno dall'operazione, mentre 18 hanno avuto remissione della patologia. Prima dell'intervento i due gruppi di pazienti differiscono soprattutto per i valori emoglobina glicata ( $P = 0.0016$ ), maggiore nei primi [9.20 (7.50-10.50) %] rispetto ai secondi [6.80 (6.28-7.95) %], per la sensibilità al glucosio delle cellule  $\beta$  ( $P = 0.0060$ ), minore nei soggetti che non presentano remissione del diabete [11.21 (6.81-17.70) pmol/min\*m<sup>2</sup>\*mM] rispetto ai soggetti che hanno remissione del diabete [26.25 (12.87-56.71) pmol/min\*m<sup>2</sup>\*mM], ma in particolare per la durata della malattia ( $P = 0.0005$ ). Per quanto riguarda le singole frazioni di GGT, è emerso che prima dell'operazione non vi sono significative differenze tra i due gruppi, mentre ad un anno dall'intervento è maggiormente significativa la riduzione della b-GGT in coloro che hanno remissione del T2D ( $P < 0.0001$ ) rispetto a coloro che non vanno in remissione ( $P = 0.0300$ ), inoltre è significativa la differenza tra i due gruppi ( $P = 0.0175$ ) ad un anno dall'operazione.

Dall'analisi di correlazione lineare è emerso che è la frazione b-GGT a mostrare le associazioni maggiori con i parametri del metabolismo glucidico, in particolare una correlazione positiva con glicemia basale ( $r = 0.4999$ ), insulinemia basale ( $r = 0.5609$ ) ed emoglobina glicata ( $r = 0.5690$ ), mentre negativa con la sensibilità al glucosio delle cellule  $\beta$  ( $r = -0.3337$ ), clearance dell'insulina ( $r = -0.2602$ ) e OGIS 120 ( $r = -0.5473$ ). Tra le altre frazioni, invece, s-GGT è quella che mostra la migliore associazione con le ALT ( $r = 0.4102$ ).

Da questo studio è stata trovata conferma che l'intervento di chirurgia bariatrica comporta un miglioramento del metabolismo glucidico e, in alcuni casi, remissione del T2D, infatti è stimato che circa il 30% di coloro che effettuano l'operazione cessa il trattamento farmacologico antidiabetico ad un anno dall'operazione. Il parametro che discrimina maggiormente i soggetti che hanno avuto remissione del diabete e i soggetti senza remissione è la durata della patologia. Infatti un alterato metabolismo glucidico, che perdura da un tempo maggiore, comporta una superiore condizione di esaurimento per le cellule  $\beta$  del pancreas, testimoniata dalla loro ridotta sensibilità al glucosio e, di conseguenza, un loro recupero risulterà più difficoltoso. Per la riuscita dell'intervento, è comunque fondamentale l'impegno del paziente stesso a rispettare e condurre una dieta alimentare sana ed equilibrata.



Inoltre è stato trovato conferma sia dell'associazione dell'attività di GGT con la condizione di insulino-resistenza, in quanto nel corso dell'anno post operatorio si assiste ad una diminuzione significativa dei livelli di GGT nel siero, sia dell'associazione, in particolare di b-GGT e delle ALT, con il grado di steatosi, poiché all'aumentare dei livelli di steatosi epatica si evidenzia in parallelo un incremento di concentrazione di entrambi i parametri.

Infine tra le frazioni di GGT, quella che mostra la maggiore associazione con gli indici del metabolismo glucidico è b-GGT, che quindi potrebbe essere la frazione che meglio descrive la condizione glicemica del paziente. e si può ipotizzare che una diminuzione della sua attività potrebbe essere indice del miglioramento del controllo del metabolismo glucidico da parte del paziente.

## Abstract

In a large percentage of patients with pathological obesity, bariatric surgery allows for a significant reduction in the risk of developing diseases associated with overweight and obesity. In particular, within one year after surgery, in parallel to weight loss, it is observed a substantial improvement of carbohydrate metabolism with reduction or even remission of type 2 diabetes. These patients also have a general improvement in liver function and the consequent reduction in the levels of steatosis.

Serum gamma glutamyltransferase (GGT) activity is predominantly secreted by the liver, in fact serum GGT and hepatic GGT have the same chemical and physical characteristics (same molecular weight, type of glycosylation and sialic acid content), and same kinetics. Therefore serum GGT activity could be a sensitive marker of liver dysfunction, but its specificity is modest, as its value increases with common conditions causing liver dysfunction.

In prospective studies, serum GGT, within reference interval, predicts incident type 2 diabetes. In addition, the association of obesity with the prevalence of type 2 diabetes varies with serum GGT activity. Body mass index (BMI) is associated with prevalent diabetes only when GGT is in its high normal range. In patients with low normal serum GGT activity, BMI is not associated with diabetes.

Gel filtration chromatography allows the identification of four GGT fractions in plasma of all healthy subjects, named big-GGT (b-GGT), medium-GGT (m-GGT), small-GGT (s-GGT) and free-GGT (f-GGT), with molecular weight corresponding to 2000, 1000, 250 and 70 kDa respectively. In particular, plasma b-GGT fraction is constituted of membrane microvesicles, such as exosomes, b-GGT dimension and density being compatible with this membrane microvesicle class. More complicated seems to be the biogenesis of the other GGT fractions (m-GGT, s-GGT and f-GGT) that might arise from progressive modifications of the b-GGT fraction, in the extracellular compartment, after b-GGT secretion. M-GGT and s-GGT might be constituted of micelles of bile acids, while f-GGT corresponds to the free, soluble form of the enzyme, lacking the N-terminal anchoring peptide and it could originate directly from both m-GGT and s-GGT fraction as a consequence of a proteolytic cleavage.

A recent study has shown that b-GGT fraction increases in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). NAFLD is now recognized as the hepatic manifestation of the metabolic syndrome, being associated with insulin resistance, type 2 diabetes,

atherogenic dyslipidaemia and increased risk for cardiovascular events. A prominent increase of s-GGT fraction in viral hepatitis and alcoholic liver disease suggests that s-GGT fraction might reflect the different extents of inflammatory, structural and functional derangement in liver disease. F-GGT is the most abundant fraction in healthy adults, while m-GGT has not yet a diagnostic significance.

The aims of this study are to determine circulating GGT fractions in obese patients before and after bariatric surgery and to analyze their variations in relation to weight change and descriptive parameters of glucose metabolism.

Twenty-nine obese and diabetic patients, subjected to bariatric surgery, have been identified in a serum bank and in the respective database. Before the operation, these subjects have been hospitalized for a period of eight days at the University Hospital of Pisa, during which they have been subjected to blood analyzes and clinical trials, repeated 15 days and one year after surgery. For each patient 3 plasma aliquots have been identified, corresponding to the pre-operation date (T0), 15 (T15) and 365 (T365) days later. These anonymized samples have been analyzed by molecular exclusion chromatography followed by post-column injection of a fluorescent substrate specific for the GGT (gamma-glutamyl-7-amido-4-methylcoumarina). The separation of molecules occurs on the basis of their molecular size and shape. The mixing of the eluate, leaving the column, with the substrate specific for the GGT, occurs in a coil of volume 2.6 ml which corresponds to 4 minutes incubation time, at 37 °C. The four GGT fractions have been identified by the subsequent detection with a spectrofluorometer, operating at an excitation wavelength of 380 nm and emission of 440 nm. A computer program (Version 7 MATLAB MathWorks, Inc) have been used to quantify total and fractional GGT activities and to resolve the overlap of the resulting chromatograms.

Patients exhibit a significant reduction in body mass index from, median (25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile), 41.98 (37.62-47.96) kg/m<sup>2</sup> at T0 to 29.73 (26.99-33.71) kg/m<sup>2</sup> at T365; (P < 0.0001) and a significant improvement in hepatic function (evaluated by alanine aminotransferase, ALT; and aspartate aminotransferase, AST), in lipidic profile (total cholesterol, HDL, triglycerides) and in glucose metabolism (fasting blood glucose, glycosylated hemoglobin, fasting blood insulin,  $\beta$ -cell glucose sensitivity, insulin clearance, OGIS 120). GGT concentration decreases significantly in all patients from 22.13 (16.34-35.03) U/L at baseline to 12.97 (10.73-17.25) U/L after one year from the surgery (P < 0.0001). A year after surgery, GGT fractions are significantly lower (P <

0.0001), in fact b-GGT shows about a 60% decrease (T0: 2.95, 2.10-6.76 U/L; T365: 1:18, 0.86-1.55 U/L,  $P < 0.0001$ ), while the other fractions are about 27%.

After the operation, patients follow a low calorie diet (1200 kcal) for 30 days, we observe an increase of the enzymes ALT and AST as well as of b-GGT and s-GTT fractions (T15). This initial decline of hepatic function and degree of steatosis, after surgery, could be related with an unusually high amount of fatty acids that liver have to metabolize.

GGT chromatograms of three patients, characterized by a different diagnosis of steatosis, show that elution volume of GGT fractions remain constant over time, so the molecular weight of each fraction doesn't change after bariatric surgery. Instead the height and the width of the GGT fractions peaks widely vary, indicating greater or lesser GGT activity. In particular, the area under the peak of b-GGT fraction increases with the degree of steatosis.

A year later, 11 patients have had no remission of type 2 diabetes, while 18 patients have had remission. Before the operation, the two groups of subjects differ mainly for glycosylated hemoglobin ( $P = 0.0016$ ), for  $\beta$ -cell glucose sensitivity ( $P = 0.0060$ ), but in particular for the duration of diabetes ( $P = 0.0005$ ). As for the GGT fractions, it is found that there aren't significant differences between the two groups before the operation. Instead, a year after surgery, b-GGT decreases more in the group with remission ( $P < 0.0001$ ) than in the group without remission of type 2 diabetes ( $P = 0.0300$ ), therefore the difference between the two groups is significant ( $P = 0.0175$ ).

The linear correlation indicates that b-GGT fraction has more associations with glucose metabolism parameters, in particular a positive correlation with fasting plasma glucose ( $r = 0.4999$ ), basal insulin ( $r = 0.5609$ ) and glycosylated hemoglobin ( $r = 0.5690$ ), while negative with  $\beta$ -cell glucose sensitivity ( $r = -0.3337$ ), insulin clearance ( $r = -0.2602$ ) and OGIS 120 ( $r = -0.5473$ ). Instead s-GGT shows the best association with ALT ( $r = 0.4102$ ).

This study has confirmed that bariatric surgery results in an improvement of glucose metabolism, and, in some cases, remission of diabetes type 2, in fact it is estimated that about 30% of patients undertaking the operation ceases antidiabetic drug treatment one year later. The parameter that discriminates the subjects with or without remission of diabetes is the duration of the disease. In fact an altered glucose metabolism, which persists for a longer time, implicates a higher exhaustion condition for the  $\beta$  cells of the pancreas, as demonstrated by their reduced sensitivity to glucose and thus their recovery

will be more difficult. Moreover, for the success of bariatric surgery, the diligence of the patient to respect and lead a healthy and balanced diet is essential.

Therefore this study confirms the relation between GGT activity and insulin resistance condition, in fact during the year after surgery there is a significant decrease in the levels of serum GGT. In addition b-GGT and ALT are in close association with the degree of hepatic steatosis, actually higher degree of fatty liver is associated with an increase of concentration of both parameters.

Finally, b-GGT is the most associated GGT fraction with the indices of glucose metabolism, so it could describe the condition of patient's blood glucose. Our results suggest that a decrease of b-GGT activity could be a marker of improvement in the control of glucose metabolism.

.

## Capitolo 1: Introduzione

L'attività dell'enzima gamma-glutamyltransferasi (GGT) è considerata un marcatore diagnostico sensibile, ma non malattia-specifico di disordini epatobiliari e abuso di alcool.

Infatti la GGT mostra una correlazione positiva con il consumo di alcool e l'abitudine al fumo, la pressione sanguigna, gli indici di obesità, in particolare l'indice di massa corporea (BMI), e con i livelli sierici di glucosio, trigliceridi, colesterolo e acido urico. [Whitfield, 2001].

Inoltre l'aumentata attività dell'enzima circolante è stata associata ad un notevole rischio di ipertensione, diabete e sindrome metabolica [Lee et al., 2007]. Infine è stato dimostrato che la GGT riveste un ruolo importante nella formazione di radicali liberi a causa della sua interazione con il ferro, quindi elevati livelli di GGT potrebbero rappresentare un buon marcatore dell'infiammazione e dello stress ossidativo, caratteristiche proprie dell'ipertensione [Lee et al., 2004].

Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato che livelli elevati di GGT sierici sono sia un fattore di rischio indipendente di mortalità per tutte le cause [Dasal., 2008] sia per quelle legate a patologie epatiche e neoplastiche [Ruttman et al., 2005].

Il normale range dei valori di riferimento per la GGT varia tra 0 e 30 IU/L; livelli maggiori si riscontrano negli uomini, rispetto alle donne (25%), e inoltre, in quest'ultime, i valori aumentano con l'avanzare dell'età [Lum et al, 1972]. Nei neonati, invece, il range dei valori di riferimento supera di 6-7 volte il limite superiore del normale intervallo fisiologico, per poi stabilizzarsi ai valori riscontrati negli adulti intorno al settimo mese di vita [Cabrera-Abreu et al, 2002].

### 1.1 Biochimica della Gamma-Glutamiltransferasi

#### 1.1.1 Struttura e localizzazione

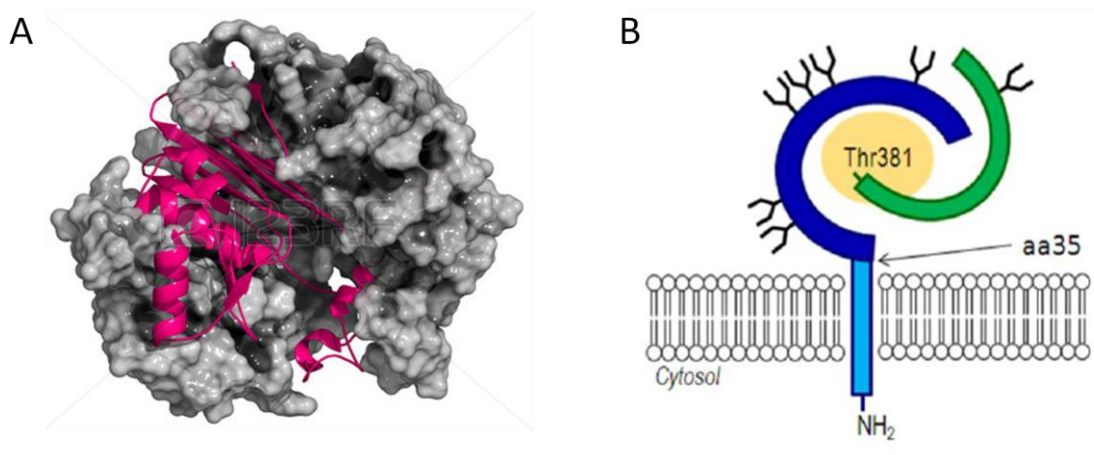
La GGT è un enzima che è stato ritrovato nelle piante [Martin et al., 2000], nei batteri [Suzuki et al., 1986; Okada et al., 2006] e in tutto il regno animale, quindi è ampiamente diffuso e conservato nel mondo vivente.

In particolare nei mammiferi, la GGT è una glicoproteina dimerica di membrana di tipo II, costituita da una subunità pesante (380 amminoacidi, 55-62 kDa) e una subunità leggera (189 amminoacidi, 20-30 kDa) legate da legami non covalenti. Il dominio

intracellulare è formato da quattro amminoacidi, quindi, nell'ambiente extracellulare, si ritrova la maggior parte della proteina [Finidori et al., 1984; Castonguay et al., 2007].

Il dominio idrofobico transmembrana permette all'enzima di ancorarsi alla membrana cellulare ed è situato nella porzione ammino (N)-terminale della catena pesante. Il sito catalitico è localizzato nella subunità leggera nello spazio extracellulare, e ciò gli permette di agire su substrati che si trovano all'esterno della cellula [Tate et al., 1981; Ikeda et al., 1995].

La proteina si forma come singolo polipeptide che viene tagliato per azione di una proteasi, producendo, in questo modo, la subunità pesante e la subunità leggera. La catena pesante presenta inoltre un dominio extracellulare che rende possibile il legame con la catena leggera. Quest'ultima, in vitro, mostra un'attività protesica che le permette di digerire la catena pesante; in vivo, invece, ciò non avviene, molto probabilmente perché la subunità pesante è in grado di modificare il sito catalitico della subunità leggera [Taniguchi et al., 1998].



**Figura 1.1:** A: struttura GGT: in grigio la subunità pesante, in rosa la subunità leggera; B: rappresentazione schematica della GGT umana all'interno della membrana plasmatica.

Nei mammiferi la GGT è stata localizzata, tramite studi di immunoistochimica, sulla membrana di tutte le cellule, ma in particolare nei tessuti epiteliali con funzioni di assorbimento e secrezione [Hanigan et al., 1996]. La maggiore concentrazione di GGT è stata ritrovata nel rene, sulla superficie del lume delle cellule del tubulo contorto prossimale, mentre la GGT è praticamente assente nelle cellule del tubulo contorto distale e nei glomeruli [Tate et al., 1981].

Nel fegato l'attività enzimatica si è riscontrata, soprattutto, nelle cellule epiteliali della vie biliari extraepatiche e nei canalicoli epatici, mentre nel pancreas all'interno delle cellule acinose. Inoltre la GGT si può localizzare nelle cellule delle ghiandole sudoripare, delle ghiandole sottomandibolari, dei dotti galattofori, dell'epididimo, dell'epitelio bronchiale, delle vescicole seminari e della prostata.

Nel cervello, la GGT sembra rivestire un ruolo importante nella funzionalità della barriera ematoencefalica, promuovendo la detossificazione degli xenobiotici e il metabolismo dei leucotrieni vasotattivi, infatti si ritrova nei capillari (ad esempio nel plesso corioideo), negli astrociti che rivestono quest'ultimi, ma anche sulla superficie delle cellule endoteliali del corpo ciliare e del midollo spinale [Zhang et al., 1997; Garcion et al., 1999].

Nel sangue la proteina è espressa nella maggior parte della frazione corpuscolata, come le piastrine e i leucociti [Bolodeoku et al., 1997], in particolare nei granulociti e nei linfociti la sua maggiore espressione è considerata un marcatore di differenziazione e trasformazione neoplastica [Khalaf et al., 1997; Grisk et al., 1993; Sener et al., 2005].

Infine l'attività della GGT è stata riscontrata anche nel siero, molto probabilmente in seguito al rilascio da parte della membrana cellulare dei parenchima dei vari organi, quindi le modificazioni nella concentrazione sierica della GGT sono in rapporto con i cambiamenti quantitativi della sua produzione, del suo rilascio e della sua rimozione [Huseby et al., 1993].

### *1.1.2 Famiglia genica, biosintesi e glicosilazione*

Nel genoma umano è stata individuata una famiglia multigenica per la GGT che comprende sette differenti geni situati sul cromosoma 22 nella regione 22q11.1-q11.2, posta nelle vicinanze dei loci BCR ("breakpoint cluster region") e IG- $\lambda$  [Courtay et al., 1994; Bulle et al., 1987; Collins et al., 1997].

Inoltre sui cromosoma 18, 19 e 20 sono state identificate delle sequenze correlate, probabilmente pseudogeni [Figlewicz et al., 1993].

Recentemente, tramite un'analisi sistematica delle sequenze nucleotidiche aventi un grado di omologia significativo con il gene codificante per l'enzima GGT attivo, riportate nella banca dati del National Institute for Biotechnology (NCBI), è stato possibile proporre una nuova e unitaria nomenclatura per identificare tutti i componenti della famiglia genica della GGT [Heisterkamp et al., 2006].



Tra questi solo il gene GGT1 ha espressione ubiquitaria e produce una proteina completa con attività enzimatica [Heisterkamp et al., 2006; Chikhi et al., 1999; Ikeda et al., 2005]. Questo gene GGT1 è costituito da una sequenza di almeno 32 Kb comprendente circa venti esoni: dodici di questi codificano la sequenza amminoacidica della GGT, in particolare i primi sette codificano la subunità pesante, l'esone otto codifica l'estremità carbossilica della subunità pesante e l'estremità amminica della subunità leggera, mentre gli ultimi quattro esoni codificano la parte rimanente della subunità leggera. La regione non codificante all'estremità 5' (5'-UTR) è formata da otto esoni, alcuni dei quali sono separati da potenziali siti di splicing alternativo [Leh et al., 1998; Visvikis et al., 2001].

Degli altri sei geni, almeno quattro sono trascritti in mRNA codificanti per peptidi costituiti in gran parte dalla subunità pesante e leggera, ma le proteine relative non sono state ancora identificate [Courtay et al., 1994; Chikhi et al., 1999].

Nel 1995, Brannigan e collaboratori hanno scoperto una nuova superfamiglia di proteine, raccolte sotto il nome di "idrolasi nucleofilo N-terminale" (idrolasi-nNt) [Brannigan et al., 1995].

I membri di questo gruppo sono caratterizzati dalle seguenti proprietà strutturali comuni:

- sono tradotti in un unico propeptide, successivamente convertito, tramite proteolisi autocatalitica e senza perdita di amminoacidi, nell'enzima attivo;
- l'amminoacido, in genere una treonina (Thr) o una serina (Ser), situato nella nuova estremità N-terminale, idrolizza un legame ammidico tramite attacco nucleofilo;
- il core del sito catalitico possiede una struttura  $\alpha\beta\beta\alpha$ , nella quale due foglietti  $\beta$  antiparalleli sono situati tra due  $\alpha$  eliche antiparallele.

Nonostante queste caratteristiche strutturali comuni, le idrolasi-nNt non hanno omologie nella sequenza primaria e nella specificità di substrato [Brannigan et al., 1995; Oinonen et al., 2000].

Si può ritenere che la GGT appartenga a questa superfamiglia in quanto:

- l'mRNA completo, trascritto a partire dal gene GGT1, è tradotto in un unico propeptide, che in seguito trasloca nel reticolo endoplasmatico e, tramite proteolisi, genera le due subunità che caratterizzano la proteina [Kinlough et al., 2005]; questo processo è definito autocatalitico e avviene per opera dell'amminoacido Thr, situato all'estremità N-terminale e conservato in tutta la filogenesi [Okada et al 2006;

Kinlough et al., 2005; Storozhenko et al., 2002; Boanca et al., 2006], infatti è stato confermato 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 [Castonguay et al., 1984];

- l'enzima GGT è in grado di scindere il legame ammidico presente tra il gruppo carbossile in posizione  $\gamma$  dell'acido glutammico e un'ammina;
- tramite analisi strutturale del cristallo di GGT di *Escherichia Coli* e di *Helicobacter Pylori* è stato possibile evidenziare la struttura  $\alpha\beta\beta\alpha$  del core catalitico [Okada et al 2006; Boanca et al., 2006].

Andando più nel dettaglio, durante la biosintesi della GGT, il gruppo ossidrilico della Thr del proenzima serve come sito nucleofilo per il clivaggio. La Thr attacca il gruppo carbonilico del residuo precedente, che è spesso una glutammina o una glicina, producendo un intermedio tetraedrico. Il clivaggio del legame C-N, attraverso la protonazione del gruppo amminico della Thr, produce come intermedio un estere, che è poi idrolizzato da una molecola d'acqua per formare la subunità grande e la subunità piccola dell'enzima maturo, avente la Thr come nuovo residuo N-terminale. Nel processo un ruolo cruciale potrebbe essere svolto dalla molecola d'acqua che potrebbe accrescere la nucleofilicità del gruppo ossidrilico della Thr [Okada et al., 2007; Chang et al., 2010; Lin et al., 2006].

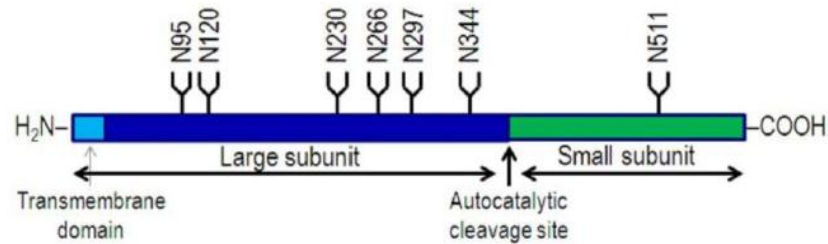
Il precursore e l'enzima maturo hanno diverse caratteristiche strutturali nei vari organismi. Nei mammiferi, come in molti batteri, il proenzima è un dimero di due monomeri identici  $(\alpha\beta)_2$  mentre la GGT attivata è un eterodimero, composto da una subunità pesante e una subunità leggera [Okada et al., 2006].

La GGT umana è una proteina altamente glicosilata, infatti contiene sette siti di N-glicosilazione [West et al., 2011]: sei nella subunità pesante (N95, 120, 230, 266, 297 e 344) e uno nella subunità leggera (N511). Quattro siti di N-glicosilazione (N95, 120, 344 e 511) sono molto conservati tra gli eucarioti, due siti (N230 e 297) sono conservati tra i mammiferi, mentre il sito N266 non è conservato, per esempio non è presente nei maiali e nei ratti.

La N-glicosilazione è tessuto specifica e rappresenta il 25-30% della massa totale dell'enzima, infatti le GGT, provenienti dai vari organi e purificate, presentano peso molecolare diverso e di conseguenza diversa mobilità elettroforetica; inoltre si possono

distinguere per la diversa affinità per le lectine e per il diverso contenuto di acido sialico [Shaw et al., 1980; Huseby et al., 1981; Evjen et al., 1992].

Quanto la glicosilazione influisca sull'integrità strutturale e sul clivaggio autocatalitico dell'enzima nascente non è ancora molto chiaro, anche se è stato dimostrato che le varie caratteristiche dei glicani comportano una modulazione nella cinetica di reazione dell'eterodimero maturo [Meredith, 2011].

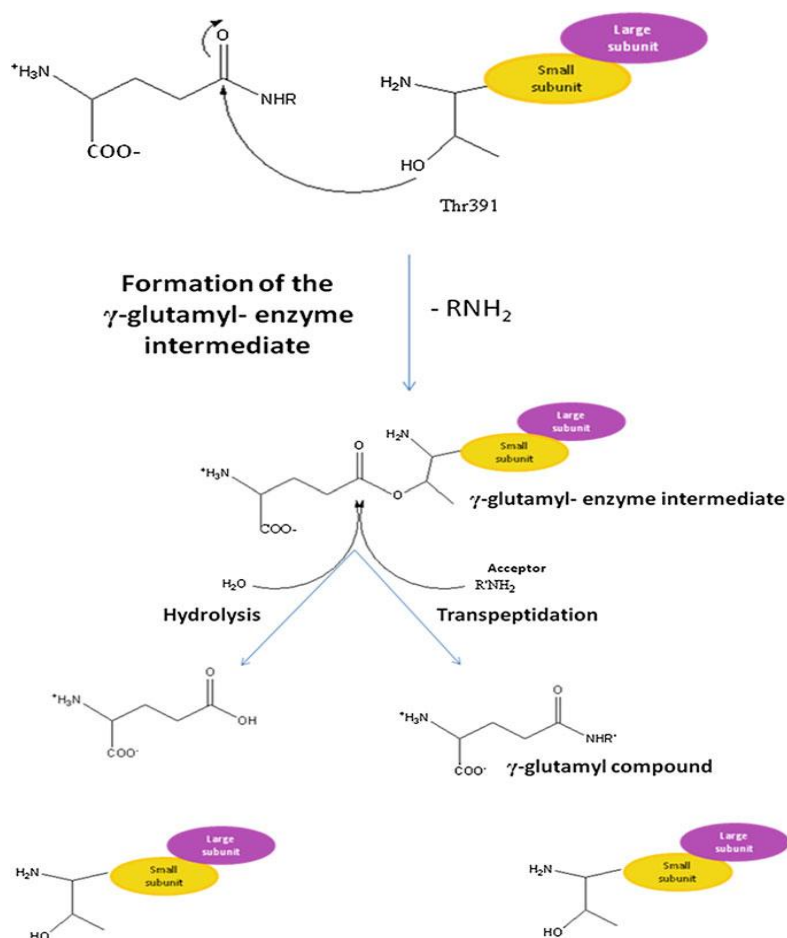


**Figura 1.2:** Rappresentazione schematica del propeptide della GGT umana e i suoi sette siti di N-glicosilazione. Sono indicati le posizioni del dominio transmembrana (TM), i siti consenso di N-glicosilazione (N) e il sito di clivaggio del propeptide.

Tuttavia, successivamente, è stato dimostrato che la perdita di un singolo sito di N-glicosilazione è tollerata dal punto di vista funzionale, ma la mutazione N95Gln porta ad una diminuzione evidente dell'efficienza autoproteolica del propeptide. Inoltre una mutagenesi combinata di tutti i siti di N-glicosilazione conduce ad un accumulo della forma inattiva del propeptide della GGT. È stato anche dimostrato che l'evento critico per il corretto ripiegamento e la successiva scissione del propeptide in enzima attivo è rappresentato dalla glicosilazione co-traduzionale. Infatti, la deglicosilazione enzimatica della forma matura della GGT wild type non modifica il comportamento cinetico e la stabilità termica dell'enzima umano completamente processato. Questi studi sono stati eseguiti sia sul gene wild type sia sul gene umano della GGT espresso nella linea cellulare HEK293 ("human embryonic kidney") [West et al., 2011].

### 1.1.3 Meccanismo di reazione

L'enzima GGT agisce catalizzando la scissione del legame  $\gamma$ -glutammilico (presente tra il gruppo carbossile in posizione  $\gamma$  dell'acido glutammico ed un'ammina) e il trasferimento successivo dell'acido glutammico su un accettore. Questo tipo di reazione è un classico esempio di meccanismo a "ping pong" [Keillor et al., 2005]: nello stadio di acilazione il gruppo  $\gamma$ -glutammilico della molecola che agisce da substrato è trasferito sul gruppo ossidrilico della Thr N-terminale della subunità leggera e viene liberata un'ammina. Si forma, così un intermedio, l'acil-enzima, che lega una molecola accettore e, nello stadio successivo di deacilazione, l'acido glutammico è trasferito sul gruppo amminico dell'accettore. In questo modo viene formato un nuovo legame  $\gamma$ -glutammilico (reazione di transpeptidazione). Nel caso in cui non sia presente un accettore, l'acil-enzima può reagire con una molecola d'acqua, portando alla liberazione di acido glutammico (reazione di idrolisi).



**Figura 1.3:** Meccanismo d'azione della GGT

L'enzima GGT è molto specifica riguardo il tipo di legame scisso, mentre è aspecifica per quanto riguarda i substrati perché l'unico elemento critico è la porzione  $\gamma$ -glutammina. Quindi sono potenziali substrati per la GGT tutti i  $\gamma$ -glutammina-composti; i principali sono: il glutathione (GSH), il leucotriene C4 (coniugato del GSH), i coniugati del glutathione prodotti dalla GSH-transferasi e il nitrosoglutatione. Invece come molecola accettore la GGT riconosce L-amminoacidi (Cis, Met, Gln, Glu) o, meglio, i dipeptidi amminoacilglicina (CisGly, MetGly, GlnGly, CysGly, GlyGly) [Thompson et al., 1977; Allison et al., 1985].

Nel 2006 Barycki e collaboratori hanno proposto che il gruppo idrossile di una seconda Thr, che segue la Thr catalitica nella sequenza della subunità leggera ed è molto ben conservata nella famiglia delle GGT, forma due legami a idrogeno con la Thr catalitica stessa [Boanca et al., 2006]. Proprio questo diade Thr-Thr è critico per il clivaggio del legame  $\gamma$ -glutamminico del GSH. La GGT catalizza sia reazioni di idrolisi che reazioni di transpeptidazione. In vivo, la reazione principale è quella di idrolisi [West et al., 2011]. Queste due reazioni mostrano diversi profili di pH. Questo permette alla GGT di catalizzare selettivamente una delle due reazioni, modificando il pH della miscela di reazione [Keillor et al., 2005].

#### *1.1.4 Funzioni fisiologiche della GGT*

L'enzima GGT è coinvolto in numerose funzioni fisiologiche, alcune delle quali sembrano essere in contrapposizione tra loro. In particolare si fa riferimento al suo ruolo antiossidante e pro ossidante quando agisce sulla molecola del GSH.

##### *1.1.4.1 Ruolo antiossidante: sintesi del glutathione*

Il glutathione ( $\gamma$ -L-glutammina-L-cisteinilglicina) è un tripeptide, costituito dagli amminoacidi cisteina (Cys), glicina (Gly) e glutammato (Glu). Si trova nei tessuti di tutti i mammiferi, essendo la più abbondante e importante molecola antiossidante. È coinvolto in molteplici funzioni cellulari, tra cui: la protezione delle cellule dallo stress ossidativo, la detossificazione degli xenobiotici e altri metaboliti, la modulazione della proliferazione cellulare, l'apoptosi e la fibrogenosi. Inoltre il GSH è fondamentale per la sintesi di ossido nitrico (NO) e la conservazione e il trasporto della Cys. Il glutathione non può essere idrolizzato dalle classiche peptidasi, in quanto contiene un legame inusuale tra il glutammato e la cisteina, ovvero per il legame viene utilizzato il gruppo  $\gamma$  carbossile del glutammato piuttosto che il gruppo  $\alpha$  [Foyer et al., 2005].

La concentrazione intracellulare di GSH è basata sull'equilibrio che si instaura tra la sua sintesi e il suo consumo. A causa della presenza del legame atipico citato precedentemente, l'unico enzima in grado di iniziare la degradazione del GSH extracellulare è la GGT. Dalla sua degradazione la cellula è in grado di recuperare gli amminoacidi che lo compongono (ciclo del  $\gamma$  glutammile).

In particolare la GGT trasferisce il gruppo glutammilico del GSH su accettori amminoacidici ( $\gamma$ -glutammil-amminoacidi) o su accettori dipeptidici ( $\gamma$ -glutammil-dipeptidi). Questi vengono trasportati all'interno della cellula, dove diventano il substrato dell'enzima  $\gamma$ -glutammil-ciclotransferasi, che li divide nei diversi amminoacidi e in 5-oxoprolina. Quest'ultima può essere convertita in glutammato che viene riusato per la sintesi del GSH intracellulare. Oltre ad amminoacidi e 5-oxoprolina, dalla reazione catalizzata dalla GGT, si libera un dipeptide, la cisteinilglicina (CysGly), che viene idrolizzata, dalle dipeptidasi di membrana, a cisteina e glicina, che possono essere trasportate all'interno delle cellule ed riusate per la sintesi di GSH [Tate et al., 1981; Griffith et al., 1979; Lieberman et al., 1995].

Il ciclo del  $\gamma$ -glutammile, pertanto, può essere visto come un continuo riciclo del glutatione attraverso la membrana plasmatica, in base al gradiente di concentrazione, nell'ordine dei millimolari all'interno della cellula e dei micromolari all'esterno [Sze et al., 1993; Cole et al., 2006].

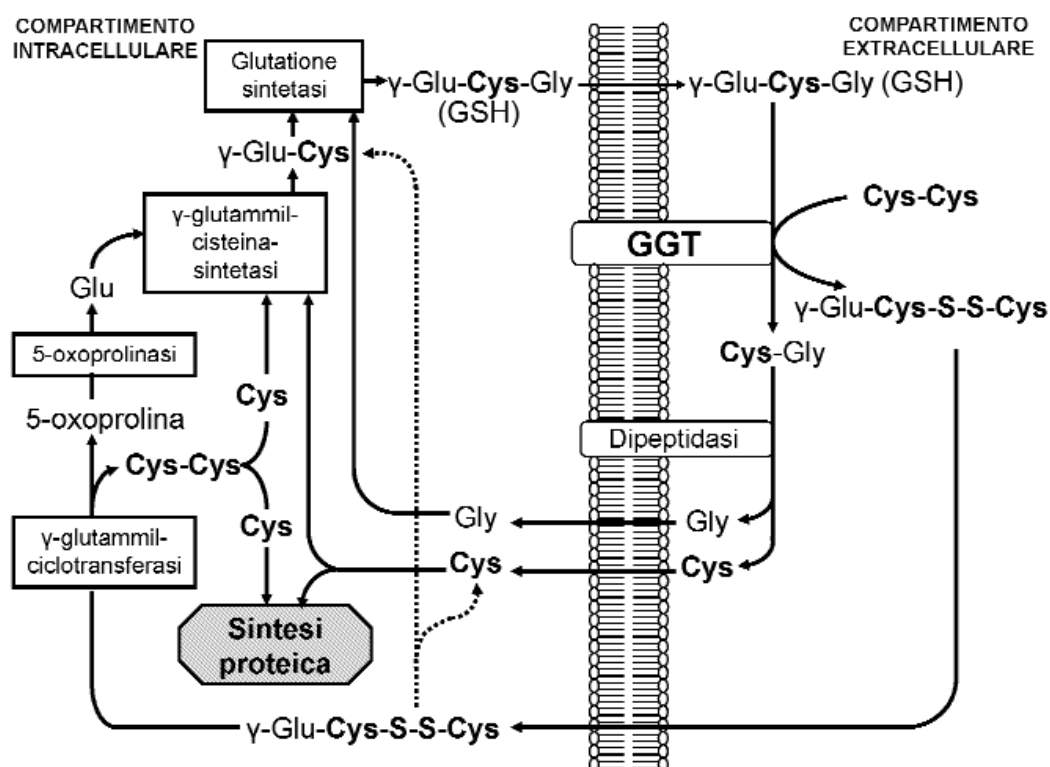
Collegata a tutto ciò, un'altra importante funzione del GSH è quella di trasportatore della Cys, estremamente instabile nell'ambiente extracellulare, poiché, ossidandosi a cistina (Cis), promuove la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [Lu et al., 1999]. La GGT degrada il GSH a CysGly, in questo modo promuove il recupero di cistina; inoltre quest'ultima è l'accettore più efficiente della reazione di transpeptidazione, quindi il complesso  $\gamma$ -glutamilstina è importante per il recupero di Cys [Lu et al., 1999; Zhang et al., 2005].

Tutto questo è stato dimostrato tramite esperimenti con topi "knock out" per l'espressione della GGT. Infatti in questi studi si afferma che topi omozigoti soffrono di glutationuria, ovvero diminuita concentrazione di GSH cellulare e Cys plasmatica, ritardi della crescita, infertilità, cataratta e aumento di mutazioni geniche; questa condizione può essere normalizzata attraverso la somministrazione di N-acetilcisteina come fonte di Cys [Lieberman et al., 1996; Harding et al., 1997; Rojas et al., 2000].

Le dipeptidasi di membrana che agiscono insieme alla GGT sono in particolare "l'amminopeptidasi-N" (ApN, CD13) e la "membrane-bond-dipeptidase" (MBD).

La prima è specifica per la forma ridotta di CysGly ( $K_m = 2,5$  mM), mentre la seconda per la forma ossidata cistinil-bis-glicina ( $K_m = 0,6$  mM) [Kozak et al., 1982]. Avendo il tiolo della CysGly un'elevata reattività, è probabile che questa si ossidi rapidamente nell'ambiente extracellulare, quindi la MBD potrebbe ricoprire un ruolo importante nel metabolismo del GSH.

Anche in questo caso, studi sulla coespressione della MBD e della GGT sono stati eseguiti nel topo: alti livelli di attività di entrambi gli enzimi sono stati trovati solo nell'epitelio del tubulo renale e dell'intestino tenue, dove è probabile che la GGT e la MBD siano entrambe coinvolte nel metabolismo del GSH extracellulare, mentre negli altri tessuti potrebbero agire in modo indipendente l'uno dall'altro in altri processi metabolici [Habib et al., 1996].



**Figura 1.4:** Degradazione extracellulare e risintesi intracellulare di glutatione (GSH) ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly, ciclo del  $\gamma$ -glutammina). La GGT promuove anche il recupero di Cys extracellulare degradando il GSH a CysGly ed impiegando come accettore della reazione di transpeptidazione la L-Cis.

#### 1.1.4.2 Ruolo pro ossidante: produzione di ROS nell'ambiente extracellulare

Il ruolo dell'attività enzimatica della GGT è controverso, in quanto permette certamente un'adeguata utilizzazione degli amminoacidi che costituiscono il GSH, però in presenza di metalli di transizione come il ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e il rame ( $\text{Cu}^{2+}$ ) causa la formazione di ROS nell'ambiente extracellulare. Quindi in base alla disponibilità di questi ioni metallici cambia l'equilibrio tra la funzione antiossidante e la funzione pro ossidante.

Per quanto riguarda quest'ultima, l'elevata reattività del gruppo tiolico (-SH) della CysGly, che è sottoforma di anione tiolato ( $\text{S}^-$ ) a pH fisiologico, causa la riduzione del  $\text{Fe}^{3+}$  in  $\text{Fe}^{2+}$ , liberando il radicale tiile ( $\text{S}\bullet$ ) della CysGly. A sua volta, il  $\text{Fe}^{2+}$  riduce l'ossigeno molecolare in ione superossido ( $\text{O}_2^- \bullet$ ) che successivamente viene convertito, dall'enzima superossidodismutasi, in perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). L'anione superossido e il perossido di idrogeno possono produrre radicali ossidrilici, in presenza di  $\text{Fe}^{3+}$  libero (reazione di Fenton) o chelato dall'ADP (reazione di Haber Weiss), dando il via alle reazioni a catena della perossidazione lipidica [Zalit et al., 1997].

Il GSH è un riducente del complesso ADP- $\text{Fe}^{3+}$ , ma le proprietà chelanti proprie del gruppo  $\alpha$ -carbossilico dell'acido glutammico impediscono l'interazione tra il gruppo tiolico della Cys e il  $\text{Fe}^{3+}$  [Paolicchi et al., 1999]. Inoltre la GGT rimuove il glutammato, causando un abbassamento del pKa del gruppo tiolico che di conseguenza, a pH fisiologico, si trova prevalentemente come anione tiolato [Stark et al., 1989]. In questo modo, nell'ambiente extracellulare, l'azione enzimatica della GGT promuove eventi ossidativi basati sull'interazione tra il  $\text{Fe}^{3+}$  e il residuo di Cys nel GSH che si ripercuotono però su tutte le cellule lì presenti.

Le reazioni pro ossidanti della GGT si possono verificare anche in presenza di sorgenti fisiologiche di ferro, come la transferrina e la ferritina; inoltre il potere riducente della CysGly può sostenere la produzione continua di ROS, in quanto promuove il rilascio di ioni  $\text{Fe}^{3+}$  attivi dalle proteine di accumulo [Stark et al., 1993; Drozd et al., 1998; Corti et al., 2004].

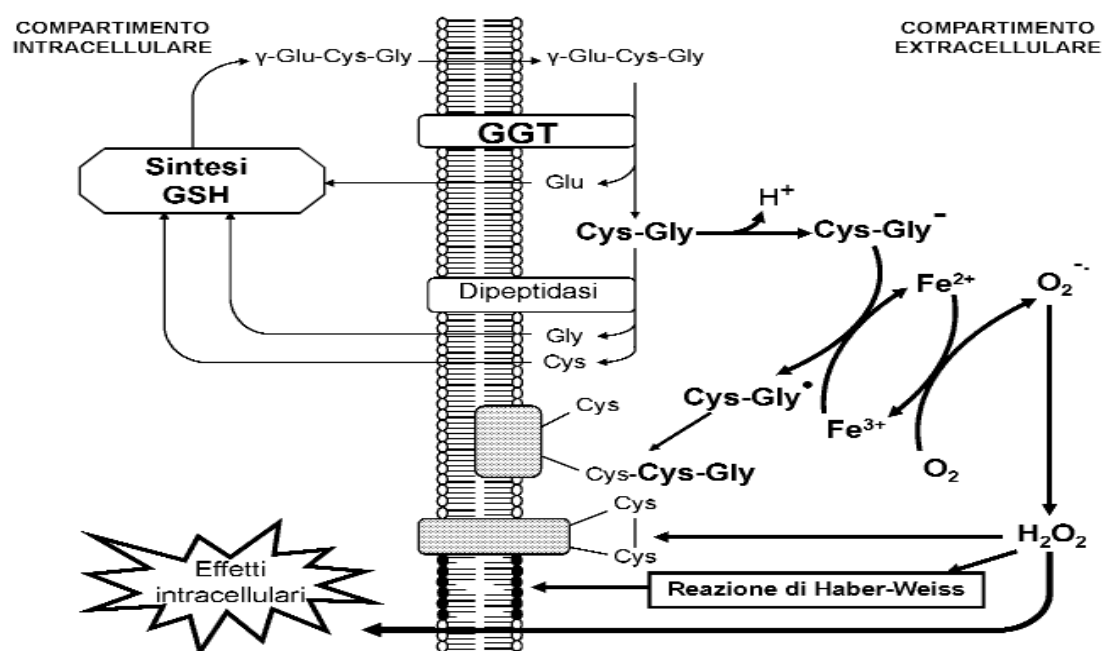
Invece l'azione pro ossidante del  $\text{Cu}^{2+}$  è dovuta alla sua capacità di mediare il trasferimento degli elettroni dal gruppo tiolico al  $\text{Fe}^{3+}$  [Glass et al., 1997].

Un'eccessiva produzione di ROS da parte del catabolismo del GSH può causare mutazioni genetiche [Stark et al., 1987; Stark et al., 1988] o innescare il processo di perossidazione lipidica, a carico ad esempio dell'acido linoleico [Stark et al., 1993] o delle lipoproteine LDL [Paolicchi et al., 1999].



Invece i ROS, a basse concentrazioni, possono agire da secondi messaggeri e modulare molti aspetti del metabolismo cellulare [Genestra et al., 2007], ad esempio è stato dimostrato che l'ossidazione dei tioli esposti sulla superficie della membrana cellulare, a causa dell'azione del perossido di idrogeno oppure in seguito alla formazione di ponti disolfuro con il radicale tiile della CysGly [Corti et al., 2005], rappresenta uno stimolo pro apoptotico per la linea cellulare di cancro dell'ovaio A2780, ma antiapoptotico per la linea cellulare di linfoma istiocitario U937 [Dominici et al., 2003].

Altre azioni dei ROS sono la promozione del legame tra il DNA e i fattori di trascrizione "nuclear factor kappa B" (NF- $\kappa$ B) e tra il DNA e "l'activator protein 1" (AP1) [Dominici et al., 2003], l'attivazione delle tirosinfosfatasi e l'inibizione delle serin/treoninfosfatasi [Dominici et al., 2003; Pieri et al., 2003]; infine modulano lo stato di ossidoriduzione dei domini ricchi in cisteina del recettore 1 per il fattore di necrosi tumorale ("tumor necrosis factor receptor 1") [Dominici et al., 2004].



**Figura 1.5:** Attività pro-ossidante della GGT in presenza di  $Fe^{3+}$  nell'ambiente extracellulare. I principali bersagli del radicale tiile della CysGly e delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte sono sia molecole della superficie cellulare (fenomeni di ossidazione e tiolazione delle proteine, perossidazione dei lipidi di membrana), sia proteine intracellulari sensibili allo stato redox della cellula (ad es., nuclearfactor-kappa B, activatorprotein 1) [Franzini et al. 2009].

#### *1.1.4.3 Formazione di acidi mercapturici*

L'enzima GGT è in grado di condurre alla sintesi di acidi mercapturici, a partire da coniugati del GSH, in quanto è un componente di questa via metabolica. In questo modo, la GGT interviene nei processi di detossificazione. Il meccanismo d'azione comporta, come prima tappa, la coniugazione degli xenobiotici elettrofili con il gruppo sulfidrilico del GSH, grazie all'enzima citosolico glutatione-S-transferasi. Dopo essere escreti dalla cellula nell'ambiente extracellulare, i coniugati glutationici perdono l'acido glutammico per azione della GGT ed entrano nella via metabolica per la sintesi di acidi mercapturici. Quest'ultimi vengono escreti dal sistema tubulare del rene e dal sistema duttale del fegato e si ritrovano, come tali, rispettivamente nell'urina e nella bile durante i normali processi digestivi [Hinchman et al., 1998; Kearns et al., 1998].

#### *1.1.4.4 Metabolismo dei leucotrieni*

I leucotrieni (LTs) sono dei mediatori lipidici che contribuiscono ai processi infiammatori e/o ai meccanismi dell'immunità e derivano dall'acido arachidonico, convertito in acido 5-idrossiperossieicosatreinoico (5-HPETE) dall'enzima 5-lipossigenasi (5-LO).

A questa classe di molecole appartengono: LTA<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>.

LTA<sub>4</sub> deriva direttamente da 5-HPETE ed è il precursore sia di LTB<sub>4</sub>, sia di LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>, quest'ultimi tre chiamati anche leucotrieni cisteinici, per la presenza dell'amminoacido cisteina nella loro struttura oppure "sostanze di risposta lenta all'anafilassi". LTC<sub>4</sub> deriva dal LTA<sub>4</sub> in seguito alla reazione con una molecola di GSH, e successivamente viene convertito in LTD<sub>4</sub> grazie all'azione della GGT. Invece LTE<sub>4</sub> viene prodotto dalla successiva idrolisi del residuo di glicina [Lewis et al., 1990].

La funzione principale dei cisteinil-LTs è quella di indurre una prolungata broncocostrizione, andandosi a legare a specifici recettori sulle cellule muscolari lisce [Anderson et al., 1982; Bernstrom et al., 1982], ma possono mediare anche un'azione di tipo vasocostrittoria sulle arterie coronarie, svolgendo un ruolo attivo nella patogenesi e nelle manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi. Infatti in alcuni studi è emerso che le lesioni aterosclerotiche sono associate ad una maggiore espressione dei recettori per i cisteinil-LTs. È stato dimostrato, in studi su modelli animali di ischemia, che inibitori dell'enzima 5-LO e antagonisti dei recettori per i cisteinil-LTs hanno un'azione riducente sull'estensione dell'infarto e sull'aritmia causata dalla riperfusione [Allen et al., 1998].

Nel 2004 Mayatapek e collaboratori hanno analizzato il metabolismo dei cisteinil-LTs in tre pazienti con deficit di GGT. Da questo studio è emerso che il profilo di LTs nelle urine e nel plasma di questi soggetti era anormale, in particolare si evidenziava un aumento delle concentrazioni di LTC<sub>4</sub> e l'assenza di LTD<sub>4</sub> e di LTE<sub>4</sub>, mentre la sintesi di LTB<sub>4</sub> non mostrava cambiamenti. Queste diverse concentrazioni di LTs potrebbero quindi essere la causa di tutti o alcuni dei sintomi osservati in questi pazienti, in particolare quelli di carattere neurologico.

La carenza di GGT può essere considerata come un errore congenito della sintesi dei cisteinil-LTs. Tuttavia non è ancora chiaro se i tre cisteinil-LTs condividano la stessa attività biologica. In particolare il deficit di sintesi di LTC<sub>4</sub> è legato ad una sindrome dello sviluppo fetale, che comporta grave ipotonia muscolare, ritardo psicomotorio e della crescita e microcefalia [Mayatapek et al., 1998].

#### *1.1.4.5 Metabolismo del nitrosoglutatione*

NO interviene in molte funzioni biologiche, tra le più importanti ricordiamo l'azione vasodilatatrice nella regolazione del tono vascolare, l'inibizione dell'aggregazione piastrinica, l'attività come neurotrasmettitore e, in quanto radicale, può agire sia da pro ossidante (azione citotossica) sia da antiossidante.

Avendo un'emivita di pochi millisecondi, NO agisce in prossimità del sito di produzione della molecola stessa, ma possiede anche la capacità di reagire sia con gruppi tiolici di proteine, come l'albumina e l'emoglobina, sia con tioli a basso peso molecolare, come GSH, CysGly, Cys e omocisteina. In questo modo vengono prodotti i nitrosotioli (RSNO) che costituiscono una forma di stabilizzazione e di trasporto del NO [Giustarini et al., 2003].

In particolare, il nitrosoglutatione (GSNO) possiede attività farmacologiche simili a quelle del NO libero [Zeng et al., 2001; Rassaf et al., 2002]. Inoltre il nitrosoglutatione è un substrato dell'enzima GGT, in quanto in vitro, in presenza di glicilglicina (GlyGly) come accettore della reazione di transpeptidazione, la GGT catalizza la conversione del GSNO in nitroso-cisteinil-glicina (CG-SNO), che a sua volta, in presenza di ioni metallici di transizione, si dissocia spontaneamente in CysGly e NO [Hogg et al., 1997]. Quindi la GGT potrebbe consentire l'utilizzo del NO, favorendo la dissociazione del GSNO. Poiché la GGT è espressa nelle cellule endoteliali, un probabile bersaglio potrebbero essere proprio i vasi sanguigni.

#### 1.1.4.6 La proteina GGT e il rimodellamento osseo

Studi recenti hanno dimostrato che la GGT può svolgere funzioni biologiche, in modo indipendente dalla sua attività enzimatica [Niida et al., 2004]. Come modello di studio sono state utilizzate colture cellulari di midollo osseo di topo ed è stato dimostrato che la presenza della GGT nel mezzo di coltura favorisce la formazione di osteoclasti e incrementa l'espressione del ligando per il recettore che attiva il fattore di trascrizione NF-Kb (RANKL, "receptor activator NF-Kb ligand") negli osteoblasti che si trovano nella porzione stromale. Il legame tra RANKL, esposto sugli osteoblasti, e RANK, esposto sulla membrana dei precursori degli osteoclasti, attiva il differenziamento di quest'ultimi. Per dimostrare che questi processi sono indipendenti dall'attività catalitica della GGT, è stato aggiunto l'acivicina, un inibitore non competitivo dell'enzima e sono stati ottenuti risultati analoghi [Niida et al., 2004]. Ulteriori esperimenti atti a verificare il ruolo della GGT nel riassorbimento osseo sono stati eseguiti in vivo in topi transgenici, nei quali l'enzima è stato sovraespresso oppure facendo esprimere una proteina mutata, non nella sua struttura, ma priva di attività enzimatica. Tramite l'analisi strutturale e istologica della tibia si è dimostrato che nei topi transgenici è presente un minore volume osseo, una riduzione del numero e dello spessore delle trabecole, un maggior numero di osteoclasti e un minor numero di osteoblasti (osteopenia) [Hiramatsu et al., 2007].

Nel 2006 Asaba e collaboratori hanno dimostrato che l'escrezione urinaria di GGT varia in modo lineare insieme a specifici marcatori biochimici del riassorbimento osseo (come deossipiridinolina e collagene di tipo I N-telopeptide), sia in modelli animali che in soggetti umani.

Il ruolo simil-citochina della GGT è supportato dalle proprietà strutturali della proteina. Infatti è stato ipotizzato che esistano due ponti disolfuro nella GGT di mammifero, il primo tra Cys 50 e 74, il secondo tra Cys 192 e Cys 196; in particolare quest'ultime due cisteine sono organizzate secondo il motivo CX3C, nel quale due residui di cisteina legati da ponte disolfuro sono separati da tre amminoacidi [Kinlough et al., 2005] e al quale sono stati associati diversi significati biologici: in primo luogo, si tratta di un motivo che caratterizza una classe di chemochine, alla quale appartiene, ad oggi, un solo elemento la fractalchina o neuroactina [Bazan et al., 1997; Stievano et al., 2004]; in secondo luogo, in molte proteine di lievito il motivo CXC3 è un sito di coordinazione per il Cu(I) e nella GGT sembra essere espresso sulla superficie della proteina [Kinlough et al., 2005]; infine è importante per il funzionamento della proteina A2.5L

del virus Vaccinia, una tiolo ossidoreduttasi che regola la formazione di disolfuri in proteine di membrana virale [Senkevich et al., 2002].

È interessante notare che il ponte disolfuro Cys-50-Cys-74 è inaccessibile al solvente poiché è situato 10 Å sotto la superficie della subunità pesante, mentre il ponte disolfuro Cys-192-Cys-196 risulta in parte esposto sulla superficie molecolare (West et al., 2013).

### *1.1.5 Effetti della mancanza di GGT*

La mancanza dell'enzima GGT è molto rara, infatti è stata documentata la presenza di solo cinque pazienti [O'Daley et al., 1968; Goodman et al., 1971; Wright et al., 1980; Hammond et al., 1995]. Tuttavia è una mutazione recessiva compatibile con la vita.

La deficienza di GGT è associata in genere a problemi neurologici, anche se in un caso non sono presenti [Hammond et al., 1995]. Nei topi omozigoti, invece, l'assenza di GGT provoca ritardi nella crescita e morte prematura. Non si sa ancora il motivo per cui le conseguenze negli essere umani siano più lievi rispetto ai topi [Lieberman et al. 1996; Harding et al., 1997].

Le urine di questi pazienti contengono elevate quantità di peptidi GSH-coniugati [Hammond et al., 1999], il che dimostra ulteriormente il ruolo che riveste la GGT nel riassorbimento del GSH e dei suoi amminoacidi dal filtrato glomerulare. Tuttavia il riassorbimento tubulare di amminoacidi è stato trovato essere normale in due soggetti [Wright et al., 1980], ciò va contro l'ipotesi che la GGT abbia un'azione generale nel trasporto di amminoacidi alla membrana cellulare attraverso il ciclo del  $\gamma$ -glutammile.

Successivamente è stato scoperto che tre pazienti, a cui manca l'enzima GGT, non riescono a sintetizzare il leucotriene D<sub>4</sub>; è stato possibile affermare ciò grazie a misurazioni dei livelli di leucotrieni nei monociti, nel plasma e nelle urine di questi soggetti [Mayatepek et al., 2004].

## 1.2 La GGT nel sangue: caratteristiche analitiche e strutturali

### 1.2.1 Variabili pre analitiche

L'attività dell'enzima GGT può essere valutata sia nel plasma (si utilizza un anticoagulante, in particolare la litio eparina) sia nel siero, anche se il campione migliore per l'esecuzione del procedimento è quest'ultimo. Nell'analisi comparativa del siero e del plasma è stato evidenziato un rapporto medio plasma/siero vicino a 0,9 e una distribuzione dei valori di tale rapporto non simmetrica [Dominici et al., 2004]. Tuttavia, nella pratica, l'attività della GGT viene valutata nel plasma con litio eparina, mentre è sconsigliato l'utilizzo di altri anticoagulanti come citrato e EDTA.

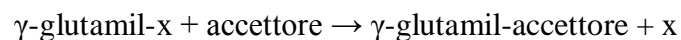
Nel plasma e nel siero l'enzima è stabile per circa sette giorni se il campione viene conservato ad una temperatura di 4°-8°, mentre può essere conservato per più anni se viene mantenuto ad una temperatura intorno ai -20°, invece a temperatura ambiente si osservano abbassamenti significativi nel giro di un solo giorno e l'enzima risulta poco stabile [Heins et al., 1995].

La concentrazione di attività catalitica della GGT nel sangue può essere modificata da numerose variabili pre-analitiche di tipo biologico: età, sesso, etnia, ma anche gravidanza, fumo di tabacco e uso di contraccettivi orali [Whitfield, 2001].

### 1.2.2 Metodologia di misura

Per la misurazione della GGT esiste un solo tipo di dosaggio, usato universalmente in ciascun laboratorio, a differenza degli altri enzimi misurati a scopo medico nel sangue.

In generale, la reazione catalizzata dalla GGT è la seguente:



Differenti substrati sintetici sono stati utilizzati come donatore di  $\gamma$ -glutammile, come la  $\gamma$ -glutamil-p-nitroanilide che agisce da substrato cromogenico, favorendo una misurazione spettrofotometrica diretta, in continuo, dell'andamento della reazione [Panteghini et al., 2006]. Tuttavia nel dosaggio automatizzato viene preferenzialmente utilizzata una sua forma carbossilata, L- $\gamma$ -glutamil-3-carbossi-4-nitroanilide, che ha il vantaggio di essere più solubile, consentendo di lavorare a concentrazioni prossime alla saturazione.

Invece tra i diversi amminoacidi e peptidi, la GlyGly è utilizzata come accettore di  $\gamma$ -glutammile, in quanto possiede un ottimo potere tamponante ai valori di pH ottimale per l'attività dell'enzima.

Tuttavia, nonostante sin da subito, si abbia avuto un'uniformità di metodologia analitica tra i differenti laboratori, nella realtà esperimenti internazionali recenti hanno evidenziato come la situazione non sia ancora pienamente soddisfacente, in quanto i limiti di deviazione tollerabile, calcolati in base alla variabilità biologica dell'enzima, sono ancora violati con una certa frequenza [Jansen et al., 2006].

La Federazione Internazionale di Chimica Clinica (IFCC) già nel 1983 era intervenuta per proporre un "metodo IFCC" per la misura della attività catalitica della GGT nel siero [Shaw et al., 1983], ma successivamente nel 2002 la IFCC ha ridefinito i procedimenti primari di riferimento per la misurazione dei più importanti enzimi del siero a 37°, inclusa la GGT [Schumann et al., 2002].

È possibile applicare il metodo ai diversi modelli di analizzatore automatico, senza variarne sostanzialmente le caratteristiche, tra cui la temperatura di incubazione.

Le caratteristiche principali del metodo IFCC sono riassunte nella seguente tabella.

**Tabella 1.1** Concentrazioni dei componenti la miscela di reazione completa e condizioni analitiche per la misurazione della concentrazione di attività catalitica della GGT con il procedimento primario di riferimento IFCC. [Schumann et al., 2002]

Concentrazioni dei componenti*	Condizioni per la misurazione
GlyGly: 150 mmol/L	Temperatura $37,0 \pm 0,1$ °C
pH: $7,70 \pm 0,05$	Lunghezza d'onda $410 \pm 1$ nm
L- $\gamma$ -glutammil-3-carbossi-4-nitroanilide: 6 mmol/L	Cammino ottico: $10,00 \pm 0,01$ nm
Frazione di volume del campione: 0,0909 (1/11)	Tempo di incubazione: 180 s
	Tempo di ritardo: 60 s
	Intervallo di misurazione: 180 s
	No. Letture: $\geq 6$

\* Nella miscela di reazione completa

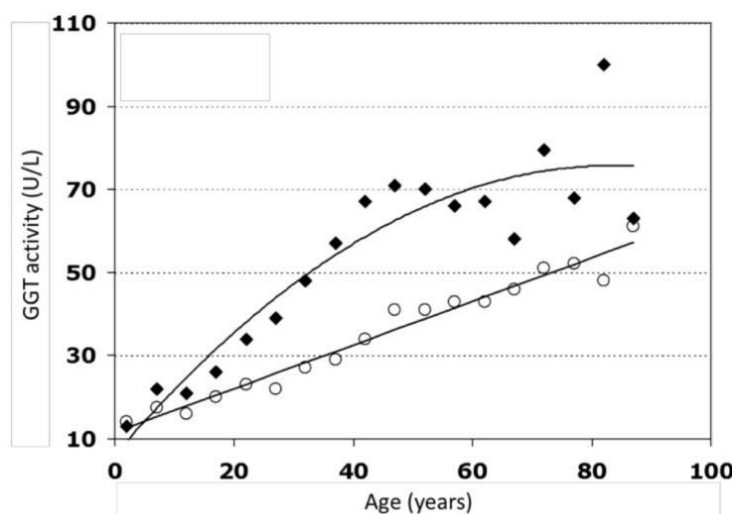
### 1.2.3 Valori di riferimento della GGT sierica

I valori della GGT del siero dipendono, come citato in precedenza, da diverse variabili biologiche, come il genere e l'età dell'individuo, per cui i valori di riferimento sono diversi per i due generi e vengono divisi per fasce d'età, anche se quest'ultima regola è meno rispettata della prima.

Ovviamente i valori di riferimento sono confrontabili tra loro solo per osservazioni in pazienti effettuate con lo stesso metodo, ciò sottolinea maggiormente l'importanza della standardizzazione metodologica.

I valori di riferimento sono normalmente presentati sotto forma di un intervallo di riferimento, delimitato da un limite inferiore di riferimento (LIR) e da un limite superiore di riferimento (LSR), anche se per molti enzimi del siero il LIR ha poco significato e ci si limita solamente a definire il LSR.

Grazie all'analisi retrospettiva di un grande database (n = 61.246) è stato ottenuto l'intervallo dei valori di riferimento di numerosi analiti plasmatici. In riferimento all'enzima GGT, nel 2005 Grossi e collaboratori hanno stimato i seguenti valori: 1-45 U/L per gli uomini e 1-34 U/L per le donne. Inoltre dal database è stata ricavata la variazione del limite superiore di riferimento (URL) per la GGT in base ai gruppi di età (da 2 a 87 anni di età, classi di ampiezza di 5 anni) e il genere, come si può vedere nella figura sottostante, dove assumono una configurazione simile a quella riportata da Whitfield.



**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 nelle donne (cerchi bianchi). Le curve di interpolazione hanno le seguenti equazioni: uomini  $y = -0.01x^2 + 1.6712x + 6.149$ ;  $r^2 = 0.8533$  donne  $y = 0.5248x + 11.564$ ;  $r^2 = 0.9646$*

Dal punto di vista pratico, le variazioni del LSR della GGT non sono facilmente gestibili in funzione dell'età. In particolare si dovrebbero individuare metodi di partizione basati sull'individuazione statistica di sottopopolazioni gaussiane all'interno della popolazione globale perché la divisione di tutto l'intervallo dei valori di età in



classi di ampiezza uniforme non rappresenta l'approccio migliore [Gellerstedt et al., 2006; Gellerstedt et al., 2007]. Alternativamente si può considerare l'età come una variabile continua e calcolare l'equazione della curva di regressione che si adatta ai punti sperimentali (LSR/età) nel modo migliore possibile, così da ricavare l'URL di ogni età. In genere regressioni polinomiali di secondo o terzo ordine consentono un adattamento soddisfacente, anche se per l'utilizzo di questo modello è necessaria una elevata numerosità campionaria.

#### *1.2.4 Frazioni GGT plasmatica: origine e variabilità biologica*

Le conoscenze sull'origine tissutale della GGT sierica e sui meccanismi di secrezione e di rimozione dal circolo sono ancora poche, nonostante l'utilizzo clinico e diagnostico sempre maggiore. La GGT sierica sembra essere di origine epatica, in quanto la GGT circolante e quella di origine epatica hanno le stesse caratteristiche chimico-fisiche, come stesso peso molecolare, tipo di glicosilazione e contenuto di acido sialico e stesse caratteristiche cinetiche [Shaw et al., 1980; Huseby et al., 1981]. Le proprietà della GGT sierica sembrano invece differire da quelle dell'enzima purificato dal rene, dal pancreas e dalle urine [Shaw et al., 1978; Shaw et al., 1980; Huseby et al., 1981].

La GGT plasmatica si può suddividere in due componenti, una idrofoba e una idrofila, che mostrano caratteristiche diverse per quanto riguarda carica, dimensione e densità. Infatti la frazione idrofobica è costituita da complessi molecolari, ancora non completamente determinati nella loro struttura, mentre la frazione idrofila è la componente solubile dell'enzima, mancante del peptide N-terminale lipofilo [Huseby, 1978; Huseby, 1982; Selvaraj et al., 1984].

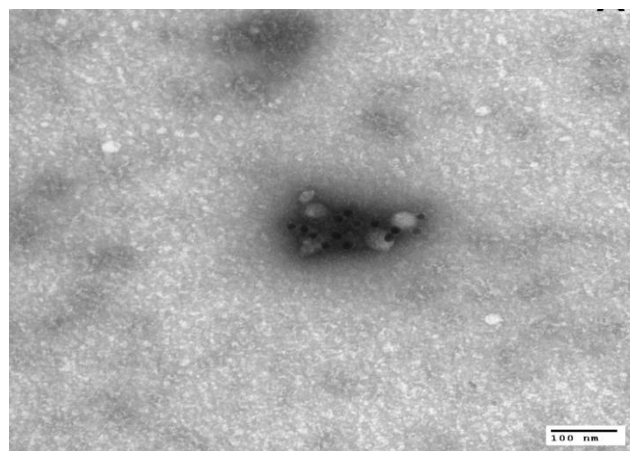
Inizialmente si pensava che la porzione idrofobica della GGT fosse costituita da un insieme di complessi molecolari formati da GGT trasportata dalle lipoproteine VLDL, LDL, HDL e chilomicroni e che l'associazione dell'enzima con le lipoproteine avvenisse tramite il dominio lipofilo, situato all'estremità N-terminale della catena pesante della GGT, importante per l'inserzione dell'enzima nella membrana plasmatica.

La relazione tra GGT e lipoproteine era stata studiata nel siero di pazienti con patologie epatobiliari, nei quali il 60-80% dell'attività totale dell'enzima era idrofoba [Huseby et al., 1982; Watanabe et al., 1984; Wenham et al., 1984].

Tuttavia nel 2012 Franzini e collaboratori hanno dimostrato che nessuna delle tre frazioni di GGT (b-GGT, m-GGT e s-GGT) può essere completamente identificata con le corrispondenti classi di lipoproteine mostranti lo stesso peso molecolare e di

conseguenza quest'ultime non possono essere trasportatrici di GGT. Infatti da questo studio, tramite ultracentrifugazione differenziale è stato rilevato che la frazione b-GGT eluisce maggiormente con le HDL e in misura minore con le VLDL, mentre le frazioni m-GGT e s-GGT sono osservate rispettivamente nei campioni LDL e HDL; invece la frazione f-GGT non è associata a nessuna lipoproteina, essendo stata ritrovata nei campioni di plasma privi di queste molecole. Quindi tutte le frazioni di GGT mostrano caratteristiche diverse rispetto alle lipoproteine e possono essere separate fisicamente da esse. Inoltre questo studio dimostra che era errato pensare che la GGT fosse troppo lipofila per circolare liberamente nel plasma, infatti la frazione f-GGT plasmatica ha peso molecolare corrispondente alla proteina GGT libera, dimostrando che quella parte di GGT plasmatica non necessita di nessun trasportatore per circolare nel sangue.

Tramite la tecnica immunogold è stato dimostrato che la frazione b-GGT plasmatica è legata a membrane di microvescicole, come microparticelle ed esosomi, essendo la dimensione e la densità della b-GGT (30-80 nm; 1.06-1.21 g/ml) compatibile con la dimensione e la densità delle microvescicole (40-100 nm; 1.15-1.27 g/ml). Un ruolo fondamentale nella esocitosi/endocitosi e nella biogenesi di queste microvescicole è rivestito dai microdomini ricchi di colesterolo delle membrane plasmatiche, chiamati raft lipidici [Cocucci et al., 2009]; inoltre le microvescicole secrete possiedono un elevato contenuto di colesterolo [Hanzal-Bayer et al., 2007]. La membrana plasmatica della GGT è stata localizzata proprio all'interno dei raft lipidici, dove è associata con la tetraspanina CD81 [Nichols et al., 1998], un marcatore ritrovato normalmente anche negli esosomi e nelle microparticelle [Simpson et al., 2009].



**Figura 1.7:** *GGT localizzata negli esosomi nel plasma tramite microscopio elettronico a trasmissione [Franzini et al., 2014]*

La biogenesi delle altre frazioni di GGT (m-GGT, s-GGT, f-GGT) sembra più complicata da determinare. L'idea è quella che derivino da progressive modificazioni della frazione b-GGT. Infatti è stato dimostrato che la b-GGT è sensibile alla proteasi papaina, solo dopo un pre-trattamento con acido deossicolico (DOC), ciò suggerisce un ruolo protettivo del doppio strato di fosfolipidi della b-GGT sul sito di clivaggio della papaina. La papaina è una cisteina proteasi in grado di promuovere il rilascio della forma solubile di GGT dalle membrane, DOC invece è un detergente anionico presente fisiologicamente nella bile. Inoltre DOC è in grado di convertire la frazione b-GGT in micelle con dimensioni della s-GGT, ciò potrebbe significare che quest'ultima frazione è costituita da micelle di acidi biliari e che questa conversione potrebbe avvenire nel compartimento extracellulare, dopo la secrezione di b-GGT. La m-GGT sembra essere sensibile alla papaina, ma insensibile al DOC, così questa proprietà insieme alle caratteristiche fisiche (dimensione, densità) suggerisce che la m-GGT potrebbe essere formata da micelle di acidi biliari con dimensioni maggiori rispetto alla s-GGT. Infine la f-GGT, che corrisponde alla forma libera e solubile dell'enzima, avendo perso la parte N-terminale di ancoraggio, presente invece nelle altre frazioni, potrebbe originare direttamente sia dalla m-GGT che dalla s-GGT, come conseguenza di un taglio proteolitico [Franzini et al., 2014].

In seguito alla scoperta che le frazioni m-GGT e s-GGT sono costituite da micelle di acidi biliari e GGT, sempre nel 2012 Fornaciari e collaboratori hanno analizzato il profilo di eluizione delle frazioni di GGT in campioni di bile umana in modo da poterla confrontare con le frazioni plasmatiche e valutare il contributo del fegato all'enzima plasmatico.

Da questo studio è emerso, contrariamente a quanto ci si aspettasse, che nella bile sono presenti solo due forme che sono corrispondenti alle frazioni plasmatiche b-GGT e f-GGT. Una possibile spiegazione potrebbe essere il fatto che nella bile epatica la concentrazione di acidi biliari è 10 volte inferiore rispetto alla quantità di DOC utilizzata, in questo caso, per osservare la conversione della b-GGT plasmatica in s-GGT. Di conseguenza, potrebbe essere utile analizzare il profilo di eluizione dell'attività di GGT nella bile colecistica, i cui soluti hanno una concentrazione 5-10 volte superiore rispetto alla bile epatica.

Per quanto riguarda le frazioni biliari, sono caratterizzate da una maggiore eterogeneità rispetto alle frazioni plasmatiche.

Come nel plasma, la frazione f-GGT biliare rappresenta la proteina solubile, mentre per quanto riguarda la frazione b-GGT, è stato osservato che può essere distinta in due diversi complessi molecolari: il primo con le caratteristiche di dimensione e proprietà simile agli esosomi, il secondo con una dimensione sempre simile agli esosomi, ma con una struttura diversa, tale da rendere accessibile alla papaina il sito di taglio presente nella GGT.

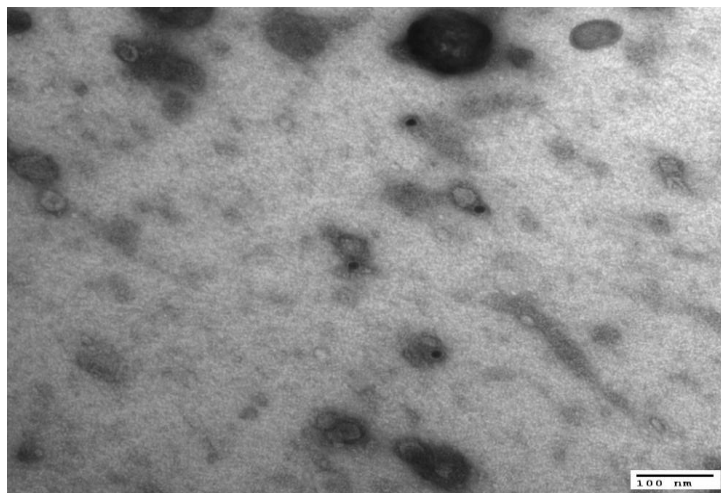
Una probabile spiegazione è che la porzione della b-GGT biliare sensibile alla papaina sia costituita da micelle di acidi biliari. Infatti circa l'80% dell'attività di GGT biliare può essere recuperata nella frazione avente una densità di 1.123 g/ml, il più ricco contenuto di proteine (55% del totale) e acidi biliari (35%), ma il più basso contenuto di fosfolipidi (17%) e inosservabili livelli di colesterolo [Accatino et al., 1995]. La composizione sembra quindi suggerire che la porzione papaina-sensibile della b-GGT biliare potrebbe essere composta da micelle di acidi biliari.

Un'altra caratteristica della GGT biliare è che in seguito al trattamento con papaina, sia in presenza che in assenza di DOC, l'attività totale di GGT recuperata nella frazione f-GGT presenta un picco maggiore di quanto ci si aspettasse, inoltre questo fenomeno non è stato osservato nel plasma. Probabilmente il contesto molecolare in cui è inserita la GGT biliare potrebbe alterare non solo la sua sensibilità alle proteasi, ma anche la cinetica dell'attività dell'enzima, ad esempio influenzando l'accessibilità del substrato al sito attivo dell'enzima. Quindi la proteina in f-GGT sembrerebbe avere una cinetica enzimatica più veloce.

Studi recenti hanno dimostrato che sia gli epatociti che i colangiociti possono rilasciare esosomi nella bile [Masyuk et al., 2010]; inoltre è stato osservato che gli esosomi rilasciati dagli epatociti interagiscono con le ciglia primarie dei colangiociti, regolandone i meccanismi intracellulari e la proliferazione [Masyuk et al., 2010]. Nel 2014 Fornaciari e collaboratori hanno analizzato i campioni di bile, mostrando tramite cromatografia gel filtrazione, tecniche immunoenzimatiche e microscopio a trasmissione elettronica, che tutta la b-GGT si trova nel pellet contenente esosomi, mentre la frazione f-GGT rimane nel soprannatante. In vitro tutte le linee cellulari che esprimono GGT sulla membrana rilasciano nel mezzo di coltura attività enzimatica sotto forma di b-GGT [Franzini et al., 2009], perciò in vivo tutti i tessuti che esprimono GGT sulla membrana potrebbero contribuire alla frazione b-GGT.

Sfruttando la caratteristica che le microvescicole di membrana sono associate a proteine specifiche del tessuto di origine, l'identificazione di marcatori specifici delle cellule di

origine nella frazione b-GGT permetterebbe di capire i tipi cellulari contribuenti alla GGT plasmatica nelle varie condizioni patologiche associate ad un suo aumento.



**Figura 1.8:** *GGT localizzata negli esosomi nella bile tramite microscopio elettronico a trasmissione [Franzini et al., 2014]*

### *1.2.5 Separazione e quantificazione delle forme molecolari della GGT*

Per separare e quantificare le diverse forme molecolari della GGT sono stati utilizzati diversi metodi via via sempre più specifici. Inizialmente è stata utilizzata prevalentemente l'elettroforesi su acetato di cellulosa [Sacchetti et al., 1988], poi anche su agarosio [Bellini et al., 1997], e poliacrilammide [Yao et al., 1998].

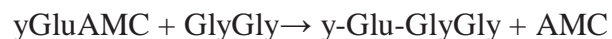
In ambito clinico il metodo più utilizzato per lo studio della frazioni circolanti dell'enzima è proprio l'elettroforesi in acetato di cellulosa, con cui è possibile rilevare sei frazioni di GGT. Le frazioni alfa1-GGT e alfa2-GGT sono sempre presenti, le frazioni dep-GGT, gamma-GGT, beta-GGT sono state rilevate prevalentemente in epatopatie di origine colestatica, mentre la frazione alb-GGT è presente in pazienti con tumore epatico e cirrosi [Sacchetti et al., 1988].

In particolare la frazione alb-GGT in associazione con un aumento dell'alfa-fetoproteina ( $> 20$  ug/L) permette di discriminare, con una sensibilità di 84% e una specificità di 61%, pazienti affetti da tumore epatico rispetto a quelli con cirrosi [Pompili et al., 2003].

Nel 2008 Franzini e collaboratori hanno proposto un nuovo metodo per la separazione e determinazione delle forme molecolari di GGT. In particolare è stato utilizzato un

sistema FPLC (“fast protein liquid chromatography”; AKTA purifier UPC 10, GE Healthcare Europa) con una colonna per cromatografia ad esclusione molecolare (Superose 6HR 10/300 GL, GE Healthcare). Questa tecnica permette di separare le molecole sulla base della loro dimensione e forma, sfruttando la proprietà di setaccio molecolare di una varietà di materiali porosi, caratterizzati da una rete tridimensionale di pori che gli conferisce le proprietà di un gel; quindi una colonna di particelle di gel o di granelli di vetro poroso è in equilibrio con una fase mobile adatta per le molecole che devono essere separate. Le componenti plasmatiche sono quindi separate in base al loro peso molecolare in un intervallo compreso tra 5000 e 5 kDa.

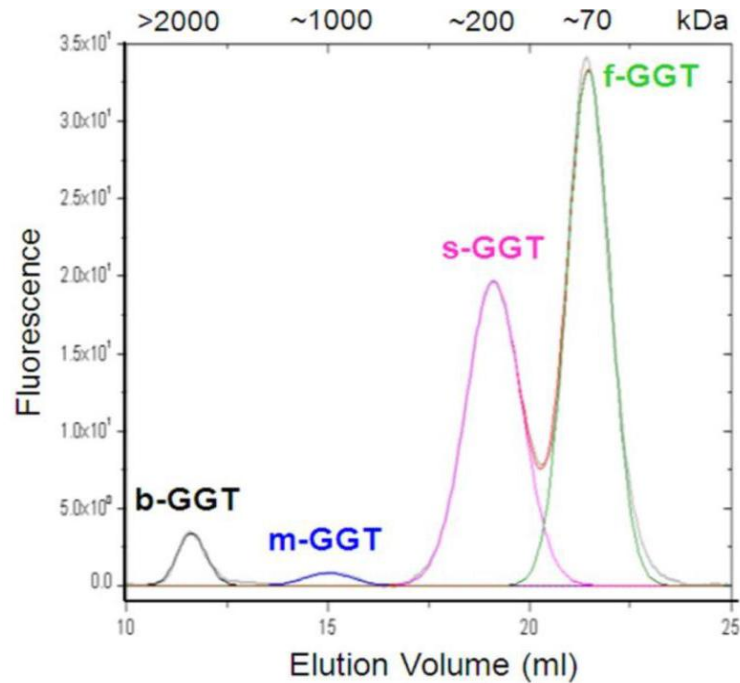
Per riuscire a determinare in continuo l'attività di GGT, viene aggiunta continuamente all'eluato una soluzione contenente  $\gamma$ -glutammina-7-amido-4-metilcumarina ( $\gamma$ GluAMC), un substrato fluorescente specifico per la GGT. Tutto ciò avviene grazie alla presenza di una connessione a T, posta all'uscita della colonna. La miscelazione dell'eluato uscente dalla colonna con il substrato della GGT avviene in una spira avente volume di 2,6 mL (corrispondente ad una incubazione di circa 4 minuti) posta in bagno termostatico a 37°. L'accettore della reazione di transpeptidazione è incluso nella fase mobile, quindi la presenza dell'enzima GGT è visualizzata tramite la liberazione del composto fluorescente amminometilcumarina (AMC), in base alla reazione:



Il prodotto AMC viene rilevato grazie un fluorimetro che opera 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 pari a 0,5 U/L, mentre il tempo necessario per la valutazione dell'attività dell'enzima in un singolo campione è di circa 50 minuti.

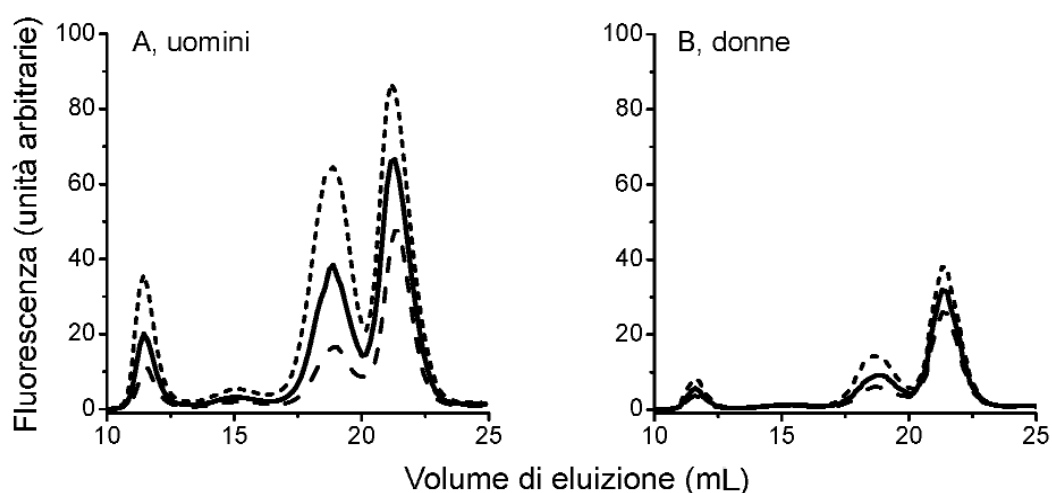
L'area sottesa ai picchi è proporzionale all'attività delle frazioni di GGT e l'area totale sottesa al cromatogramma, con volume di eluizione tra 10 e 25 ml, è proporzionale all'attività della GGT totale. L'attività totale della GGT plasmatica, espressa in U/L, è calcolata sulla base di una curva di calibrazione ottenuta analizzando campioni di plasma con attività nota della GGT totale. L'area totale e delle frazioni della GGT viene calcolata con l'ausilio di un programma informatico (MATLAB Version 7 MathWorks, Inc.) per risolvere la sovrapposizione dei picchi. 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 Gaussiane modificate

esponenzialmente (EMG); per ciascun picco sono stati fissati i limiti superiori e inferiori per l'ampiezza, la larghezza, la posizione e l'asimmetria della curva.



**Figura 1.9:** Cromatogramma del profilo di eluizione delle quattro frazioni di GGT in soggetti sani. Le quattro gaussiane, evidenziate con colori differenti, corrispondono alle diverse frazioni di GGT [Franzini, 2008].

Inoltre analizzando l'andamento dell'attività delle quattro frazioni in funzione dell'attività totale di GGT, si nota che in entrambi i generi la frazione f-GGT è quella più presente alle basse concentrazioni di GGT totale ( $< 20$  U/L), mentre l'aumento di questa dipende dalle frazioni s-GGT e b-GGT. Un'altra caratteristica della f-GGT, rispetto alle frazioni con alto peso molecolare, è che la sua forma di distribuzione di frequenza nella popolazione è gaussiana, mentre per le altre tre, così come per la GGT totale, è simmetrica a destra [Franzini et al., 2008].



**Figura 1.10:** Elaborazione dei profili di eluizione delle frazioni plasmatiche di GGT ottenuti con metodo cromatografico in una popolazione di riferimento. A) uomini ( $n = 100$ ), B) donne ( $n = 100$ ). I cromatogrammi rappresentano l'andamento del 25° (linea tratteggiata), 50° (linea continua) e 75° (linea punteggiata) percentile del segnale fluorescente registrato ad ogni volume di eluizione. [Franzini, 2008]

**Tabella 1.2:** Attività della GGT totale e delle sue frazioni in una popolazione sana di 200 soggetti [Franzini et al., 2008]

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

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



### 1.3 Attività della GGT sierica e fegato

A partire dagli anni '60 l'attività dell'enzima GGT è stata studiata ed utilizzata come test per valutare la funzionalità epatica o come saggio per l'attività enzimatica nel fegato. Nel 1961 Szczeklik e collaboratori hanno rilevato i valori medi di GGT in diverse patologie epatiche e mostrato diversi casi in cui sono avvenuti cambiamenti nell'attività di GGT sierica nel tempo, a differenza di altri enzimi. Si tratta di un test molto sensibile, essendo la GGT elevata nella maggior parte dei pazienti con disfunzioni epatiche indipendentemente dalle cause, sebbene i valori maggiori siano stati riscontrati in pazienti con colestasi. Tuttavia il test risulta poco specifico, a causa della varietà delle malattie epatiche e di altre condizioni che possono essere presenti (pancreatite, diabete, obesità, eccessivo consumo di alcool, uso di droghe) che possono innalzare i livelli di GGT.

#### *1.3.1 Relazione tra espressione di GGT epatica e attività di GGT plasmatica*

Il modo in cui le patologie epatiche causano un incremento della GGT plasmatica non è ancora stato ben compreso. I primi esperimenti sono stati condotti principalmente su ratti, che mostrano sia valori dell'attività della GGT plasmatica ed epatica di circa 20 volte più bassi rispetto agli umani [Teschke et al., 1983] sia hanno una diversa organizzazione ed espressione genica [Chikhi et al., 1999].

La relazione tra GGT plasmatica ed epatica è stata studiata da diversi autori. Nel 1980 Satoh e collaboratori hanno sviluppato un metodo sensibile per valutare l'attività enzimatica in campioni prelevati con agobiopsia. In particolare in 57 pazienti, affetti da diverse disfunzioni epatiche, hanno mostrato possibili valori elevati di GGT plasmatica o epatica, o di entrambe o di nessuna. I valori più elevati di GGT plasmatica ed epatica sono stati ritrovati nei pazienti con epatiti causate da abuso di alcool e droghe, rispetto ai pazienti con epatiti virali. Inoltre i primi mostrano un incremento di GGT plasmatica al di sopra della norma di circa sei volte, mentre l'incremento di GGT epatica è di circa tre volte.

Nel 1982 Selinger e collaboratori hanno condotto un ulteriore studio su pazienti con diverse patologie epatiche. Essi hanno mostrato che solo il gruppo con malattie del fegato dovuto ad abuso di alcool ha un incremento significativo di GGT epatica sopra alla norma, ma tutti i pazienti, indipendentemente dalle cause, mostrano un incremento dei livelli plasmatici. In particolare nei primi, la GGT epatica approssimativamente

raddoppia, mentre la GGT plasmatica aumenta di circa sette volte. Invece nei singoli pazienti, la correlazione tra l'attività della GGT plasmatica ed epatica non è significativa.

**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 su tessuti omogenati. \*(U/g proteina) \*\*(U/L)

Da questi studi si possono trarre due conclusioni. In primo luogo, la GGT epatica aumenta in diverse malattie del fegato e l'incremento di GGT non è semplicemente dovuta al rilascio dell'enzima da parte delle cellule danneggiate. Tuttavia la sequenza degli eventi, a partire dall'origine dello stimolo fino all'aumento dell'espressione genica o al diminuito esaurimento della proteina, non è ancora stato completamente esplorato. È evidente che la GGT sierica aumenta maggiormente rispetto alla GGT epatica, ciò potrebbe essere dovuto al fatto che l'enzima espresso sulla superficie della cellula viene rilasciato in circolo più rapidamente del solito, in seguito all'azione degli acidi biliari presenti sulla membrana cellulare. In secondo luogo, l'induzione della GGT appare in qualche misura specifica per le patologie causate dall'abuso di alcool, sebbene non può essere esclusa la possibilità che i livelli vicini alla normalità nel tessuto epatico in altri tipi di malattia, siano una conseguenza di una più rapida perdita di GGT, sintetizzata nuovamente, dalla superficie delle cellule e rilasciata in circolo [Selinger et al., 1982].

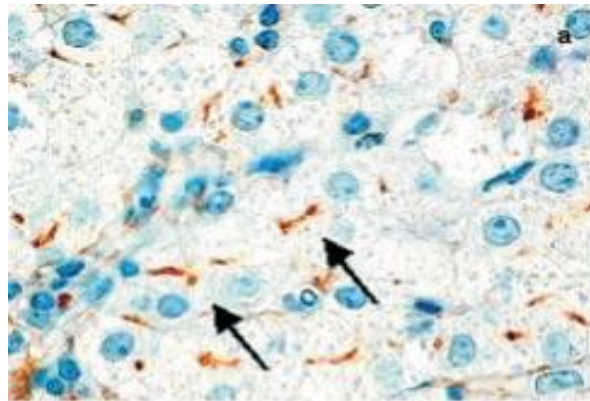
La localizzazione istopatologica della GGT in pazienti affetti da epatite cronica C (CHC) è stata studiata nel 2005 da Paolicchi e collaboratori. In tutte le biopsie la GGT è stata rilevata nei canalicoli biliari, in corrispondenza del polo sinusoidale degli epatociti e delle cellule endoteliali nelle vene centrolobulari. Il citoplasma degli epatociti è risultato negativo per la GGT nei pazienti con bassa attività enzimatica, 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).

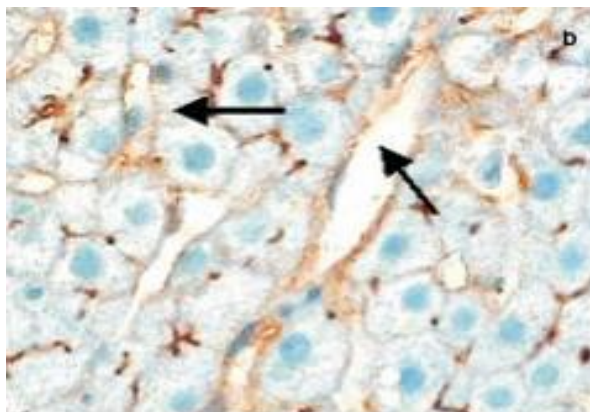
Lo smascheramento con l'antigene permette di identificare la proteina GGT anche nelle cellule infiammatorie sparse nel parenchima renale.

Così epatociti, cellule biliari e infiammatorie possono contribuire all'aumento di GGT epatica durante CHC, mentre l'aumento della GGT plasmatica sembra dipendere dall'attivata espressione di proteine all'interno degli epatociti.

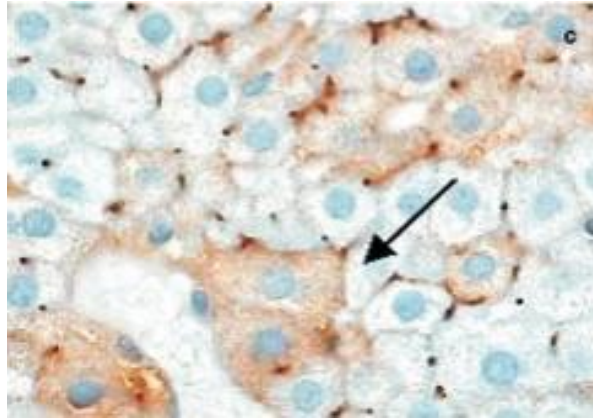
Tuttavia i meccanismi di secrezione dell'attività della GGT epatica e biliare non sono ancora del tutto conosciuti [Paolicchi et al., 2005].



**Figura 1.11:** Immunolocalizzazione della GGT in corrispondenza del polo sinusoidale degli epatociti (freccia a sinistra) e sulla superficie della vena centrolobulare (freccia a destra) [Paolicchi, 2005]



**Figura 1.12:** Immunolocalizzazione della GGT nel citoplasma degli epatociti. [Paolicchi, 2005]



**Figura 1.13:** Immunolocalizzazione della GGT sulla superficie luminare del capillare biliare. [Paolicchi, 2005]

### 1.3.2 Induzione della GGT epatica

L'ipotesi che la GGT potesse essere un marker precoce di trasformazione neoplastica è stata formulata sulla base dei primi studi che mostrano la comparsa di foci GGT-positivi in animali da laboratorio esposti a sostanze chimiche cancerogene [Whitfield 2001; Pompella et al., 2006], tuttavia i motivi che causano questa maggiore espressione di GGT sono ancora sconosciuti.

Da diversi studi è emerso che la GGT è up-regolata in diversi tipi cellulari in seguito ad esposizione acuta a stress ossidativo [Kugelman et al., 1994; Knickelbein et al., 1996; Liu et al., 1998; Borud et al., 2000; Mikkelesen et al., 2002] e al coinvolgimento dell'attivatore del fattore di trascrizione della proteina-1-like (AP-1) [Daubeuf et al., 2004]; inoltre sono stati presi in considerazione pathways che coinvolgono l'EpRE/Nrf2 (electrophile response element/nuclear factor erythroid 2-related factor 2) tramite l'attivazione della chinasi regolata da segnali extracellulari (ERK) e della p38 proteina chinasi attivata da mitogeni (MAPK) [Zhang et al., 2006].

Nel 2006 Roomi e collaboratori hanno avanzato l'ipotesi del coinvolgimento di una via di trasduzione Ras-dipendente, ed effettivamente un collegamento tra espressione di GGT e l'attivazione dei pathways Ras-MAPK è stato dimostrato in cellule tumorali sottoposte ad irradiazione con raggi gamma [Pankiv et al., 2006] o a stress ossidativo [Pandur et al., 2007].

L'aumento di GGT nei tumori potrebbe essere dovuta al fatto che i ROS sono coinvolti sia nel processo di cancerogenesi sia nella regolazione redox di molti geni che modulano l'espressione della GGT.

L'induzione della trascrizione dell'mRNA della GGT può essere modulata anche dalle citochine, compreso il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ) [Daubeuf et al., 2001] e l'interferone (IFN) alfa e beta [Bouman et al., 2002], in pratica è stato dimostrato che il TNF- $\alpha$  è in grado di indurre l'espressione della GGT tramite un processo di segnalazione che dipende dal fattore nucleare kB (NF-kB), dal fattore di trascrizione Sp1 (specifity protein 1) e il reclutamento dell'RNA polimerasi II al promotore della GGT [Reuter et al., 2009]. Quindi questi risultati sembrano trovare un legame tra infiammazione e GGT, sia come stress ossidativo legato all'infiammazione stessa, sia come effetto di specifiche citochine infiammatorie. Di conseguenza, l'aumento dell'espressione della GGT potrebbe avere un duplice significato biologico: potrebbe essere sia un meccanismo di difesa contro lo stress ossidativo sia un meccanismo di regolazione, probabilmente attraverso il metabolismo dei leucotrieni GGT-mediato e GSNO.

## 1.4 GGT sierica: associazioni epidemiologiche e cliniche

### 1.4.1 GGT e steatosi epatica non alcolica

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) sta emergendo come una delle principali cause di malattia epatica nei paesi Occidentali, infatti circa il 25% della popolazione ne risulta affetta e include un vasto spettro di patologie, dalla semplice steatosi alla steatoepatite non alcolica [Bedogni et al., 2005; Lazo et al., 2008].

NAFLD potrebbe evolvere in fibrosi, cirrosi, epatocarcinoma [Bedogni et al., 2005], ed è ora considerata come la manifestazione epatica della sindrome metabolica, associata ad insulino-resistenza, diabete di tipo due (T2D), dislipidemia [De Alwis et al., 2008] e aumentato rischio di eventi cardiovascolari [Lee et al., 2007].

La mancanza di specifici marcatori rappresenta un ulteriore ostacolo per la diagnosi e la prevenzione di NAFLD, infatti sebbene essa sia associata ad un aumento dell'aspartato aminotransferasi (AST), dell'alanina aminotransferasi (ALT) e dei trigliceridi, nessuno di questi mostra una elevata specificità per la patologia in esame [Loria et al., 2010; Fierbinteanu-Braticevici et al., 2010].

L'attività della GGT sierica rappresenta un marcatore sensibile, ma non malattia-specifico, infatti il suo valore aumenta in presenza di comuni condizioni che causano disfunzioni epatiche [Whitfield, 2001], come la steatosi [Fraser et al., 2007; Haring et al., 2009] ed epatiti virali [Itoh et al., 1986]. Inoltre il valore di GGT è stato già incluso in un algoritmo diagnostico (FLI, FattyLiver Index) per verificare la presenza di steatosi, ed è emerso che la sua specificità è alta se considerato insieme ad altri marcatori, ma bassa se considerato da solo [Bedogni et al., 2006].

La stretta associazione tra NAFLD e la ridotta sensibilità all'insulina (misurata mediante “clamp” euglicemico-iperinsulinemico) è stata verificata in uno studio condotto su 30 pazienti aventi NAFLD accertata tramite biopsia epatica. In questi soggetti è stata osservata una ridotta influenza dell'insulina sul metabolismo glucidico e lipidico indipendentemente dal peso e dagli indici di tolleranza al glucosio [Marchesini et al., 2001].

In un ulteriore studio, condotto su 1095 soggetti adulti, è emerso che la GGT sierica correla positivamente con il contenuto lipidico intraepatico (determinato tramite spettroscopia di risonanza magnetica) oltre che con la resistenza all'insulina [Thamer et al., 2005]. Quindi è evidente che l'alterazione dell'attività sierica di GGT può rappresentare un precoce marcatore di resistenza epatica all'insulina conseguente a NAFLD.

Più recentemente nel 2012 Franzini e collaboratori hanno dimostrato che, in particolare, è la frazione b-GGT ad aumentare nei pazienti affetti da NAFLD, mentre ad esempio in soggetti con CHC la b-GGT non mostra significativi cambiamenti, a differenza della s-GGT che è caratterizzata da un notevole incremento. Quindi il rapporto b-GGT/s-GGT potrebbe rivestire un ruolo diagnostico importante per discriminare i casi di CHC da quelli con NAFLD.

**Tabella 1.4** Attività totale e delle frazioni di GGT (U/L) in plasma di pazienti con steatosi epatica non alcolica (NAFLD), epatite C virale cronica (CHC) e soggetti sani (HS) [Franzini, 2012]

	NAFLD (n= 90)	CHC (n=45)	HS (n=70)	P NAFLD vs CHC	P NAFLD vs HS	P CHC vs HS
Total GGT*	39,4 (20,0-82,0)	41,5 (21,9-84,5)	18,4 (13,2-24,9)	n.s.	<0,001	<0,001
b-GGT*	5,1 (2,5-14,9)	2,1 (1,2-5,3)	1,7 (0,2-2,4)	<0,001	<0,001	n.s.
m-GGT*	1,7 (0,6-3,7)	1,2 (0,4-3,7)	0,6 (0,4-0,9)	n.s.	<0,001	<0,05
s-GGT*	14,9 (5,9-43,5)	22,9 (10,0-59,6)	4,7 (2,9-8,9)	n.s.	<0,001	<0,001
f-GGT*	14,2 (10,3-18,6)	13,8 (9,3-16,9)	9,9 (8,4-12,2)	n.s.	<0,001	<0,01
b/s ratio*	0,37 (0,24-0,51)	0,10 (0,07-0,15)	0,32 (0,22-0,48)	<0,001	n.s.	<0,001

I dati totali e delle frazioni di GGT sono presentati come mediana (25°-75° percentile)

\*One way ANOVA seguito dal test di Tukey per confronti multipli su dati in valori logaritmici  
n.s. non significativo

#### 1.4.2 GGT e disturbi metabolici: sindrome metabolica

La Sindrome metabolica (MS) è una situazione clinica caratterizzata dalla presenza di numerosi fattori di rischio e sintomi che si manifestano contemporaneamente nell'individuo [Grundy et al., 2007]. L'esatto meccanismo di comparsa della sindrome metabolica non è ancora del tutto chiaro, ma l'insulino-resistenza e l'obesità addominale sono tra le principali cause di malattia. Infatti per la diagnosi di sindrome metabolica è necessaria la presenza di almeno tre dei seguenti fattori [Alberti et al., 2009]:

- obesità addominale, (definita per la popolazione Caucasica in base ai seguenti valori: circonferenza vita per gli uomini  $\geq 94$  cm, per le donne  $\geq 80$  cm) ;
- trigliceridi elevati: ( $\geq 150$  mg/dl);
- ridotto colesterolo HDL: ( $< 40$  mg/dL negli uomini,  $< 50$  mg/dL nelle donne);
- ipertensione: sistolica  $\geq 130$  mmHg e/o diastolica  $\geq 85$  mmHg;
- elevata glicemia a digiuno ( $\geq 100$  mg/dl.)

Da numerosi studi è emerso che esiste un'associazione positiva ed indipendente con i valori sierici di GGT, quindi quest'ultima può essere considerata un fattore predittivo

indipendente di insorgenza di sindrome metabolica [Rantala et al., 2000; Nakanishi et al., 2003; Lee et al., 2007].

#### *1.4.2.1 GGT e obesità*

La correlazione positiva tra GGT e obesità, quantificata mediante BMI è stata valutata anche in pazienti non diabetici. In particolare il BMI, insieme alla concentrazione plasmatica dei trigliceridi, è la variabile biologica che mostra il grado di correlazione maggiore con l'attività sierica di GGT. Andando più nel dettaglio, un valore elevato di GGT è associato a una distribuzione della massa grassa di tipo centrale; infatti correla, in modo indipendente dal BMI, con il rapporto di circonferenza vita, con la sola circonferenza vita, con il contenuto di grasso viscerale nell'area addominale, ma non con l'adiposità subcutanea [Iwasaki et al., 2008].

#### *1.4.2.2 GGT e pressione arteriosa*

Le concentrazioni sieriche della GGT mostrano un'associazione positiva con la pressione arteriosa sistolica e diastolica. Da molti studi è emerso che questa correlazione è indipendente dal consumo di alcool, dall'età, dal BMI e dall'attività fisica, mentre risulta condizionata dalla distribuzione dell'adiposità.

Infatti da alcuni studi si evince che:

- l'inclusione nell'analisi multivariata del rapporto tra le circonferenze di vita e fianchi o la concentrazione plasmatica di trigliceridi e colesterolo attenua il grado di correlazione tra le due variabili [van Barneveld et al., 1989; Wannamethee et al., 1995; Pintus et al., 1996];
- è stata documentata un'interazione tra GGT e BMI in relazione all'incidenza di ipertensione [Lee et al., 2003];
- la GGT sierica è significativamente associata con l'incidenza di ipertensione solo nei soggetti con aumentati indici di obesità addominale (BMI > 26 kg/m<sup>2</sup>, circonferenza vita > 86 cm, altezza addominale > 19 cm) [Stranges et al., 2005].

#### *1.4.2.3 GGT e dislipidemia*

In tutti gli studi epidemiologici e di popolazione è risultato evidente che l'attività della GGT si associa a profilo lipidico sfavorevole caratterizzato da elevate concentrazioni plasmatiche di trigliceridi, di colesterolo totale LDL, mentre i dati sulla correlazione con la colesterolemia HDL sono contrastanti, positiva in alcuni e negativi in altri [Brenner et



al., 1997; Ruttman et al., 2005; Meisinger et al., 2006; Nilsenn et al., 1990; Pintus et al., 1996; Poikolainen et al., 1997; Whitfield et al., 2002].

#### *1.4.3 GGT e disturbi metabolici: insulino-resistenza e diabete di tipo 2*

Già dopo pochi anni l'utilizzo dei valori dell'attività di GGT come parametri di valutazione di danno epatico, è emerso che nei soggetti con alterati livelli di glicemia e insulina o con T2D, la GGT è tendenzialmente più elevata rispetto ad un gruppo di controllo [Umeki et al., 1989; Perry et al., 1996].

In particolare, in uno studio prospettico della durata di tredici anni, condotto su 7458 uomini adulti non diabetici, è stato rilevato che la GGT, per valori di concentrazioni all'interno dell'intervallo fisiologico, predice l'insorgenza di T2D, indipendentemente dal consumo di alcool e dal BMI [Perry et al., 1998].

Il valore predittivo della GGT sierica rispetto allo sviluppo di insulino-resistenza e di T2D è stato confermato in ripetuti studi analoghi condotti su popolazioni diverse [Lee et al., 2003; Rantala et al., 2000; Fraser et al., 2007; Nakanishi et al., 2003; Nakanishi et al., 2004; Lee et al., 2003; Marchesini et al., 2001; Meisinger et al., 2005].

L'insorgenza di diabete, secondo alcuni studi epidemiologici, può essere predetta dalla correlazione tra i livelli di GGT e il BMI [Lee et al., 2003; Lee et al., 2004; Targher et al., 2007]. Infatti il rischio di ammalarsi di diabete aumenta progressivamente con i valori di GGT e questa associazione diventa più forte all'aumentare del BMI; invece quest'ultimo è associato all'insorgenza di diabete solo per valori di GGT oltre la mediana (22 U/L) della distribuzione [Lim et al., 2007].

Nel 2014 Hong e collaboratori hanno mostrato una correlazione tra la GGT sierica e il BMI, in relazione al rischio di alterata glicemia a digiuno (IFG) sia negli uomini che nelle donne.

Le associazioni tra BMI e IFG sono diverse a seconda dei livelli sierici di GGT all'interno del normale range fisiologico. Infatti tra i soggetti appartenenti al terzile più basso della GGT sierica, il BMI non ha mostrato significative associazioni con il rischio di IFG, mentre per i soggetti appartenenti al terzile più alto di GGT, il rischio di IFG è 3-4 volte più alto tra le persone con  $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$  rispetto a coloro che hanno  $BMI \leq 23 \text{ kg/m}^2$ .

Le interazioni tra la GGT sierica e l'obesità in relazione al rischio di insorgenza di IFG suggeriscono un importante meccanismo patofisiologico del T2D.

In particolare, la non significativa associazione tra l'obesità e IFG nelle persone con i livelli fisiologici minori di GGT sierica, fa ipotizzare che l'obesità potrebbe essere un debole fattore di rischio per lo sviluppo di IFG e T2D e che certi livelli di GGT sierica, all'interno del normale range, potrebbero essere un prerequisito per l'obesità di essere strettamente correlata a IFG e T2D, quindi la funzione fisiologica della GGT potrebbe essere sfruttata per interpretare questi risultati.

Almeno tre meccanismi possono essere considerati per spiegare questo fenomeno:

- la GGT, essendo un marcatore di steatosi epatica non alcolica, è strettamente legata all'obesità e al deposito di grasso addominale [Marchesini et al., 2001];
- la GGT è un marcatore di stress ossidativo [Lee et al., 2004];
- la GGT è un marcatore di esposizione a basse dosi di varie sostanze chimiche e miscele [Lee et al., 2009].

Tuttavia, la possibilità che la GGT sierica possa mostrare tali correlazioni con l'obesità, essendo un indice di steatosi epatica non alcolica, potrebbe essere escluso perchè le ALT, un ulteriore marcatore sensibile di NAFLD, non mostra associazioni con l'obesità [Lim et al., 2007].

Sia studi sperimentali che test clinici evidenziano che lo stress ossidativo gioca un ruolo importante nella patogenesi del T2D e delle sue complicazioni [Ceriello et al., 2004].

Inoltre l'aumentato stress ossidativo che si osserva nell'obesità è un importante meccanismo associato all'insorgenza della sindrome metabolica [Furukawa et al., 2004]. Pertanto, se la GGT sierica all'interno dell'intervallo di valori fisiologici, è un marcatore di stress ossidativo, la correlazione tra i livelli dell'enzima e l'obesità potrebbe essere biologicamente plausibile perchè le persone obese con elevata GGT sierica possono essere considerate come quelle ad alto rischio di patologie obesità-associata a causa dello stress ossidativo [Hong et al., 2014].

Un altro potenziale meccanismo è che la GGT sierica potrebbe essere un marcatore di esposizione a basse dosi di sostanze e miscele chimiche perchè la GGT cellulare è un enzima necessario per metabolizzare i GSH-coniugati di alcune sostanze chimiche ambientali [Lee et al., 2009].

È interessante notare che ci sono correlazioni tra i persistenti inquinanti organici (POP), miscele chimiche lipofile, immagazzinate nel tessuto adiposo e continuamente rilasciate in circolo, e l'obesità in relazione al rischio di T2D [Airaksinen et al., 2011; Gasull et al., 2012; Lee et al., 2006], parallelamente ai dati trovati per GGT sierica e obesità;

inoltre la relazione tra obesità e T2D diventa più forte in base all'aumento delle concentrazioni sieriche dei POP.

Indipendentemente dai meccanismi coinvolti nell'interazione tra la GGT sierica e l'obesità, questa scoperta ha un'importante implicazione clinica. Infatti le persone con simili gradi di obesità possono avere un rischio diverso di insorgenza di T2D [Sims et al., 2001]. Per esempio circa il 75-80% di soggetti obesi non sviluppano mai T2D, anche se l'80% dei pazienti con T2D sono obesi [Gregg et al., 2004]. L'insulina-resistenza, uno stato prediabetico, varia di sei volte tra le persone obese [McLaughlin et al., 2007]. Quindi le informazioni sulla GGT sierica possono essere utili per prevedere quali persone obese hanno un elevato rischio di sviluppare T2D.

## **1.5 Valutazione del metabolismo glucidico**

Per quanto riguarda i parametri del metabolismo glucidico si ricorda che l'ADA (American Diabetes Association) ha stabilito il valore di 126 mg/dl per la concentrazione plasmatica di glucosio a digiuno come soglia limite oltre alla quale si può fare diagnosi di diabete, mentre quando i valori della glicemia si attestano tra i 100 e 126 mg/dl si parla di alterata glicemia a digiuno.

Il valore di 126 mg/dl corrisponde alla soglia oltre alla quale il rischio di retinopatia e nefropatia aumenta drasticamente. Il gruppo di pazienti con glicemia a digiuno alterata sono considerati ad alto rischio per lo sviluppo successivo di diabete mellito e malattie cardiovascolari.

Il test di laboratorio maggiormente utilizzato per la diagnosi di diabete è la glicemia a digiuno, misurata dopo almeno 8-16 ore dall'ultimo pasto. Nelle ore che precedono il test, il paziente può bere acqua, ma dovrebbe astenersi dal fumare e assumere farmaci. Inoltre malattie acute, interventi chirurgici, ricoveri ospedalieri nelle 8 settimane precedenti, rappresentano controindicazioni relative al test, poiché possono portare a risultati falsi-positivi.

In un paziente con glucosio plasmatico a digiuno  $< 126$  mg/dl, in presenza di un quadro clinico che merita ulteriori approfondimenti, è indicato il test di tolleranza al glucosio (OGTT). Nei tre giorni che precedono il test, il paziente dovrebbe seguire una dieta regolare, con un apporto di carboidrati di almeno 100 g al giorno. Solo una malattia grave o un ricovero ospedaliero rappresentano una controindicazione per il test che viene effettuato facendo assumere al paziente, per via orale, 75 g di glucosio disciolto in 10-12 ml di acqua. Il bolo va consumato entro 5 minuti. Il protocollo del test richiede due campioni: il primo a digiuno e il secondo 2 ore dopo il bolo. Se due ore dopo l'assunzione di glucosio, la glicemia è  $\geq 200$  mg/dl si può fare la diagnosi di diabete mellito. Se, invece, la glicemia è compresa tra 140 mg/dl e 200 mg/dl si parla di ridotta tolleranza al glucosio. I pazienti che appartengono a questo gruppo, come quelli che hanno una glicemia alterata a digiuno, sono considerati a maggior rischio di sviluppare diabete mellito e malattie cardiovascolari. Per prevenire o ritardare la comparsa di diabete in questi soggetti, le misure adottate includono: perdita del 5-10% del peso corporeo, esercizio fisico e trattamento con farmaci appropriati.

Per monitorare a lungo termine lo stato glicemico del soggetto e capire se un paziente diabetico ha raggiunto un adeguato controllo metabolico viene valutata la percentuale di

emoglobina glicata (HbA1c) nel sangue, poiché il tasso di formazione di HbA1c è direttamente proporzionale alla concentrazione di glucosio nel sangue e per questo motivo è indicativa dei valori di glucosio nel corso delle ultime 8-12 settimane. HbA1c si forma perché, nel normale arco di vita di 120 giorni dei globuli rossi, la molecola di glucosio entra nel globulo rosso e si lega non enzimaticamente all'emoglobina per creare una chetoammina stabile che perdura per tutta la durata di vita del globulo rosso. Il mantenimento di un valore di HbA1c < 7% è ampiamente raccomandato.

L'insulina è un ormone prodotto delle cellule  $\beta$  delle isole di Langerhans del pancreas. I suoi effetti principali sono l'abbassamento dei livelli del glucosio plasmatico e l'azione anabolizzante (glicogeno sintesi, sintesi dei trigliceridi a partire da acidi grassi e glicerolo), quindi svolge un'azione antagonista nei confronti del glucagone e delle catecolammine, inibendo la glicogeno lisi, la lipolisi e la gluconeogenesi. Affinchè l'insulina possa svolgere le sue funzioni si deve legare al suo recettore, una proteina transmembrana  $(\alpha\beta)_2$ , presente sulle cellule di diversi tessuti in numero variabile in base alle condizioni fisiologiche e patologiche (alimentazione, digiuno, diabete, obesità).

Nelle cellule insulino-dipendenti il legame insulina-recettore agisce su un pool intracellulare di vescicole, liberando il trasportatore del glucosio che viene trasferito alla membrana cellulare per fusione. Il trasportatore trasporta il glucosio all'interno della cellula, abbassando così i livelli di glicemia e portando alla dissociazione tra l'insulina e il suo recettore.

Nelle persone sane l'insulinemia non è costante, ma varia sensibilmente in relazione allo stato nutrizionale, dopo un pasto infatti i valori insulinemici aumentano sensibilmente per poi ritornare a livello basale dopo un paio d'ore. Il picco raggiunto è tanto maggiore quanto più è abbondante la quantità di carboidrati introdotta, mentre il contenuto proteico e quello lipidico hanno minore influenza. Tuttavia anche i livelli basali plasmatici di insulina non sono perfettamente stabili, infatti è stata osservata una secrezione oscillatoria con periodi di 3-6 minuti e si ritiene che questo fenomeno sia fondamentale per mantenere costante la sensibilità delle cellule all'insulina. Quando i recettori delle cellule perdono sensibilità nei confronti dell'insulina l'organismo cerca di compensare aumentando la secrezione pancreatica dell'ormone, si parla in questo caso di insulino-resistenza. Le principali cause di insulino-resistenza sono:

- prodotto di secrezione anomalo delle cellule  $\beta$  (molecole di insulina anomale, conversione incompleta della pro insulina a insulina);
- antagonisti circolanti dell'insulina (cortisolo, glucagone, catecolammine);
- alterazioni a livello dei tessuti bersaglio (difetti dei recettori per l'ormone);
- deficit del trasportatore del glucosio, dovuto ad un suo difetto su base genetica, o a una sua difettosa traslocazione dalle vescicole di deposito alla membrana plasmatica;
- ridotta capacità dei muscoli di ossidare il glucosio dovuta a una minore efficienza dei mitocondri, soprattutto nei soggetti anziani.

La produzione di insulina ha come stimolo attivatore la glicemia, che in proporzione al proprio valore, regola la quantità di insulina secreta, che, a sua volta, va a regolare l'utilizzazione di glucosio nei vari distretti. Dopo un carico di glucosio nel soggetto normale l'insulinemia plasmatica aumenta fortemente in 1-2 minuti (prima fase), successivamente ha un brusco calo, rimanendo però ad un valore superiore al normale per circa un'ora (seconda fase) La prima fase è dovuta ad un rilascio dai granuli delle cellule  $\beta$  di insulina preformata mentre la seconda fase è dovuta alla sintesi di insulina seguita da un suo rapido rilascio [Laposata et al., 2012 ; Pontieri et al., 2005].

Il protocollo maggiormente utilizzato in clinica per la determinazione dell'insulino-resistenza periferica è il clamp euglicemico-iperinsulinemico, durante il quale si inietta al paziente una quantità di insulina tale da portare i valori ematici dell'ormone a un livello costante di 100  $\mu$ U/ml, mentre i livelli glicemici vengono mantenuti a livello basale, mediante un'iniezione di glucosio a velocità variabile. Quando viene raggiunto uno stato di equilibrio, la velocità di infusione del glucosio corrisponde alla quantità di glucosio assorbito dai tessuti, quindi si ottiene una stima della sensibilità all'insulina dei tessuti periferici. Questo test è tuttavia molto impegnativo, sia per il paziente sia per il personale sanitario che deve valutare la glicemia ogni cinque minuti e regolare di conseguenza la velocità di infusione del glucosio per mantenerne il livello basale. Per questo motivo sono stati sviluppati dei modelli matematici, come la clearance del glucosio (OGIS 120), la clearance dell'insulina e la sensibilità al glucosio delle cellule beta, valutati a partire dal test OGTT, utilizzando i valori di glucosio e di insulina a 0, 30, 60, 90, 120, 180 minuti (3-h OGTT), dopo che al paziente sono stati somministrati 75 g di glucosio in 250-300 ml di acqua in un tempo che va dai 30 secondi ai 5 minuti.

In presenza di insulino-resistenza, si osserva una diminuzione della clearance del glucosio e dell'insulina. Per quanto riguarda la sensibilità al glucosio delle cellule  $\beta$ ,

essa è stimata come il rapporto tra l'area sottesa all'incremento della concentrazione di insulina e l'area sottesa all'aumento di concentrazione di glucosio nel tempo, valutati durante il test OGTT. Una riduzione della sensibilità al glucosio è indice di una ridotta funzionalità delle cellule  $\beta$ . [Mari et al., 2001; Nannipieri et al., 2011].

## **Capitolo 2: Scopo della tesi**

Il presente studio nasce dall'osservazione che una grande percentuale di pazienti con obesità patologica, sottoposti a chirurgia bariatrica, mostrano una notevole riduzione del rischio di sviluppare patologie associate al sovrappeso e all'obesità, in particolare, in parallelo alla perdita di peso, si osserva un notevole miglioramento del metabolismo glucidico con riduzione o addirittura remissione del T2D.

Conseguentemente, l'obiettivo del presente studio è la determinazione delle frazioni plasmatiche dell'enzima gamma glutamiltransferasi in soggetti obesi e diabetici sottoposti ad interventi di riduzione dello stomaco e l'analisi delle loro variazioni in relazione al cambiamento di peso e dei parametri descrittivi del metabolismo glucidico, in modo da poter verificare se la GGT possa svolgere un ruolo di marcatore specifico della funzionalità metabolica del fegato e, in particolare, se e quali singole frazioni dell'enzima correlano con gli indici che descrivono il metabolismo glucidico e la patologia diabetica.



## Capitolo 3: Materiali e metodi

### 3.1 Scelta dei soggetti e disegno dello studio

Lo studio include 29 pazienti con T2D, messi in lista di attesa per interventi in laparoscopia di “Bypass gastrico” (RYGB) o di “Sleeve gastrectomy” (SGL). Il gruppo selezionato include 22 donne e 7 uomini con età media (dev.st) di 52 anni ( $\pm 9,55$  anni). RYGB consiste nella creazione di una piccola tasca, avente un volume di circa 30 ml, che si riversa, mediante un piccolo orifizio di dimensioni di 1 cm, in un’ansa digiunale, in modo tale che duodeno e stomaco distale non siano coinvolti. Il bypass gastrico è un intervento misto ad azione prevalentemente funzionale, poiché raggruppa le due componenti d’azione di “gastrorestrizione” e di “malassorbimento”. L’intervento determina un calo ponderale grazie alla riduzione della quantità di cibo introdotto e provoca una sensazione di sazietà nel paziente.

SGL è un intervento di tipo gastrorestrittivo nel quale si effettua una resezione verticale dello stomaco, in cui circa l’80-90% dell’organo viene asportato permanentemente dopo averlo isolato dalle connessioni vascolari con la milza. La porzione che rimane ha una forma a manica (“sleeve”) e ha la caratteristica di avere le medesime funzioni del periodo precedente all’intervento, ma con il vantaggio di un più rapido passaggio degli alimenti e svuotamento dello stomaco.

La diagnosi di diabete è stata fatta secondo i criteri della "American Diabetes Association" [2002] riportati in tabella 3.1. Come trattamento anti-diabete alcuni pazienti hanno assunto insulina, altri sulfonilurea più metformina per via orale, altri ancora hanno seguito una dieta.

I criteri di esclusione presi in considerazione sono stati:

- condizioni mediche richiedenti l'ospedalizzazione [Ferrannini et al., 1998]
- cecità [Weyer et al., 2001];
- gravi patologie (cirrosi epatica, tumori, malattie del tessuto connettivo, malattie endocrine, infarto, angina pectoris instabile) [Nannipieri et al., 2011].

Dopo lo screening, i soggetti sono stati ammessi presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana per un periodo di otto giorni, durante i quali sono stati misurati i parametri clinici. Il range dei valori di riferimento, utilizzati nel laboratorio clinico, sono riportati nella tabella 3.2.

Dopo una notte a digiuno, sono stati eseguiti prelievi per gli esami del sangue di routine, la glicemia e la concentrazione di HbA1c. In seguito è stato eseguito un test standard

OGTT, per il quale i pazienti hanno assunto 75g di glucosio sciolti in acqua. Per sette giorni tutti i pazienti, indipendentemente dal tipo di intervento, hanno seguito una dieta semiliquida ipocalorica (1200 kcal), uguale a quella che avrebbero seguito dal quinto al trentesimo giorno post operatorio. I farmaci antidiabetici sono stati assunti fino ai due giorni precedenti l'inizio della dieta.

I test clinici sono stati ripetuti a quindici, quarantacinque giorni e ad un anno dall'intervento.

---

**Tabella 3.1:** Quattro opzioni per la diagnosi di diabete mellito stabilite dall'American Diabetes Association (ADA) [2002]

---

- A) Glucosio plasmatico a digiuno > 126 mg/dl dopo un digiuno di  $\geq 8$  ore
  - B) Glicemia  $\geq 200$  mg/dl 2 ore dopo l'inizio del test di tolleranza a 75 g di glucosio orale (OGTT)
  - C) Glicemia casuale  $\geq 200$  mg/dl
  - D) HbA1c  $\geq 6,5$  %
- 

---

**Tabella 3.2:** Valori di riferimento del laboratorio clinico

---

Alanina aminotransferasi ALT (U/L)	10-40
Aspartato aminotransferasi AST (U/L)	20-48
Colesterolo totale (mg/dl)	< 200
Colesterolo LDL (mg/dl)	60-130
Colesterolo HDL (mg/dl) maschi	35-65
Colesterolo HDL (mg/dl) femmine	35-85
Emoglobina glicata (%)	4-7
Gamma glutamil transferasi (U/L)	0-30
Glucosio (mg/dl)	70-110
Insulina ( $\mu$ U/ml)	5-20
Trigliceridi (mg/dl)	10-190

---

### 3.2 Reagenti

La  $\gamma$ -glutamyl-4-nitroanilide ( $\gamma$ GluNA), la  $\gamma$ GluAMC, la GlyGly, il sodio fosfato monobasico e dibasico sono stati acquistati dalla ditta Sigma Aldrich (Italia).

La soluzione  $\gamma$ -GluAMC è preparata aggiungendo 3,6 mmol/L in 0,005 N NaOH e immediatamente diluita 20 volte usando una soluzione Tris-HCl 0,25 M, pH 8,5 (25 vC). Questo stock viene conservato a 4°.

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

### 3.3 Determinazione delle frazioni plasmatiche della GGT

Per determinare l'attività totale della GGT e delle sue frazioni è stato utilizzato un sistema FPLC (fast protein liquid chromatography, AKTA purifier, GE Healthcare) avente 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 3.1:** Sistema FPLC "Akta Purifier"

La separazione delle molecole avviene sulla base della loro forma e dimensione molecolare e sfrutta la proprietà di setaccio molecolare di composti organici polimerici che possiedono una rete tridimensionali di pori che conferisce loro le caratteristiche di un gel. Quindi una colonna di particelle di gel è in equilibrio con una fase mobile adatta per le molecole che devono essere separate. Le molecole grandi, che sono

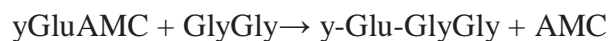
completamente escluse dai pori, passano attraverso gli spazi interstiziali e si presentano per prime nell'eluato. Le molecole più piccole, invece, si distribuiscono tra la fase mobile all'interno e all'esterno del setaccio molecolare e perciò passano ad una velocità minore, comparando di conseguenza per ultime nell'eluato.

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 logaritmo della massa molecolare inversamente proporzionale al volume di eluizione.

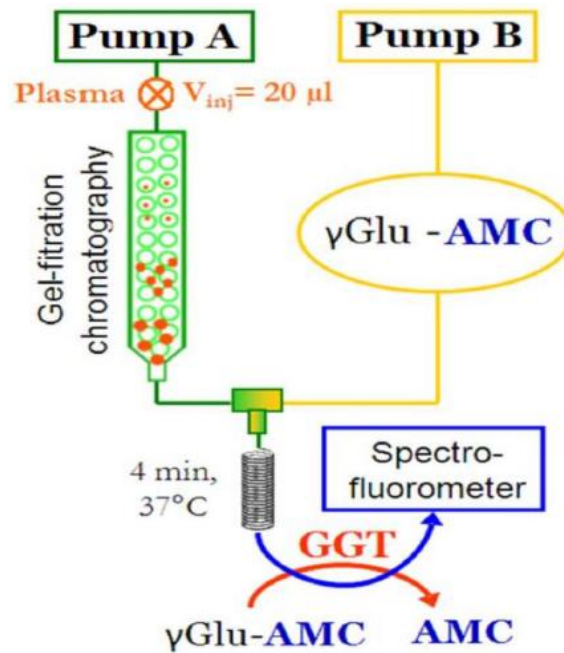
La separazione delle frazioni di GGT avviene mediante un'eluizione isocratica, al flusso di 0,5 mL/min, con un tampone di sodio fosfato 0,1 mol/L (pH 7.4) contenente NaCl 0,2 mol/L, 0,1 mmol/L di EDTA e 4,5 mmol/L di GlyGly come accettore della reazione di transpeptidazione catalizzata dall'enzima. Prima dell'iniezione i campioni di plasma vengono filtrati mediante un filtro 0,45µm PVDF (Millipore) e ogni iniezione è eseguita con 0,02 ml di campione filtrato.

Per riuscire a determinare in continuo l'attività di GGT, viene aggiunta continuamente all'eluato una soluzione contenente  $\gamma$ GluAMC, un substrato fluorescente specifico per la GGT. Tutto ciò avviene grazie alla presenza di una connessione a T, posta all'uscita della colonna. La miscelazione dell'eluato uscente dalla colonna con il substrato della GGT avviene in una spira avente volume di 2,6 mL (corrispondente ad una incubazione di circa 4 minuti) posta in bagno termostatico a 37°.

L'accettore della reazione di transpeptidazione è incluso nella fase mobile, quindi la presenza dell'enzima GGT è visualizzata tramite la liberazione del composto fluorescente AMC, in base alla reazione:



Il prodotto AMC viene rilevato grazie un fluorimetro che opera 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 pari a 0,5 U/L, mentre il tempo necessario per la valutazione dell'attività dell'enzima in un singolo campione è di circa 50 minuti [Franzini et al., 2008].



**Figura 3.2:** Schema delle componenti del sistema per la determinazione delle frazioni di GGT [Franzini et al., 2008]

### 3.4 Quantificazione dell'attività della GGT associata alle frazioni

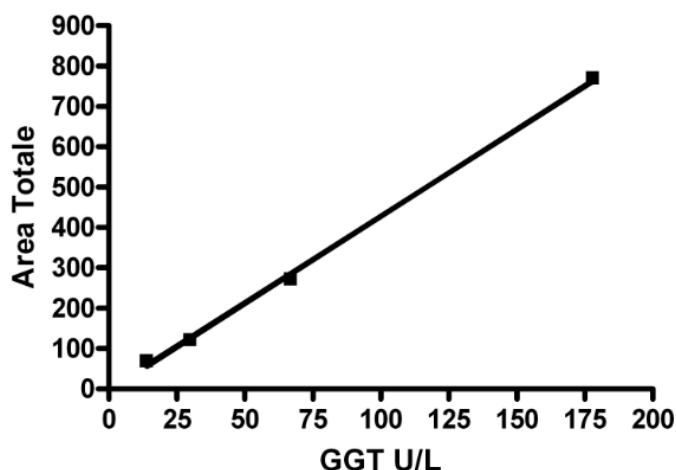
L'area totale e delle frazioni della GGT viene calcolata con l'ausilio di un programma informatico (MATLAB Version 7 MathWorks, Inc.) per risolvere la sovrapposizione dei picchi del cromatogramma risultante. La costruzione della curva dei quattro picchi cromatografici della GGT è condotta con un non-lineare algoritmo di minimizzazione dei minimi quadrati usando quattro curve Gaussiane modificate esponenzialmente (EMG); per ciascun picco sono stati fissati i limiti superiori e inferiori per l'ampiezza, la larghezza, la posizione e l'asimmetria della curva.

L'area sottesa ai picchi è proporzionale all'attività delle frazioni di GGT, mentre 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.

La retta è costruita mettendo sulle ascisse i dati relativi all'attività di GGT dei campioni standard e sulle ordinate i dati relativi all'area sottesa al cromatogramma ottenuto dall'analisi di tali campioni mediante gel 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, viene calcolata la retta di regressione lineare passante per (0,0) con equazione:  $y = ax$  (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 [Franzini et al., 2008].



**Figura 3.3:** Retta di calibrazione costruita analizzando campioni di plasma standard con attività di GGT nota.

### 3.5 Metodi statistici

L'analisi statistica dell'andamento e delle variazioni dei valori dei parametri epatici, lipidici, glucidici, dell'attività di GGT totale e delle sue frazioni in soggetti diabetici, sottoposti ad interventi di chirurgia bariatrica, è stata effettuata tramite l'utilizzo del programma di statistica GRAPHPAD PRISM..

In particolare, nell'analisi descritta nei seguenti paragrafi 4.1, 4.2, 4.3, per ogni gruppo di variabili sono stati calcolati la mediana e il 25°-75° percentile, per verificare se ci siano state delle modificazioni significative nella distribuzione di tali parametri nell'arco di un anno dall'intervento (T365). Infatti i valori dei parametri epatici, lipidici e glucidici, valutati nei campioni di siero dei pazienti diabetici, si riferiscono a tre diversi prelievi effettuati prima dell'operazione (T0), dopo 15 giorni (T15) e dopo un anno (T365). Inoltre per quanto riguarda l'attività di GGT in tali pazienti, essa è stata determinata anche in campioni di siero prelevati a 45 giorni dall'intervento (T45). Successivamente sulle stesse variabili è stata effettuata l'analisi della varianza tramite il

test ANOVA ad una via per misure ripetute, seguita da un post test per valutare l'andamento del parametro tra i tempi analizzati (linear trend).

L'analisi ANOVA permette di confrontare tre o più gruppi di dati comparando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità tra i gruppi, infatti l'ipotesi alla base dell'analisi della varianza è che dati N gruppi, è possibile scomporre la varianza in due componenti: la varianza interna ai gruppi (Varianza Within) e la varianza tra i gruppi (Varianza Between). Il motivo di tale distinzione è l'idea che determinati fenomeni trovino spiegazioni in caratteristiche proprie del gruppo di appartenenza. Quindi l'analisi della varianza si usa per determinare se più gruppi possono essere significativamente diversi tra loro (la Varianza Between contribuisce significativamente alla varianza totale, ovvero il fenomeno è legato a caratteristiche proprie di ciascun gruppo) oppure significativamente omogenei (la Varianza Within contribuisce significativamente alla varianza totale, ovvero il fenomeno è legato a caratteristiche proprie di tutti i gruppi). L'ipotesi nulla prevede in genere che i dati di tutti i gruppi abbiano la stessa origine, ovvero la stessa distribuzione stocastica, e che le differenze osservate tra i gruppi siano dovute solo al caso.

I parametri che non hanno una distribuzione gaussiana sono stati trasformati tramite la funzione logaritmo naturale ( $y = \ln(x)$ ) prima di applicare l'analisi ANOVA.

Il post test di linear trend serve a valutare se i cambiamenti tra i gruppi di dati per ciascun parametro, raggruppati in base al periodo trascorso dall'intervento di chirurgia bariatrica, seguano un andamento lineare di aumento o riduzione di valore nell'arco di un anno dall'operazione.

Nell'analisi dei dati, presente nel [paragrafo 4.4](#), è stato utilizzato il test t di Student per dati appaiati per verificare se ci siano stati cambiamenti significativi nell'andamento dei valori dei parametri del metabolismo glucidico e dell'attività di GGT, prima dell'operazione (T0) e ad un anno dall'intervento (T365), nei soggetti che ad un anno dall'intervento mostrano una remissione del diabete di tipo 2 e nei soggetti che invece non hanno remissione del diabete. Quest'ultimi, comunque, potrebbero mostrare un miglioramento dei parametri glucidici e dei valori di attività di GGT. Inoltre è stato effettuato un test t di Student per dati non appaiati per verificare l'eventuale presenza di significative differenze prima dell'intervento (T0) e dopo un anno (T365) nei valori dei parametri considerati nelle due popolazioni.

Il test t di Student è un test statistico di tipo parametrico atto a verificare se il valore medio di una distribuzione si discosta significativamente da un certo valore di

riferimento. I parametri che non hanno una distribuzione gaussiana sono stati trasformati tramite la funzione logaritmo naturale ( $y = \ln(x)$ ) prima di applicare il test t di Student. Inoltre per questi gruppi di variabili sono stati calcolati la mediana e il 25°-75° per valutare eventuali differenze nella distribuzione dei parametri tra i due gruppi di pazienti.

Nel paragrafo 4.5 è stata effettuata l'analisi correlazione, calcolando il coefficiente r di Spearman, per valutare se esiste una relazione tra l'attività totale di GGT e delle sue frazioni e la concentrazione di alcuni parametri che descrivono il metabolismo glucidico, lipidico ed epatico dei pazienti. Come variabili cliniche sono state prese in considerazione: BMI, concentrazione plasmatica di HbA1c, trigliceridi, ALT e colesterolo HDL, i valori di pressione diastolica, glicemia a digiuno, insulinemia a digiuno, sensibilità al glucosio delle cellule  $\beta$ , clearance dell'insulina, il parametro OGIS 120 e la durata del diabete.

L'analisi di correlazione verifica se esiste una relazione tra due variabili, ovvero come e quanto due variabili variano insieme. Non si tratta necessariamente di un rapporto causa-effetto, ma è la tendenza di una variabile a modificarsi in relazione ad un'altra.

Il coefficiente di correlazione di Spearman non è parametrico, non occorre che i dati abbiano una distribuzione normale, e assume valori compresi tra +1 (correlazione positiva) e -1 (correlazione negativa), mentre il valore 0 indica assenza di correlazione.



## Capitolo 4: Analisi dei risultati

### *4.1 Analisi dei parametri epatici, lipidici e del metabolismo glucidico in pazienti diabetici prima e dopo l'intervento di chirurgia bariatrica*

Per i 29 pazienti diabetici sottoposti ad interventi di chirurgia bariatrica sono stati raccolti il BMI, i valori dei parametri epatici (transaminasi), lipidici (colesterolo totale, HDL, trigliceridi) e del metabolismo glucidico (glicemia a digiuno, insulinemia basale, emoglobina glicata, sensibilità al glucosio delle cellule  $\beta$ , clearance dell'insulina, OGIS 120) ricavati da tre diversi prelievi eseguiti prima dell'operazione (T0), dopo 15 giorni (T15) e dopo 365 giorni (T365). I dati ricavati sono riportati nella tabella 4.1.

In particolare ad un anno dall'intervento (T365) è emerso una significativa riduzione del BMI di circa il 30% [mediana (25°-75° percentile) T0: 41,98 (37,62-47,96)  $\text{kg}/\text{m}^2$ ; T365: 29,73 (26,99-33,71)  $\text{kg}/\text{m}^2$ ], di conseguenza i soggetti sono passati da una condizione di obesità grave (BMI > 40  $\text{kg}/\text{m}^2$ ) ad una condizione di sovrappeso (25 < BMI < 29,99  $\text{kg}/\text{m}^2$ ) (Figura 4.1 A).

Per quanto riguarda gli indici lipidici, sempre ad un anno dall'intervento (T365) di chirurgia bariatrica, sono diminuiti del 12% i valori del colesterolo totale [T0: 207,50 (186,50-221,50) mg/dl; T365: 182,00 (149,00-203,00) mg/dl], mentre il colesterolo HDL è aumentato del 15% [T0: 40,00 (33,00-48,50) mg/dl; T365: 46,00 (44,00-54,00) mg/dl]. Inoltre si può osservare una diminuzione del 43% dei valori dei trigliceridi [T0: 181,00 (149,00-235,00) mg/dl; T365: 103,00 (84,00-132,00) mg/dl], quindi già nell'arco di un anno dall'operazione si può notare un miglioramento dei parametri clinici lipidici dei soggetti sottoposti ad interventi di chirurgia bariatrica (Figura 4.1 B-C-D).

Per quanto riguarda gli indici di funzionalità epatica, le transaminasi, si osserva anche in questo caso una diminuzione significativa dei livelli plasmatici ad un anno dall'intervento (T365) rispetto alla situazione precedente l'operazione (T0) (P = 0,0001). È interessante però sottolineare come a 15 giorni dall'intervento (T15) ci sia un peggioramento della condizione epatica, con un innalzamento delle AST [T0: 21,00 (16,00-30,50) U/L; T15: 34,5 (21,50-55,00) U/L] e delle ALT [T0: 30,00 (15,50-40,00) U/L; T15: 33,00 (20,00-64,50) U/L]. Tutto ciò è giustificato dal fatto che dopo

l'intervento i pazienti devono seguire una dieta ipocalorica (1200 kcal) per 30 giorni che comporta la mobilitazione di acidi grassi dal tessuto adiposo fino a quando non viene trovato un nuovo equilibrio metabolico. Perciò nell'immediato post operazione il fegato deve metabolizzare una quantità insolitamente elevata di acidi grassi che ne peggiora momentaneamente la funzionalità e probabilmente il grado di steatosi. (Figura 4.2 A-B).

I pazienti coinvolti in questo studio sono tutti diabetici, in particolare prima dell'intervento (T0) hanno una glicemia basale di 136,00 (118,00-176,00) mg/dl, mentre ad un anno dall'operazione (T365) i valori di glicemia a digiuno si attestano su valori di 99,00 (89.50-109.50) mg/dl, quindi si osserva una remissione del T2D nella maggior parte dei pazienti. Questi dati confermano quanto già precedentemente osservato in uno studio del 2013 di Nannipieri e collaboratori in cui hanno affermato che già ad un anno dall'intervento di chirurgia bariatrica si osserva una remissione del T2D in molti dei soggetti [Nannipieri et al., 2013] (Figura 4.3 A).

Dall'analisi dei dati si osserva una netta riduzione dei livelli basali di insulina già dopo un anno dall'intervento rispetto al periodo pre operatorio [T0: 15,90 (12,50-26,65)  $\mu\text{U/mL}$ ; T365: 7,68 (5,56-10,79)  $\mu\text{U/mL}$ ], conseguentemente si osserva anche un miglioramento nella sensibilità al glucosio delle cellule  $\beta$  [T0: 17,93 (10,88-34,13)  $\text{pmol}/\text{min}\cdot\text{m}^2\cdot\text{mM}$ ; T365: 40,41 (17,82-74,84)  $\text{pmol}/\text{min}\cdot\text{m}^2\cdot\text{mM}$ ], ciò è in accordo con il risultato di remissione totale o parziale del T2D (Figura 4.3 B-C).

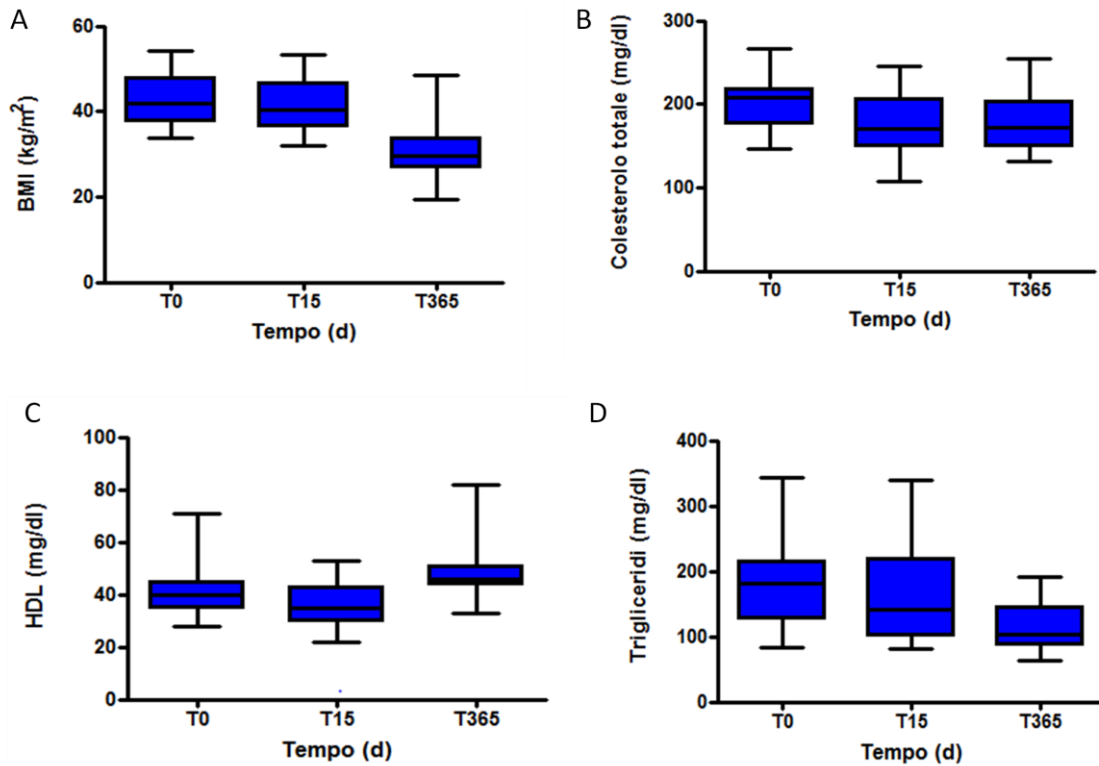
Negli ultimi anni si utilizza sempre più spesso un indice matematico OGIS 120, un indicatore di sensibilità all'insulina. Analizzando i risultati ottenuti si osserva, anche per quanto riguarda il parametro OGIS 120, un significativo aumento dei valori, quindi un miglioramento della sensibilità all'insulina, ad un anno dall'intervento ( $P < 0.0001$ ).

In individui diabetici, che hanno uno scarso controllo della glicemia, la quantità di HbA1c che si forma è maggiore rispetto ai soggetti sani. Conforme a quanto detto è quindi la riduzione di concentrazione dell'HbA1c in questi pazienti ad un anno dall'intervento [T365: 7,50 (6,55-9,40) %] rispetto alla situazione pre operatoria [T0: 6,20 (5,80-7,15) %]. Infine significativo è l'aumento della clearance dell'insulina ( $P < 0,0001$ ). (Figura 4.3 D-E-F).

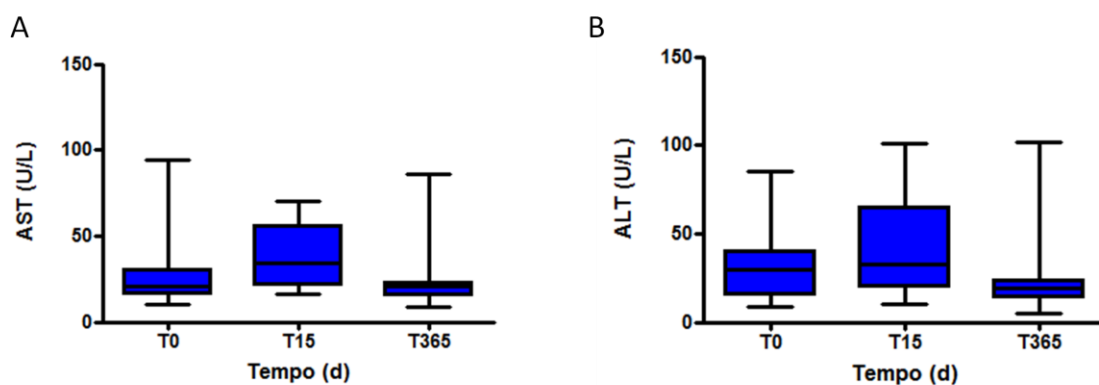
**Tabella 4.1:** Parametri epatici, lipidici e del metabolismo glucidico, misurati prima dell'intervento (T0), dopo 15 giorni (T15) e un anno (T365), in 29 pazienti diabetici sottoposti ad interventi di chirurgia bariatrica.

	<b>T0</b>	<b>T15</b>	<b>T365</b>	<b>P anova</b>	<b>P linear trend</b>
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	41,98 (37,62-47,96)	40,40 (36,54-46,80)	29,73 (26,99-33,71)	< 0,0001	< 0,0001
<b>AST* (U/L)</b>	21,00 (16,00-30,50)	34,50 (21,50-55,00)	20,00 (15,00-23,00)	0,0001	n.s
<b>ALT* (U/L)</b>	30,00 (15,50-40,00)	33,00 (20,00-64,50)	19,00 (13,50-23,50)	0,0001	0,0095
<b>Colesterolo totale (mg/dl)</b>	207,50 (186,50-221,50)	167,00 (147,00-201,00)	182,00 (149,00-203,00)	0,0484	0,0378
<b>HDL (mg/dl)</b>	40,00 (33,00-48,50)	35,50 (30,50-42,50)	46,00 (44,00-54,00)	<0,0001	< 0,0001
<b>Trigliceridi* (mg/dl)</b>	181,00 (149,00-235,00)	135,00 (103,00-218,00)	103,00 (84,00-132,00)	< 0,0001	< 0,0001
<b>Emoglobina glicata* (%)</b>	7,50 (6,55-9,40)	7,10 (6,40-8,95)	6,20 (5,80-7,15)	< 0,0001	< 0,0001
<b>Glicemia basale* (mg/dl)</b>	136,00 (118,00-173,00)	124,00 (108,50-182,50)	99,00 (89,50-109,50)	< 0,0001	< 0,0001
<b>Insulinemia basale* (μU/mL)</b>	15,90 (12,50-26,65)	17,20 (11,29-20,35)	7,68 (5,56-10,79)	< 0,0001	< 0,0001
<b>Sens. al glucosio cellule β (pmol/min*m<sup>2</sup>*mM)</b>	17,93 (10,88-34,13)	25,83 (18,59-58,41)	40,41 (17,82-74,84)	< 0,0001	< 0,0001
<b>Clearance insulina* (ml/min)</b>	0,69 (0,44-1,16)	1,28 (1,13-1,43)	1,13 (0,91-1,60)	< 0,0001	< 0,0001
<b>OGIS 120 (ml/min*m<sup>2</sup>)</b>	282,00 (242,50-315,50)	312,00 (255,50-360,50)	390,00 (360,50-429,00)	< 0,0001	< 0,0001

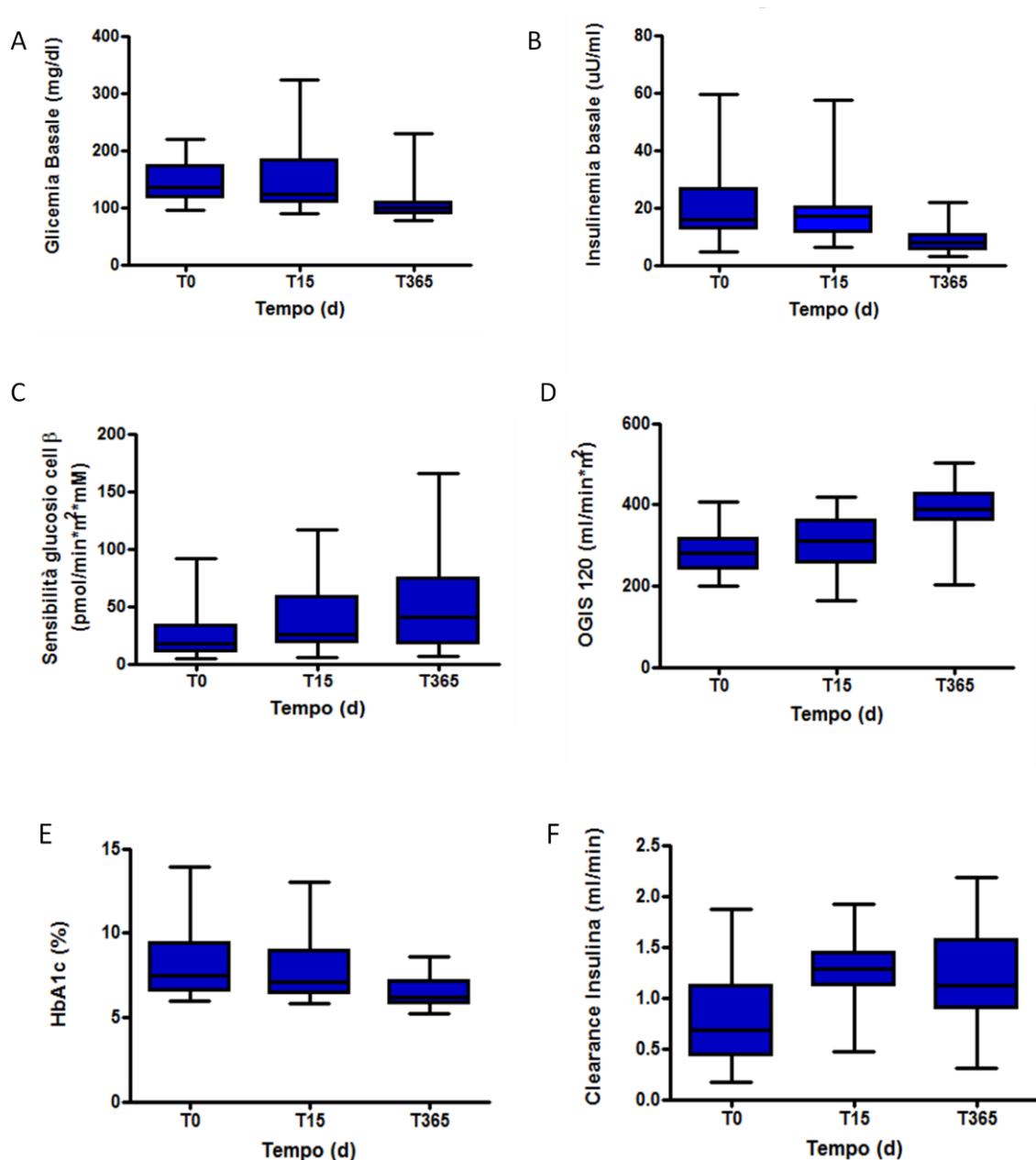
\*Anova a una via e post linear trend sono stati eseguiti su valori logaritmici (ln), n.s = non significativo.



**Figura 4.1:** A: andamento dei valori del BMI; B: andamento della concentrazione plasmatica del colesterolo; C: andamento della concentrazione plasmatica delle HDL; D: andamento della concentrazione plasmatica dei trigliceridi. Per ogni parametro sono stati riportati la mediana, il valore massimo e il valore minimo della distribuzione valutati nell'arco di un anno dall'intervento.



**Figura 4.2:** A: andamento della concentrazione plasmatica delle AST; B: andamento della concentrazione plasmatica delle ALT. Per entrambi i parametri sono riportati la mediana, il valore massimo e il valore minimo della distribuzione valutata nell'arco di un anno dall'intervento.



**Figura 4.3:** A:andamento dei valori di glicemia basale; B: andamento dei valori di insulinemia basale; C: andamento dei valori di sensibilità al glucosio delle cellule  $\beta$ ; D: andamento del parametro OGIS 120; E: andamento della percentuale di emoglobina glicata nel sangue; F: andamento dei valori di clearance dell'insulina. Per ogni parametro sono indicati la mediana, il valore massimo e il valore minimo di ciascuna distribuzione valutata nell'arco di un anno dall'intervento.

#### 4.2 Analisi dell'attività delle frazioni di GGT

Successivamente ho analizzato statisticamente l'andamento e le variazioni dell'attività totale di GGT e delle sue frazioni nei soggetti diabetici sottoposti a chirurgia bariatrica, dopo aver analizzato i campioni di siero mediante la tecnica della cromatografia ad esclusione molecolare. I dati ricavati sono riportati in tabella 4.2.

Ad un anno dall'intervento (T365) rispetto alla condizione pre operatoria (T0), è significativa la diminuzione ( $P < 0,0001$ ) dell'attività totale di GGT [mediana, 25°-75° percentile: T0: 22,13 (16,34-35,03) U/L, T365: 12,97 (10,73-17,25) U/L]. Comunque già a 45 giorni dall'intervento (T45) si assiste ad una riduzione di circa il 42% rispetto a T0 [T45: 17,06 (14,98-22,96) U/L].

Anche per quanto riguarda l'attività delle singole frazioni plasmatiche di GGT si assiste ad una importante diminuzione ad un anno dall'intervento (T365) rispetto alla condizione pre operatoria (T0) ( $P < 0,0001$ ).

In particolare la frazione b-GGT si riduce del 60% [T0: 2,95 (2,10-6,76) U/L; T365: 1,18 (0,86-1,55 U/L)], mentre le frazioni m-GGT, s-GGT e f-GGT mediamente del 27% [m-GGT T0: 0,44 (0,25-1,11) U/L, T365: 0,32 (0,18-0,44) U/L; s-GGT T0: 5,31 (3,85-12,39) U/L, T365: 3,85 (2,65-5,62) U/L; f-GGT T0: 10,46 (9,17-14,82) U/L, T365: 7,60 (5,87-9,17) U/L].

Interessante notare, invece, come a 15 giorni dall'intervento si registra un incremento dell'attività delle frazioni b-GGT e s-GGT di circa il 40% rispetto alla condizione pre operatoria [b-GGT T15: 4,13 (2,33-5,02) U/L; s-GGT T15: 7,24 (4,25-9,63) U/L].

Questo incremento è dovuto al fatto che, come precedentemente ricordato per giustificare l'aumento delle ALT e delle AST sempre 15 giorni dopo l'intervento, i pazienti devono seguire una dieta ipocalorica (1200 kcal) per 30 giorni che comporta la mobilitazione di acidi grassi dal tessuto adiposo fino a quando non viene trovato un nuovo equilibrio metabolico. Perciò nell'immediato post-intervento il fegato deve metabolizzare una quantità insolitamente elevata di acidi grassi che ne peggiora momentaneamente la funzionalità e il grado di steatosi e questo potrebbe indurre l'aumento di b-GGT, che è la frazione maggiormente influenzata dall'alterata funzione metabolica del fegato [Franzini et al., 2011].

Successivamente ho raggruppato i soggetti in esame in tre gruppi sulla base del grado di steatosi diagnosticata prima dell'intervento (S0: no steatosi, S1: steatosi, S2:

steatoepatite), e calcolato i valori di attività delle singole frazioni di GGT e della GGT totale, sempre considerando i quattro prelievi ematici prima dell'operazione e dopo 15, 45 e 365 giorni. Lo scopo è quello di stabilire se c'è una relazione tra i livelli di steatosi e i valori di attività della GGT totale e delle sue singole frazioni.

Già sovrapponendo i cromatogrammi dei profili di attività delle singole frazioni di GGT si possono fare alcune considerazioni. In particolare ho scelto i cromatogrammi a T0, T15 e T365 di tre pazienti caratterizzati dalla diversa diagnosi di steatosi.

Per tutti e tre i soggetti, i volumi a cui eluiscono le singole frazioni di GGT rimangono costanti a T0, T15 e T365, quindi non ci sono modificazioni nel peso molecolare delle singole frazioni a seguito dell'intervento di chirurgia bariatrica.

Ciò che varia notevolmente, anche in base al grado di steatosi, sono l'altezza e l'ampiezza del picco delle singole frazioni, indice di una maggiore o minore attività di GGT. In particolare si può notare come a T0 l'area sottesa al profilo di eluizione di b-GGT sia tanto maggiore quanto maggiore è il grado di steatosi.

A T15 risulta evidente, soprattutto per i soggetti con steatosi e steatoepatite, una maggiore attività, in particolare, delle frazioni b-GGT ed s-GGT, indice di un peggioramento della funzionalità epatica subito dopo l'intervento.

Infine a T365, in tutti e tre i soggetti, si nota una riduzione di attività delle singole frazioni di GGT, raggiungendo valori migliori rispetto al periodo pre operatorio (Figure 4.4-4.5-4.6).

Successivamente ho eseguito l'analisi statistica sui valori di attività di GGT totale e delle sue frazioni caratteristici dei 29 pazienti diabetici raggruppati in base al livello di steatosi diagnosticato prima dell'intervento. I risultati ottenuti sono elencati nella tabella 4.3.

Prima dell'intervento (T0) l'attività totale di GGT è maggiore nei pazienti con steatoepatite [mediana (25°-75° percentile): 33,12 (21,79-56,83) U/L] rispetto ai pazienti senza steatosi [15,03 U/L] o con livelli steatosi [18,61 (16,11-27,94) U/L] (Figura 4.7).

In particolare sono le frazioni b-GGT e s-GGT ad essere più elevate nei pazienti con steatoepatite [b-GGT: 6,14 (2,90-8,83) U/L, s-GGT: 12,63 (7,42-23,41) U/L] rispetto ai soggetti senza steatosi [b-GGT: 1,87 U/L, s-GGT: 2,7 U/L] o con steatosi [b-GGT: 2,70 (1,88-5,81) U/L, s-GGT: 4,89 (4,04-9,79) U/L] (Figura 4.8).

Questi risultati sono in accordo con quanto emerso dallo studio condotto nel 2011 da Franzini e collaboratori in cui hanno dimostrato che i valori delle frazioni della GGT, in particolare b-GGT, aumentano nei soggetti affetti da NAFLD, e per questo motivo b-GGT può essere considerata un fattore diagnostico positivo per la diagnosi di steatosi epatica non alcolica [Franzini et al., 2011].

Per quanto riguarda le altre frazioni m-GGT e f-GGT non si evidenziano particolari variazioni tra i tre gruppi di pazienti.

Analizzando i risultati ad un anno dall'intervento (T365) di chirurgia bariatrica, emerge una significativa riduzione dell'attività totale di GGT sia per pazienti con steatosi ( $P < 0,0001$ ) che con steatoepatite ( $P = 0,0004$ ) ed è interessante notare come i livelli di GGT finale siano simili tra i due gruppi di pazienti [S1: 14,72 (11,09-17,98) U/L, S2: 12,90 (11,28-16,28) U/L], ma comunque più elevati di circa il 75% (S1) - 55% (S2) rispetto ai soggetti privi di steatosi [S0: 8,33 U/L] (Figura 4.7). La variazione nei valori di attività totale in quest'ultimi, in seguito all'intervento di chirurgia bariatrica, è invece meno significativa ( $P = 0,0486$ ), ma si deve anche tenere presente il ridotto numero di individui appartenenti a questa categoria ( $n = 4$ ).

Per quanto riguarda le singole frazioni di GGT, sempre ad un anno dall'intervento (T365), è significativa la riduzione della frazione di b-GGT sia nei pazienti con steatosi ( $P < 0,0001$ ) sia con steatoepatite ( $P = 0,0004$ ); un risultato analogo si ottiene anche per la frazione s-GGT per entrambi i gruppi di pazienti (S1:  $P = 0,0017$ ; S2:  $P = 0,0016$ ). Interessante notare, come anche per le frazioni b-GGT e s-GGT, i valori ad un anno dall'intervento diventano molto simili nei due gruppi [b-GGT S1: 1,09 (0,90-1,95) U/L, S2: 1,49 (1,26-1,55) U/L; s-GGT S1: 4,25 (2,77-7,08) U/L, S2: 4,55 (2,65-5,02) U/L], ma comunque sempre più elevati rispetto ai pazienti non affetti da steatosi [b-GGT S0: 0,585 U/L; s-GGT S0: 1,85 U/L] (Figura 4.8).

Nei soggetti considerati in questo studio non è stata rivalutata la condizione di steatosi epatica dopo l'intervento, ma la variazione di b-GGT in particolare può far ipotizzare che ci sia stato un netto miglioramento di questa patologia, che ricordiamo essere legata alla condizione di insulino-resistenza.



**Tabella 4.2:** Valori di attività della GGT totale e delle sue frazioni in pazienti diabetici prima dell'intervento di chirurgia bariatrica (T0) e 15 (T15), 45 (T45) e 365 giorni dopo (T365)

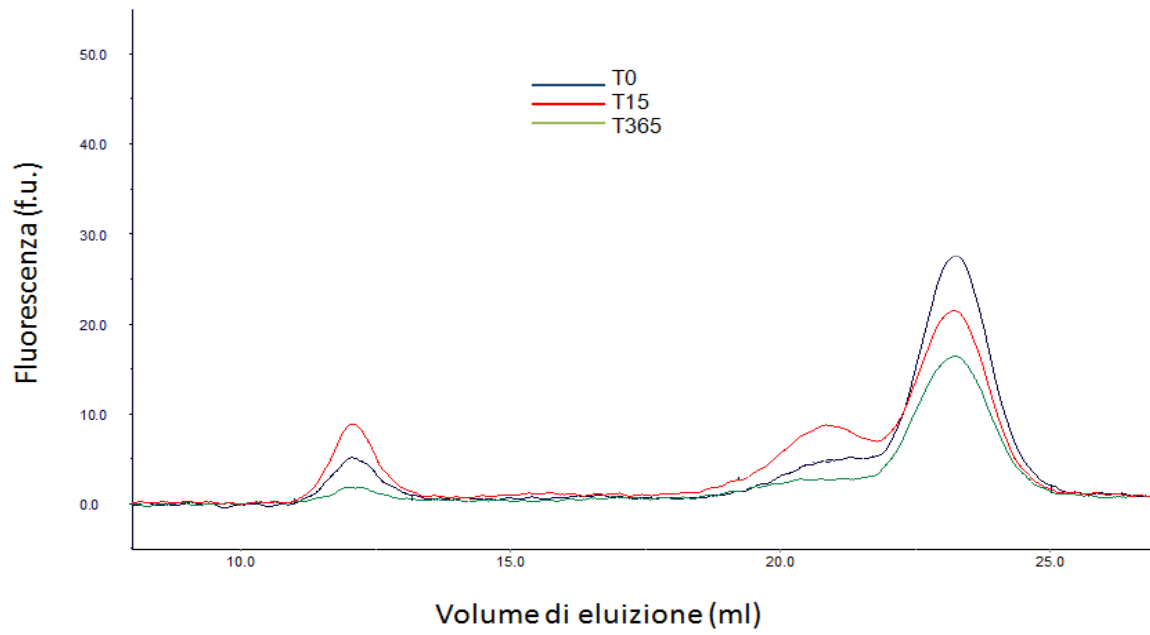
		<b>T0</b>	<b>T15</b>	<b>T45</b>	<b>T365</b>		
	<b>n</b>	<b>Mediana (25-75 perc)</b>	<b>Mediana (25-75 perc)</b>	<b>Mediana (25-75 perc)</b>	<b>Mediana (25-75 perc)</b>	<b>ANOVA</b>	<b>Linear Trend</b>
<b>GGT</b>	29	22,13 (16,34-35,03)	22,08 (18,77-27,73)	17,06 (14,98-22,96)	12,97 (10,73-17,25)	P<0,0001	P<0,0001
<b>bGGT</b>	29	2,95 (2,10-6,76)	4,13 (2,33-5,02)	2,77 (1,73-4,47)	1,18 (0,86-1,55)	P<0,0001	P<0,0001
<b>mGGT</b>	29	0,44 (0,25-1,11)	0,43 (0,32-0,88)	0,43 (0,27-0,77)	0,32 (0,18-0,44)	P=0,0031	P=0,0006
<b>sGGT</b>	29	5,31 (3,85-12,39)	7,24 (4,25-9,63)	4,68 (3,70-6,20)	3,85 (2,65-5,62)	P<0,0001	P<0,0001
<b>fGGT</b>	29	10,46 (9,17-14,82)	10,14 (8,59-12,28)	9,67 (8,23-10,27)	7,60 (5,87-9,17)	P<0,0001	P<0,0001

I valori di attività totale di GGT e delle sue frazioni sono espressi in U/L. \* Anova a una via e il post test di linear trend sono stati eseguiti su valori logaritmici (ln)

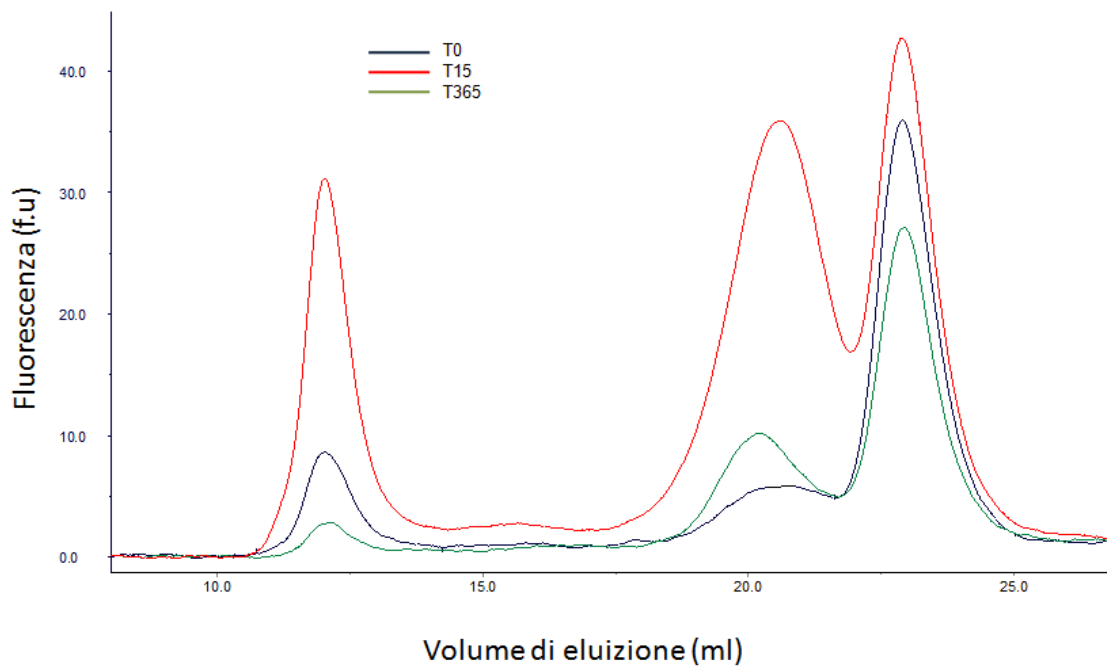
**Tabella 4.3:** Valori dell'attività totale di GGT e delle sue frazioni in relazione al grado di steatosi

No Steatosi		T0	T15	T45	T365	ANOVA	Linear Trend
N	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)		
GGT	4	15,03	16,65	12,98	8,34	P=0,0486	P=0,0209
b-GGT	4	1,87	3,12	2,18	0,59	n.s	P=0,0319
m-GGT	4	0,25	0,24	0,31	0,11	n.s	n.s
s-GGT	4	2,76	4,04	2,22	1,86	P=0,0243	P=0,0352
f-GGT	4	9,95	7,36	6,99	3,07	n.s	n.s
Steatosi		T0	T15	T45	T365	ANOVA	Linear Trend
N	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)		
GGT	15	18,61 (16,11-27,94)	21,59 (18,43-28,95)	17,06 (15,20-22,52)	14,72 (11,09-17,98)	P<0,0001	P<0,0001
b-GGT	15	2,70 (1,88-5,81)	3,74 (2,37-5,01)	2,04 (1,37-4,85)	1,09 (0,90-1,96)	P<0,0001	P<0,0001
m-GGT	15	0,42 (0,21-1,03)	0,53 (0,31-0,96)	0,41 (0,29-0,54)	0,36 (0,20-0,52)	n.s	n.s
s-GGT	15	4,89 (4,04-9,79)	7,46 (4,03-8,96)	4,68 (3,57-6,09)	4,26 (2,78-6,09)	P=0,0017	P=0,0048
f-GGT	15	10,40 (9,09-14,61)	10,29 (8,85-13,41)	9,78 (8,51-11,50)	8,61 (6,54-9,29)	P<0,0001	P<0,0001
Steatoepatite		T0	T15	T45	T365	ANOVA	Linear Trend
N	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)		
GGT	10	33,12 (21,79-56,83)	23,01 (20,75-32,07)	18,91 (16,83-32,36)	12,90 (11,28-16,28)	P=0,0003	P<0,0001
b-GGT	10	6,15 (2,9-8,84)	4,79 (2,90-8,88)	3,73 (2,63-5,26)	1,49 (1,26-1,55)	P=0,0004	P<0,0001
m-GGT	10	0,96 (0,41-1,80)	0,45 (0,37-1,09)	0,77 (0,21-1,15)	0,32 (0,17-0,40)	n.s	P=0,0102
s-GGT	10	12,63 (7,42-23,41)	7,84 (5,09-11,54)	5,81 (4,57-10,70)	4,55 (2,65-5,02)	P=0,0016	P=0,0002
f-GGT	10	11,68 (7,71-22,17)	10,56 (8,78-13,13)	10,11 (8,51-14,44)	7,60 (6,22-8,74)	P<0,0001	P<0,0001

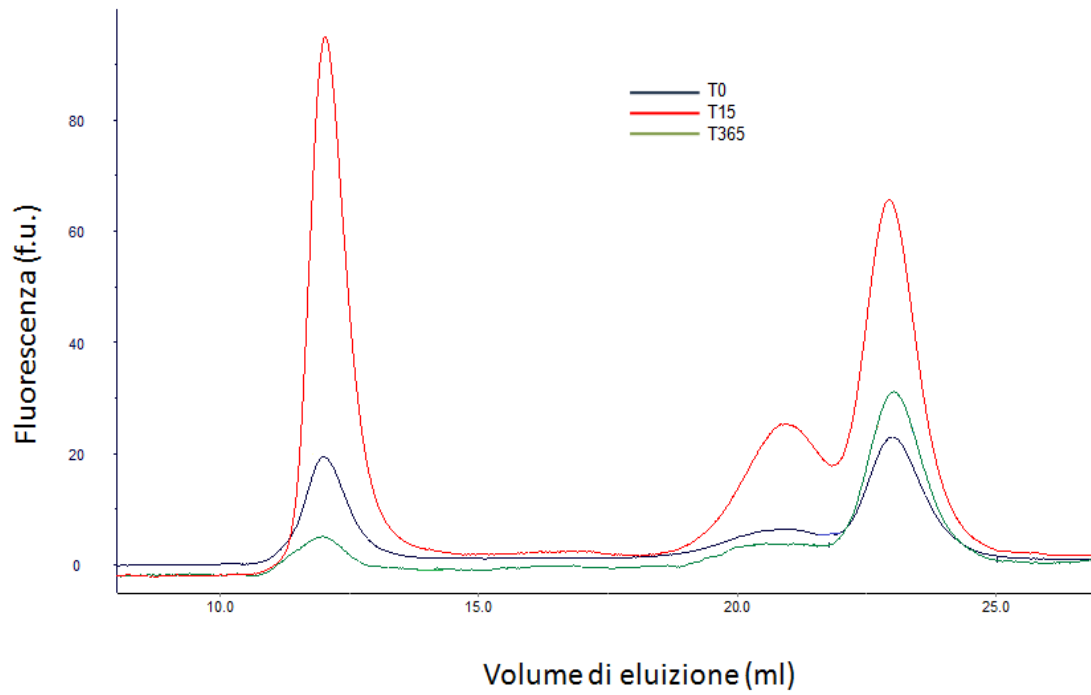
I valori di attività totale di GGT e delle sue frazioni sono espressi in U/L. Anova a una via e il post test di linear trend sono stati eseguiti su valori logaritmici (ln) n.s = valore non significativo.



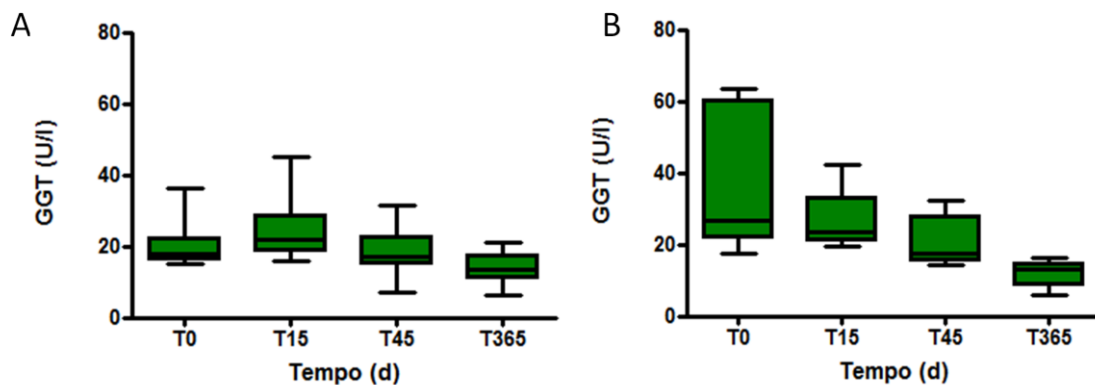
**Figura 4.4:** Profilo di eluizione dell'attività delle frazioni plasmatiche di GGT nel paziente 27b privo di steatosi (S0).



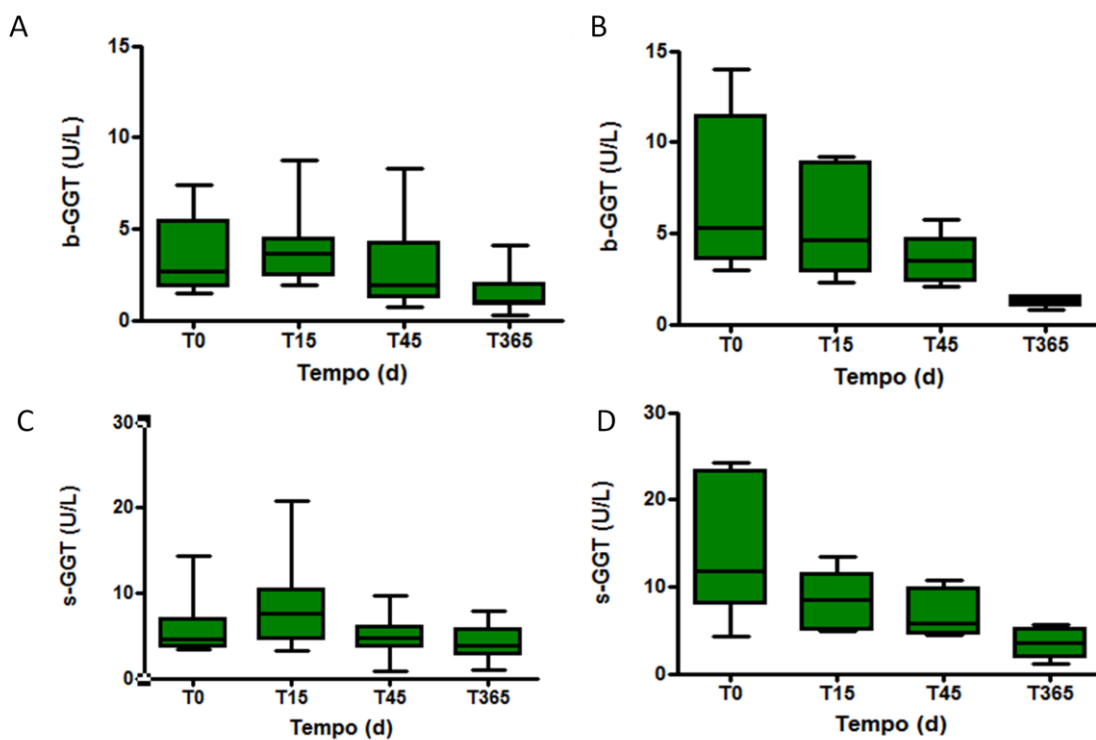
**Figura 4.5:** Profilo di eluizione dell'attività delle frazioni plasmatiche di GGT nel paziente 35b che presenta steatosi (S1).



**Figura 4.6:** Profilo di eluzione dell'attività delle frazioni plasmatiche di GGT nel paziente 39b che presenta steatoepatite (S2).



**Figura 4.7:** A: andamento dell'attività di GGT nei pazienti con steatosi (S1); B: andamento dell'attività di GGT totale nei pazienti con steatoepatite (S2). Per entrambi i parametri sono indicati la mediana, il valore massimo e il valore minimo della distribuzione valutata nell'arco di un anno dall'intervento.



**Figura 4.8:** A: andamento dell'attività di b-GGT in pazienti con steatosi (S1); B: andamento dell'attività di b-GGT in pazienti con steatoepatite (S2); C: andamento dell'attività di s-GGT in pazienti con steatosi (S1); D: andamento dell'attività di s-GGT in pazienti con steatoepatite (S2). Per ogni parametro sono indicati la mediana, il valore massimo e il valore minimo della distribuzione valutata nell'arco di un anno dall'intervento.

### *4.3 Analisi delle transaminasi in base al grado di steatosi*

I pazienti affetti da NAFLD possono mostrare un aumento della concentrazione dell'aspartato amminotransferasi (AST) e dell'alanina amminotransferasi (ALT), anche se non rappresentano un indice diagnostico malattia-specifico.

Ho raggruppato in tre gruppi (S0: assenza di steatosi, S1: steatosi; S2: steatoepatite) i pazienti in base alla diagnosi di steatosi effettuata prima dell'intervento di chirurgia bariatrica, considerando i tre prelievi ematici prima dell'operazione (T0) e dopo 15 (T15) e 365 giorni (T365).

Lo scopo è quello di stabilire se nei soggetti in studio ci sia una relazione tra i livelli di steatosi e le concentrazioni plasmatiche delle transaminasi. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 4.4.

Prima dell'intervento di chirurgia bariatrica, le concentrazioni plasmatiche di AST e ALT sono più elevate nei soggetti con steatosi [AST: mediana (25°-75° percentile): 21,00 (18,00-28,00) U/L; ALT: 26,00 (17,00-33,00) U/L] e con steatoepatite [AST: 25,50 (15,50-36,00) U/L; ALT 38,50 (21,50-53,00) U/L] rispetto ai soggetti senza steatosi [AST: 14,50 U/L; ALT 14,50 U/L].

A 15 giorni dall'intervento (T15), come è già stato fatto notare in precedenza, è evidente sempre un innalzamento delle concentrazioni delle transaminasi, che sottolineano un peggioramento della funzionalità epatica per poi migliorare progressivamente e raggiungere valori minori ad un anno dall'operazione (T365) rispetto al periodo precedente, in particolare nei soggetti con steatoepatite [T0: AST: 25,50 (15,50-36,00) U/L; ALT 38,50 (21,50-53,00) U/L; T365: AST: 18,50 (13,50-32,00) U/L; ALT: 18,50 (12,00-25,00) U/L].

**Tabella 4.4:** Valori di concentrazione di AST e ALT in relazione al grado di steatosi

No Steatosi		T0	T15	T 365	P value	linear trend
	n	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)		
AST	4	14,50	19,00	16,50	n.s	n.s
ALT	4	14,50	18,00	13,50	n.s	n.s

Steatosi		T0	T15	T365	P value	linear trend
	n	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)		
AST	15	21,00 (18,00-28,00)	35,00 (23,00-57,00)	21,00 (19,00-29,00)	0,0062	n.s
ALT	15	26,00 (17,00-33,00)	40,00 (25,00-66,00)	20,00 (16,00-25,00)	0,0044	n.s

Steatoepatite		T0	T15	T365	P value	linear trend
	n	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)	Mediana (25-75perc)		
AST	10	25,50 (15,50-36,00)	31,50 (20,00-55,00)	18,50 (13,50-32,00)	n.s	n.s
ALT	10	38,50 (21,50-53,00)	29,50 (19,50-64,50)	18,50 (12,00-25,00)	0,0430	0,0322

I dati sono espressi in U/L. Anova ad una via e post linear trend sono stati applicati su valori logaritmici (ln)

n,s non significativo

#### 4.4 Confronto tra pazienti con diabete in remissione e pazienti ancora diabetici

Andando più nel dettaglio, tra i 29 pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica, 18 hanno remissione del diabete, mentre 11 pazienti sono ancora diabetici ad un anno dall'operazione. I dati sono riportati nella tabella 4.5.

Prima dell'intervento, tra le due popolazioni si osserva una significativa differenza per quanto riguarda la percentuale di emoglobina glicata nel sangue ( $P = 0,0016$ ) e la sensibilità al glucosio delle cellule  $\beta$  ( $P = 0,0060$ ), ma soprattutto coloro che non mostrano remissione del T2D sono affetti dalla patologia da un tempo significativamente superiore rispetto a coloro che hanno remissione del diabete ( $P = 0,0005$ ), mentre non ci sono differenze significative in riferimento agli altri parametri analizzati.

Ad un anno dall'intervento è interessante notare che in entrambi i gruppi di soggetti è significativa la riduzione del BMI ( $P < 0,0001$ ), mentre i miglioramenti dei parametri del metabolismo glucidico sono maggiori nei pazienti che mostrano remissione del diabete di tipo 2.

Tuttavia anche nei soggetti che non hanno remissione del diabete si registra un cambiamento favorevole nei valori dei parametri glucidici, in particolare tra i più significativi si evidenzia una diminuzione dell'HbA1c [mediana (25°-75°percentile), P value, T0: 9,20 (7,50-10,50) %, T365: 7,50 (6,70-7,80) %,  $P = 0,0071$ ] e il miglioramento della sensibilità al glucosio delle cellule  $\beta$  [T0: 11,21 (6,81-17,70) pmol/min\*m<sup>2</sup>\*mM, T365: 18,45 (13,19-39,72) pmol/min\*m<sup>2</sup>\*mM,  $P = 0,0115$ ].

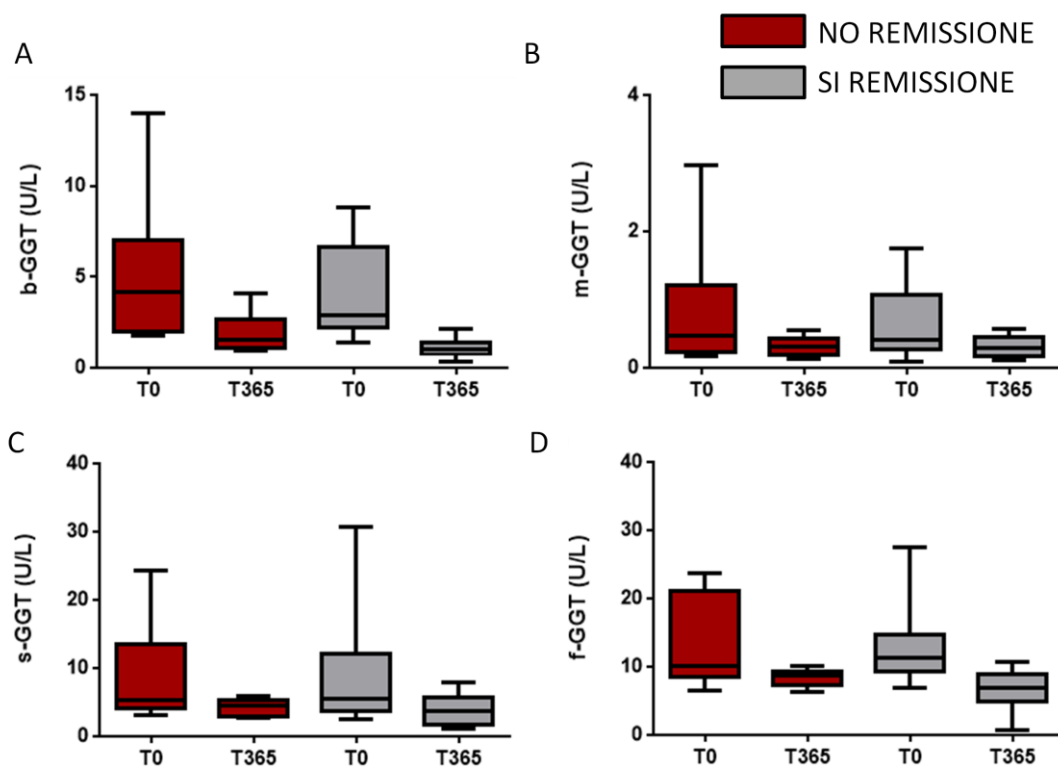
Per quanto riguarda i valori di attività della GGT, nelle due popolazioni, prima dell'intervento, non si osserva una significativa differenza nell'attività di GGT e delle sue frazioni. Tuttavia ad un anno dall'intervento è significativa la diminuzione dell'attività di GGT totale e della frazione b-GGT nei pazienti con remissione di diabete ( $P < 0,0001$ ), ciò potrebbe evidenziare una possibile relazione tra i parametri del metabolismo glucidico e la frazione b-GGT, legame che verrà ulteriormente analizzato. Ad ulteriore conferma di ciò, si nota che nei pazienti che non mostrano remissione del diabete la diminuzione dell'attività di GGT totale e della frazione b-GGT è meno importante (GGT:  $P = 0,0287$ , b-GGT:  $P = 0,0300$ ). Inoltre è significativa la differenza tra i valori di b-GGT, nei due gruppi, ad un anno dall'operazione ( $P = 0,0175$ ) (Figura 4.9).



**Tabella 4.5:** Confronto dei parametri associati a diabete e insulino-resistenza e dell'attività di GGT totale e delle sue frazioni in pazienti con diabete in remissione e non in remissione prima (T0) e dopo un anno (T365) dall'intervento di chirurgia bariatrica

	DIABETE NON IN REMISSIONE			DIABETE IN REMISSIONE			T TEST	
	T0 mediana (25-75 perc)	T365 mediana (25-75 perc)	T test P value	T0 mediana (25-75 perc)	T365 mediana (25-75 perc)	T test P value	T0 P value	T365 P value
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	38,89 (36,33-43,26)	31,55 (29,21-32,87)	P<0,0001	43,96 (39,42-50,27)	29,40 (26,69-34,63)	P<0,0001	n.s	n.s
<b>HbA1c (%)</b>	9,20 (7,50-10,50)	7,50 (6,70-7,80)	0,0071	6,80 (6,28-7,95)	5,90 (5,45-6,15)	0,0002	0,0016	< 0,0001
<b>Glicemia basale (mg/dl)</b>	165,00 (126,00-197,00)	118,00 (105,00-151,00)	n.s	127,50 (114,50-146,50)	94,00 (86,00-100,00)	P<0,0001	n.s	0,0002
<b>Sens, gluc, cell, β*</b>	11,21 (6,81-17,70)	18,45 (13,19-39,72)	0,0115	26,25 (12,87-56,71)	64,43 (26,17-93,99)	0,0058	0,0060	0,0010
<b>Insulinemia basale (μU/mL)</b>	15,05 (8,40-27,50)	10,87 (7,28-14,80)	0,0330	17,87 (14,29-26,00)	7,45 (5,25-9,96)	P<0,0001	n.s	n.s
<b>Clearance insulina (ml/min)</b>	0,83 (0,49-1,60)	1,12 (0,63-1,63)	0,0285	0,67(0,42-1,15)	1,19 (1,00-1,60)	0,0048	n.s	n.s
<b>OGIS 120 (ml/min*m<sup>2</sup>)</b>	249,00 (228,00-316,00)	329,00 (248,00-365,00)	n.s	293,50 (262,00-317,00)	404,00 (386,30-455,80)	P<0,0001	n.s	0,0001
<b>Durata diabete (anni)</b>	10,00 (9,00-15,00)			4,50 (2,00-7,00)			0,0005	
<b>GGT (U/L)</b>	22,13 (16,09-41,50)	14,03 (12,18-17,58)	0,0287	21,11 (17,25-34,37)	12,53 (8,02-16,09)	P<0,0001	n.s	n.s
<b>B-GGT (U/L)</b>	4,17 (1,980-7,000)	1,54 (1,11-2,65)	0,0300	2,89 (2,18-6,65)	1,01 (0,74-1,37)	P<0,0001	n,s	0,0175
<b>M-GGT (U/L)</b>	0,46 (0,2300-1,200)	0,32 (0,18-0,43)	n.s	0,42 (0,260-1,07)	0,30 (0,17-0,45)	0,0018	n.s	n.s
<b>S-GGT (U/L)</b>	5,31 (4,040-13,45)	4,55 (2,97-5,37)	0,0346	5,45 (3,61-12,01)	3,78 (1,63-5,78)	0,0009	n.s	n.s
<b>F-GGT (U/L)</b>	10,17 (8,430-21,11)	8,72 (7,40-9,29)	0,0424	11,40 (9,39-14,72)	6,89 (4,83-8,96)	0,0012	n.s	n.s

Per confrontare i parametri a T0 e T365 dei soggetti con diabete in remissione e i parametri a T0 e T365 dei soggetti con diabete non in remissione è stato eseguito un test t di Student per dati appaiati. Per confrontare i parametri a T0 dei soggetti con diabete in remissione e diabete non in remissione, così come per il confronto a T365, è stato utilizzato il test t di Student per dati non appaiati. Entrambi i test sono stati eseguiti su valori trasformati con la funzione ln. n.s = valore non significativo. \*unità di misura: pmol/min\*m<sup>2</sup>\*mM



**Figura 4.9:** Confronto tra l'andamento dell'attività delle singole frazioni di GGT prima (T0) e dopo un anno (T365) dall'intervento di chirurgia bariatrica in pazienti che non mostrano remissione del diabete (rosso) e pazienti che hanno remissione del diabete (grigio). In ogni figura sono mostrati la mediana, il valore minimo e il valore massimo della distribuzione. A:andamento b-GGT; B: andamento m-GGT; C: andamento s-GGT; D: andamento f-GGT.

#### 4.5 Analisi di correlazione tra l'attività di GGT totale e delle sue frazioni e i valori delle variabili cliniche

Dall'analisi di correlazione, riportata in tabella 4.6, calcolando il coefficiente  $r$  di Spearman, emerge che la frazione b-GGT è quella che correla maggiormente e positivamente con il BMI [ $r = 0,5033$ ], con la percentuale di HbA1c [ $r = 0,5690$ ], con la glicemia basale [ $r = 0,4999$ ] e con l'insulinemia basale [ $r = 0,5609$ ], mentre negativamente con la sensibilità al glucosio delle cellule  $\beta$  [ $r = -0,3337$ ], con il parametro OGIS 120 [ $r = -0,5473$ ] e con la clearance dell'insulina [ $r = -0,2602$ ]. Quindi emerge ulteriormente il legame tra la frazione b-GGT e i parametri del metabolismo glucidico. Inoltre b-GGT correla con gli indici che sono associati alla diagnosi di sindrome metabolica, come la concentrazione plasmatica dei trigliceridi [ $r = 0,3791$ ] e la concentrazione delle HDL [ $r = -0,2718$ ].

Per quanto riguarda le altre frazioni, m-GGT correla positivamente, ma in misura minore rispetto a b-GGT con il BMI [ $r = 0,3667$ ], e con l'insulinemia basale [ $r = 0,3751$ ].

Sebbene tutte le frazioni di GGT correlino positivamente con la concentrazione plasmatica delle ALT, è la frazione s-GGT quella che correla maggiormente con essa [ $r = 0,4102$ ].

La frazione f-GGT correla maggiormente e positivamente con il BMI [ $r = 0,4953$ ], con la concentrazione dei trigliceridi [ $r = 0,4068$ ], con l'insulinemia basale [ $r = 0,6200$ ], mentre negativamente con il parametro OGIS 120 [ $r = -0,3583$ ].

Infine per quanto riguarda l'attività di GGT totale, essa correla positivamente con il BMI [ $r = 0,5034$ ], con la concentrazione plasmatica dei trigliceridi [ $r = 0,4415$ ] e delle ALT [ $r = 0,4102$ ], con la percentuale di HbA1c [ $r = 0,4584$ ], con la glicemia basale [ $r = 0,4584$ ], con l'insulinemia basale [ $r = 0,5688$ ], mentre negativamente con il parametro OGIS 120 [ $r = -0,4412$ ], con la clearance dell'insulina [ $r = -0,2312$ ] e con la concentrazione delle HDL [ $r = -0,2627$ ].

**Tabella 4.6:** Coefficienti di correlazione di Spearman tra l'attività di GGT totale e delle sue frazioni e alcuni parametri clinici

	<b>R Spearman</b>				
	<b>GGT</b>	<b>b-GGT</b>	<b>m-GGT</b>	<b>s-GGT</b>	<b>f-GGT</b>
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	0,5034	0,5033	0,3667	0,3372	0,4953
<b>Trigliceridi (mg/dl)</b>	0,4415	0,3791	0,3021	0,2441	0,4068
<b>HDL (mg/dl)</b>	-0,2627	-0,2718	n.s	n.s	n.s
<b>ALT (U/L)</b>	0,4102	0,3515	0,3585	0,4102	0,2610
<b>Pressione diastolica (mmHg)</b>	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
<b>Durata diabete (anni)</b>	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
<b>HbA1c (%)</b>	0,4584	0,5690	n.s	0,3299	0,3173
<b>Glicemia basale (mg/dl)</b>	0,3822	0,4999	n.s	0,2557	0,3089
<b>Insulinemia basale (μU/mL)</b>	0,5688	0,5609	0,3751	0,3010	0,6200
<b>Sensibilità al glucosio delle cellule β (pmol/min*m<sup>2</sup>*mM)</b>	n.s	-0,3337	n.s	n.s	n.s
<b>Clearance insulina (ml/min)</b>	-0,2312	-0,2602	n.s	n.s	-0,2771
<b>OGIS 120 (ml/min*m<sup>2</sup>)</b>	-0,4412	-0,5473	-0,2811	-0,3339	-0,3583

## **Capitolo 5: Discussione dei risultati**

Già ad un anno dall'intervento, nei pazienti diabetici sottoposti a interventi di chirurgia bariatrica si osserva, in parallelo alla perdita di peso, un netto miglioramento del metabolismo glucidico, tale da determinare in alcuni soggetti una remissione totale del diabete di tipo 2. Recentemente Shauer e collaboratori hanno affermato, infatti, che circa il 30% dei pazienti con diabete di tipo 2 interrompe il trattamento farmacologico dopo l'intervento di chirurgia bariatrica. Numerose ipotesi sono state fatte per spiegare il miglioramento nel controllo glicemico, ma nessuna è stata fino ad ora dimostrata. Inoltre, in seguito all'operazione, si ottiene un miglioramento della funzionalità epatica, grazie alla riduzione dei livelli di steatosi.

È bene però sottolineare, che per la riuscita dell'intervento, è fondamentale l'impegno del paziente stesso a rispettare e condurre una dieta alimentare sana ed equilibrata. Dall'analisi dei risultati emerge che il valore del BMI prima dell'intervento (T0) non permette di discriminare i pazienti che successivamente mostreranno remissione del diabete di tipo 2 da coloro che non avranno remissione della patologia. Infatti il BMI ha valori maggiori nei primi [43,96 (39,42-50,27)  $\text{kg}/\text{m}^2$ ], rispetto ai secondi [38,89 (36,33-43,26)  $\text{kg}/\text{m}^2$ ], mentre la percentuale di emoglobina glicata e i valori di glicemia basale sono più elevati in coloro che non avranno remissione del diabete di tipo 2 rispetto a quelli con remissione. Inoltre il miglioramento dei parametri del metabolismo glucidico è ovviamente più significativo nei soggetti con remissione del diabete di tipo 2 (vedere paragrafo 4.4). Tuttavia il parametro che discrimina maggiormente i soggetti che hanno avuto remissione del diabete e i soggetti senza remissione è la durata della patologia. Infatti un alterato metabolismo glucidico, che perdura da un tempo maggiore, comporta una superiore condizione di esaurimento per le cellule  $\beta$  del pancreas, testimoniata dalla loro ridotta sensibilità al glucosio e, di conseguenza, un loro recupero risulterà più difficoltoso. Questo risultato è in accordo con quanto già affermato nel 2011 da Nannipieri e collaboratori nel cui studio dimostrarono che la remissione del diabete è indipendente dalla perdita di peso dei soggetti, e posero l'attenzione in particolare allo "stato di salute" delle cellule  $\beta$  del pancreas che producono insulina. Infatti affermarono che peggiore è la disfunzione delle cellule  $\beta$ , soprattutto nella sensibilità al glucosio, e minore è la probabilità che l'intervento di chirurgia bariatrica possa portare a una remissione della patologia diabetica. Questo concetto, comunque,

non vale solo per l'operazione chirurgica, ma può essere esteso anche alla riuscita e ai possibili benefici dei trattamenti farmacologici.

È ormai noto il valore predittivo della GGT sierica rispetto allo sviluppo di insulino-resistenza e di diabete di tipo 2, in quanto confermato in ripetuti studi su diverse popolazioni, tanto è vero che il rischio di ammalarsi di diabete aumenta progressivamente con i valori di GGT e questa associazione diventa più forte all'aumentare del BMI [Lim et al., 2007].

I risultati ottenuti in questa tesi concordano con i numerosi studi presenti in letteratura, infatti i valori di attività di GGT nei pazienti diabetici diminuiscono notevolmente ad un anno dall'intervento di chirurgia bariatrica, in concomitanza con la remissione della patologia diabetica (vedere paragrafo 4.2). Una possibile spiegazione può essere dovuta al fatto che la GGT è un marcatore di stress ossidativo [Lee et al., 2004] e sia studi sperimentali che test clinici evidenziano che lo stress ossidativo gioca un ruolo importante nella patogenesi del T2D e delle sue complicazioni [Ceriello et al., 2004]. Inoltre l'aumentato stress ossidativo che si osserva nell'obesità è un importante meccanismo associato all'insorgenza della sindrome metabolica [Furukawa et al., 2004]. Pertanto, se la GGT sierica all'interno dell'intervallo di valori fisiologici, è un marcatore di stress ossidativo, la correlazione tra i livelli dell'enzima e l'obesità potrebbe essere biologicamente plausibile.

La particolarità di questo studio, ovvero il fatto di comprendere pazienti obesi e diabetici sottoposti a un intervento chirurgico che comporta perdita di peso e miglioramento generale dei parametri clinici, ha permesso di indagare la possibile relazione tra i parametri del metabolismo glucidico e le frazioni plasmatiche di GGT. In particolare è emerso che la frazione plasmatica b-GGT è quella che correla maggiormente, rispetto alle altre frazioni e anche alla GGT totale, con gli indici che descrivono il metabolismo glucidico, soprattutto positivamente con il BMI, con la percentuale di emoglobina glicata, con la glicemia basale e con l'insulinemia basale, mentre negativamente con la sensibilità al glucosio delle cellule  $\beta$  e con il parametro OGIS 120, quindi un aumento della frazione b-GGT sembrerebbe essere associato a un peggioramento della condizione metabolica e glucidica, mentre la sua diminuzione potrebbe essere indicativa di un miglioramento (vedere paragrafo 4.5). Inoltre è interessante notare che la frazione b-GGT è l'unica frazione che correla con l'indice di

funzionalità delle cellule  $\beta$  pancreatiche, ovvero con la sensibilità al glucosio delle cellule  $\beta$ .

Questi risultati concordano con le precedenti evidenze che la frazione b-GGT è quella maggiormente sensibile e specifica per la diagnosi di steatosi epatica non alcolica (NAFLD) [Franzini et al., 2011]. Infatti NAFLD è ora considerata come la manifestazione epatica della sindrome metabolica, associata ad insulino-resistenza, diabete di tipo 2, dislipidemia [De Alwis et al., 2008] e aumentato rischio di eventi cardiovascolari [Lee et al., 2007]. La stretta associazione tra NAFLD e la ridotta sensibilità all'insulina (misurata mediante "clamp" euglicemico-iperinsulinemico) è stata verificata in uno studio condotto su 30 pazienti aventi NAFLD accertata tramite biopsia epatica. In questi soggetti è stata osservata una ridotta influenza dell'insulina sul metabolismo glucidico e lipidico indipendentemente dal peso e dagli indici di tolleranza al glucosio; ciò potrebbe derivare dal danno epatico stesso come è stato dimostrato nei pazienti affetti da cirrosi [Marchesini et al., 2001].

Inoltre la diminuzione della sensibilità insulinica potrebbe coinvolgere il metabolismo lipidico, in quanto elevati livelli di trigliceridi e di acidi grassi liberi nel sangue sono stati associati a NAFLD [Marchesini et al., 1999].

Infatti NAFLD è associato anche ad un aumento delle AST, delle ALT e dei trigliceridi. I risultati emersi in questa tesi sono concordi con quanto appena detto, poichè in seguito all'analisi statistica dell'andamento delle frazioni di GGT e delle transaminasi nei tre gruppi di pazienti, suddivisi in base al livello di steatosi diagnosticata prima dell'intervento, si è osservato in particolare un aumento dell'attività della frazione b-GGT e delle concentrazioni plasmatiche delle ALT e delle AST nei soggetti con steatosi rispetto a coloro non affetti da steatosi (vedere paragrafo 4.2-4.3).

Un'ulteriore conferma che b-GGT e le transaminasi descrivano la funzionalità epatica è il fatto che ci sia un innalzamento dei loro valori a 15 giorni dall'intervento, in concomitanza della dieta ipocalorica (1200 kcal) che i pazienti devono seguire per 30 giorni e che comporta la mobilitazione di acidi grassi dal tessuto adiposo fino a quando non viene trovato un nuovo equilibrio metabolico.

In conclusione, come riportato in letteratura, è emersa l'associazione tra la maggiore attività di GGT totale, all'interno del range fisiologico dei valori, e il rischio di alterata glicemia a digiuno, considerato uno stato pre diabetico. Questo legame diventa più forte all'aumentare del BMI [Hong et al., 2014]. Tuttavia, in base ai dati raccolti in questo

studio, si può affermare che è la frazione b-GGT l'indice principale che descrive un'alterata condizione glicemica nel paziente e che concorre all'aumento dell'attività enzimatica, probabilmente in seguito al suo rilascio dalle membrane cellulari. Quindi si evidenzia ulteriormente il ruolo di b-GGT come marcatore del metabolismo epatico e dell'accumulo di trigliceridi nel fegato (NAFLD), che può essere dovuto alla condizione di insulino-resistenza, la causa principale di insorgenza di diabete di tipo 2. Quindi b-GGT potrebbe svolgere un ruolo patogenetico nella manifestazione della patologia diabetica.

Inoltre, in base ai risultati trovati, si deve sottolineare l'aumento della frazione s-GGT, in parallelo all'incremento della b-GGT, nei pazienti con diagnosi di steatoepatite, ovvero una condizione patologica caratterizzata non solo dall'accumulo di grasso intraepatico, ma anche dalla presenza di uno stato infiammatorio e lesioni a carico del fegato. Quindi s-GGT, che si ricorda essere la frazione che mostra le correlazioni maggiori con le transaminasi anche in questo studio, è l'indice che meglio descrive una situazione di danno epatico. Infatti nei pazienti con steatoepatite, diversamente dai pazienti affetti da semplice steatosi, è evidente non solo l'aumento della b-GGT, ma anche della frazione s-GGT.

Attualmente è in corso la raccolta di una casistica analoga, ma costituita da pazienti obesi non diabetici, per verificare l'andamento delle frazioni di GGT sempre in relazione ai parametri del metabolismo glucidico durante il periodo di recupero post intervento. Si potrebbe effettuare un confronto tra le due popolazioni in modo da verificare il peso di b-GGT, come marcatore di metabolismo epatico e il suo eventuale ruolo nell'insorgenza della patologia diabetica.



## Riferimenti bibliografici

Accatino L, Pizarro M, Soli's N, et al. Association of canalicular membrane enzymes with bile acid micelles and lipid aggregates in human and rat bile. *Biochim Biophys Acta* 1995, 1243: 33–42.

Airaksinen R, Rantakokko P, Eriksson JG, et al. Association between type 2 diabetes and exposure to persistent organic pollutants. *Diabetes Care* 2011, 34:1972–1979.

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, et al. International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640-1645.

Allen S, Dashwood M, Morrison K, et al. Differential leukotriene constrictor responses in human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 1998;97:2406-13.

Allison RD. Gamma-glutamyl transpeptidase: kinetics and mechanism. *Methods Enzymol* 1985;113:419-37.

American Diabetes Association. Tests of glycemia in diabetes (position statement). *Diabetes Care*. 2002;25(suppl 1):S97–S99.

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

Asaba Y, Hiramatsu K, Matsui Y, et al. Urinary gamma-glutamyltransferase (GGT) as a potential marker of bone resorption. *Bone*. 2006;39:1276-1282.

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;385:640-4.

Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006; 6. 33-39.

Bedogni G, Miglioli L, Masutti F et al. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005; 42: 44-52.

Bellini M, Tumino E, Giordani R, et al. Serum  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase isoforms in alcoholic liver disease. *Alcohol and Alcoholism* 1997;32:259-66.

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

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

Bolodeoku JA, Ganotakis ES, Mikhailidis DP, et al. Correlation between serum  $\gamma$ -glutamyltransferase activity and the platelet count. *Platelets* 1997;8:333-5.

Borud O, Mortensen B, Mikkelsen IM, et al. 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, et al. 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, et al. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* 1995;378:416-9.

Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V, et al. Distribution, determinants, and prognostic value of gammaglutamyltranspeptidase for all-cause mortality in a cohort of construction workers from south Germany. *Prev Med* 1997;26:305-10.

Bulle F, Mattei MG, Siegrist S, et al. Assignment of the human gamma-glutamyl transferase gene to the long arm of chromosome 22. *Hum Genet* 1987;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, et al. Kinetic characterization and identification of the acylation and glycosylation sites of recombinant human gammaglutamyltranspeptidase. *Biochemistry* 2007;46:12253-62.

Ceriello A, Motz E: Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24:816-823.

Chang HP, Liang WC, Lyu RC, et al. Effects of C-terminal truncation on autocatalytic processing of *Bacillus licheniformis* gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry (Mosc)* 2010, 75(7):919-929.

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

Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 2009, 19: 43-51.

Cole SP, Deeley RG. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:438-46.

Collins JE, Mungall A.J, Badcock KL, et al. The organization of the gamma-glutamyl transferase genes and other low copy repeats in human chromosome 22q11. *Genome Res* 1997;7:522-31.

Corti A, Paolicchi A, Franzini M, et al. 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* 2005;7:911-18.

Corti A, Raggi C, Franzini M, et al. Plasma membrane gamma-glutamyltransferase activity facilitates the uptake of vitamin C in melanoma cells. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1906-15.

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

Das SK, Dhanya L, Vasudevan DM. Biomarkers of alcoholism: an updated review. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68: 81–92.

Daubeuf S, Accaoui MJ, Pettersen I, et al. 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, et al.. Phorbol ester regulation of the human gamma-glutamyltransferase gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313(2):300-307.

De Alwis NM, Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J Hepatol* 2008; 48 (Suppl.1): S104-12.

Dominici R, Infusino I, Valente C, et al. Plasma or serum samples: measurements of cardiac troponin T and other analytes compared. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:945-51.

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

Dominici S, Pieri L, Paolicchi A, et al. Endogenous oxidative stress induces distinct redox forms of tumor necrosis factor receptor-1 in melanoma cells. *Ann NY Acad Sci* 2004;1030:62-8.

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

Evjen G, Huseby NE. Characterization of the carbohydrate moiety of human gamma-glutamyltransferases using lectin-blotting and glycosidase treatment. *Clin Chim Acta* 1992;209:27-34.

Ferrannini E. Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin- dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev*. 1998;19:477–490.

Fierbinteanu-Braticcevi C, Dina I, Petrisor A et al. Non-invasive investigations for non alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4784-91.

Figlewicz DA, Delattre O, Guellaen G, et al. Mapping of human gamma-glutamyl transpeptidase genes on chromosome 22 and other human autosomes. *Genomics* 1993;17:299-305.

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

Fornaciari I, Fierabracci V, Corti A, et al. Gamma-glutamyltransferase fractions in human plasma and bile: characteristic and biogenesis. *PLoS One*. 2014, 12;9(2):e88532.

Foyer CH, Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 2005, 17(7):1866–1875.

Franzini M, Bramanti E, Ottaviano V, et al. A high performance gel filtration chromatography method for  $\gamma$ -glutamyltransferase fraction analysis. *Anal Biochem* 2008;374:1-6.

Franzini M, Corti A, Fornaciari I, et al. Cultured human cells release soluble gamma-glutamyltransferase complexes corresponding to the plasma b-GGT. *Biomarkers* 2009;14:486-92.

Franzini M, Passino C, Ottaviano V, et al. Fractions of plasma gamma-glutamyltransferase in healthy individuals: Reference values. *Clin Chim Acta* 2008;395:188-9.

Franzini M, Fornaciari I, Fierabracci V, et al. Accuracy of b-GGT fraction for the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver int.* 2012, 32:629-34.

Fraser A, Ebrahim S, Smith GD, et al. A comparison of associations of alanine aminotransferase and gammaglutamyltransferase with fasting glucose, fasting insulin, and glycated hemoglobin in women with and without diabetes. *Hepatology* 2007;46:158-65.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004, 114:1752–1761.

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

Gasull M, Pumarega J, Tellez-Plaza M, et al. Blood concentrations of persistent organic pollutants and prediabetes and diabetes in the general population of Catalonia. *Environ Sci Technol* 2012, 46:7799–7810.

Gellerstedt M, Hyltoft Petersen P. Partitioning reference values for several subpopulations using cluster analysis. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1026-32.

Gellerstedt M. Partitioning reference values of several Gaussian subpopulations with unequal prevalence – a procedure with computer program support. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1258-63.

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

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

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

Goodman SI, Mace JW, Pollack S. Serum gamma-glutamyl transpeptidase deficiency. *Lancet* 1971; 1: 234–5

Gregg EW, Cadwell BL, Cheng YJ, et al. Trends in the prevalence and ratio of diagnosed to undiagnosed diabetes according to obesity levels in the U.S. *Diabetes Care* 2004, 27:2806–2812.

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

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

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

Grundy SM. Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:399–404.

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

Hammond JW, Potter M, Sim KG, et al. Reduced glutathione, gamma-glutamylcysteine, cysteine and gamma-glutamylglutamine in gamma-glutamyltransferase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1999; 22: 235–9.

Hammond JW, Potter M, Wilcken B, et al. Siblings with gamma-glutamyltransferase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1995; 18: 82–3.

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

Hanzal-Bayer MF, Hancock JF Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett* 2007, 581: 2098–104.

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

Haring R, Wallaschofski H, Nauk M et al. Ultrasonographic hepatic steatosis increases prediction of mortality risk from elevated serum gamma-glutamyl transpeptidase levels. *Hepatology* 2009; 50: 1403-11.

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

Heisterkamp N, Groffen J, Warburton D, et al. The human gamma-glutamyltransferase gene family. *Hum Genet* 2008;123:321-32.

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

Hiramatsu K, Asaba Y, Takeshita S, et al. Overexpression of gamma-glutamyltransferase in transgenic mice accelerates bone resorption and causes osteoporosis. *Endocrinology* 2007;148:2708-15.

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

Hong NS, Kim JG, Lee YM, et al. Different associations between obesity and impaired fasting glucose depending on serum gamma-glutamyltransferase levels within normal range: a cross-sectional study. *BMC Endocr Disord.* 2014;14:57-64.

Huseby NE, Ingebretsen OC. The level of gammaglutamyltransferase in serum, effect of carbohydrate heterogeneity on clearance rate. *Scand J Clin Lab Invest* 1993;215:S93-10.

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

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

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

Ikeda Y, Fujii J, Anderson ME, et al. Involvement of Ser-451 and Ser-452 in the catalysis of human gammaglutamyl transpeptidase. *J Biol Chem* 1995;270:22223-8.

Ikeda Y, Taniguchi N. Gene expression of gammaglutamyltranspeptidase. *Methods Enzymol* 2005;401:408-25.

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

Itoh S, Nakajima M. Liver gamma-glutamyl-transferase activity in viral liver-disease. *Digestion* 1986; 33: 121-5.

Iwasaki T, Yoneda M, Kawasaki S, et al. Hepatic fat content-independent association of the serum level of gamma-glutamyltransferase with visceral adiposity, but not subcutaneous adiposity. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;79:13-4.

Jansen R, Schumann G, Baadenhuijsen H, et al. Trueness verification and traceability assessment of results from commercial systems for measurement of six enzyme activities in serum. An international study in the EC4 framework of the Calibration 2000 project. *Clin Chim Acta* 2006;368:160-7.

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

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

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

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

Knickelbein RG, Ingbar DH, Seres T, et al. 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. Glutathione-degrading enzymes of microvillus membranes. *J Biol Chem* 1982;257:6322-7.

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

Laposata Michael. Medicina di laboratorio: la diagnosi di malattia nel laboratorio clinico. *Piccin*, 2012.

Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 339-50.

Lee DH, Blomhoff R, Jacobs DR. Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radical Res* 2004, 38:535–539.

Lee DH, Ha MH, Kim JH, et al. Gamma-glutamyltransferase and diabetes-A 4 year follow-up study. *Diabetologia* 2003;46:359-64.

Lee DH, Jacobs DR Jr, Gross M, et al. Gammaglutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Clin Chem* 2003;49:1358- 66.

Lee DH, Jacobs DR Jr: Is serum gamma-glutamyltransferase a marker of exposure to various environmental pollutants? *Free Radic Res* 2009,43:533–537.

Lee DH, Lee IK, Song K, et al. A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Examination Survey 1999-2002. *Diabetes Care* 2006, 29:1638–1644.

Lee DH, Silventoinen K, Jacobs DR Jr, et al. Gammaglutamyltransferase, obesity, and the risk of type 2 diabetes: observational cohort study among 20,158 middle-aged men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5410-4.

Lee DS, Evans JC, Robins SJ et al. Gamma glutamyltransferase and metabolic syndrome, cardiovascular disease and mortality risk: the Framingham Heart study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 127-33.

Leh H, Chikhi N, Ichino K, et al. An intronic promoter controls the expression of truncated human gammaglutamyltransferase mRNAs. *FEBS Lett* 1998;434:51-6.

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

Lieberman MW, Barrios R, Carter BZ, et al. Gammaglutamyl transpeptidase. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions? *Am J Pathol* 1995;147:1175-85.

Lieberman MW, Wiseman AL, Shi ZZ, et al. Growth retardation and cysteine deficiency in  $\gamma$  glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7923-6.

Lim JS, Lee DH, Park JY, et al. A strong interaction between serum gamma-glutamyltransferase and obesity on the risk of prevalent type 2 diabetes: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clin Chem* 2007;53:1092-8.

Lin LL, Chou PR, Hua YW, et al. Overexpression, one-step purification, and biochemical characterization of a recombinant gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus licheniformis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, 73(1):103–112.

Liu RM, Shi MM, Giulivi C, et al. 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.



Loria P, Adinolfi LE, Bellentani S et al. NAFLD Expert Committee of the Associazione Italiana per lo studio del Fegato. Practice guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease. A decalogue from the Italian Association for the Study of the Liver (AISF) Expert Committee. *Dig Liver Dis* 2010; 42: 272-82.

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

Lum G, Gambino SR. Serum gamma-glutamyltranspeptidase activity as an indicator of disease of liver, pancreas, or bone. *Clin Chem* 1972, 18:358–362

Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-50.

Marchesini G, Brizi M, Morselli Labate AM, et al. Association of non-alcoholic fatty liver disease to insulin resistance. *Am J Med*107:450 – 455, 1999.

Mari A, Pacini G, Murphy E, et al. A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care* 24; 539-548, 2001.

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

Masyuk AI, Huang BQ, Ward CJ, et al. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;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, et al. Synthesis and metabolism of leukotrienes in gamma-glutamyl transpeptidase deficiency. *J Lipid Res*. 2004;45:900–904.

McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, et al. Heterogeneity in the prevalence of risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus in obese individuals: effect of differences in insulin sensitivity. *Arch Intern Med* 2007, 167:642–648.

Meisinger C, Doring A, Schneider A, et al. Serum gammaglutamyltransferase is a predictor of incident coronary events in apparently healthy men from the general population. *Atherosclerosis* 2006;189:297-302.

Meisinger C, Löwel H, Heier M, et al. Serum gammaglutamyltransferase and risk of type 2 diabetes mellitus in men and women from the general population. *J Intern Med* 2005;258:527-35.

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, et al. 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.

Nakanishi N, Nishina K, Li W, et al. Serum gammaglutamyltransferase and development of impaired fasting glucose or type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *J Intern Med* 2003;254:287-95.

Nakanishi N, Suzuki K, Tatara K. Serum gammaglutamyltransferase and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetes Care* 2004;27:1427-32.

Nannipieri M, Baldi S, Mari A, et al. Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: mechanisms of diabetes remission and role of gut hormones. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(11):4391-9.

Nannipieri M, Mari A, Anselmino M, et al. The role of  $\beta$ -cell function and insulin sensitivity in the remission of type 2 diabetes after gastric bypass surgery. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:E1372–E1379.

Nichols TC, Guthridge JM, Karp DR, et al. Gamma-glutamyltranspeptidase, an ectoenzyme regulator of intracellular redox potential, is a component of TM4 signal transduction complexes. *Eur J Immunol* 1998, 28: 4123–9.

Niida S, Kawahara M, Ishizuka Y, et al. Gammaglutamyltranspeptidase stimulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression independent of its enzymatic activity and serves as a pathological boneresorbing factor. *J Biol Chem* 2004;279:5752-6.

Nilssen O, Førde OH, Brenn T. The Tromsø Study. Distribution and population determinants of gammaglutamyltransferase. *Am J Epidemiol* 1990;132:318-26.

O'Daley, S. An abnormal sulphhydryl compound in urine. *Irish J Med Sci* 1968, 7: 578–579.

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

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

Okada T, Suzuki H, Wada K, et al. Crystal structure of the gamma-glutamyltranspeptidase precursor protein from *Escherichia coli*. Structural changes upon autocatalytic processing and implications for the maturation mechanism. *J Biol Chem* 2007, 282(4):2433–2439.

Pandur S, Pankiv S, Johannessen M, et al. 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, et al. Radiation-induced up-regulation of gammaglutamyltransferase in colon carcinoma cells is mediated through the Ras signal transduction pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760:151-157.

Panteghini M, Bais R, van Solinge WW. Gamma-glutamyl transferase. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. St. Louis: Elsevier Saunders, 2006:612-4.

Paolicchi A, Minotti G, Tonarelli P, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent iron reduction and LDL oxidation - a potential mechanism in atherosclerosis. *J Investig Med* 1999;47:151-60.

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

Perry IJ, Wannamethee SG, Shaper AG. Prospective study of serum gamma-glutamyltransferase and risk of NIDDM. *Diabetes Care* 1998;21:732-7.

Perry IJ, Wannamethee SG, Whincup PH, et al. Serum insulin and incident coronary heart disease in middle-aged British men. *Am J Epidemiol* 1996;144:224-34.

Pieri L, Dominici S, Del Bello B, et al. Redox modulation of protein kinase/phosphatase balance in melanoma cells: the role of endogenous and gamma-glutamyltransferase-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. *Biochim Biophys Acta* 2003;1621:76-83.

Pintus F, Mascia P. Distribution and population determinants of gamma-glutamyltransferase in a random sample of Sardinian inhabitants. "ATS-Sardegna" Research Group. *Eur J Epidemiol* 1996;12:71-6.

Poikolainen K, Vartiainen E. Determinants of gammaglutamyltransferase: positive interaction with alcohol and body mass index, negative association with coffee. *Am J Epidemiol* 1997;146:1019-24.

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

Pompili M, Addolorato G, Pignataro G, et al. Evaluation of the albumin-γ-glutamyltransferase isoenzyme as a diagnostic marker of hepatocellular carcinoma complicating liver cirrhosis. *J Gastr Hep* 2003;18:288-95.

Pontieri G.M., Russo M.A, Frati L. Patologia generale: tomo II, *Piccin III edizione*, 2005.

Rantala AO, Lilja M, Kauma H, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase and the metabolic syndrome. *J Intern Med* 2000;248:230-8.

Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, et al. 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* 2002;91:470-7.

Reuter S, Schnekenburger M, Cristofanon S, et al. 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, et al. Accumulation of DNA damage in the organs of mice deficient in gammabiochimica clinica, 2009, vol. 33, n. 1 31 glutamyltranspeptidase. *Mutat Res* 2000;447:305-16.

Roomi MW, Gaal K, Yuan QX, et al. Preneoplastic liver cell foci expansion induced by thioacetamide toxicity in drug-primed mice. *Exp Mol Pathol.* 2006;81(1):8-14.

Ruttman E, Brant LJ, Concin H, et al. Gamma-glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality. An investigation in a cohort of 163, 944 Austrian adults. *Circulation* 2005; 112: 2130-7.

Ruttman E, Brant LJ, Concin H, et al.  $\Gamma$ -Glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality. An investigation in a cohort of 163,944 austrian adults. *Circulation* 2005;112:2130-7.

Sacchetti L, Castaldo G, Fortunato G, et al. Improved procedure for measuring gamma-glutamyltransferase isoenzymes in serum. *Clin Chem* 1988;34:419-22.

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

Schauer PR, Kashyap SR, Wolski K, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes. *N Engl J Med.* 2012;366:1567-1576.

Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, et al. 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;40:734-8.

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. Activity determination, kinetic analyses and isoenzyme identification of gammaglutamyltransferase in human neutrophils. *J Biochem Mol Biol* 2005;38:343-9.

Senkevich TG, White CL, Weisberg A, et al. Granek. Expression of the vaccinia virus A2.5L redox protein is required for virion morphogenesis. *Virology*. 2002;300:296-303.

Shaw LM, London JW, Petersen LE. Isolation of gammaglutamyltransferase from human liver, and comparison with the enzyme from human kidney. *Clin Chem* 1978;24:905-15.

Shaw LM, Petersen-Archer L, London JW, et al. Electrophoretic, kinetic, and immunoinhibition properties of gamma-glutamyltransferase from various tissues compared. *Clin Chem* 1980;26:1523-7.

Shaw LM, Stromme JH, London JL, et al. IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 4. IFCC method for gammaglutamyltransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:633-46.

Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, et al. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics* 2009, 6: 267–83.

Sims EA: Are there persons who are obese, but metabolically healthy? *Metabolism* 2001, 50:1499–1504.

Stark AA, Arad A, Siskindovich S, et al. Effect of pH on mutagenesis by thiols in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat Res* 1989;224:89-94.

Stark AA, Zeiger E, Pagano DA. Glutathione metabolism by gamma-glutamyltranspeptidase leads to lipid peroxidation: characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1993;14:183-9.

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

Stark AA, Zeiger E, Pagano DA. Glutathione mutagenesis in *Salmonella typhimurium* is a gamma-glutamyltranspeptidase- enhanced process involving active oxygen species. *Carcinogenesis* 1988;9:771-7.

Stievano L, Piovan E, Amadori A. C and CX3C chemokines: cell sources and physiopathological implications. *Crit Rev Immunol* 2004;24:205-28.

Storozhenko S, Belles-Boix E, Babiychuk E, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase in transgenic tobacco plants. Cellular localization, processing, and biochemical properties. *Plant Physiol* 2002;128:1109-19.

Stranges S, Trevisan M, Dorn JM, et al. Body fat distribution, liver enzymes, and risk of hypertension: evidence from the Western New York Study. *Hypertension* 2005;46:1186-93.

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

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

Szczeklik E, Orłowski M, Szewczuk A. Serum g-glutamyl transpeptidase activity in liver disease. *Gastroenterology* 1961; 41: 353–359.

Sze G, Kaplowitz N, Ookhtens M, et al. Bidirectional membrane transport of intact glutathione in Hep G2 cells. *Am J Physiol* 1993;265:G1128-34.

Taniguchi N, Ikeda Y. gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic mechanism and gene expression. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1998; 72: 239–78.

Targher G, Zoppini G, Lippi G, et al. Effect of serum gamma-glutamyltransferase and obesity on the risk of dyslipidemia and poor glycemic control in type 2 diabetic patients: cross-sectional findings from the Verona Diabetes Study. *Clin Chem* 2007;53:1867-9.

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

Thamer C, Tschritter O, Haap M, et al. Elevated serum GGT concentrations predict reduced insulin sensitivity and increased intrahepatic lipids. *Horm Metab Res* 2005;37:246-51.

Thompson GA, Meister A. Interrelationships between the binding sites for amino acids, dipeptides, and gammaglutamyl donors in gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem* 1977;252:6792-8.

Umeki S, Hisamoto N, Hara Y. Study on background factors associated with impaired glucose tolerance and/or diabetes mellitus. *Acta Endocrinol* 1989;120:729-34.

Van Barneveld T, Seidell JC, Traag N, et al. Fat distribution and gamma-glutamyl transferase in relation to serum lipids and blood pressure in 38-year old Dutch males. *Eur J Clin Nutr* 1989;43:809-18.

Visvikis A, Pawlak A, Accaoui MJ, et al. Structure of the 5' sequences of the human gamma-glutamyltransferase gene. *Eur J Biochem* 2001;268:317-25.

Wannamethee G, Ebrahim S, Shaper AG. Gammaglutamyltransferase: determinants and association with mortality from ischaemic heart disease and all causes. *Am J Epidemiol* 1995;142:699-708.

Watanabe M, Taketa K, Izumi M, et al. Association of gamma-glutamyltransferase with plasma lipoprotein and lipid-protein complex in cholestasis. *Hepato gastroenterology* 1984;31:204-7.

Wenham PR, Horn DB, Smith AF. Physical properties of gamma-glutamyltransferase in human serum. *Clin Chim Acta* 1984;141:205-18.

West MB, Chen Y, Wickham S, et al. Novel insights into eukaryotic  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase 1 from the crystal structure of the glutamate-bound human enzyme. *J Biol Chem*. 2013, 288(44):31902-13.

West MB, Wickham S, Quinalty LM, et al. Autocatalytic cleavage of human gamma-glutamyl transpeptidase is highly dependent on N-glycosylation at asparagine 95. *J Biol Chem* 2011, 286(33):28876–28888.

Weyer C, Tataranni PA, Bogardus C, et al Insulin resistance and insulin secretory dysfunction are independent predictors of worsening of glucose tolerance during each stage of type 2 diabetes development. *Diabetes Care*. 2001;24:89–94.

Whitfield JB, Zhu G, Nestler JE, et al. Genetic covariation between serum gamma-glutamyltransferase activity and cardiovascular risk factors. *Clin Chem* 2002;48:1426-31.

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

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

Yao DF, Huang ZW, Chen SZ, et al. Diagnosis of hepatocellular carcinoma by quantitative detection of hepatoma-specific bands of serum gammaglutamyltransferase. *Am J Clin Pathol* 1998;110:743-9.

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

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

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

Zhang H, Liu H, Iles KE, et al. 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.

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

## **Ringraziamenti**

Ringrazio la dott.ssa Monica Nannipieri per aver collaborato alla realizzazione di questa tesi, mettendo a disposizione i campioni dei pazienti per la determinazione dell'attività totale e delle singole frazioni di GGT e i relativi dati clinici.

Ringrazio la dott.ssa Silvia Masotti per il supporto tecnico e scientifico nell'analisi dell'attività delle frazioni dell'enzima GGT e nella stesura della presente tesi.