

γ -Glutamyltransferasi: biochimica clinica e fisiopatologia umana

Maria Franzini¹, Alessandro Corti², Chiara Mammini³

¹Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

²Dipartimento di Patologia Sperimentale Biotecnologie Mediche ed Infettivologia, Università di Pisa

³Dipartimento di Medicina Cardiovascolare, Fondazione G. Monasterio, Centro Nazionale delle Ricerche, Pisa

ABSTRACT

γ -glutamyltransferase: clinical biochemistry and human pathophysiology. Serum γ -glutamyltransferase (GGT) activity is a sensitive test of liver function, but its clinical use is limited by the low specificity. This paper reviews the biochemical characteristics and physiological functions of GGT, the aspects of serum GGT measurement and the epidemiological and biochemical evidence related to the clinical meaning of serum GGT in human pathology and the role of membrane GGT in tumors. Epidemiological studies have shown that GGT values still within the reference interval are positively associated with the risk of onset and evolution of atherosclerotic process and related diseases, such as hypertension, type II diabetes, and metabolic syndrome. The relevance of the predictive value of serum GGT has been recently increased by studies showing the association of GGT concentrations with the risk and prognosis of cancer and renal disease. Serum GGT has also been proposed as marker of exposure to environmental xenobiotics, which may directly induce oxidative stress.

L'attività di γ -glutamyltransferasi [(γ -glutamyl)-peptide amino acido: γ -glutamyltransferasi; EC 2.3.2.2; GGT] nel siero è un sensibile indicatore di epatopatia, ma il suo impiego clinico è limitato dalla scarsa specificità (1). Infatti si può osservare una marcata elevazione dell'attività sierica di GGT in caso di colestasi, steatosi, steatoepatite, epatite virale, epatocarcinoma cellulare o metastasi epatiche e abuso di alcool.

A partire dagli anni '80, è emerso che la GGT sierica, già per valori all'interno dell'intervallo di riferimento, rappresenta un fattore di rischio di mortalità per numerose e svariate cause, indipendentemente dalla presenza di malattie epatiche e dal consumo di alcool. Negli studi epidemiologici condotti fino ad oggi è stato approfondito il significato della GGT sierica nella patologia umana e dimostrato che la GGT sierica è un fattore di rischio indipendente di mortalità sia per tutte le cause che per cause vascolari legate ad aterosclerosi (infarto e ictus), insorgenza di diabete di tipo 2, di ipertensione, di sindrome metabolica e di nefropatia cronica.

Questa rassegna è suddivisa in tre sezioni. Nella prima sono discusse le caratteristiche biochimiche della GGT e le sue funzioni fisiologiche. La seconda è dedicata agli aspetti analitici e strutturali dell'attività sierica di GGT e delle sue forme molecolari. Nella terza sezione è proposto un aggiornamento dei dati epidemiologici e clinici, con particolare attenzione al ruolo della GGT sierica nel predire il rischio cardiovascolare e metabolico. E' anche discusso il ruolo della GGT di membrana nelle cellule neoplastiche e della proteina GGT come fattore promuovente il riassorbimento osseo.

BIOCHIMICA DELLA GGT

Generalità

La GGT è un enzima ampiamente diffuso e conservato nel mondo vivente, essendo presente nei batteri (2,3), nelle piante (4) e in tutto il regno animale. Nei mammiferi la GGT è una glicoproteina di membrana di tipo II, composta di una subunità pesante (380 amminoacidi, 55-62 kDa) e una leggera (189 amminoacidi, 20-30 kDa) unite da legami non covalenti. Nella porzione ammino (N)-terminale della catena pesante è presente un dominio idrofobico transmembrana che permette l'inserzione dell'enzima nella membrana cellulare; il dominio intracellulare è costituito da solo quattro amminoacidi, mentre il resto della proteina è esposto nell'ambiente extracellulare (5,6). Il sito catalitico è localizzato nella catena leggera e quindi agisce su substrati presenti all'esterno della cellula (7,8).

Mediante studi di immunostochimica è stato dimostrato che nei mammiferi la GGT è presente sulla membrana di tutte le cellule e che è preferenzialmente localizzata nei tessuti epiteliali implicati in attività secretorie e di assorbimento (9). La più elevata concentrazione di GGT è stata individuata nel rene, sulla superficie luminale delle cellule del tubulo contorto prossimale, mentre le cellule del tubulo distale e dei glomeruli ne sono praticamente prive (7). Nel fegato, la GGT è concentrata nelle cellule epiteliali delle vie biliari extraepatiche e dei canalicoli epatici. Nel pancreas, la maggiore attività di GGT è presente nelle cellule acinose. Sono GGT positive anche le cellule delle ghiandole sudoripare, delle ghiandole sottomandibolari, dei dotti galattofori, dell'epitelio bronchiale, dell'epididimo, delle

vescicole seminali e della prostata. Marcata immunoreattività è stata osservata anche sulla superficie delle cellule endoteliali del corpo ciliare, del midollo spinale, dei capillari del cervello (ad es. nel plesso corioideo) e negli astrociti che avvolgono questi ultimi. Nel cervello, la GGT sembra contribuire alla funzionalità della barriera emato-encefalica promuovendo la detossificazione di xenobiotici e il metabolismo dei leucotrieni vasoattivi (10,11). Attività di GGT è presente sulla membrana e in granuli intracitoplasmatici delle piastrine e dei leucociti (12). In particolare nei granulociti e linfociti l'aumento di espressione di GGT sulla membrana plasmatica è considerato un marcatore di differenziazione e trasformazione neoplastica (13-15). Infine, attività di GGT è presente anche nel siero, verosimilmente rilasciata dalle membrane cellulari dei parenchimi dei vari organi; di conseguenza le variazioni delle concentrazioni sieriche dell'enzima riflettono le modificazioni quantitative della sua produzione, del suo rilascio e della sua rimozione (16).

Espressione genica e biosintesi

Nel genoma umano è presente una famiglia multigenica per la GGT che include almeno 7 differenti geni mappati sul cromosoma 22 nella regione 22q11.1-q11.2 vicino ai loci BCR ("breakpoint cluster region") e IG- λ (17-19). Sequenze correlate, probabilmente pseudogeni, sono state identificate sui cromosomi 18, 19, 20 (20), 13 e 17 (21). Recentemente è stata eseguita un'analisi sistematica delle sequenze nucleotidiche riportate nella banca dati del National Institute for Biotechnology Information (NCBI) aventi un grado significativo di omologia con il gene codificante per l'enzima GGT attivo; a seguito di questo lavoro è stata proposta una nuova e unitaria nomenclatura per identificare tutti i membri della famiglia genica della GGT (21). Tra questi solo il gene GGT1 (precedentemente definito come GGT di tipo I) ha espressione ubiquitaria e dà origine ad una proteina completa con attività di GGT (21-23).

Il gene GGT1 si estende su una sequenza di almeno 32 Kb e include 20 esoni (Figura 1): i primi sette codificano la subunità pesante, l'esone otto codifica l'estremità carbossilica della subunità pesante e l'estremità amminica di quella leggera, e gli ultimi quattro esoni codificano la parte restante della subunità leggera. La regione non codificante all'estremità 5' (5'-UTR) comprende 8 esoni: 5'- VIII-VII-V-IV-VI-III-IIa-IIb-IIc-I -3' (Figura 2). Gli esoni IIa, IIb, IIc e gli esoni III e VI sono separati solo da potenziali siti di "splicing" alternativo, individuati anche alle estremità dell'introne tra gli esoni I e IIc, IIa e III. Per quanto riguarda gli esoni VIII, VII e VI è ancora da stabilire se siano trascritti a partire da diversi promotori tessuto-specifici (24,25).

I cDNA corrispondenti ai messaggeri per la GGT sono stati clonati a partire da genoteche di vari tessuti umani: placenta (26), fegato fetale (27), HepG2 (28), pancreas (29), polmone (30). Questi cDNA presentano la stessa cornice di lettura aperta ("open reading frame") (ORF) di 1706 nucleotidi (Figura 1b), mentre la regione

5'-UTR subisce un riarrangiamento tessuto-specifico, a causa di una specifica combinazione di eventi di "splicing" (25). L'ORF di 1706 nucleotidi presente nei cDNA appena citati è l'unica tradotta nell'enzima GGT completo e funzionante, ma non è l'unica generata a partire dal gene GGT1; sono stati descritti, infatti, altri due tipi di messaggeri con una ORF alterata.

Il primo messaggero alterato è stato individuato in una genoteca di fegato: un evento di "splicing" alternativo provoca l'inserzione di 22 basi, localizzate all'estremità 3' dell'introne 7 del gene GGT1 (Figura 1c), con conseguente scivolamento della cornice di lettura e inserzione di un codone di stop prematuro che riduce l'ORF a 1098 nucleotidi. Tale mRNA codificherebbe per una proteina di 39,3 kDa (366 amminoacidi), corrispondente essenzialmente alla sola subunità pesante della GGT e pertanto priva di attività di GGT, poiché il sito catalitico è localizzato nella subunità leggera. Questo messaggero alterato è stato poi trovato in altri tessuti, quali rene, cervello, intestino, stomaco, placenta, ghiandola mammaria (27).

Nel polmone e nel rene è stato identificato un altro mRNA, detto "troncato", codificato dal gene GGTL1, caratterizzato da una ORF di 675 nucleotidi che in vitro permette la sintesi di una proteina di 24 kDa, corrispondente alla subunità leggera della GGT con 36 amminoacidi N-terminali corrispondenti a quelli C-terminali della catena pesante. Questo peptide non ha attività di GGT e non è mai stato identificato in vivo (24,30). Il sequenziamento dell'introne 7 ha rivelato che la sua estremità 3' corrisponde alla regione 5'-UTR del messaggero troncato. Quest'ultima è organizzata in tre regioni (A, B, C) separate da sequenze consenso per eventi di "splicing" alternativo e infatti sono stati individuati tre diversi riarrangiamenti rappresentati dalla sola regione A, dalle regioni A, B e C e dalle regioni A e C. In particolare, la regione C contiene le 22 basi inserite nel primo tipo di mRNA alterato descritto (24,30) (Figura 1d). Sempre nella sequenza dell'introne 7 sono stati individuati una regione "TATA-like", dei potenziali siti di legame per i fattori Sp1 e per AP2 e un motivo GT omologo al core di sequenze riconosciute da molti "enhancers" (24). Studi di transfezione hanno dimostrato che la regione dell'introne 7 (circa 3,6 Kb), al 5' rispetto la prima base del mRNA troncato, ha un'alta attività promotrice in fibroblasti di polmone, mentre è silente in cellule ovariche; questi dati suggeriscono che l'attività del promotore interno nell'introne 7 del gene GGT1 sia tessuto-specifica (24).

Nel 1995, Brannigan et al. (31) hanno individuato una nuova superfamiglia di proteine raggruppate sotto il nome di "idrolasi nucleofilo N-terminale" (idrolasi-nNt). I membri di questo raggruppamento sono caratterizzati dai seguenti elementi strutturali comuni: a) sono tradotti in un unico propeptide convertito ad enzima attivo per proteolisi autocatalitica e senza perdita di amminoacidi; b) l'amminoacido della nuova estremità N-terminale, una Thr o una Ser, tramite attacco nucleofilo catalizza l'idrolisi di un legame ammidico; c) il core del sito catalitico è caratterizzato da una struttura $\alpha\beta\alpha$ nella

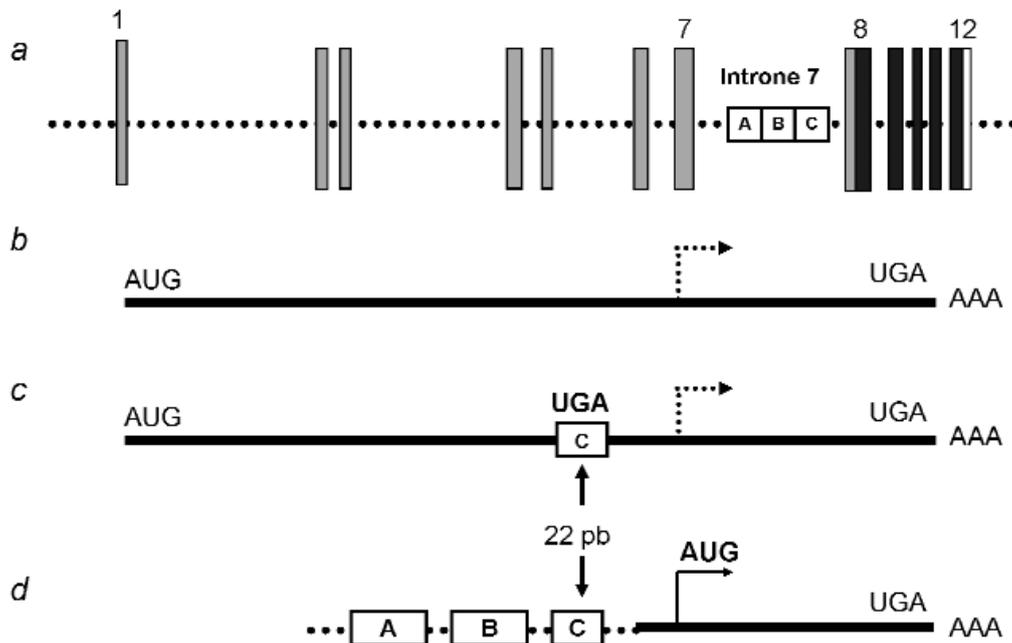


Figura 1

a) Struttura del gene GGT1 codificante per l'enzima GGT umano: in grigio chiaro sono rappresentati gli esoni codificanti la catena pesante e in grigio scuro gli esoni codificanti la subunità leggera. Nell'introne 7 sono evidenziate le sequenze A, B, C che costituiscono parte della sequenza 5'-UTR del mRNA troncato.
 b) mRNA con "open reading frame" (ORF) completa (1706 nucleotidi), codificante per l'enzima GGT attivo.
 c) mRNA alterato dall'inserzione di 22 nucleotidi.
 d) mRNA troncato trascritto dal promotore interno presente nell'introne 7.

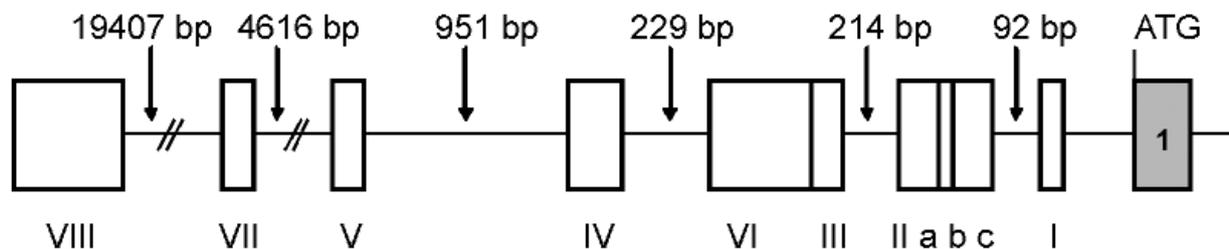


Figura 2

Struttura della regione 5'-UTR del gene GGT1.
 Con i numeri romani sono indicati gli esoni non codificanti, il rettangolo grigio rappresenta il primo esone codificante. I numeri in alto indicano la distanza, in paia di basi, tra gli esoni.

quale due β -foglietti antiparalleli sono racchiusi tra due α -eliche antiparallele. Le idrolasi-nNt non presentano invece omologie nella sequenza primaria o nella specificità di substrato (31,32). Anche la GGT appartiene a questa superfamiglia in quanto:

- a) il mRNA completo trascritto dal gene GGT1 è tradotto in un unico propeptide, traslocato nel reticolo endoplasmatico dove per proteolisi si generano due subunità (33). Il processo è autocatalitico e catalizzato dall'amminoacido Thr che costituisce la nuova estremità N-terminale. Questo amminoacido, così come quelli coinvolti nel legame enzima-substrato, è conservato nella sequenza della GGT in tutta la filogenesi (3,33-35). Il processo di autocatalisi e il ruolo della Thr N-terminale della subunità leggera sono stati

confermati per l'enzima di Escherichia coli (36,37), del ratto (33), di Helicobacter pylori (35) e dell'uomo (6);

- b) l'enzima GGT catalizza la scissione del legame ammidico presente tra il gruppo carbossile in posizione γ dell'acido glutammico e un'ammina;
- c) l'analisi strutturale del cristallo di GGT di Escherichia coli e di Helicobacter pylori, gli unici disponibili fino ad oggi, ha messo in evidenza che il core catalitico è composto dalla struttura $\alpha\beta\beta\alpha$ (3,35).

La GGT è una proteina altamente glicosilata; in base alla sequenza primaria sono state individuati sei possibili sequenze consenso (Asn-X-Ser/Thr) di N-glicosilazione (38), quattro delle quali sono stati recentemente confermate (catena pesante: Asn¹²⁰, Asn²⁶⁶ e Asn³⁴⁴;

catena leggera: Asn⁵¹¹) (6). Nella GGT purificata da rene di ratto è stato individuato anche un possibile sito di O-glicosilazione (Pro²⁷-Thr²⁸-Thr²⁹-Ser³⁰) adiacente al dominio trans-membrana della catena pesante (39). La N-glicosilazione rappresenta il 25-30% della massa totale della GGT ed è tessuto-specifica; infatti le GGT purificate dai vari organi presentano diverso PM e quindi mobilità elettroforetica, si possono distinguere per la diversa affinità per le lectine e hanno pI distinti secondo il contenuto in acido sialico (40-43). Riferendosi all'eterogeneità della glicosilazione è possibile parlare in senso lato di isoforme enzimatiche per la GGT, mentre non sono state individuate vere e proprie forme isoenzimatiche rispetto alla sequenza amminoacidica.

Il confronto tra tessuto normale e il corrispondente neoplastico ha messo in evidenza alterazioni strutturali e quantitative (diverso grado di sialidazione) della glicosilazione della GGT, specifiche per ogni tipo di tumore (44-46). In modelli sperimentali di cancerogenesi, ma non nell'uomo, è stata osservata anche la presenza di isoforme tumore-specifiche nel siero (47-49).

Meccanismo d'azione e funzioni fisiologiche

La GGT catalizza specificamente la scissione del legame γ -glutamminico (che si realizza tra il gruppo carbossile in posizione γ dell'acido glutammico ed un'ammina) e il successivo trasferimento dell'acido glutammico su un accettore. La reazione catalizzata dalla GGT procede con un meccanismo a ping-pong (50): nello stadio di acilazione il gruppo γ -glutamminico della molecola substrato è trasferito sul gruppo OH della Thr N-terminale della catena leggera ed è rilasciata l'ammina. L'intermedio acil-enzima lega una molecola accettore e, nel successivo stadio di deacilazione, l'acido glutammico è trasferito sul gruppo amminico dell'accettore con la formazione di un nuovo legame γ -glutamminico (reazione di transpeptidazione). In assenza di un accettore l'acil-enzima può reagire anche con una molecola di H₂O; in questo caso sarà liberato acido glutammico (reazione di idrolisi).

Tanto la GGT è specifica nel tipo di legame scisso, tanto è aspecifica per il substrato in quanto solo la porzione γ -glutamminica è critica per l'interazione con l'enzima GGT; perciò tutti i γ -glutamminici composti sono potenziali substrati per la GGT. I principali substrati fisiologici della GGT sono il glutatione (γ -glutamminilcisteinilglicina, GSH), il leucotriene C₄ (coniugato del GSH), i coniugati del glutatione prodotti dalla GSH-transferasi, il nistrosoglutatione.

Come molecola accettore la GGT riconosce solo L-amminoacidi (Cis, Met, Gln, Glu) o, preferenzialmente, dipeptidi; gli accettori migliori sono Cis, Met, Gln e i dipeptidi amminoacilglicina (CisGly, MetGly, GlnGly, CysGly, GlyGly) (51,52).

Sintesi intracellulare di GSH e trasporto di cisteina attraverso la membrana plasmatica

Il GSH ha molte funzioni biologiche importanti, tra cui

la coniugazione di composti elettrofili, il mantenimento del normale stato redox dell'ambiente intracellulare tramite reazioni di interscambio tiolico e azione "scavenger" dei radicali liberi; inoltre è cofattore di enzimi con funzione anti-ossidante (GSH-perossidasi, deidroascorbato reductasi GSH-dipendente). Il mantenimento della concentrazione intracellulare del GSH è quindi di fondamentale importanza per la sopravvivenza delle cellule (53).

La concentrazione intracellulare di GSH dipende dall'equilibrio che si instaura tra il suo consumo e la sua sintesi, quest'ultima regolata dall'apporto di amminoacidi costituenti. La GGT è l'unico enzima che può dare inizio alla degradazione del GSH extracellulare rendendo possibile la successiva captazione degli amminoacidi che lo compongono da parte della cellula (ciclo del γ -glutamminile). La GGT trasferisce il gruppo glutammilico del GSH su accettori amminoacidici o dipeptidici; i γ -glutamminil-amminoacidi e i γ -glutamminil-dipeptidi sono quindi trasportati all'interno della cellula dove diventano substrato dell'enzima γ -glutamminil-ciclotransferasi che li scinde nei corrispondenti amminoacidi e 5-oxoprolina, la quale può essere convertita a glutammato e usata per la sintesi del GSH intracellulare (Figura 3). Dalla reazione catalizzata dalla GGT è liberato anche il dipeptide cisteinilglicina (CysGly). Le dipeptidasi di membrana idrolizzano la CysGly a cisteina (Cys) e glicina (Gly) che, trasportate all'interno delle cellule, possono essere utilizzate per la sintesi di GSH (7,54,55). La GGT è considerata un enzima ancillare dei sistemi antiossidanti basati sul GSH: da questo punto di vista l'enzima avrebbe un ruolo protettivo contro il danno ossidativo intracellulare (56,57). Il ciclo del γ -glutamminile può essere interpretato anche come un continuo riciclo del GSH attraverso la membrana plasmatica; infatti nelle cellule di mammifero è stato documentato un efflusso continuo di GSH, secondo gradiente di concentrazione, millimolare all'interno della cellula e micromolare all'esterno (58,59).

Un'altra importante funzione del GSH è quella di trasportatore della Cys, altrimenti estremamente instabile nell'ambiente extracellulare in quanto si auto-ossida a cistina (Cis), promuovendo la generazione di specie reattive dell'ossigeno (60). La GGT promuove il recupero di Cys degradando il GSH a CysGly; inoltre la Cis è l'accettore più efficiente della reazione di transpeptidazione, perciò anche il tripeptide γ -GluCis contribuisce al recupero di Cys (Figura 3). La Cys è un substrato limitante per la sintesi del GSH, ma anche per la sintesi proteica in generale, in quanto è un amminoacido essenziale (60,61). L'importanza della GGT per il recupero della Cys extracellulare è stata dimostrata in studi con topi "knock-out" per l'espressione di GGT. Gli animali omozigoti presentano glutationuria, ridotta concentrazione di GSH cellulare e di Cys plasmatica, ritardi nella crescita, infertilità, cataratta, maggiore tasso di mutazioni geniche. Tutti questi aspetti fenotipici possono essere normalizzati tramite la somministrazione di N-acetilcisteina come fonte di Cys (62-64).

Nella funzione di recupero degli amminoacidi

costituenti il GSH o di utilizzo di questo come fonte di Cys, la GGT deve agire in concerto con altri enzimi di membrana capaci di idrolizzare il legame peptidico della CysGly. Le dipeptidasi più probabilmente coinvolte sono l'amminopetidasi-N (ApN, CD13) e la "membrane-bound dipeptidase" (MBD). L'enzima ApN è specifica per la forma ridotta di CysGly (K_m 2,5 mM), che è invece un inibitore della MBD, per la quale è un ottimo substrato la forma ossidata cistinil-bis-glicina (K_m 0,6 mM) (65). A causa dell'alta reattività del tiolo della CysGly è probabile che questa si ossidi velocemente nell'ambiente extracellulare; per questo la MBD potrebbe svolgere un ruolo prominente nel metabolismo del GSH. La coespressione tissutale della MBD e della GGT è stata studiata ad oggi solo nel topo (66): alti livelli di attività di entrambi gli enzimi sono stati riscontrati nell'epitelio del tubulo renale e dell'intestino tenue, mentre in altri tessuti (polmone, vescicole seminali, fegato fetale) l'espressione è discordante. Nel rene e nell'intestino è possibile che la GGT e la MBD siano coinvolte entrambe nel metabolismo del GSH extracellulare, mentre in altri tessuti potrebbero partecipare indipendentemente ad altri processi metabolici.

Produzione di specie reattive dell'ossigeno nell'ambiente extracellulare

L'attività enzimatica di GGT rappresenta un'arma a doppio taglio in quanto se da una parte permette un'adeguata utilizzazione degli aminoacidi costituenti il

GSH, dall'altra, in presenza di metalli di transizione quali il ferro [Fe(III)] e il rame [Cu(II)], promuove la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nell'ambiente extracellulare. L'equilibrio tra funzione anti-ossidante e pro-ossidante dipende della disponibilità di ioni metallici, in particolare di Fe(III), che promuovono la formazione di ROS.

Gli effetti pro-ossidanti della GGT dipendono dall'alta reattività del gruppo tiolico (-SH) della CysGly, che a pH fisiologico è presente in forma di anione tiolato (S^-). Quest'ultimo riduce il Fe(III) a Fe(II), generando il radicale tiile (S^{\cdot}) della CysGly. Il Fe(II), a sua volta, riduce l'ossigeno molecolare a ione superossido ($O_2^{\cdot-}$) convertito in perossido di idrogeno (H_2O_2) dall'enzima superossido dismutasi. L'anione superossido e l' H_2O_2 , in presenza di Fe(III) libero (reazione di Fenton) o chelato dall'ADP (reazione di Haber Weiss), possono generare radicali ossidrilici (Figura 4). Questi ultimi possono dare inizio alle reazioni a catena della perossidazione lipidica (67).

Anche il GSH è di per sé un riducente del complesso ADP-Fe(III), ma le proprietà chelanti del gruppo α -carbossilico dell'acido glutammico ostacolano l'interazione tra il gruppo SH della Cys e il Fe(III) (68). La rimozione del Glu da parte della GGT causa anche un abbassamento del pKa del gruppo tiolico che passa da 8,6 nel GSH a 6,4 nella CysGly, che pertanto a pH fisiologico è presente prevalentemente come anione tiolato (69). In questo modo l'azione enzimatica della GGT dà inizio ad eventi ossidativi basati sull'interazione

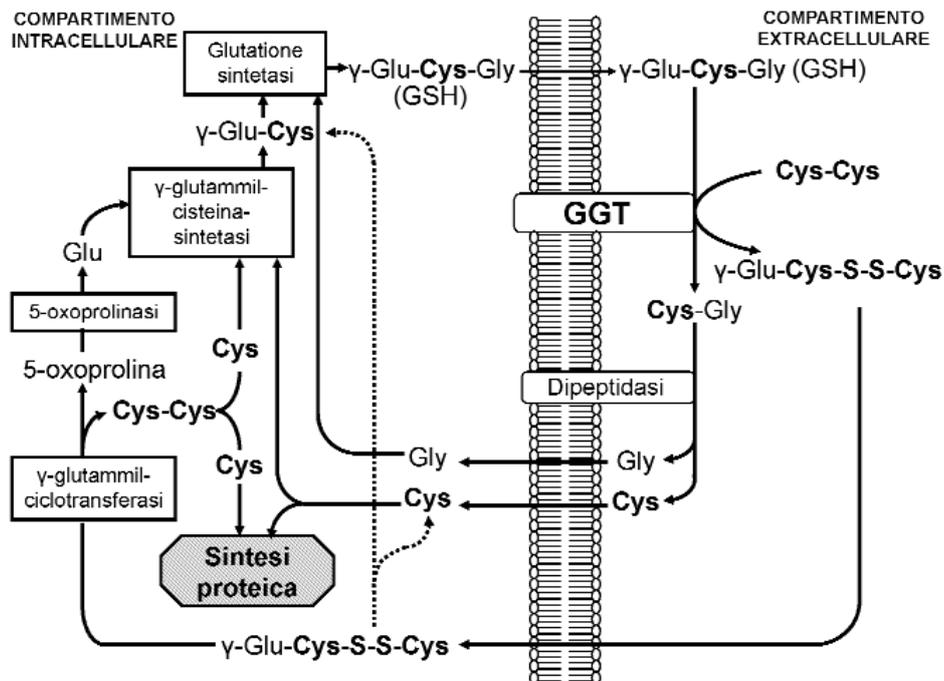


Figura 3
 Degradazione extracellulare e risintesi intracellulare di glutatione (GSH) (γ -Glu-Cys-Gly, ciclo del γ -glutammine). La GGT promuove anche il recupero di Cys extracellulare degradando il GSH a CysGly ed impiegando come accettore della reazione di transpeptidazione la L-Cis.

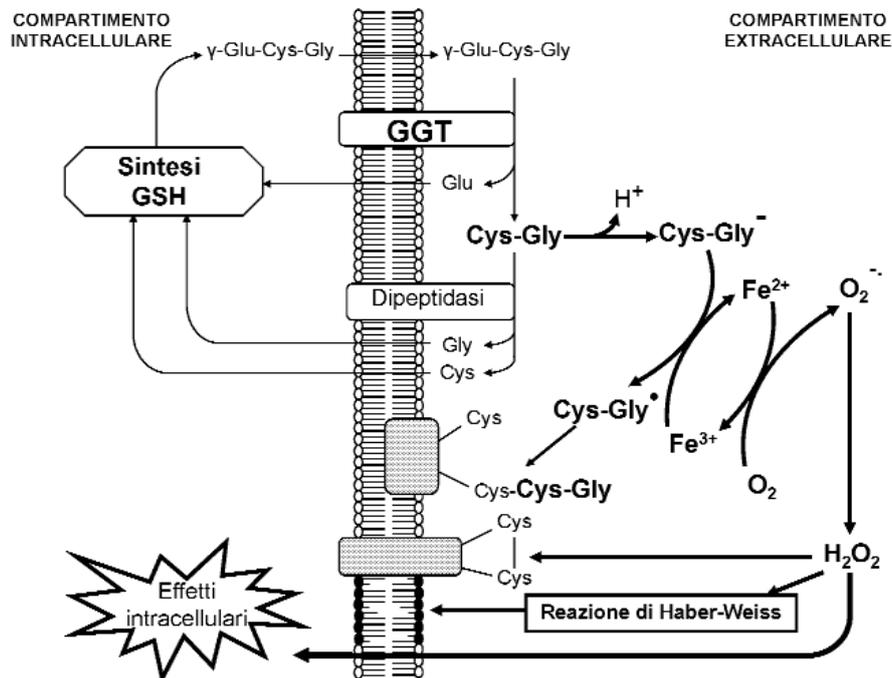


Figura 4

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., nuclear factor-kappa B, activator protein 1).

tra il Fe(III) e il residuo di cisteina del GSH; tutti questi fenomeni si svolgono all'esterno della cellula, al di fuori della portata dei sistemi di difesa anti-ossidante in essa contenuti, ma ovviamente le conseguenze si ripercuotono su tutta la cellula.

Reazioni pro-ossidanti dipendenti dall'attività di GGT sono state osservate anche in presenza di sorgenti fisiologiche di ferro, come la transferrina e la ferritina; inoltre il potere riducente della CysGly è tale da promuovere il rilascio di ioni Fe(III) redox attivi dalle proteine di accumulo sostenendo così la generazione di ROS (70-72). Il Cu(II) e la ceruloplasmina possono partecipare a questi eventi mediando il trasferimento degli elettroni dal gruppo tiolico al Fe(III) (73).

Un'eccessiva produzione di ROS da parte del catabolismo del GSH può indurre mutazioni genetiche (74,75) o innescare il processo di perossidazione lipidica, evento documentato in vitro a carico dell'acido linoleico (70), delle lipoproteine LDL isolate (68) o di cellule esponenti di per sé l'attività enzimatica (lesioni epatiche preneoplastiche, cellule epatiche isolate o cellule HepG2) (76,77).

D'altra parte a basse concentrazioni i ROS assumono la funzione di secondi messaggeri e sono in grado di modulare molti aspetti del metabolismo cellulare (78). In particolare è stato dimostrato che le reazioni pro-ossidanti conseguenti all'attività di GGT sono responsabili dell'ossidazione dei tioli esposti sulla superficie della membrana cellulare per azione del H_2O_2 (79) o in conseguenza alla formazione di ponti disolfuro

con il radicale tiile della CysGly (S-cisteinilglicilazione, 80); rappresentano uno stimolo pro-apoptotico per la linea cellulare di cancro dell'ovaio A2780, ma anti-apoptotico per la linea cellulare di linfoma istiocitario U937 (79); promuovono il legame con il DNA dei fattori di trascrizione nuclear factor-kappa B (NF-kB) e activator protein 1 (AP1) (79); attivano le Tyr-fosfatasi, mentre inibiscono l'attività delle Ser/Thr-fosfatasi (79,81); modulano lo stato di ossidoriduzione dei domini ricchi in Cys del recettore 1 per il fattore di necrosi tumorale (tumor necrosis factor receptor 1) (82).

Formazione di acidi mercapturici

La GGT interviene anche in processi di detossificazione essendo un componente della via metabolica per la sintesi di acidi mercapturici a partire da coniugati del GSH. L'enzima citosolico glutatione-S-transferasi coniuga gli xenobiotici elettrofilici con il gruppo sulfidrilico del GSH, i coniugati sono escreti dalla cellula attraverso trasportatori specifici. Nell'ambiente extracellulare il coniugato glutationico perde l'acido glutammico per l'azione della GGT ed è indirizzato nella via di formazione degli acidi mercapturici. Questi ultimi sono escreti dal sistema tubulare del rene e dal sistema duttale del fegato, caratterizzati entrambi da un'elevata attività di GGT, ed eliminati come tali rispettivamente nell'urina e nella bile durante i normali processi digestivi (83,84).

Il metabolismo dei leucotrieni

I leucotrieni (LTs) sono una classe di mediatori lipidici sintetizzati e rilasciati dai leucociti e dalle cellule di tessuti sottoposti a stimolo infiammatorio. I LTs derivano dall'acido arachidonico convertito in acido 5-idrossiperossieicosatreinoico (5-HPETE) per azione dell'enzima 5-lipossigenasi (5-LO). 5-HPETE è a sua volta convertito in LTA4 che rappresenta il precursore sia del LTB4 che dei cisteinil-LTs (LTC4, LTD4 e LTE4). Il LTC4 deriva dal LTA4 in seguito a reazione con una molecola di GSH; a sua volta è convertito in LTD4 (glicilcisteinil-LT) dall'attività enzimatica della GGT. La successiva idrolisi del residuo di Gly porta alla formazione del LTE4 (cisteinil-LT) (85).

I cisteinil-LTs, legandosi a specifici recettori sulle cellule muscolari lisce, possono indurre una prolungata broncocostrizione (86,87) e possono esercitare una potente azione vasocostrittiva sulle arterie coronarie. Alcuni autori ipotizzano che i cisteinil-LTs svolgano un ruolo attivo nella patogenesi e nelle manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi (88). In modelli animali di ischemia è stato dimostrato che inibitori dell'enzima 5-LO e antagonisti dei recettori per i cisteinil-LTs sono efficaci nel ridurre l'estensione dell'infarto e dell'aritmia indotta dalla ripercussione. Inoltre sembra che le lesioni aterosclerotiche si associno a una maggior espressione dei recettori per i cisteinil-LTs (88). Tuttavia non è ancora chiaro se i tre cisteinil-LTs condividano la stessa attività biologica, così come anche il ruolo della GGT nel processo infiammatorio è tuttora poco definito.

Il metabolismo del nitrosoglutatione

Il monossido di azoto (NO) è un importante mediatore di molte funzioni biologiche. Le più importanti sono la regolazione del tono vascolare con funzione vasodilatatrice, l'inibizione dell'aggregazione piastrinica, la funzione di neurotrasmettitore e, in quanto radicale, può agire come pro-ossidante (azione citotossica) o anti-ossidante. Gli effetti diretti del NO si esplicano nel sito di produzione della molecola stessa in quanto la sua emivita è di pochi millisecondi. Il NO può reagire anche con i gruppi tiolici di proteine (albumina, emoglobina) o con tioli a basso PM (GSH, CysGly, Cys, omocisteina) formando nell'insieme i nitrosotoli (RSNO) che rappresentano una forma di stabilizzazione e di trasporto del NO (89). In particolare, il nitrosoglutatione ha numerose attività farmacologiche sovrapponibili a quelle del NO libero (90,91).

Il nitrosoglutatione è anche un substrato per l'enzima GGT; infatti è stato dimostrato che in vitro la GGT, in presenza di GlyGly come accettore della reazione di transpeptidazione, catalizza la conversione di nitrosoglutatione in nitroso-cisteinil-glicina (CG-SNO); questa in presenza di ioni metallici di transizione si dissocia spontaneamente in Cys-Gly e NO (92). Quindi, se il nitrosoglutatione consente il trasporto del NO, l'attività di GGT potrebbe consentire l'utilizzo promuovendo la dissociazione del nitrosoglutatione. Un

possibile bersaglio potrebbero essere proprio i vasi sanguigni, in quanto la GGT è espressa dalle cellule endoteliali.

LA GGT DEL SANGUE: ASPETTI ANALITICI E STRUTTURALI

Variabili preanalitiche

L'enzima può essere determinato pressoché indifferentemente nel plasma (anticoagulante eparina o, meglio, litio eparina) e nel siero, ma il tipo di campione preferito, anche per la esecuzione del procedimento di riferimento, è il siero. Nell'analisi comparativa del siero e del plasma (da litio-eparina) è stato riscontrato un rapporto medio plasma/siero medio vicino a 0,9 ed una distribuzione non-simmetrica dei valori di tale rapporto (93). L'utilizzo di altri anticoagulanti (EDTA, citrato) è sconsigliato.

Mentre nel sangue a temperatura ambiente l'enzima è poco stabile, e si osservano abbassamenti significativi nel giro di un giorno, nel plasma e nel siero l'enzima è stabile per più anni a -20 °C e per 7 giorni a 4-8 °C oppure a 20-25 °C (94).

Numerose variabili preanalitiche di tipo biologico sono in grado di influenzare la concentrazione di attività catalitica dell'enzima nel sangue (1). Tra esse è possibile menzionare gravidanza, parto, etnia, fumo di tabacco, uso di contraccettivi orali. Età e genere hanno anche un effetto marcato, che sarà discusso nel contesto dei valori di riferimento.

Metodologia di misura

Rispetto ad altri enzimi misurati a scopo medico nel sangue, la GGT occupa una posizione "fortunata", in quanto per la sua misurazione non sono stati proposti o comunque estensivamente usati metodi capaci di fornire valori radicalmente diversi, al contrario di quanto accaduto ad esempio con la determinazione della fosfatasi alcalina o della lattato deidrogenasi.

In termini generali, la reazione catalizzata dalla GGT ha il formato:



Come "donatore" di gamma-glutammina (γ -glutamminil-x) si sono impiegati differenti substrati sintetici (95), tra i quali già inizialmente hanno incontrato particolare favore la γ -glutamminil-p-nitroanilide, che si comporta da substrato cromogenico permettendo una misurazione spettrofotometrica diretta in continuo dell'andamento della reazione, e successivamente il suo equivalente carbossilato, L- γ -glutamminil-3-carbossi-4-nitroanilide, che aggiunge il vantaggio di una maggiore solubilità, permettendo di lavorare a concentrazione prossima alla saturante.

Come "accettore" di gamma-glutammina, tra i differenti amminoacidi e peptidi, la scelta si è indirizzata verso la glicil-glicina, che ha inoltre ottimo potere

tampone ai valori di pH ottimale per l'attività dell'enzima.

Sin dagli inizi si è quindi registrata un'uniformità di metodologia analitica tra i differenti laboratori, anche utilizzando strumentazioni automatiche differenti. Inoltre, il medesimo principio analitico utilizzato nei laboratori clinici è utilizzato nel metodo di riferimento, il che contribuisce a rendere più facilmente standardizzabili i risultati delle determinazioni di routine. Nonostante questa favorevole situazione, esperimenti internazionali recenti hanno evidenziato come la situazione nella realtà non sia completamente soddisfacente e che i limiti di deviazione tollerabile, calcolati sulla base della variabilità biologica dell'enzima, sono ancora violati con una certa frequenza (96). Allo stato attuale dello sviluppo della metodologia di riferimento e in vista della disponibilità di materiali di riferimento certificati, è pensabile che un importante passo avanti nella armonizzazione dei risultati ottenuti con strumentazioni differenti possa derivare dall'applicazione del principio della riferibilità metrologica (97).

Pur riconoscendo l'esistenza di uno spazio per futuri miglioramenti, si deve osservare che, come anche accade per altri enzimi del siero misurati a scopo diagnostico, la variabilità analitica che caratterizza le misure di attività del siero è sostanzialmente dello stesso ordine di grandezza di quella riscontrata nella analisi di metaboliti non enzimatici. Per esempio, dai dati riepilogativi del programma di VEQ della Regione Lombardia (ciclo 2007; 12 sieri di differente concentrazione) si rileva che la variabilità (espressa come CV) tra i laboratori che usano lo stesso metodo (substrato donatore: L- γ -glutammina-3-carbossi-4-nitroanilide) applicato ad analizzatori differenti si attesta tra 7,5% e 8,0% per valori di concentrazione di attività catalitica nell'intervallo 100-250 U/L, salendo a valori più alti (13,6%) per valori di attività pari a 28 U/L. Se si analizzano in maniera autonoma i risultati dei laboratori che utilizzano il medesimo metodo (substrato carbossilato) applicato al medesimo analizzatore o ad analizzatori della stessa famiglia, i valori di CV per i medesimi 12 sieri scendono significativamente, risultando compresi tra 4,0% e 7,3%. In sostanza, i dati delle VEQ sono in accordo con l'ipotesi che una importante componente della variabilità inter-laboratori ancora osservata (pur con l'utilizzo del medesimo

metodo) sia attribuibile alla calibrazione. Tale componente di variabilità è quindi destinata a diminuire con la disponibilità di adatti calibratori e con l'applicazione della standardizzazione basata sul principio della riferibilità metrologica (97).

Su questo punto la IFCC è intervenuta già nel 1983 proponendo un "metodo IFCC" per la misura della attività catalitica della GGT nel siero (98). Nonostante l'impatto sul mondo laboratoristico ed il sicuro contributo dell'iniziativa alla armonizzazione dei risultati, i tempi non erano allora probabilmente maturi per capire quale via poteva in pratica essere seguita al fine di trasferire l'esattezza del metodo alla attività analitica routinaria. Successivamente, la maturazione del concetto e della prassi di "sistema di riferimento" e di riferibilità, includenti alcuni aspetti pratici ma fondamentali in enzimologia clinica, come l'adozione di una identica temperatura sia nei metodi di riferimento sia nelle condizioni di misura usuali (99,100), hanno indotto la IFCC a ridefinire nel 2002 i procedimenti primari di riferimento per la misurazione dei più importanti enzimi del siero a 37 °C, inclusa la GGT (101). I metodi descritti nel 2002 sono per lo più basati sui precedenti metodi IFCC: se ne discostano per alcuni dettagli o per alcune più accurate definizioni e, soprattutto, per l'utilizzo diffuso della temperatura di 37 °C come temperatura standard di incubazione da utilizzarsi nelle differenti modalità analitiche.

Le caratteristiche principali del metodo IFCC sono riassunte nella Tabella 1. Chiaramente è possibile applicare il metodo ai differenti modelli di analizzatore automatico, senza variane sostanzialmente le caratteristiche (inclusa la temperatura di incubazione). E' in tal modo facilitata la riferibilità dei valori misurati a quelli ottenibili con il procedimento di riferimento. Con l'uso degli analizzatori automatici, non potendo garantire l'assoluta esattezza di alcune variabili strumentali (con particolare riferimento alla lunghezza d'onda) è consigliabile che la conversione del segnale (variazione di assorbanza nel tempo) in concentrazione di attività enzimatica (in U/L o in μ kat/L) sia effettuata con l'ausilio di un calibratore commutabile, con valore assegnato mediante procedimento di riferimento (102).

Tabella 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 (da rif. 101)

Concentrazioni dei componenti*	Condizioni per la misurazione
Glicilglicina: 150 mmol/L	Temperatura: 37,0 \pm 0,1 °C; lunghezza d'onda: 410 \pm 1 nm
pH: 7,70 \pm 0,05	Banda passante: \leq 2 nm
L- γ -glutammina-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.

Valori di riferimento

Come menzionato, i valori di GGT del siero sono modulati da variabili biologiche, quali il genere e l'età dell'individuo. Di conseguenza, i valori di riferimento devono essere formulati separatamente per i due generi, regola che in realtà è quasi sempre osservata, e per differenti età o fasce di età, regola che è meno frequentemente osservata. I valori di riferimento sono in genere presentati sotto forma di un intervallo di riferimento, delimitato da un limite inferiore di riferimento (LIR) e da un limite superiore di riferimento (LSR). Per quanto riguarda molti enzimi del siero, poiché le loro variazioni patologiche sono quasi esclusivamente in aumento, il LIR ha poco significato, per cui spesso ci si limita a definire il LSR.

L'argomento dei valori di riferimento e della loro affidabilità è ulteriormente complicato dalla molteplicità delle metodologie suggerite per la loro formulazione, con particolare riguardo al reclutamento degli individui di riferimento. Per questo esistono due modelli: la selezione degli individui che rispondono a una determinata definizione (modello suggerito dalla IFCC) (103) oppure l'utilizzo di valori da banche-dati ospedaliere o di laboratorio da cui le componenti "normali" sono estratte statisticamente o mediante applicazione di criteri di esclusione/inclusione di tipo medico (104-106).

Un ulteriore punto è rappresentato dalla metododipendenza dei risultati. I valori di riferimento sono validi solo per la comparazione di osservazioni (in pazienti) effettuate con lo stesso metodo, il che sottolinea l'estrema importanza della standardizzazione metodologica anche al fine dell'uso "universale" dei valori di riferimento. Nonostante i problemi sopra menzionati, se la situazione analitica è accettabilmente sotto controllo, è possibile che con metodologie e con numerosità campionarie differenti si giunga a definire LSR per la popolazione adulta, separati per genere, sostanzialmente simili (Tabella 2).

Un secondo fattore biologico modulante la concentrazione della GGT nel siero è rappresentato dall'età. In effetti se i dati riportati da Grossi et al. (105) sono divisi in classi di età (da 2 a 87 anni, classi di 5 anni di ampiezza) i due grafici di dispersione LSR/età assumono la configurazione riportata nella Figura 5, molto simile peraltro a quella già riportata da Whitfield (1). La caratteristica variazione di GGT in funzione

dell'età è simile a quella osservata per l'alanina amminotransferasi del siero (107), prevedibile in base alla significativa correlazione osservata tra le concentrazioni dei due enzimi (105).

Sul piano pratico le variazioni del LSR della GGT in funzione dell'età non sono facilmente gestibili. Inoltre, la divisione di tutto l'arco dei valori di età in classi di uniforme ampiezza non è considerato l'approccio migliore, ma si dovrebbero individuare metodi di partizioni basati sulla individuazione statistica di sottopopolazioni gaussiane all'interno della popolazione globale (108,109). Alternativamente si può suggerire di considerare l'età come una variabile continua (come in effetti è) e calcolare l'equazione della curva di regressione che meglio si adatta ai punti sperimentali (LSR/età). In genere regressioni polinomiali di secondo o terzo ordine (quando non di primo) consentono un adattamento soddisfacente. Per l'adozione di questo modello è tuttavia necessaria un'elevata numerosità campionaria. Mediante interpolazione (considerando sempre che la curva non può essere estrapolata all'esterno dei valori sperimentali) è possibile ottenere il valore di LSR per ciascun valore di età. A titolo di esempio, le equazioni delle rette interpolanti nella Figura 5 consentono di ricavare il LSR per individui di genere femminile oppure maschile, per qualsiasi valore di età compreso tra 2 ed 87 anni.

Variabilità biologica

Come accade per le concentrazioni di tutti i componenti misurati in un liquido biologico, anche per la GGT la (relativa) stabilità di concentrazione nel sangue (punto omeostatico) è il risultato di un equilibrio dinamico tra velocità di ingresso e velocità di uscita/inattivazione. Ciascun individuo mostra un'oscillazione di concentrazione attorno al punto omeostatico (variabilità biologica intra-individuale, VB_{intra}) e un valore di punto omeostatico differente dagli altri (variabilità biologica inter-individuale, VB_{inter}). VB_{intra} e VB_{inter} sono due caratteristiche biologiche intrinseche dell'individuo e della popolazione. Non possono essere modificate, ma possono essere misurate con opportuni protocolli sperimentali. Possono rappresentare una base per la definizione di caratteristiche di prestazione analitica e devono essere considerate nell'interpretazione dei risultati di laboratorio (110).

Tabella 2

Limite superiore di riferimento (LSR) della GGT del siero, determinato con approcci metodologici differenti

Metodo analitico	Numerosità del gruppo-campione	Genere individui	LSR, U/L	Riferimento bibliografico
IFCC riferimento	420	F	38	101, 104
Sistema Olympus AU2700	26209	F	34	105
Sistema Abbott Aeroset	1870	F	34	106
IFCC riferimento	407	M	55	101, 104
Sistema Olympus AU2700	34623	M	54	105
Sistema Abbott Aeroset	1750	M	51	106

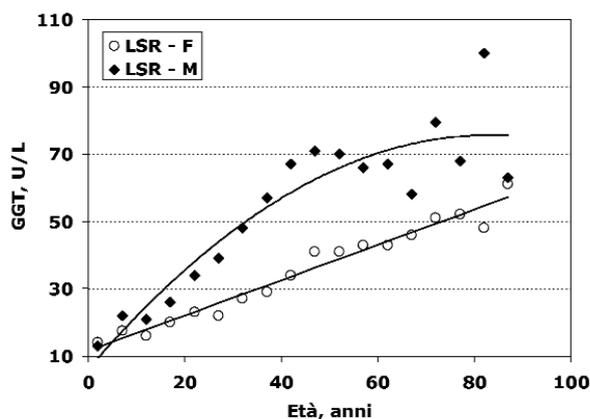


Figura 5
Limite superiore di riferimento (LSR) della GGT in soggetti di genere femminile e maschile in funzione dell'età. Le equazioni delle curve interpolanti sono rispettivamente: LSR-F, $y = 0,5248x + 11,564$; $r^2 = 0,9646$; LSR-M, $y = -0,01x^2 + 1,6712x + 6,149$; $r^2 = 0,8533$ (y è la concentrazione di attività catalitica della GGT corrispondente al LSR (in U/L) e x è l'età in anni).

In letteratura esistono diverse fonti che riportano i valori di VB_{intra} e VB_{inter} per grandezze misurate nel laboratorio clinico. Una delle più accreditate (111) riporta per GGT i seguenti valori: $VB_{intra} = 13,8\%$; $VB_{inter} = 41,0\%$. Da tali valori, applicando le formule universalmente accettate, e per livelli "desiderabili" di qualità analitica, si ricavano le seguenti specificazioni di qualità (traguardi analitici): per l'imprecisione, $CV \leq 6,9\%$; per l'inesattezza (scostamento sistematico), $\pm 10,8\%$; per l'errore totale della singola misura, $\pm 22,2\%$. La differenza critica, per $P < 0,05$ e per imprecisione analitica = $6,9\%$, risulta $42,9\%$. Poiché la specificazione analitica per l'imprecisione è facilmente raggiunta, si possono usare le specificazioni per livelli "ottimali" di qualità, che risultano per l'imprecisione, $CV \leq 3,5\%$; per l'inesattezza, $\pm 5,4\%$; e per l'errore totale, $\pm 11,1\%$. Nei programmi di VEQ delle Regioni Toscana e Lombardia il limite di accettabilità per l'errore totale della singola misura è posto, rispettivamente, a $11,1\%$ e a $15,0\%$ (111).

Specazione chimica della GGT nel siero

Nonostante il frequente uso clinico e diagnostico, le conoscenze sull'origine tissutale della GGT sierica e sui meccanismi di secrezione e rimozione dal circolo sono frammentarie.

La GGT sierica sembra essere di origine epatica, come suggerito dalle sue caratteristiche chimico-fisiche e cinetiche. Infatti la GGT circolante e quella epatica presentano uguale PM, tipo di glicosilazione, contenuto di acido sialico (e quindi stesso pl) e caratteristiche cinetiche simili (41,42). Le caratteristiche della GGT sierica sono invece diverse da quelle dell'enzima purificato dal rene, dal pancreas o dalle urine (40-42).

La GGT sierica può essere distinta in due frazioni, una idrofilica e una idrofobica, che differiscono per carica, dimensione e densità (113-115). La frazione

idrofilica è a sua volta costituita da un insieme di complessi molecolari probabilmente costituiti da GGT trasportata dalle lipoproteine VLDL, LDL, HDL e chilomicroni. Si suppone che l'associazione della GGT con le lipoproteine avvenga tramite il dominio lipofilo localizzato all'estremità N-terminale della catena pesante della GGT, responsabile della normale inserzione dell'enzima nella membrana plasmatica. La forma idrofilica sarebbe invece costituita da GGT priva del peptide lipofilo N-terminale e perciò non associata ad alcun trasportatore plasmatico. La porzione idrofilica della GGT rappresenta circa il 60-70% dell'attività totale in soggetti sani, ma solo il 15-30% in pazienti con malattie epatiche, nei quali si osserva un aumento della componente idrofobica (114,115).

La relazione tra GGT e lipoproteine è stata studiata in particolare nel siero di pazienti con patologie epatobiliari, nei quali il 60-80% dell'attività totale della GGT risultava essere idrofobica (114,116,117). In questi studi la GGT sierica è stata sottoposta a cromatografia per esclusione molecolare, tecnica che ha permesso di separare tre picchi di attività: il picco I con PM di circa 1000 kDa e il picco II con PM compreso tra 250 e 450 kDa e il picco III corrispondente all'enzima libero. Indagini successive hanno permesso di stabilire che nel picco I eluiva attività di GGT associata con le VLDL e LDL, in quanto questi complessi presentavano mobilità β in elettroforesi su gel d'agarosio, densità $< 1,06$ ed erano precipitabili con polianioni insieme alle β -lipoproteine. Il picco II invece sembra essere costituito da GGT associata con le HDL; infatti l'attività enzimatica raccolta in questo picco presentava mobilità α_1 - α_2 , densità compresa tra 1,06 e 1,22 ed era precipitabile con polianioni insieme alle HDL.

La GGT sierica è quindi un insieme eterogeneo di forme molecolari solo parzialmente caratterizzate nella struttura e composizione, per le quali non è ancora conosciuto il meccanismo di rilascio in circolo. Le forme ad alto PM potrebbero essere costituite da GGT associata a lipoproteine, ma anche da frammenti di membrana plasmatica derivante dagli epatociti (114,118,119). Per quanto riguarda la forma idrofilica a basso PM si ipotizza che sia generata da un'attività proteolitica, non specificata, presente a livello della membrana degli epatociti oppure in circolo (114,118).

I meccanismi di rimozione della GGT circolante sono stati studiati in vivo in modelli animali (coniglio e ratto) utilizzando il complesso circolante GGT-HDL (picco II) purificato da sieri di pazienti con elevata GGT oppure GGT umana purificata da fegato con un procedimento che prevede l'uso di papaina che idrolizza il peptide N-terminale di inserzione in membrana; l'enzima così ottenuto corrisponde alla porzione idrofilica di GGT presente in circolo. Da questi studi è emerso che la GGT idrofilica ha una emivita in circolo di 9 ore contro le 20 del complesso GGT-HDL (120). La cinetica di rimozione della GGT idrofilica mostra un andamento bifasico con una prima fase molto veloce (emivita 15-20 min) e una seconda molto lenta (65% di rimozione dopo 2 ore). La prima fase di rimozione, ma non la seconda, è molto sensibile al grado di sialilazione della proteina; infatti

l'enzima desialilato ha una emivita inferiore a 10 min (121). Sempre utilizzando GGT idrofila di origine epatica e marcata con ^{125}I è stato dimostrato che la proteina, ancora attiva e non degradata, è rimossa selettivamente dal recettore per le asialoglicoproteine presente sugli epatociti (121-123).

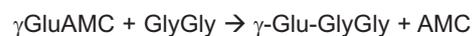
Metodi per la misura delle forme molecolari della GGT

Con lo scopo di migliorare la specificità della determinazione della GGT sono stati approntati diversi metodi per la separazione e quantificazione delle forme circolanti dell'enzima (124). Come tecnica di separazione è stata principalmente usata l'elettroforesi su acetato di cellulosa (125), ma anche su agarosio (126) e poliacrilammide (127). In letteratura è descritto anche un metodo basato su una cromatografia per esclusione molecolare (128), ma gli stessi Autori riconoscono l'inadeguatezza del loro metodo in quanto per ogni campione sono necessari 60 min per la cromatografia e l'attività di GGT è determinata successivamente sull'eluato raccolto in frazioni, con conseguente perdita di risoluzione e ulteriore impiego di tempo.

Il metodo più usato per lo studio delle frazioni circolanti di GGT in ambito clinico è sicuramente quello basato sull'elettroforesi in acetato di cellulosa (125). Con questo metodo è possibile rivelare sei frazioni di GGT, le cui caratteristiche sono riassunte nella Tabella 3 (129-131). Le frazioni α_1 - e α_2 -GGT sono sempre presenti, le frazioni dep-, γ - e β -GGT sono prevalentemente presenti in epatopatie di origine colestatica, mentre la frazione alb-GGT è principalmente presente in pazienti con tumore epatico e/o cirrosi. In uno studio volto ad appurare il valore diagnostico della frazione alb-GGT è stato dimostrato che, in associazione con un aumento dell' α -fetoproteina ($>20 \mu\text{g/L}$), permette di discriminare pazienti con un tumore epatico rispetto ai pazienti affetti da cirrosi, con sensibilità di 84% e specificità di 61% (132). In un altro studio, sempre con l'intento di discriminare pazienti affetti da cirrosi da pazienti con tumore del fegato, è stata messa a punto una funzione basata su sette componenti sieriche che ha permesso di classificare correttamente il 93% dei casi in una coorte composta da 135 affetti da cirrosi e 77 con epatocarcinoma. Tra gli analiti presi in considerazione (α -fetoproteina, fosfatasi alcalina, lattico deidrogenasi 5, GGT totale, aspartato aminotransferasi, rame) è stato incluso l'insieme delle frazioni di GGT associate alle LDL (dep-, γ - e β -GGT), ma non l'alb-GGT (133,134).

Recentemente è stato proposto un nuovo metodo di separazione e determinazione delle forme molecolari di GGT (135). La determinazione dell'attività delle frazioni di GGT è eseguita con un sistema FPLC utilizzando una colonna per cromatografia ad esclusione molecolare (Superose 6HR 10/300 GL, GE Healthcare) che consente di separare le componenti plasmatiche esclusivamente in base al loro PM in un intervallo compreso tra 5000 e 5 kDa. Perciò è possibile separare

anche le molecole legate alle VLDL da quelle legate alle LDL. Per poter determinare in continuo l'attività di GGT, attraverso una connessione a T, all'eluato è continuamente aggiunta una soluzione contenente γ -glutammi-7-amido-4-metilcumarina (γGluAMC), substrato fluorescente specifico per la GGT. La miscelazione dell'eluato dalla colonna con il substrato della GGT avviene in una spira con volume di 2,6 mL (corrispondente ad un'incubazione di circa 4 min) posta in un bagno termostatico a 37 °C. Poiché l'accettore della reazione di transpeptidazione è incluso nella fase mobile, la presenza dell'enzima è visualizzata attraverso la liberazione del composto fluorescente amminometilcumarina (AMC) secondo la reazione:



Il prodotto AMC è rilevato tramite un fluorimetro operante a una lunghezza d'onda di eccitazione di 380 nm e di emissione di 440 nm. Le condizioni di reazione sono tali per cui limite di rivelazione dell'attività è pari a 0,5 U/L. Il principale svantaggio di questo metodo è il tempo necessario per una determinazione, che è di circa 50 min.

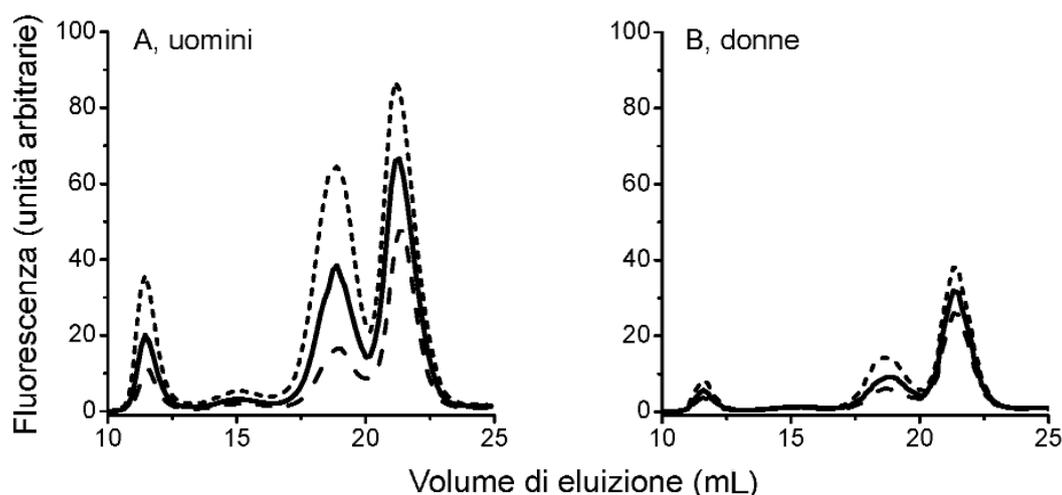
Con questo metodo è stata caratterizzata la distribuzione delle forme molecolari di GGT in 200 soggetti sani, donatori di sangue (100 uomini e 100 donne) (136). In tutti i soggetti sono state identificate quattro forme di GGT, denominate big-GGT (b-GGT, 2000 kDa), medium-GGT (m-GGT, 940 kDa), small-GGT (s-GGT, 140 kDa) e free-GGT (f-GGT, 70 kDa). I PM delle frazioni b-, m- e s-GGT sono compatibili con quelli di complessi con le lipoproteine VLDL, LDL, HDL, rispettivamente, mentre quello di f-GGT è indicativo di una forma enzimatica libera. Il PM delle singole frazioni è indipendente dai livelli di GGT associati ad esse; ciò suggerisce l'esistenza di un'interazione specifica tra l'enzima e il trasportatore piuttosto che un adsorbimento casuale in circolo. E' perciò possibile che la secrezione e la rimozione delle singole frazioni siano indipendenti l'una dall'altra. Analizzando l'andamento dell'attività delle quattro frazioni in funzione dell'attività totale di GGT, è emerso che in entrambi i generi f-GGT è la frazione più rappresentata alle basse concentrazioni di GGT totale ($<20 \text{ U/L}$), mentre l'aumento di queste dipende principalmente dalle frazioni s- e b-GGT (Figura 6). Un altro aspetto che distingue f-GGT dalle frazioni ad alto PM è la forma della distribuzione di frequenza nella popolazione, gaussiana per f-GGT e asimmetrica a destra, come per la GGT totale, per le altre tre (136).

Lo studio delle frazioni della GGT continua a prospettarsi di notevole interesse, sia per una migliore utilizzazione clinica di quest'enzima, sia per migliorare la comprensione della patogenesi delle malattie ad esso connesse. È tuttavia necessario raggiungere un'uniformità metodologica che permetta il confronto tra i risultati ottenuti dai diversi gruppi di ricerca.

Tabella 3

Forme molecolari sieriche di GGT ottenute tramite separazione con elettroforesi su acetato di cellulosa in tampone Tris-barbital pH 8,6

Frazione	Mobilità elettroforetica	Presenza di soggetti sani	Principale patologia epatica associata	Classi di lipoproteine con le quali coprecipita
Dep-GGT	Assente (in sede di deposizione)	Assente	Ittero extraepatico	VLDL, LDL
γ -GGT	γ -globuline	Assente	Ittero extraepatico, epatite cronica e cirrosi (<10% della GGT totale)	VLDL, LDL
β -GGT	β -globuline	Assente	Ittero ostruttivo intra- ed extraepatico; tumore (<30% della GGT totale)	VLDL, LDL
α_2 -GGT	α_2 -globuline	20-40% della GGT totale	Sempre presente	-
α_1 -GGT	α_1 -globuline	60-80% della GGT totale	Sempre presente	HDL (solo nei pazienti con cirrosi, non nei soggetti sani)
Alb-GGT	Albumina	Assente	Tumore primitivo o metastasi, cirrosi	-

**Figura 6**

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 (da rif. 136).

GGT SIERICA: ASPETTI EPIDEMIOLOGICI E CLINICI

GGT sierica, sopravvivenza a lungo termine e rischio cardiovascolare

Dal 1961 la determinazione della GGT sierica è entrata nell'uso clinico come marcatore di disfunzione epatica e di abuso di alcool (137). La sua associazione con il rischio di morbilità e mortalità era inizialmente riportata in questa prospettiva (138,139). Agli inizi degli anni '90 un piccolo studio condotto su 330 persone mise in evidenza che la GGT poteva avere un valore prognostico per mortalità da tutte le cause indipendentemente dalle malattie epatiche e dal consumo di alcool (140). In studi successivi, realizzati su popolazioni più numerose, è emerso che la GGT correla

positivamente con il consumo di alcool, ma anche e soprattutto con l'età, l'indice di massa corporea, la pressione arteriosa, il diabete e con eventi precedenti di infarto del miocardio (141-143). In questi stessi studi è stato confermato il ruolo della GGT come predittore indipendente di mortalità per tutte le cause. Questa associazione è stata recentemente oggetto di indagine di un ampio studio retrospettivo nel quale concentrazioni di GGT superiori a quelle del primo quintile della distribuzione di riferimento (donne, $GGT \geq 9$ U/L; uomini, $GGT \geq 14$ U/L) erano significativamente associate con un progressivo aumento del rischio relativo di mortalità per tutte le cause, per neoplasie epatiche e non e per cause non neoplastiche (patologie epatobiliari, cause vascolari, cardiopatia ischemica e malattie cerebrovascolari) (144). In questo studio è interessante osservare che a valori di

GGT all'interno dell'intervallo di riferimento (donne, GGT <35 U/L; uomini, GGT <55 U/L), ma non oltre il LSR, corrisponde un aumentato rischio di mortalità per malattie cardiovascolari associate ad aterosclerosi. Elevati valori di GGT (donne, GGT \geq 36 U/L; uomini, GGT \geq 56 U/L) sono invece più fortemente correlati con disfunzioni epatiche (Tabella 4).

Già nei primi studi epidemiologici è emerso che elevate concentrazioni di GGT (>24 U/L) erano associate ad un significativo aumento di mortalità per cardiopatia ischemica (145-147). Tale aumento risultava più marcato nei soggetti con già manifesta cardiopatia ischemica e in particolare in quelli con un precedente infarto del miocardio al momento del reclutamento nello studio. Da qui l'ipotesi dell'esistenza di un collegamento tra la GGT sierica e l'evoluzione della malattia aterosclerotica, ulteriormente supportata da studi condotti su popolazioni con sindrome ischemica e malattia coronaria accertata e dall'osservazione che la GGT sierica correla anche con un'aumentata incidenza di ictus emorragico (143,148-150).

Un recente studio prospettico, condotto su circa 164.000 soggetti adulti austriaci, ha definitivamente confermato che le concentrazioni di GGT nel siero sono un fattore prognostico indipendente per eventi fatali di forme croniche di malattia coronarica e per eventi cardiaci acuti (151); questa conclusione era verificata per entrambi i sessi, con una chiara relazione dose-risposta e una maggiore importanza nei soggetti giovani (età <60 anni). Anche in questo studio i valori di GGT considerati prognostici per eventi cardiovascolari erano all'interno dell'intervallo di concentrazioni fisiologico: 28 U/L per gli uomini e 18 U/L per le donne sono stati proposti come valori soglia per discriminare i soggetti a rischio (151). Dopo lo studio austriaco, in questi ultimi anni sono stati pubblicati molti studi prospettici, compreso lo studio Framingham (152), condotti sempre su popolazione generale, che hanno ulteriormente confermato il significato prognostico dell'attività sierica di

GGT per le malattie cardiovascolari (153-157). Da questi studi è emerso che il valore prognostico dell'attività di GGT è più marcato nei soggetti giovani, nei diabetici e che le concentrazioni sieriche di GGT sono predittori indipendenti per l'insorgenza della sindrome metabolica.

È importante sottolineare che in tutti gli studi riportati, la GGT continua ad essere un fattore prognostico indipendente rispetto alla patologia cardiovascolare anche dopo che l'analisi statistica è stata aggiustata per l'età, genere, consumo di alcool e per i più noti fattori di rischio cardiovascolare (dislipidemia, indice di massa corporea, pressione arteriosa, intolleranza al glucosio, insulino-resistenza, proteina C-reattiva, fumo), incluso il diabete di tipo 2 (157).

GGT sierica e aterosclerosi

La presunta connessione tra GGT sierica e patologia aterosclerotica ha ricevuto un ulteriore conferma in uno studio prospettico, della durata di 6 anni, realizzato presso l'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa, nel quale sono stati arruolati 469 pazienti con sindrome ischemica e malattia coronarica documentata angiograficamente (148). Dopo correzione per gli altri fattori di rischio cardiovascolari (età, fumo di sigaretta, colesterolo, frazione di eiezione del ventricolo sinistro, indice di massa corporea, diabete mellito) e per fattori confondenti (alanina amminotransferasi sierica, consumo di alcool) è stato confermato il valore prognostico dell'attività della GGT sierica per morte cardiaca e infarto non fatale. In particolare, il significato prognostico della GGT sierica era più evidente in un sottogruppo di pazienti con aterosclerosi diffusa (malattia multivasale) e un precedente infarto del miocardio. Il rischio risultava aumentato usando due differenti valori soglia di GGT (25 o 40 U/L) e la maggior parte degli eventi cardiaci erano concentrati nei primi tre anni dopo il primo infarto. Il significato prognostico della GGT sierica risultava così correlato con la diffusione delle lesioni aterosclerotiche nelle arterie coronariche.

Tabella 4

Rischio relativo di mortalità e concentrazione di GGT sierica (dati da rif. 144)

Cause di morte	Categorie di attività sierica di GGT (U/L)				
	F: <9 M: <14	F: 9-17 M: 14-24	F: 18-26 M: 28-41	F: 27-35 M: 42-55	F: \geq 36 M: \geq 56
Tutte	1,0	1,2	1,4	1,6	2,0
Non neoplastiche	1,0	1,1	1,3	1,5	1,9
Neoplastiche	1,0	1,3	1,5	1,7	2,3
Vascolari	1,0	1,1	1,3	1,5	1,6
Cardiopatia ischemica	1,0	1,2	1,3	1,5	1,6
Cerebrovascolari	1,0	1,1	1,3	1,5	1,4
Malattie epatobiliari	1,0	1,4	3,2	4,9	15,1
Carcinoma epatocellulare	1,0	1,4	3,1	5,2	18,5

F, donne; M, uomini.

I dati riportati corrispondono al valore di rischio relativo di mortalità, rispetto alla categoria di soggetti con minore attività di GGT.

Ancora più interessante è il fatto che il valore prognostico della GGT scompariva nei soggetti sottoposti a rivascolarizzazione mediante angioplastica o by-pass, procedure che comportano la stabilizzazione della placca (158). Quindi la prognosi sfavorevole segnalata dall'elevata GGT sierica sembrava essere applicabile su pazienti con placche vulnerabili, suggerendo l'esistenza di una connessione tra GGT e i processi coinvolti nella destabilizzazione della placca (148,159).

In uno studio prospettico di recente pubblicazione è stato dimostrato che, in una popolazione di 474 soggetti con sindrome coronarica documentata, le concentrazioni sieriche di GGT, proteina C-reattiva e glicemia a digiuno presentano un valore prognostico additivo; l'associazione di valori elevati dei tre biomarcatori (GGT >25 U/L, proteina C-reattiva >8 mg/L, glicemia a digiuno >118 mg/dL) identifica un gruppo di soggetti con il più alto rischio di mortalità cardiaca (160). L'additività di questi fattori di rischio cardiovascolare potrebbe riflettere la pluralità di meccanismi che concorrono alla patogenesi della malattia aterosclerotica, ed in particolare la GGT, come discusso di seguito, potrebbe avere un ruolo diretto nella destabilizzazione della placca tramite la produzione di ROS. I dati ottenuti in questo studio sono in accordo con l'osservazione che il valore prognostico della GGT è più evidente nei soggetti diabetici (155).

Con studi istochimici è stato dimostrato che nelle placche aterosclerotiche carotidea (68), coronarica (161) e cerebrale (162) è presente un'intensa attività di GGT nel core lipidico dove si accumulano anche le cellule schiumose derivanti dai macrofagi CD68⁺ e le LDL ossidate; inoltre attività di GGT è stata riscontrata anche nei microtrombi aderenti alla superficie dell'ateroma (79).

Nella placca aterosclerotica è presente GSH, substrato dell'enzima GGT (163); inoltre sono stati individuati depositi di ferro co-localizzati con i ceroidi, complessi insolubili di proteine e lipidi ossidati presenti sia all'interno che all'esterno delle cellule schiumose ed anche ferro redox attivo (164,165); nelle placche aterosclerotiche è descritto anche un accumulo di ferritina, ulteriore possibile fonte di Fe(III) per la GGT (70-72,166). In questo contesto potrebbero essere favorite le reazioni pro-ossidanti conseguenti all'attività di GGT. Come già descritto precedentemente, la CysGly, prodotto della reazione catalizzata dalla GGT, riduce il Fe(III) generando simultaneamente il corrispondente radicale tiile, che può formare ponti disolfuro con le proteine presenti, e Fe(II), che porta alla successiva formazione di anione superossido e H₂O₂ (80). L'analisi dei tioli a basso PM in estratti acidi di placca ha messo in evidenza la presenza, oltre al GSH, di CysGly libera che indica l'effettiva presenza di GGT attiva nella placca e di CysGly legata alle proteine, che è considerata un marcatore biochimico delle avvenute reazioni pro-ossidanti dipendenti dall'attività di GGT (80,163). Lo stress ossidativo indotto dalla GGT potrebbe contribuire alla progressione e destabilizzazione della placca aterosclerotica favorendo l'ossidazione delle LDL (68),

ma anche modulando l'attività delle metalloproteinasi, la proliferazione ed apoptosi degli elementi cellulari, l'aggregazione piastrinica e la trombosi (79,167).

Riguardo l'origine della GGT nella placca possono essere prese in considerazione due fonti: una endogena a carico degli elementi cellulari della placca (cellule infiammatorie e muscolari lisce), ipotesi supportata dalla presenza di mRNA per la GGT (163), e una esogena, ipotesi supportata, a sua volta, dalla constatazione che la GGT sierica sembra essere trasportata da lipoproteine, incluse le LDL (114,116,117). Uno studio preliminare di caratterizzazione della GGT estratta da placche aterosclerotiche ha dimostrato la presenza in queste ultime di due forme enzimatiche distinte per dimensione, carica superficiale e precipitabilità con acido fosforotungstico; la forma a maggior PM (simile a quello dei complessi sierici tra GGT e LDL), a maggiore carica negativa (più acido sialico presente) e precipitabile con polianioni (nelle condizioni delle LDL sieriche) potrebbe avere origine sierica (163).

GGT sierica e rischio metabolico

In studi cronologicamente paralleli a quelli che hanno definito il significato prognostico della GGT (168-177), ma anche in questi stessi (141,147,151,153,157), è stata valutata la distribuzione della GGT in popolazioni di individui adulti di entrambi i sessi e sono state individuate le determinanti dell'attività sierica di GGT. Questa è influenzata da molti fattori sia genetici, con una ereditabilità di 0,52, che ambientali e comportamentali (Tabella 5). L'attività di GGT è positivamente associata a riconosciuti fattori di rischio cardiovascolare, marcatori anche di alterato metabolismo lipidico e glucidico: resistenza all'insulina e diabete, indice di massa corporea ("body mass index", BMI) ipertensione, dislipidemia (alti trigliceridi e basso colesterolo HDL).

GGT, resistenza all'insulina e diabete di tipo 2

Già pochi anni dopo l'introduzione della determinazione dell'attività di GGT come parametro di valutazione di danno epatico è stato notato che in soggetti con alterati valori di glicemia e insulina o con diabete mellito di tipo 2 la GGT era tendenzialmente più alta rispetto a un gruppo di controllo (185,186). In studi prospettici di mortalità (141,147), già discussi in precedenza, è stata confermata l'associazione positiva tra GGT e presenza di diabete di tipo 2 all'ingresso nello studio. Successivamente, in uno studio prospettico della durata di 13 anni condotto su 7458 uomini adulti non diabetici, è stato dimostrato che la GGT, per valori di concentrazione all'interno dell'intervallo fisiologico, predice l'insorgenza di diabete di tipo 2 indipendentemente dal consumo di alcool e dal BMI (178). Il valore predittivo della GGT sierica rispetto allo sviluppo di insulino-resistenza e di diabete di tipo 2 è stato confermato ripetutamente in studi analoghi realizzati su popolazioni diverse (176,187-193).

L'elemento di connessione tra l'attività sierica di GGT e l'insulino-resistenza potrebbe essere rappresentato

Tabella 5*Determinanti dell'attività sierica di GGT*

Correlazione	Riferimento bibliografico
<i>Positiva</i>	
Genere*	141,147,151,153,157,168-177
Età	153,169-172
Menopausa	169,170
Indice di massa corporea	141,147,151,153,157,168-177
Circonferenza vita	169,174,178-180
Consumo di alcool	141,147,151,153,157,168-177
Fumo	141,147,151,171,172
Pressione arteriosa	147,151,153,169,170,172,176,179,181,182
Frequenza cardiaca	147,169,172
Colesterolemia totale	141,147,151,153,157,168-177
Colesterolemia HDL	147,169,171,172
Trigliceridemia	151,168,169,171,173
Glicemia a digiuno	147,151
Insulinemia	173
Uricemia	151,173
Ferritinemia	173,177
Diabete di tipo 2	141,147,153,176
Ipertensione	141,147,153,176
Farmaci:	
Contraccettivi orali	168-170
Anti-ipertensivi	147
Analgesici	169
Indici di infiammazione e stress ossidativo:	
Proteina C-reattiva	176
Fibrinogeno	176
F2-isoprostani	176
8-idrossi-desossiguanina nelle urine	177
<i>Negativa</i>	
Gravidanza	141,147,171
Attività fisica	168-172
Caffè	147
Funzione respiratoria	151,153,173
Colesterolemia HDL	
Farmaci:	
Acido ursodesossicolico	183
Fibrati	184

*Concentrazioni generalmente più elevate nel genere maschile.

dall'epatopatia steatosica non alcolica ("nonalcoholic fatty liver disease", NAFLD), condizione di sofferenza

epatica caratterizzata da un'alterazione delle concentrazioni sieriche di GGT e di alanina

amminotransferasi, da dislipidemia (aumento di trigliceridi e diminuzione di colesterolo HDL), aumento del grasso viscerale addominale e insulino-resistenza epatica (stimata in base ai valori di glicemia e insulinemia a digiuno e di emoglobina glicata (188). La stretta associazione tra NAFLD e la riduzione della sensibilità all'insulina (misurata tramite "clamp" euglicemico-iperinsulinemico) è stata confermata in uno studio condotto su 30 pazienti con NAFLD accertata tramite biopsia epatica, nei quali è stato osservato anche una ridotta influenza dell'insulina sul metabolismo glucidico e lipidico indipendentemente dal peso e dagli indici di tolleranza al glucosio (192). In un recente studio condotto su 1095 soggetti adulti è stato dimostrato che la GGT sierica correla positivamente anche con il contenuto lipidico intraepatico (determinato tramite spettroscopia di risonanza magnetica), oltre che con la resistenza all'insulina (stimata tramite prova di tolleranza al glucosio) (194). Questi dati sono a favore dell'ipotesi che l'alterazione dell'attività sierica di GGT possa rappresentare un precoce biomarcatore di resistenza epatica all'insulina conseguente a NAFLD.

In alcuni studi epidemiologici è emersa anche un'interazione tra i livelli di GGT e il BMI nel predire l'insorgenza di diabete (176,195,196). Infatti, il rischio di ammalarsi di diabete aumenta progressivamente con i valori di GGT e tale associazione diventa più forte all'aumentare del BMI; quest'ultimo, invece, è associato con l'insorgenza di diabete solo per valori di GGT oltre la mediana (22 U/L) della distribuzione (197). Parallelamente non è stata dimostrata un'analogia interazione tra le concentrazioni sieriche di alanina amminotransferasi e il BMI (197); perciò l'associazione specifica tra GGT e BMI in questo caso non sembra poter essere giustificata dalla presenza di NAFLD. Un'ipotesi alternativa, discussa diffusamente nel paragrafo "GGT sierica e inquinamento ambientale", prende in considerazione la possibilità che l'elemento scatenante il diabete sia rappresentato dalle "sostanze inquinanti organiche persistenti" residenti nel tessuto adiposo aumentato (obesità, da alterato bilancio tra apporto calorico e attività fisica), le quali a loro volta sarebbero responsabili dell'aumento della GGT in quanto enzima appartenente alle difese antiossidanti e ai sistemi di detossificazione (197,198).

GGT e obesità

La marcata correlazione positiva tra GGT e obesità, quantificata col BMI, è stata confermata anche in soggetti non diabetici e, indipendentemente, su popolazioni generali o selezionate. Il BMI è la variabile biologica che presenta il maggior grado di correlazione con l'attività sierica di GGT insieme alla concentrazione plasmatica dei trigliceridi. In particolare, l'elevazione della GGT è preferenzialmente associata a una distribuzione della massa grassa di tipo centrale; correla, infatti, indipendentemente dal BMI, con il rapporto di circonferenze vita: fianchi, con la sola circonferenza vita, con il contenuto di grasso viscerale nell'area

addominale, ma non con l'adiposità subcutanea (199).

GGT e pressione arteriosa

Una correlazione positiva è stata riscontrata anche tra concentrazioni sieriche di GGT e pressione arteriosa sistolica e diastolica. In molti studi questa associazione è risultata indipendente dal consumo di alcool, dall'età, dal BMI e dall'attività fisica. D'altra parte, in altri studi, l'associazione tra GGT e pressione arteriosa è risultata essere condizionata dalla distribuzione dell'adiposità in quanto: a) l'inclusione nell'analisi multivariata del rapporto tra le circonferenze di vita: fianchi o la concentrazione plasmatica di trigliceridi e colesterolo attenua il grado di correlazione tra le due variabili (147,171,200); b) come per il diabete, è documentata un'interazione tra GGT e BMI sul rischio relativo di incidenza di ipertensione (176); c) in un recente studio prospettico della durata di 6 anni condotto su circa 900 soggetti selezionati tra i controlli sani dello studio "Western New York Health" è stato dimostrato che la GGT sierica è significativamente associata con l'incidenza di ipertensione solo nei soggetti con aumentati indici di obesità addominale (BMI >26 kg/m², circonferenza vita >86 cm, altezza addominale >19 cm) (179).

GGT e dislipidemia

In tutti gli studi epidemiologici e di popolazione già menzionati è stato osservato che l'attività di GGT si associa a un profilo lipidico sfavorevole caratterizzato da elevate concentrazioni plasmatiche di trigliceridi, di colesterolo totale e LDL, indipendentemente da tutti i possibili fattori confondenti. I dati della letteratura sono contrastanti riguardo la correlazione tra GGT e colesterolemia HDL, positiva in alcuni studi e negativa in altri (147,151,153,169,171-173).

GGT e sindrome metabolica

La sindrome metabolica è una situazione clinica ad alto rischio cardiovascolare che comprende una serie di fattori di rischio e di sintomi che si manifestano contemporaneamente nell'individuo (201). Tra questi sono inclusi l'alterazione della glicemia a digiuno, il diabete, l'obesità, l'ipertensione, l'ipertrigliceridemia, tutti fattori per i quali è descritta un'associazione positiva e indipendente con le concentrazioni sieriche di GGT. Infatti, in diversi studi di popolazione è stato dimostrato che la GGT sierica è un fattore predittivo indipendente di insorgenza di sindrome metabolica (152,187,189, 202,203).

GGT sierica e nefropatia cronica

Gli studi epidemiologici degli ultimi quindici anni hanno prima suggerito e poi confermato che l'attività sierica di GGT è un fattore di rischio per l'evoluzione delle malattie vascolari correlate con l'aterosclerosi e per l'insorgenza di malattie metaboliche quali il diabete e la

sindrome metabolica, situazioni cliniche spesso associate con una progressiva diminuzione della funzionalità renale.

L'ipotesi che la GGT sierica possa essere un indicatore precoce di sviluppo di nefropatia cronica ("chronic renal disease", CRD) è stata analizzata in un recente studio prospettico, della durata di 4 anni, condotto su più di 10000 soggetti di genere maschile, dipendenti di una ditta coreana operante nella produzione di semiconduttori; tutti i soggetti arruolati nello studio erano non diabetici, normotesi e con normale funzione renale (204). In questa coorte è stata descritta una correlazione positiva tra aumento di GGT sierica e rischio di insorgenza di CRD, con un rischio relativo nel quartile più alto della distribuzione della GGT (GGT ≥ 40 U/L) rispetto al primo quartile (GGT < 18 U/L) di 1,9, dopo correzione dell'analisi statistica per l'età, i livelli basali di velocità di filtrazione renale, trigliceridemia e colesterolemia HDL. L'associazione tra GGT e rischio di CRD è stata confermata anche in soggetti consumatori moderati di alcool (≤ 20 g/giorno), non sovrappeso (BMI < 23 kg/m²), con valori di alanina aminotransferasi all'interno dell'intervallo di riferimento, concentrazioni di proteina C-reattiva < 3 mg/L e non affetti da sindrome metabolica.

In questa stessa coorte è stato messo in evidenza che la NAFLD è associata con un aumentato rischio di CRD, indipendentemente dai parametri di insulino-resistenza, sindrome metabolica e infiammazione. L'attività sierica di GGT è l'unica variabile che presenta una significativa interazione sull'associazione tra NAFLD e il rischio di CRD, che è più forte nei soggetti con NAFLD e GGT elevata (≥ 36 U/L) (205). D'altra parte la NAFLD è un fattore prognostico indipendente per lo sviluppo della malattia aterosclerotica ed è strettamente correlata con tutte le componenti della sindrome metabolica (dislipidemia, obesità, ipertensione, insulino resistenza) (206). Caratteristici della NAFLD sono una maggiore produzione epatica di lipoproteine aterogeniche, la presenza di uno stato infiammatorio cronico subclinico e un aumento dello stress ossidativo, meccanismi che promuovono la formazione di lesioni aterosclerotiche, ma anche disfunzione endoteliale (206). La relazione tra NAFLD e CRD potrebbe dipendere proprio dalle modificazioni vascolari indotte dalla prima; in questo quadro l'alterazione della GGT rappresenterebbe oltre che un indice di NAFLD anche un biomarcatore del processo patogenetico di deterioramento della funzionalità renale (188,206). Tuttavia, allo stato attuale delle conoscenze non è possibile stabilire se la GGT sia solo un biomarcatore o se abbia un ruolo attivo nella patogenesi della CRD; inoltre il significato della GGT in soggetti affetti da NAFLD non è ancora stato stabilito, mentre è accertato che la GGT è un fattore di rischio per l'evoluzione dell'aterosclerosi e per l'incidenza di sindrome metabolica, importanti condizioni patologiche responsabili di danno vascolare e renale.

GGT sierica e "microalbuminuria"

La presenza nelle urine di una piccola quantità di albumina (30-300 mg/g creatinina) è un precoce indice di alterazione della funzione glomerulare renale, ma anche un fattore di rischio indipendente di malattia cardiovascolare in soggetti diabetici, ipertesi e nella popolazione generale (207). Il meccanismo fisiopatologico sottostante a questa correlazione non è stato ancora chiarito; un'ipotesi è che l'albuminuria sia un marcatore di disfunzione endoteliale sistemica che comporta un'alterazione della funzione glomerulare e una predisposizione per lo sviluppo di aterosclerosi (207).

Dato che la GGT sierica è un predittore dose-dipendente di diabete di tipo 2 e di ipertensione, è stata presa in esame la possibilità che questa potesse essere positivamente correlata con il rischio di albuminuria. Nello studio CARDIA ("Coronary Artery Risk Development in Young Adults") è stato, infatti, messo in evidenza che l'attività di GGT sierica, all'interno dell'intervallo di concentrazione fisiologico, ha un ruolo predittivo per la albuminuria in pazienti con ipertensione o diabete, assumendo, perciò, un ruolo predittivo per complicazioni microvascolari e/o renali in questi soggetti (208). Nei soggetti che non hanno sviluppato né diabete né ipertensione durante lo studio, la GGT sierica mostrava un'associazione con la albuminuria a forma di "U", andamento interpretato come il risultato di una efficace/inefficace risposta anti-ossidante: un leggero incremento dell'attività di GGT potrebbe essere interpretato come il risultato di una efficace risposta anti-ossidante (vedi il ruolo della GGT nella sintesi del GSH intracellulare) che proteggerebbe dal danno endoteliale e dalla conseguente albuminuria. Aumenti marcati di GGT sarebbero invece indice di un forte stress ossidativo che, nonostante l'aumento dell'enzima, soverchierebbe la funzione anti-ossidante della GGT, determinando il danno endoteliale e la conseguente albuminuria (209). In soggetti diabetici o ipertesi, infine, si potrebbero creare le condizioni necessarie per la comparsa degli effetti pro-ossidanti indotti dall'attività di GGT che contribuirebbero al danno endoteliale ed alla comparsa della albuminuria (208).

GGT sierica e inquinamento ambientale

La relazione esistente tra GGT ed inquinamento ambientale è stata studiata focalizzando l'attenzione sugli effetti dell'esposizione alle cosiddette "sostanze inquinanti organiche persistenti" ("persistent organic pollutants", POPs) che, come il diclorodifeniltricloroetano (DDT), i policlorobifenili (PCB), le diossine e i furani, sono difficilmente bio-degradabili e, essendo spesso liposolubili, si concentrano nei tessuti adiposi animali accumulandosi lungo la catena alimentare. In particolare è stata osservata una correlazione positiva tra i valori di GGT sierica e la concentrazione sierica di 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD) (210,211), la concentrazione di tricloroetilene nelle urine (212), la concentrazione sierica di esaclorobenzene (213), e quelli dei PCB (214); risultati contrastanti sono stati

ottenuti relativamente ad esposizione ad altri policloro dibenzo-p-diossine e policloro dibenzofurani (215-217). In generale l'interpretazione suggerita in questi studi per spiegare l'aumento della GGT sierica è legata al danno epatico determinato dall'esposizione ai POP. Nel caso dei PCB, prima del danno epatico, è stata osservata una modulazione dell'attività epatica indicata dall'aumento della concentrazione plasmatica dei trigliceridi e del colesterolo HDL (214).

Utilizzando i dati resi disponibili dal "National Health and Nutrition Examination Survey" (NHANES) (218), relativi a 2016 individui di età ≥ 20 anni, è stata presa in esame l'ipotesi che la GGT sierica possa essere un marcatore di esposizione ambientale ai POPs. In questo studio è stata presa in considerazione la concentrazione ematica di sei differenti POPs per i quali almeno l'80% degli individui mostrava valori superiori al limite di misurazione. La concentrazione di cinque di questi è risultata positivamente associata all'attività di GGT, come osservato anche per la correlazione tra enzima del siero e basse concentrazioni di piombo nel sangue e di cadmio nelle urine (219). L'attività di alanina aminotransferasi invece è risultata inversamente correlata con le concentrazioni dei POPs, contraddicendo così l'interpretazione basata su un effetto di epatotossicità come causa dell'aumento della GGT (218). Un'ipotesi alternativa propone la GGT come biomarcatore di esposizione a differenti inquinanti ambientali, in modo particolare quelli biotrasformati mediante coniugazione con il GSH (198,218) e gli induttori di stress ossidativo (209,219,220); entrambi i processi causerebbero la deplezione del GSH intracellulare epatico e la conseguente induzione di GGT. Questa interpretazione sarebbe in accordo con il riscontro di un incremento della GGT del siero negli anni, dal 1996 al 2003, in Corea del Sud (220). Anche in questo caso, il comportamento della alanina aminotransferasi si dissocia da quello della GGT rendendo poco verosimile l'ipotesi di un meccanismo epatotossico alla base dell'incremento della GGT (Figura 7). È ritenuto, invece, più probabile un meccanismo legato a variazioni di stress ossidativo, dovute a differenti cause, incluso il variare delle abitudini dietetiche della popolazione. Per esempio, anti-ossidanti di origine alimentare, come ascorbato e β -carotene, e pro-ossidanti come il ferro dell'eme, mostrano rispettivamente una associazione inversa o diretta con GGT del siero (220). La popolazione sud-coreana sta sperimentando, infatti, una crescente esposizione ad inquinanti ambientali, che inducono direttamente stress ossidativo contribuendo in tal modo all'innalzamento della GGT del siero (218).

Questi studi contribuiscono a definire un potenziale ruolo dell'attività sierica di GGT come marcatore precoce e sensibile di stress ossidativo e di esposizione ambientale a POPs (209,220).

Numerosi studi, su base prevalentemente epidemiologica, hanno confermato l'esistenza di una significativa associazione tra concentrazione di POPs, diabete e fattori di rischio per la malattia diabetica (221,222), e tra valori di GGT sierica e rischio di diabete

di tipo 2 (197). Nel tentativo di proporre una spiegazione logica di queste differenti associazioni tra GGT sierica, POPs (o, più generalmente, xenobiotici) e diabete di tipo 2 è stata formulata un'ipotesi articolata sulla patogenesi del diabete di tipo 2 (197). L'ipotesi formulata è presentata come alternativa alla ipotesi classica, che considera come elemento scatenante del diabete l'obesità (da sbilancio tra eccessivo apporto calorico alimentare e insufficiente attività fisica), accoppiata a predisposizione genetica. Nell'ipotesi alternativa l'elemento scatenante il diabete sarebbero le POPs residenti nel tessuto adiposo aumentato (obesità, sempre da sbilancio tra apporto calorico e attività fisica): le POPs sarebbero responsabili dell'aumento della GGT del siero (e nelle cellule) per le esigenze della loro coniugazione con il GSH (vedi il ruolo della GGT nella sintesi degli acidi mercapturici); contemporaneamente le POPs potrebbero indurre modificazioni epigenetiche che porterebbero allo sviluppo della malattia diabetica. Gli Autori stessi riconoscono la necessità di ulteriori conferme epidemiologiche e tossicologiche alla ipotesi (197,223).

GGT E TUMORI

Espressione di GGT e neoplasie

Negli ultimi anni molti studi hanno mostrato l'esistenza di un'alterata espressione di GGT in numerose neoplasie umane suggerendo una possibile relazione tra aumentata espressione di GGT e trasformazione neoplastica (224).

La connessione esistente tra GGT e neoplasie è stata inizialmente proposta sulla base di studi di epato-cancerogenesi chimica su animali da laboratorio. Una serie di evidenze sperimentali ha infatti mostrato come il processo di trasformazione neoplastica conseguente all'esposizione di cellule e tessuti a sostanze cancerogene sia spesso accompagnato da un'aumentata espressione di GGT nel distretto interessato (225-230), un aspetto questo che ha portato a considerare l'incremento dell'attività di GGT come un marcatore precoce di trasformazione neoplastica (224). Parallelamente, aumentati livelli di espressione di GGT rispetto ai tessuti normali sono stati descritti in differenti neoplasie umane maligne come i tumori dell'ovaio (231,232), del colon (233,234), del fegato (235), del polmone (236), alcuni tumori del sistema nervoso centrale (237), certi sarcomi (238), melanomi (239), leucemie (240,241), ed una correlazione positiva tra espressione di GGT e potenziale metastatico è stata proposta in alcune neoplasie (239,242-244). Uno studio di vasta portata condotto su 451 neoplasie umane ha mostrato che la maggior parte dei tumori derivati dai tessuti GGT-positivi studiati esprime a sua volta GGT, ma che anche neoplasie che derivano da epiteli GGT-negativi, come i carcinomi del polmone e dell'ovaio, sono generalmente GGT positive (245). In alcuni casi l'alterata espressione di GGT nei tumori sarebbe associata a variazioni dello stato di metilazione del gene della GGT

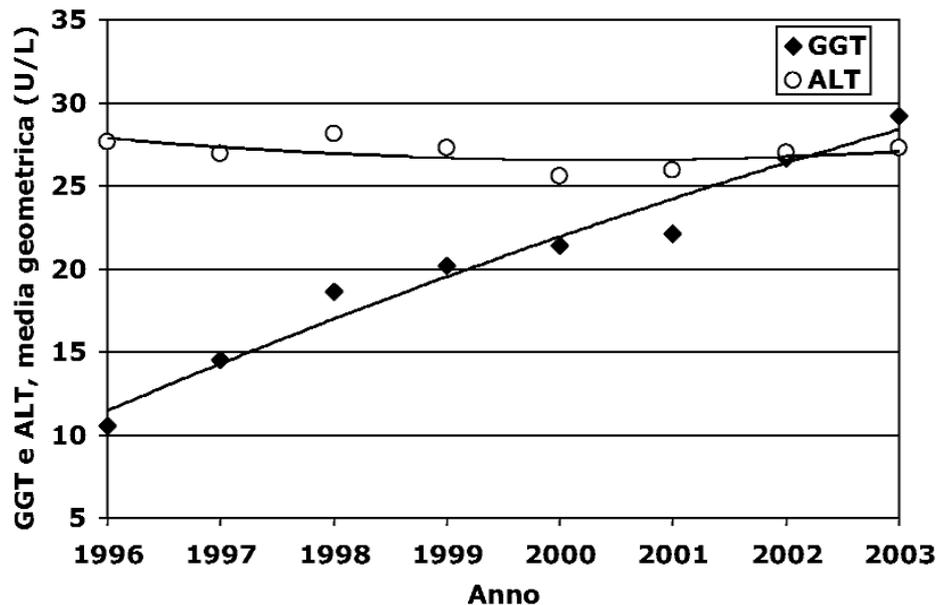


Figura 7

Media geometrica annuale della concentrazione di attività catalitica della GGT e della alanina amminotransferasi (ALT) del siero in un gruppo campione di 8072 lavoratori clinicamente sani, di genere maschile, nel periodo 1996-2003 (da rif. 220).

(246,247), ai sottotipi di mRNA trascritti (235) ed alla comparsa di forme di glicosilazione dell'enzima tumore-specifiche (47,247).

Nonostante la numerosità degli studi condotti, l'insieme dei dati presenti in letteratura non consente tuttavia di individuare una relazione costante tra espressione di GGT e trasformazione maligna, visto che risultati piuttosto contrastanti sono stati ottenuti in differenti modelli di studio (231,248,249). Se da una parte tali differenze possono essere spiegate con l'estrema variabilità esistente da neoplasia a neoplasia, dall'altra è stato suggerito che aspetti come l'esposizione a vari fattori ambientali, a farmaci o il tipo di dieta possano a loro volta alterare il fenotipo delle lesioni pre-neoplastiche, anche per quanto riguarda l'attività di GGT (250).

Nonostante i numerosi studi al riguardo, i meccanismi che sono alla base dell'aumentata attività di GGT in seguito all'esposizione ad agenti cancerogeni non sono stati ancora pienamente chiariti. In alcuni lavori condotti su differenti modelli cellulari esposti ad agenti cancerogeni è stata proposta una connessione tra espressione di GGT e stress ossidativo chiamando in causa meccanismi di modulazione trascrizionale e post-trascrizionale apparentemente legati alla formazione di ROS e di coniugati del GSH (251-255). In questa prospettiva, visto il coinvolgimento della GGT nel metabolismo del GSH, la sua aumentata espressione è stata spesso interpretata come un importante meccanismo adattativo, riscontrabile in numerosi tessuti, nei confronti dello stress ossidativo (1) ed il fatto che l'intervento di ROS sia stato ripetutamente chiamato in causa nell'ambito del processo di cancerogenesi ha fatto ipotizzare che proprio l'aumentato

stress ossidativo fosse alla base dell'aumentata espressione di GGT nei tumori (253). In linea con queste evidenze sperimentali, è stato osservato che anche l'esposizione a farmaci chemioterapici come il cisplatino (256), la doxorubicina (238,257) o il 5-fluorouracile (258) è in grado di promuovere l'espressione di GGT, a cui consegue un aumento dei livelli intracellulari di GSH e della resistenza ai farmaci impiegati. Recentemente, una serie di evidenze sperimentali ha portato a suggerire l'esistenza di una relazione tra l'attivazione della via di trasduzione del segnale dipendente da ras e l'espressione di GGT in modelli di epatociti transfettati con l'oncogene ras (259-261) ed in cellule di carcinoma del colon esposte ai raggi γ (262).

Numerosi studi hanno affrontato la questione riguardante gli effetti legati all'aumentata espressione di GGT nelle cellule tumorali e con il tempo due linee interpretative, non necessariamente antitetiche, si sono venute affermando. Essenzialmente la domanda a cui tali studi hanno cercato di dare una risposta è se l'espressione di GGT semplicemente conferisca alle cellule un qualche tipo di vantaggio selettivo oppure se la stessa GGT sia parte integrante della catena di eventi che causano la trasformazione neoplastica (1).

Il fatto che la GGT sia coinvolta nel metabolismo extracellulare del GSH fa sì che tale enzima rappresenti un mezzo tramite cui le cellule possono attingere ad un'importante fonte di cisteina impiegabile sia per la sintesi proteica sia per quella del GSH, soprattutto quando la cisteina è presente a basse concentrazioni come può avvenire in vivo (263). In questo senso, cellule transfettate con il cDNA di GGT sono in grado di utilizzare il GSH extracellulare (264,265) e di crescere in

mezzi di coltura con concentrazioni fisiologiche di cisteina e GSH più efficientemente rispetto ai controlli (266). E' stato anche osservato che i tumori GGT-positivi possono utilizzare il GSH e la cisteina circolanti più efficientemente dei tessuti dell'ospite (238) e che tumori ottenuti da cellule transfettate con il cDNA della GGT ed iniettate in topi nudi crescono molto più velocemente rispetto ai tumori di controllo (267,268). Sulla base di questi risultati, la GGT sembrerebbe esercitare una funzione "permissiva" nell'ambito della crescita tumorale: infatti, se da una parte il metabolismo extracellulare del GSH GGT-mediato consentirebbe alle cellule neoplastiche in rapida divisione di ricevere un adeguato rifornimento di acido glutammico e soprattutto di cisteina necessari per la sintesi proteica (263,269), dall'altra la sintesi del GSH permetterebbe loro di disporre di un'importante difesa nei confronti di composti elettrofili e ad azione pro-ossidante, come ad esempio certi farmaci chemioterapici (236,238,244,270). In questo senso è stato osservato che l'aumento dei livelli intracellulari di GSH sembrerebbe essere uno dei meccanismi mediante il quale le cellule tumorali diventano resistenti a farmaci come ciclofosfamide, melphalan, adriamicina, cisplatino e suoi derivati (256,257,271-273), e tramite cui sono in grado di modulare tutta una serie di processi legati alla proliferazione ed alla morte cellulare (274). D'altro canto, l'incremento dei livelli intracellulari di GSH non riesce da solo a spiegare l'effetto favorente la crescita e la resistenza ai farmaci delle cellule tumorali. In particolare, molti autori hanno descritto una diminuzione dei livelli intracellulari di GSH dopo transfezione con il cDNA della GGT in linee di cellule tumorali (268,275-277) e nei tumori derivati dal loro trapianto in topi nudi (267,268,278), mentre altri studi hanno descritto una relazione inversa tra attività di GGT e livelli di GSH intracellulare (279-281). Una possibile spiegazione di queste incongruenze potrebbe risiedere in quella che una serie di evidenze sperimentali ottenute negli ultimi anni ha portato a definire come "funzione pro-ossidante" della GGT (discussa nel paragrafo "Meccanismo d'azione e funzioni fisiologiche"), caratterizzata da una serie di effetti imputabili alla formazione di ROS nel compartimento extracellulare durante l'idrolisi del GSH GGT-mediata in presenza di metalli di transizione. In questa prospettiva, la sovraespressione di GGT potrebbe, in certi casi, causare un aumento dello stress ossidativo cellulare determinando una diminuzione, piuttosto che un aumento, dei livelli intracellulari di GSH (224).

Stark et al. (70) proposero per primi l'idea che il catabolismo del GSH potesse avere effetti pro-ossidanti e, successivamente, in esperimenti di epatocarcinogenesi indotta da agenti chimici nel ratto, furono descritti processi di perossidazione lipidica e di ossidazione dei tioli proteici dipendenti da GGT a livello di foci pre-neoplastici che portarono a suggerire l'ipotesi di una possibile funzione "attiva" della GGT nel contribuire al processo di progressione delle cellule pre-neoplastiche verso il fenotipo neoplastico (76,282). Negli ultimi anni numerosi studi hanno posto l'attenzione sugli

aspetti pro-ossidanti dell'attività di GGT mettendo in evidenza come questa possa determinare non solo effetti lesivi, ma possa anche intervenire in maniera più fine andando a modulare lo stato di ossidoriduzione di proteine cellulari mediante processi di ossidazione/S-tiolazione dei loro gruppi tiolici (79,80,280). Questa azione potrebbe avere importanti ripercussioni non solo sulla funzionalità di proteine presenti sulla superficie cellulare come, ad esempio, il recettore per il "tumor necrosis factor"- α (TNFR1) (82), ma, grazie alla formazione di H_2O_2 liberamente diffusibile all'interno della cellula, anche su fattori intracellulari sensibili allo stato redox come NF-kB, AP-1 (79) e le attività di protein chinasi/protein fosfatasi (81). In questa prospettiva è stato ipotizzato che l'attività pro-ossidante della GGT potrebbe avere importanti ripercussioni sulla proliferazione e sulla resistenza ai farmaci delle cellule tumorali, modulando sia la risposta cellulare verso segnali di proliferazione/apoptosi, sia i livelli intracellulari di antiossidanti (72,79,283). Recenti evidenze sperimentali hanno inoltre individuato nella GGT un importante fattore di resistenza delle cellule neoplastiche a farmaci chemioterapici come il cisplatino, un effetto espletato grazie ad un meccanismo di detossificazione extracellulare mediato dalla CysGly prodotta dall'idrolisi del GSH (268,284,285).

Gli aspetti legati all'attività pro-ossidante della GGT possono dunque contribuire a spiegare come la sua espressione nelle cellule tumorali possa rappresentare un fattore importante nella comparsa di un fenotipo più aggressivo e resistente ai farmaci chemioterapici. In questa prospettiva, l'eterogenea espressione di GGT tra differenti tipi di tumore e persino tra tumori dello stesso tipo, potrebbe diventare un'importante determinante nella scelta della terapia antineoplastica più idonea (224).

GGT sierica e neoplasie

Il rilascio di GGT da parte dei tumori è stato descritto in differenti modelli di neoplasie, anche se il meccanismo tramite cui i tumori rilasciano GGT non è stato ancora chiarito. In uno studio retrospettivo sono state registrate elevate concentrazioni di GGT plasmatica in un'alta percentuale di pazienti affetti da carcinoma renale metastatico (286), osservazione confermata anche in un lavoro più recente (287). Analogamente, in uno studio condotto su pazienti affetti da carcinoma epatocellulare sono stati osservate concentrazioni plasmatiche di GGT e di altri marcatori tumorali più elevate in soggetti con tumori poco differenziati rispetto a quelli con tumori moderatamente o ben differenziati (288). In ogni caso, le concentrazioni di GGT plasmatica sembrano essere almeno in parte indipendenti dall'espressione di GGT nei tumori (232,245) e la loro specificità come marcatore di neoplasia epatica sembra essere bassa (47).

Numerose pubblicazioni hanno affrontato il problema relativo alla specificità delle isoforme plasmatiche di GGT rispetto a diversi tipi di neoplasie, in particolare il carcinoma epatocellulare, focalizzando l'attenzione su parametri come glicosilazione ed associazione a lipoproteine, e valutandone l'impiego nella

determinazione, nel monitoraggio o persino nella prevenzione delle neoplasie. Specifici complessi macromolecolari sono stati descritti in pazienti con carcinoma epatocellulare primario, ma l'origine o la struttura di queste forme di GGT non sono state ancora chiarite. D'altro canto, confrontando tessuti normali con neoplasie sono state osservate variazioni relative alla glicosilazione della GGT, anche se questi cambiamenti sembrano variare con il tipo di tumore studiato (47).

Per quanto riguarda l'associazione tra concentrazioni di GGT plasmatica e incidenza di tumori sono stati riportati risultati contrastanti. Recentemente, in antitesi con due precedenti lavori (147,289), uno studio retrospettivo condotto sulla popolazione generale ha mostrato una significativa associazione tra concentrazioni di GGT sierica e rischio di mortalità per cause neoplastiche (144) (Tabella 4), e uno studio prospettico, della durata di 19 anni realizzato su 79279 soggetti uomini, ha messo in relazione l'attività sierica della GGT con il rischio di insorgenza generale di tumore e in particolare di neoplasie maligne del tratto digerente, dell'apparato respiratorio e dell'apparato urinario (290). Quest'ultimo studio è stato realizzato utilizzando i dati relativi alla coorte di uomini reclutati nel programma di prevenzione primaria austriaco attivo da circa venti anni nella provincia del Vorarlberg ("Vorarlberg health monitoring and promotion program"), sul quale è stato basato anche lo studio prospettico che ha definitivamente confermato il ruolo della GGT nel siero come fattore prognostico indipendente per eventi fatali di forme croniche di malattia coronarica e per eventi cardiaci acuti (151). Come già discusso, si conferma anche in questo caso che ai valori di GGT all'interno dell'intervallo di riferimento (uomini, GGT <55 U/L) corrisponde un aumentato rischio di mortalità per malattie cardiovascolari associate ad aterosclerosi, mentre il rischio di incidenza di neoplasie è associato a valori di GGT più elevati (>100 U/L).

LA "PROTEINA" GGT E IL RIMODELLAMENTO OSSEO

Recentemente è stata proposta che la GGT possa svolgere funzioni biologiche indipendentemente dall'attività catalitica (291). Utilizzando come modello di studio colture cellulari di midollo osseo di topo è stato dimostrato che la presenza di GGT nel mezzo di coltura induce la formazione di osteoclasti e una maggiore espressione del ligando per il recettore che attiva il fattore di trascrizione NF- κ B ("receptor activator NF- κ B ligand", RANKL) negli osteoblasti presenti nella componente stromale. Il legame tra RANKL esposto sugli osteoblasti e RANK presente sulla membrana dei precursori degli osteoclasti è necessario per attivare il differenziamento di questi ultimi. A dimostrazione del fatto che tali effetti sono indipendenti dall'attività enzimatica della GGT, risultati analoghi sono stati ottenuti anche dopo aggiunta di acivicina, un inibitore non competitivo della GGT (291). Il ruolo della GGT nel riassorbimento osseo è stato studiato anche in vivo in topi transgenici nei quali è stata indotta una

sovraespressione della GGT. L'analisi strutturale e istologica della tibia ha mostrato nei topi transgenici la riduzione del volume osseo, del numero e dello spessore delle trabecole, un maggior numero di osteoclasti e anche una riduzione degli osteoblasti con conseguente osteopenia (292). Nello stesso studio il ruolo della GGT come fattore proteico promuovente il riassorbimento osseo è stato confermato tramite selettiva sovraespressione di GGT nel tessuto osseo o facendo esprimere una proteina mutata, non alterata nella struttura, ma priva di attività enzimatica (292).

Le azioni non enzimatiche della GGT sono spiegabili attraverso l'ipotesi che le cellule da essa stimolate abbiano specifici recettori per la GGT, in grado di attivare la trasduzione del segnale. Le prove sperimentali a supporto della funzione citochino-simile della GGT sono supportate da elementi strutturali della proteina. In base a studi volti ad identificare la presenza di ponti disolfuro nella GGT di mammifero è stato ipotizzato che ne esistano due, uno tra Cys 49 e 73 e uno tra Cys 191 e 195; in particolare queste ultime due Cys sono disposte secondo il motivo CX3C, nel quale due residui di cisteina legati da ponte disolfuro sono separati da tre amminoacidi (33). A questo motivo sono associati diversi significati biologici: a) esso è l'elemento strutturale che designa una classe di chemochine che ad oggi comprende un solo membro, la fractalchina o neuroactina (293,294); b) in molte proteine di lievito il motivo CX3C è un sito di coordinazione per il Cu(I) e nella GGT sembra essere esposto sulla superficie della proteina (33).

In uno studio preliminare condotto su 551 donne in menopausa (età 50-89 anni), le concentrazioni di attività di GGT nelle urine sono risultate positivamente correlate con la concentrazione di desossipirridolina (DPD). Utilizzando come valore soglia 40 U/g creatinina, la determinazione della GGT ha permesso di individuare le donne con aumentato riassorbimento osseo (DPD >7,6 nM/mM creatinina) con una sensibilità del 61% e una specificità del 92% (295).

CONCLUSIONI

I dati presentati in questa rassegna mostrano la molteplicità di funzioni fisiologiche esercitate dall'enzima GGT, diverse secondo la localizzazione tissutale ed il substrato. Esse spaziano dal suo coinvolgimento nel trasporto di amminoacidi attraverso la membrana plasmatica, al mantenimento delle difese antiossidanti cellulari, alla azione nell'ambito dei processi di detossificazione da xenobiotici, del processo infiammatorio e, possibilmente, della regolazione del tono vascolare, fino alla sua capacità di favorire la formazione di ROS in presenza di Fe(III). In quest'ultimo caso, la definizione della funzione pro-ossidante della GGT ha portato a proporre un suo ruolo attivo nell'insorgenza o nella progressione di certe condizioni patologiche come, ad esempio, la trasformazione neoplastica e la malattia aterosclerotica. In particolare, nelle cellule tumorali le reazioni pro-ossidanti indotte

dalla GGT potrebbero rappresentare un importante fattore nella comparsa di un fenotipo più aggressivo e resistente ai farmaci chemioterapici, mentre nella malattia aterosclerotica la GGT contribuirebbe alle modificazioni ossidative che nel loro insieme favoriscono la progressione e la destabilizzazione della placca promuovendo l'ossidazione delle LDL e, al tempo stesso, modulando l'attività delle metalloproteinasi, la proliferazione e l'apoptosi degli elementi cellulari, l'aggregazione piastrinica e la trombosi.

Negli ultimi anni, numerosi studi hanno contribuito a creare un quadro sempre più articolato e complesso relativamente alle funzioni ed al significato fisiopatologico dell'attività di GGT e, in particolare, molta attenzione è stata dedicata alla GGT circolante ed al suo significato come fattore di rischio cardiovascolare e metabolico. Nel primo caso è verosimile che la GGT rappresenti un marcatore e un determinante della progressione della malattia, mentre nel secondo caso la GGT sembrerebbe essere un marcatore di sofferenza epatica indotta da una situazione di insulino-resistenza e dall'instaurarsi di uno stato infiammatorio subclinico (NAFLD), quadro clinico preliminare all'insorgenza di albuminuria e sindrome renale cronica.

Infine, la recente scoperta della possibile funzione citochino-simile della GGT apre un ulteriore e, a tutt'oggi, inesplorato campo di studi che potrebbe contribuire a chiarire le molteplici associazioni descritte tra GGT e patologie umane.

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori ringraziano il Prof. Carlo Franzini per i suggerimenti forniti per la stesura dei paragrafi relativi agli aspetti analitici della GGT sierica. Gli Autori ringraziano anche il Prof. Aldo Paolicchi, il Prof. Alfonso Pompella e il Dr. Michele Emdin per l'incoraggiamento e i suggerimenti forniti nel corso della preparazione di questo scritto.

BIBLIOGRAFIA

- Whitfield JB. Gamma glutamyl transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001;38:263-355.
- Suzuki H, Kumagai H, Tochikura T. Gamma-glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12: purification and properties. *J Bacteriol* 1986;168:1325-31.
- 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.
- 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.
- 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.
- Castonguay R, Halim D, Morin M, et al. Kinetic characterization and identification of the acylation and glycosylation sites of recombinant human gamma-glutamyltranspeptidase. *Biochemistry* 2007;46:12253-62.
- Tate SS, Meister A. Gamma-glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. *Mol Cell Biochem* 1981;39:357-68.
- Ikeda Y, Fujii J, Anderson ME, et al. Involvement of Ser-451 and Ser-452 in the catalysis of human gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem* 1995;270:22223-8.
- Hanigan MH, Frierson HF Jr. Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *J Histochem Cytochem* 1996;44:1101-8.
- 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.
- Garcion E, Sindji L, Leblondel G, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. *J Neurochem* 1999;73:859-66.
- Bolodeoku JA, Ganotakis ES, Mikhailidis DP, et al. Correlation between serum γ -glutamyltransferase activity and the platelet count. *Platelets* 1997;8:333-5.
- Khalaf MR, Hayhoe FG. Cytochemistry of γ -glutamyltransferase in haemic cells and malignancies. *Histochem J* 1987;19:385-95.
- Grisk O, Kuster U, Ansoerge S. The activity of gamma-glutamyl transpeptidase (gamma-GT) in populations of mononuclear cells from human peripheral blood. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1993;374:287-90.
- Sener A, Yardimci T. Activity determination, kinetic analyses and isoenzyme identification of gamma-glutamyltransferase in human neutrophils. *J Biochem Mol Biol* 2005;38:343-9.
- Huseby NE, Ingebretsen OC. The level of gamma-glutamyltransferase in serum, effect of carbohydrate heterogeneity on clearance rate. *Scand J Clin Lab Invest* 1993;215:S93-100.
- Courtay C, Heisterkamp N, Siest G, et al. Expression of multiple γ -glutamyltransferase genes in man. *Biochem J* 1994;297:503-8.
- 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.
- 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 [published erratum appears in *Genome Res* 1997;7: 942]. *Genome Res* 1997;7:522-31.
- 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.
- Heisterkamp N, Groffen J, Warburton D, et al. The human gamma-glutamyltransferase gene family. *Hum Genet* 2008;123:321-32.
- 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.
- Ikeda Y, Taniguchi N. Gene expression of gamma-glutamyltranspeptidase. *Methods Enzymol* 2005;401:408-25.
- Leh H, Chikhi N, Ichino K, et al. An intronic promoter controls the expression of truncated human gamma-glutamyltransferase mRNAs. *FEBS Lett* 1998;434:51-6.
- 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.
- Rajpert-De Meyts E, Shi M, Chang M, et al. Transfection with gamma-glutamyl transpeptidase enhances recovery from glutathione depletion using extracellular glutathione.

- Toxicol Appl Pharmacol 1992;114:56-2.
27. Pawlak A, Cohen EH, Octave JN, et al. An alternatively processed mRNA specific for gamma-glutamyl transpeptidase in human tissues. *J Biol Chem* 1990;265:3256-62.
 28. Goodspeed DC, Dunn TJ, Miller CD, et al. Human gamma-glutamyl transpeptidase cDNA: comparison of hepatoma and kidney mRNA in the human and rat. *Gene* 1989;76:1-9.
 29. Courtay C, Oster T, Michelet F, et al. Gamma-glutamyltransferase: nucleotide sequence of the human pancreatic cDNA. Evidence for a ubiquitous gamma-glutamyltransferase polypeptide in human tissues. *Biochem Pharmacol* 1992;43:2527-33.
 30. Wetmore LA, Gerard C, Drazen JM. Human lung expresses unique gamma-glutamyl transpeptidase transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7461-5.
 31. 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.
 32. Oinonen C, Rouvinen J. Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein Sci* 2000;9:2329-37.
 33. Kinlough CL, Poland PA, Bruns JB, et al. Gamma-glutamyltranspeptidase: disulfide bridges, propeptide cleavage, and activation in the endoplasmic reticulum. *Methods Enzymol* 2005;401:426-49.
 34. Storozhenko S, Belles-Boix E, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase in transgenic tobacco plants. Cellular localization, processing, and biochemical properties. *Plant Physiol* 2002;128:1109-19.
 35. Boanca G, Sand A, Barycki JJ. Uncoupling the enzymatic and autoprocessing activities of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase. *J Biol Chem* 2006;281:19029-37.
 36. Inoue M, Hiratake J, Suzuki H, et al. Identification of catalytic nucleophile of *Escherichia coli* gamma-glutamyltranspeptidase by gamma-monofluorophosphono derivative of glutamic acid: N-terminal thr-391 in small subunit is the nucleophile. *Biochemistry* 2000;39:7764-71.
 37. Suzuki H, Kumagai H. Autocatalytic processing of gamma-glutamyltranspeptidase. *J Biol Chem* 2002;277:43536-43.
 38. Sakamuro D, Yamazoe M, Matsuda Y, et al. The primary structure of human gamma-glutamyl transpeptidase. *Gene* 1988;73:1-9.
 39. Blochberger TC, Sabatine JM, Lee YC, et al. O-linked glycosylation of rat renal gamma-glutamyltranspeptidase adjacent to its membrane anchor domain. *J Biol Chem* 1989;264:20718-22.
 40. Shaw LM, London JW, Petersen LE. Isolation of gamma-glutamyltransferase from human liver, and comparison with the enzyme from human kidney. *Clin Chem* 1978;24:905-15.
 41. 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.
 42. Huseby NE. Separation and characterization of human gamma-glutamyltransferases. *Clin Chim Acta* 1981;111:39-45.
 43. 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.
 44. Huseby NE, Eide TJ. Variant gamma-glutamyltransferase in colorectal carcinoma and liver metastasis. A case study. *Clin Biochem* 1985;18:217-9.
 45. Yamashita K, Hitoi A, Tateishi N, et al. The structures of the carbohydrate moieties of mouse kidney gamma-glutamyltranspeptidase: occurrence of X-antigenic determinants and bisecting N-acetylglucosamine residues. *Arch Biochem Biophys* 1985;240:573-82.
 46. Arai K, Yoshida K, Komoda T, et al. Differences in the enzymatic nature and the sugar-chain structure of gamma-glutamyl transferase between normal and carcinomatous human kidney and prostate. *Clin Chim Acta* 1992;210:35-46.
 47. Pettersen I, Andersen JH, Bjornland K, et al. Heterogeneity in gamma-glutamyltransferase mRNA expression and glycan structures. Search for tumor-specific variants in human liver metastases and colon carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2003;1648:210-8.
 48. Li X, Mortensen B, Rushfeldt C, et al. Serum gamma-glutamyltransferase and alkaline phosphatase during experimental liver metastases. Detection of tumour-specific isoforms and factors affecting their serum levels. *Eur J Cancer* 1998;34:1935-40.
 49. Melezínek I, Borovanský J, Elleder M, et al. Tumour tissue is a source of gamma-glutamyl transpeptidase sialoform in the sera of melanoma-bearing mice. *Melanoma Res* 1998;8:39-45.
 50. Keillor JW, Castonguay R, Lherbet C. Gamma-glutamyl transpeptidase substrate specificity and catalytic mechanism. *Methods Enzymol* 2005;401:449-67.
 51. Thompson GA, Meister A. Interrelationships between the binding sites for amino acids, dipeptides, and gamma-glutamyl donors in gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem* 1977;252:6792-8.
 52. Allison RD. Gamma-glutamyl transpeptidase: kinetics and mechanism. *Methods Enzymol* 1985;113:419-37.
 53. Meister A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 1995;251:3-7.
 54. Griffith OW, Meister A. Translocation of intracellular glutathione to membrane-bound γ -glutamyltranspeptidase as a discrete step in the γ -glutamyl cycle: glutathionuria after inhibition of transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:268-72.
 55. Lieberman MW, Barrios R, Carter BZ, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions? *Am J Pathol* 1995;147:1175-85.
 56. Hanigan MH, Pitot HC. Gamma-glutamyl transpeptidase: its role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1985;6:165-72.
 57. Hanigan MH. Gamma-glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis. *Chem Biol Interact* 1998;111-112:333-42.
 58. 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.
 59. Cole SP, Deeley RG. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:438-46.
 60. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *Faseb J* 1999;13:1169-83.
 61. Zhang H, Forman HJ, Choi J. Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. *Methods Enzymol* 2005;401:468-83.
 62. Lieberman MW, Wiseman AL, Shi ZZ, et al. Growth retardation and cysteine deficiency in γ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7923-6.
 63. 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.
 64. Rojas E, Valverde M, Kala SV, et al. Accumulation of DNA damage in the organs of mice deficient in gamma-

- glutamyltranspeptidase. *Mutat Res* 2000;447:305-16. Erratum in: *Mutat Res* 2000;454:111.
65. Kozak EM, Tate SS. Glutathione-degrading enzymes of microvillus membranes. *J Biol Chem* 1982;257:6322-7.
66. Habib GM, Barrios R, Shi ZZ, et al. Four distinct membrane-bound dipeptidase RNAs are differentially expressed and show discordant regulation with gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem* 1996;271:16273-80.
67. 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.
68. Paolicchi A, Minotti G, Tonarelli P, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent iron reduction and LDL oxidation - a potential mechanism in atherosclerosis. *J Invest Med* 1999;47:151-60.
69. 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.
70. 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.
71. Drozd R, Parmentier C, Hachad H, et al. Gamma-glutamyltransferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. *Free Radic Biol Med* 1998;25:786-92.
72. 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.
73. Glass GA, Stark AA. Promotion of glutathione-gamma-glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation by copper and ceruloplasmin: the requirement for iron and the effects of antioxidants and antioxidant enzymes. *Environ Mol Mutagen* 1997;29:73-80.
74. 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.
75. Stark AA, Zeiger E, Pagano DA. Glutathione mutagenesis in *Salmonella typhimurium* is a gamma-glutamyl-transpeptidase-enhanced process involving active oxygen species. *Carcinogenesis* 1988;9:771-7.
76. Pompella A, Paolicchi A, Dominici S, et al. Selective colocalization of lipid peroxidation and protein thiol loss in chemically induced hepatic preneoplastic lesions: the role of gamma-glutamyltranspeptidase activity. *Histochem Cell Biol* 1996;106:275-82.
77. Paolicchi A, Tongiani R, Tonarelli P, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation in isolated hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. *Free Rad Biol Med* 1997;22:853-60.
78. Genestra M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal* 2007;19:1807-19.
79. Dominici S, Paolicchi A, Lorenzini E, et al. Gamma-glutamyltransferase-dependent prooxidant reactions: a factor in multiple processes. *Biofactors* 2003;17:187-98.
80. 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.
81. 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 H₂O₂ production. *Biochim Biophys Acta* 2003;1621:76-83.
82. 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.
83. Hinchman CA, Rebbeor JF, Ballatori N. Efficient hepatic uptake and concentrative biliary excretion of a mercapturic acid. *Am J Physiol* 1998;275:G612-9.
84. Kearns PR, Hall AG. Glutathione and the response of malignant cells to chemotherapy. *Drug Discovery Today* 1998;3:113-21.
85. 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.
86. 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.
87. Bernstrom K, Hammarstrom S. A novel leukotriene formed by transpeptidation of leukotriene E. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;109:800-4.
88. Allen S, Dashwood M, Morrison K, et al. Differential leukotriene constrictor responses in human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 1998;97:2406-13.
89. Giustarini D, Milzani A, Colombo R, et al. Nitric oxide and S-nitrosothiols in human blood. *Clin Chim Acta* 2003;330:85-98.
90. Zeng H, Spencer NY, Hogg N. Metabolism of S-nitrosoglutathione by endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H432-9.
91. 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.
92. Hogg N, Singh RJ, Konorev E, et al. S-Nitrosoglutathione as a substrate for gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochem J* 1997;323:477-81.
93. 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.
94. 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.
95. 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.
96. 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.
97. Infusino I, Bonora R, Panteghini M. Traceability in clinical enzymology. *Clin Biochem Rev* 2007;28:155-61.
98. Shaw LM, Stromme JH, London JL, et al. IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 4. IFCC method for gamma-glutamyltransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:633-46.
99. Lorentz K. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic concentrations of enzymes - the new concept. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:549.
100. Siekman L, Bonora R, Burtis CA, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic

- activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 1. The concept of reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:631-4.
101. 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.
102. Cattozzo G, Guerra E, Ceriotti F, et al. Commutable calibrator with value assigned by the IFCC reference procedure to harmonize serum lactate dehydrogenase activity results measured by 2 different methods. *Clin Chem* 2008;54:1349-55.
103. PetitClerk C, Sollberg HE. The theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:639-44.
104. Schumann G, Klauke R. New IFCC reference procedures for the determination of catalytic activity concentrations of five enzymes in serum: preliminary upper reference limits obtained in hospitalized subjects. *Clin Chim Acta* 2003;327:69-79.
105. Grossi E, Colombo R, Cavuto S, et al. The REALAB project: a new method for the formulation of reference intervals base on current data. *Clin Chem* 2005;51:1232-40.
106. Licol YO, Aslan D. Use of total patient data for indirect estimation of reference intervals for 40 clinical chemical analytes in Turkey. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:867-76.
107. Grossi E, Colombo R, Cavuto S, et al. Age and gender relationships of serum alanine aminotransferase values in healthy subjects. *Am J Gastroent* 2006;101:1675-6.
108. 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.
109. Gellerstedt M, Hyltoft Petersen P. Partitioning reference values for several subpopulations using cluster analysis. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1026-32.
110. Franzini C. Variabilità biologica e interpretazione degli esami di laboratorio. In: Panteghini M. Interpretazione degli esami di laboratorio. Padova: Piccin Nuova Libreria, 2008:13-24.
111. Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500.
112. Borsotti M, Quercioli M, Franzini C. Criteri per la selezione dei limiti di accettabilità dei risultati nei programmi di Valutazione Esterna della Qualità. *Biochim Clin* 2008;32:260-8.
113. Huseby NE. Multiple forms of gamma-glutamyltransferase in normal human liver, bile and serum. *Biochim Biophys Acta* 1978;522:354-62.
114. Huseby NE. Multiple forms of serum gamma-glutamyltransferase. Association of the enzyme with lipoproteins. *Clin Chim Acta* 1982;124:103-12.
115. 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;138:141-9.
116. Watanabe M, Taketa K, Izumi M, et al. Association of gamma-glutamyltransferase with plasma lipoprotein and lipid-protein complex in cholestasis. *Hepatogastroenterology* 1984;31:204-7.
117. Wenham PR, Horn DB, Smith AF. Physical properties of gamma-glutamyltransferase in human serum. *Clin Chim Acta* 1984;141:205-18.
118. Wenham PR, Horn DB, Smith AF. In vitro studies upon the release of gamma-glutamyltransferase from human liver. *Clin Chim Acta* 1986;160:223-33.
119. Van Hoof VO, Deng JT, De Broe ME. How do plasma membranes reach the circulation? *Clin Chim Acta* 1997;266:23-31.
120. Grøstad M, Huseby NE. Clearance of different multiple forms of human gamma-glutamyltransferase. *Clin Chem* 1990;36:1654-6.
121. Huseby NE, Kindberg GM, Grøstad M, et al. Clearance of purified human liver gamma-glutamyltransferase after intravenous injection in the rat. *Clin Chim Acta* 1992;205:197-203.
122. Huseby NE, Mortensen B, Smedsrød B. Clearance of circulating gamma-glutamyltransferase by the hepatic galactose receptor. Variability in clearance rate due to carbohydrate heterogeneity of the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1993;1156:283-7.
123. Mortensen B, Huseby NE. Clearance of circulating gamma-glutamyltransferase by the asialoglycoprotein receptor. Enzyme forms with different sialic acid content are eliminated at different clearance rates and without apparent desialylation. *Clin Chim Acta* 1997;258:47-58.
124. Nemesanszky E, Lott JA. Gamma-glutamyltransferase and its isoenzymes: progress and problems. *Clin Chem* 1985;31:797-803.
125. Sacchetti L, Castaldo G, Fortunato G, et al. Improved procedure for measuring gamma-glutamyltransferase isoenzymes in serum. *Clin Chem* 1988;34:419-22.
126. Bellini M, Tumino E, Giordani R, et al. Serum γ -glutamyltranspeptidase isoforms in alcoholic liver disease. *Alcohol and Alcoholism* 1997;32:259-66.
127. Yao DF, Huang ZW, Chen SZ, et al. Diagnosis of hepatocellular carcinoma by quantitative detection of hepatoma-specific bands of serum gamma-glutamyltransferase. *Am J Clin Pathol* 1998;110:743-9.
128. Wenham PR, Horn DB, Smith AF. Multiple forms of gamma-glutamyltransferase: a clinical study. *Clin Chem* 1985;31:569-73.
129. Sacchetti L, Castaldo G, Salvatore F. The gamma-glutamyltransferase isoenzyme pattern in serum as a signal discriminating between hepatobiliary diseases, including neoplasias. *Clin Chem* 1988;34:352-5.
130. Sacchetti L, Castaldo G, Cimino L, et al. Diagnostic efficiency in discriminating liver malignancies from cirrhosis by serum gamma-glutamyltransferase isoforms. *Clin Chim Acta* 1988;177:167-72.
131. Sacchetti L, Castaldo G, Salvatore F. Electrophoretic behavior and partial characterization of disease-associated serum forms of gamma-glutamyltransferase. *Electrophoresis* 1989;10:619-27.
132. 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.
133. Castaldo G, Oriani G, Lofrano MM, et al. Differential diagnosis between hepatocellular carcinoma and cirrhosis through a discriminant function based on results for serum analytes. *Clin Chem* 1996;42:1263-9.
134. Castaldo G, Intrieri M, Castellano L, et al. Serum gamma-glutamyltransferase isoform complexed to LDL in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma. *Clin Chem* 1999;45:1100-2.
135. Franzini M, Bramanti E, Ottaviano V, et al. A high performance gel filtration chromatography method for γ -glutamyltransferase fraction analysis. *Anal Biochem* 2008;374:1-6.

136. 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.
137. Szczeklik E, Orlowski M, Szewczuk A. Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity in liver disease. *Gastroenterology* 1961;41:353-9.
138. Kristenson H, Ohrn J, Trelle E, et al. Serum γ -glutamyltransferase at screening and retrospective sickness days. *Lancet* 1980;8178:1141.
139. Peterson B, Trelle E, Kristensson H, et al. Comparison of γ -glutamyltransferase and other health screening tests in average middle-aged males, heavy drinkers and alcohol non-users. *Scand J Clin Lab Invest* 1983;43:141-9.
140. Conigrave KM, Saunders JB, Reznick RB, et al. Prediction of alcohol-related harm by laboratory test results. *Clin Chem* 1993;39:2266-70.
141. Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V, et al. Distribution, determinants, and prognostic value of gamma-glutamyltranspeptidase for all-cause mortality in a cohort of construction workers from south Germany. *Prev Med* 1997;26:305-10.
142. Arndt V, Brenner H, Rothenbacher D, et al. Elevated liver enzyme activity in construction workers: prevalence and impact on early retirement and all-cause mortality. *Int Arch Occup Environ Health* 1998;71:405-12.
143. Karlson BW, Wiklund O, Hallgren P, et al. Ten-year mortality amongst patients with a very small or unconfirmed acute myocardial infarction in relation to clinical history, metabolic screening and signs of myocardial ischaemia. *J Intern Med* 2000;247:449-56.
144. Kazemi-Shirazi L, Endler G, Winkler S, et al. Gamma glutamyltransferase and long-term survival: is it just the liver? *Clin Chem* 2007;53:940-6.
145. Betro MG, Oon RC, Edwards JB. γ -Glutamyl transpeptidase and other liver function tests in myocardial infarction and heart failure. *Am J Clin Pathol* 1973;60:679-83.
146. Hood B, Kjellstrom T, Ruter G, et al. Serum cholesterol, serum triglyceride, alcohol, myocardial infarction and death (2): necessary to pay attention to serum GT in assessment of risks of myocardial infarction and death. *Lakartidningen* 1990;87:3295-8.
147. Wannamethee G, Ebrahim S, Shaper AG. Gamma-glutamyltransferase: determinants and association with mortality from ischaemic heart disease and all causes. *Am J Epidemiol* 1995;142:699-708.
148. Emdin M, Passino C, Michelassi C, et al. Prognostic value of serum gamma-glutamyl transferase activity after myocardial infarction. *Eur Heart J* 2001;22:1802-7.
149. Jousilahti P, Rastenyte D, Tuomilehto J. Serum gammaglutamyltransferase, self-reported alcohol drinking, and the risk of stroke. *Stroke* 2000;31:1851-5.
150. Bots ML, Salonen JT, Elwood PC, et al. Gamma-glutamyltransferase and risk of stroke: the Eurostroke project. *J Epidemiol Commun Health* 2002;56:i25-9.
151. Ruttman E, Brant LJ, Concin H, et al. γ -Glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality. An investigation in a cohort of 163,944 austrian adults. *Circulation* 2005;112:2130-7.
152. Lee DS, Evans JC, Robins SJ, et al. Gamma glutamyl transferase and metabolic syndrome, cardiovascular disease, and mortality risk: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:127-33.
153. Meisinger C, Doring A, Schneider A, et al. Serum gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident coronary events in apparently healthy men from the general population. *Atherosclerosis* 2006;189:297-302.
154. Hozawa A, Okamura T, Kadowaki T, et al. Gamma-glutamyltransferase predicts cardiovascular death among Japanese women. *Atherosclerosis* 2007;194:498-504.
155. Lee DH, Silventoinen K, Hu G, et al. Serum gamma-glutamyltransferase predicts non-fatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease among 28,838 middle-aged men and women. *Eur Heart J* 2006;27:2170-6.
156. Fraser A, Harris R, Sattar N, et al. Gamma-glutamyltransferase is associated with incident vascular events independently of alcohol intake: analysis of the British Women's Heart and Health Study and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2729-35.
157. Wannamethee SG, Lennon L, Shaper AG. The value of gamma-glutamyltransferase in cardiovascular risk prediction in men without diagnosed cardiovascular disease or diabetes. *Atherosclerosis* 2008;201:168-75.
158. Amoroso G, Van Boven AJ, Crijns HJ. Drug therapy or coronary angioplasty for the treatment of coronary artery disease: new insights. *Am Heart J* 2001;141:S22-5.
159. Emdin M, Franzini M, Paolichci A, et al. A role for γ -glutamyltransferase in pathogenesis and evolution of cardiovascular diseases? *Future Cardiology* 2007;3:263-70.
160. Emdin M, Passino C, Michelassi C, et al. Additive prognostic value of gamma-glutamyltransferase in coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2009 (in stampa).
161. Paolichci A, Emdin M, Ghiozeni E, et al. Human atherosclerotic plaques contain gamma-glutamyl transpeptidase enzyme activity. *Circulation* 2004;109:1440.
162. Emdin M, Passino C, Donato L, et al. Serum gamma-glutamyltransferase as a risk factor of ischemic stroke might be independent of alcohol consumption. *Stroke* 2002;33:1163-4.
163. Franzini M, Corti A, Martinelli B, et al. γ -Glutamyltransferase activity in human atherosclerotic plaques - biochemical similarities with the circulating enzyme. *Atherosclerosis* 2009;202:119-27.
164. Lee FY, Lee TS, Pan CC, et al. Colocalization of iron and ceroid in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1998;138:281-8.
165. Lapenna D, Pierdomenico SD, Ciofani G, et al. Association of body iron stores with low molecular weight iron and oxidant damage of human atherosclerotic plaques. *Free Radic Biol Med* 2007;42:492-8.
166. Pang JH, Jiang MJ, Chen YL, et al. Increased ferritin gene expression in atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1996;97:2204-12.
167. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005;111:3481-8.
168. Arnesen E, Huseby NE, Brenn T, et al. The Tromsø Heart Study: distribution of, and determinants for, gamma-glutamyltransferase in a free-living population. *Scand J Clin Lab Invest* 1986;46:63-70.
169. Nilssen O, Førde OH, Brenn T. The Tromsø Study. Distribution and population determinants of gamma-glutamyltransferase. *Am J Epidemiol* 1990;132:318-26.
170. Nilssen O, Førde OH. Seven-year longitudinal population study of change in gamma-glutamyltransferase: the Tromsø Study. *Am J Epidemiol* 1994;139:787-92.
171. 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.
172. Poikolainen K, Vartiainen E. Determinants of gamma-glutamyltransferase: positive interaction with alcohol and body mass index, negative association with coffee. *Am J Epidemiol* 1997;146:1019-24.
173. 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.
174. Lawlor DA, Sattar N, Smith GD, et al. The associations of physical activity and adiposity with alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase. *Am J Epidemiol* 2005;161:1081-8.
 175. Leggett BA, Brown NN, Bryant SJ, et al. Factors affecting the concentrations of ferritin in serum in a healthy Australian population. *Clin Chem* 1990;20:350-5.
 176. Lee DH, Jacobs DR Jr, Gross M, et al. Gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Clin Chem* 2003;49:1358-66.
 177. Takigawa T, Hibino Y, Kimura S, et al. Association between serum gamma-glutamyltransferase and oxidative stress related factors. *Hepatogastroenterology* 2008;55:50-3.
 178. Perry IJ, Wannamethee SG, Shaper AG. Prospective study of serum gamma-glutamyltransferase and risk of NIDDM. *Diabetes Care* 1998;21:732-7.
 179. 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.
 180. Wallace TM, Utzschneider KM, Tong J, et al. Relationship of liver enzymes to insulin sensitivity and intra-abdominal fat. *Diabetes Care* 2007;30:2673-8.
 181. Lee DH, Ha MH, Kim JR, et al. Gamma-glutamyltransferase, alcohol, and blood pressure. A four year follow-up study. *Ann Epidemiol* 2002;12:90-6.
 182. Shankar A, Li J. Association between serum gamma-glutamyltransferase level and prehypertension among US adults. *Circ J* 2007;71:1567-72.
 183. Santos VN, Lanzoni VP, Szejnfeld J, et al. A randomized double-blind study of the short-time treatment of obese patients with nonalcoholic fatty liver disease with ursodeoxycholic acid. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:723-9.
 184. Mabile L, Ruidavets JB, Fauvel J, et al. Differential levels of gamma-glutamyl transferase activity and apolipoprotein CIII in men on either statin or fibrate therapy. *Diabetes Care* 2003;26:1652-3.
 185. 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.
 186. 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.
 187. Rantala AO, Lilja M, Kauma H, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase and the metabolic syndrome. *J Intern Med* 2000;248:230-8.
 188. Fraser A, Ebrahim S, Smith GD, et al. A comparison of associations of alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase with fasting glucose, fasting insulin, and glycated hemoglobin in women with and without diabetes. *Hepatology* 2007;46:158-65.
 189. Nakanishi N, Nishina K, Li W, et al. Serum gamma-glutamyltransferase and development of impaired fasting glucose or type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *J Intern Med* 2003;254:287-95.
 190. Nakanishi N, Suzuki K, Tataru K. Serum gamma-glutamyltransferase and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetes Care* 2004;27:1427-32.
 191. Lee DH, Ha MH, Kim JH, et al. Gamma-glutamyltransferase and diabetes-A 4 year follow-up study. *Diabetologia* 2003;46:359-64.
 192. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-50.
 193. Meisinger C, Löwel H, Heier M, et al. Serum gamma-glutamyltransferase and risk of type 2 diabetes mellitus in men and women from the general population. *J Intern Med* 2005;258:527-35.
 194. 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.
 195. Lee DH, Silventoinen K, Jacobs DR Jr, et al. Gamma-glutamyltransferase, 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.
 196. 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.
 197. 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.
 198. Lee DH, Gross MD, Steffes MW, et al. Is serum gamma-glutamyltransferase a biomarker of xenobiotics, which are conjugated by glutathione? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:26-8.
 199. 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.
 200. 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.
 201. Grundy SM. Gamma-glutamyl transferase: another biomarker for metabolic syndrome and cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:4-7.
 202. Kang YH, Min HK, Son SM, et al. The association of serum gamma glutamyltransferase with components of the metabolic syndrome in the Korean adults. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77:306-13.
 203. Lee MY, Koh SB, Koh JH, et al. Relationship between gamma-glutamyltransferase and metabolic syndrome in a Korean population. *Diabet Med* 2008;25:469-75.
 204. Ryu S, Chang Y, Kim DI, et al. Gamma-glutamyltransferase as a predictor of chronic kidney disease in nonhypertensive and nondiabetic Korean men. *Clin Chem* 2007;53:71-7.
 205. Chang Y, Ryu S, Sung E, et al. Nonalcoholic fatty liver disease predicts chronic kidney disease in nonhypertensive and nondiabetic Korean men. *Metabolism* 2008; 57: 569-76.
 206. Targher G, Arcaro G. Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2007;19:517-9.
 207. Weir MR. Microalbuminuria and cardiovascular disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:581-90.
 208. Lee DH, Jacobs DR Jr, Gross M, et al. Serum gamma-glutamyltransferase was differently associated with microalbuminuria by status of hypertension or diabetes: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Clin Chem* 2005;51:1185-91.
 209. Lee DH, Blomhoff R, Jacobs DR Jr. Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radic Res* 2004;38:535-9.
 210. Calvert GM, Hornung RW, Sweeney MH, et al. Hepatic

- and gastrointestinal effects in an occupational cohort exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin. *JAMA* 1992;267:2209-14.
211. Sweeney MH, Mocarelli P. Human health effects after exposure to 2,3,7,8-TCDD. *Food Addit Contam* 2000;17:303-16.
 212. Nagaya T, Ishikawa N, Hata H, et al. Subclinical and reversible hepatic effects of occupational exposure to trichloroethylene. *Int Arch Occup Environ Health* 1993;64:561-3.
 213. Sala M, Sunyer J, Herrero C, et al. Association between serum concentrations of hexachlorobenzene and polychlorobiphenyls with thyroid hormone and liver enzymes in a sample of the general population. *Occup Environ Med* 2001;58:172-7.
 214. Feeley MM. Biomarkers for Great Lakes priority contaminants: halogenated aromatic hydrocarbons. *Environ Health Perspect* 1995;103:7-16.
 215. Kitamura K, Kikuchi Y, Watanabe S, et al. Health effects of chronic exposure to polychlorinated dibenzo-P-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF) and coplanar PCB (Co-PCB) of municipal waste incinerator workers. *J Epidemiol* 2000;10:262-70.
 216. Chen HL, Su HJ, Guo YL, et al. Biochemistry examinations and health disorder evaluation of Taiwanese living near incinerators and with low serum PCDD/Fs levels. *Sci Total Environ* 2006;366:538-48.
 217. Lee CC, Yao YJ, Chen HL, et al. Fatty liver and hepatic function for residents with markedly high serum PCDD/Fs levels in Taiwan. *J Toxicol Environ Health A* 2006;69:367-80.
 218. Lee DH, Jacobs DR Jr. Association between serum concentrations of persistent organic pollutants and gamma glutamyltransferase: results from the National Health and Examination Survey 1999-2002. *Clin Chem* 2006;52:1825-7.
 219. Lee DH, Lim JS, Song K, et al. Graded associations of blood lead and urinary cadmium concentrations with oxidative-stress-related markers in the U.S. population: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Environ Health Perspect* 2006;114:350-4.
 220. Lee DH, Ha MH, Kam S, et al. A strong secular trend in serum gamma-glutamyltransferase from 1996 to 2003 among South Korean men. *Am J Epidemiol* 2006;163:57-65.
 221. Lee DH, Lee IK, Jin SH, et al. Association between serum concentrations of persistent organic pollutants and insulin resistance among nondiabetic adults. *Diabetes Care* 2007;30:622-8.
 222. Lee DH, Lee IK, Steffes M, et al. Extended analysis of the association between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes. *Diabetes Care* 2007;30:1596-8.
 223. Lee DH, Steffes MW, Jacobs DR Jr. Can persistent organic pollutants explain the association between serum gamma-glutamyltransferase and type 2 diabetes? *Diabetologia* 2008;51:402-7.
 224. Pompella A, Corti A, Paolicchi A, et al. Gamma-glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:360-6.
 225. Kalengayi MM, Ronchi G, Desmet VJ. Histochemistry of gamma-glutamyl transpeptidase in rat liver during aflatoxin B1-induced carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1975;55:579-88.
 226. Cameron R, Kellen J, Kolin A, et al. Gamma-glutamyltransferase in putative premalignant liver cell populations during hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1978;38:823-9.
 227. Jalanko H, Ruoslahti E. Differential expression of alpha-fetoprotein and gamma-glutamyltranspeptidase in chemical and spontaneous hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1979;39:3495-501.
 228. Pitot HC, Goodspeed D, Dunn T, et al. Regulation of the expression of some genes for enzymes of glutathione metabolism in hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989;97:23-34.
 229. Schaff Z, Kovalszky I, Nagy P, et al. Human and experimental hepatocarcinogenesis. *Scand J Gastroenterol* 1998;228(Suppl):90-7.
 230. Yao DF, Dong ZZ, Yao DB, et al. Abnormal expression of hepatoma-derived gamma-glutamyltransferase subtyping and its early alteration for carcinogenesis of hepatocytes. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004;3:564-70.
 231. Hanigan MH, Frierson HF, Brown JE, et al. Human ovarian tumors express γ -glutamyl transpeptidase. *Cancer Res* 1994;54:286-90.
 232. Paolicchi A, Pompella A, Tonarelli P, et al. Gamma-glutamyltranspeptidase activity in human ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 1996;16:3053-8.
 233. Munjal DD. Concurrent measurements of carcinoembryonic antigen, glucosephosphate isomerase, gamma-glutamyltransferase, and lactate dehydrogenase in malignant, normal adult, and fetal colon tissues. *Clin Chem* 1980;26:1809-12.
 234. Murata J, Ricciardi-Castagnoli P, Dessous L'Eglise Mange P, et al. Microglial cells induce cytotoxic effects toward colon carcinoma cells: measurement of tumor cytotoxicity with a gamma-glutamyl transpeptidase assay. *Int J Cancer* 1997;70:169-74.
 235. Tsutsumi M, Sakamuro D, Takada A, et al. Detection of a unique gamma-glutamyl transpeptidase messenger RNA species closely related to the development of hepatocellular carcinoma in humans: a new candidate for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996;23:1093-7.
 236. Blair SL, Heerdt P, Sachar S, et al. Glutathione metabolism in patients with non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 1997;57:152-5.
 237. Schäfer C, Fels C, Brucke M, et al. Gamma-glutamyl transferase expression in higher-grade astrocytic glioma. *Acta Oncol* 2001;40:529-35.
 238. Hochwald SN, Rose DM, Brennan MF, et al. Elevation of glutathione and related enzyme activities in high-grade and metastatic extremity soft tissue sarcoma. *Ann Surg Oncol* 1997;4:303-9.
 239. Supino R, Mapelli E, Sanfilippo O, et al. Biological and enzymatic features of human melanoma clones with different invasive potential. *Melanoma Res* 1992;2:377-84.
 240. Morell A, Losa G, Carrel S, et al. Determination of ectoenzyme activities in leukemic cells and in established hematopoietic cell lines. *Am J Hematol* 1986;21: 289-98.
 241. Tager M, Ittenson A, Franke A, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase-cellular expression in populations of normal human mononuclear cells and patients suffering from leukemias. *Ann Hematol* 1995;70:237-42.
 242. Bard S, Noël P, Chauvin F, et al. Gamma-glutamyltranspeptidase activity in human breast lesions: an unfavourable prognostic sign. *Br J Cancer* 1986;53:637-42.
 243. Prezioso JA, Wang N, Duty L, et al. Enhancement of pulmonary metastasis formation and gamma-glutamyltranspeptidase activity in B16 melanoma induced by differentiation in vitro. *Clin Exp Metastasis* 1993;11:263-74.
 244. Obrador E, Carretero J, Ortega A, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase overexpression increases metastatic growth of B16 melanoma cells in the mouse liver. *Hepatology* 2002;35:74-81.
 245. Hanigan MH, Frierson HF, Swanson PE, et al. Altered

- expression of gamma-glutamyl transpeptidase in human tumors. *Hum Pathol* 1999;30: 300-5.
246. Baik JH, Griffiths S, Giulli G, et al. DNA methylation patterns of the rat gamma-glutamyl transpeptidase gene in embryonic, adult and neoplastic liver. *Carcinogenesis* 1991;12:1035-9.
247. Yao D, Jiang D, Huang Z, et al. Abnormal expression of hepatoma specific gamma-glutamyl transferase and alteration of gamma-glutamyl transferase gene methylation status in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000;88:761-9.
248. Durham JR, Frierson HF Jr, Hanigan MH. Gamma-glutamyl transpeptidase immunoreactivity in benign and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 1997;45:55-62.
249. Frierson HF Jr, Theodorescu D, Mills SE, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase in normal and neoplastic prostate glands. *Mod Pathol* 1997;10:1-6.
250. Pitot HC, Glauert HP, Hanigan M. The significance of selected biochemical markers in the characterization of putative initiated cell populations in rodent liver. *Cancer Lett* 1985;29:1-14.
251. 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;11:586-92.
252. Liu RM, Hu H, Robison TW, et al. Differential enhancement of γ -glutamyl transpeptidase and γ -glutamylcysteine synthetase by tert-butylhydroquinone in rat lung epithelial L2 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14:186-91.
253. Liu RM, Shi MM, Giulivi C, et al. Quinones increase γ -glutamyl transpeptidase expression by multiple mechanisms in rat lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1998;274:330-336.
254. Ripple MO, Pickhardt PA, Wilding G. Alteration in gamma-glutamyl transpeptidase activity and messenger RNA of human prostate carcinoma cells by androgen. *Cancer Res* 1997;57:2428-33.
255. Mikkelsen IM, Mortensen B, Laperche Y, et al. The expression of γ -glutamyltransferase in rat colon carcinoma cells is distinctly regulated during differentiation and oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 2002;232:87-95.
256. Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, et al. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3070-4.
257. Lau HM, Lewis AD, Ehsan MN, et al. Multifactorial mechanisms associated with broad cross-resistance of ovarian carcinoma cells selected by cyanomorpholino doxorubicin. *Cancer Res* 1991;51:5181-7.
258. Lewis AL, Hayes JD, Wolf CR. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of drug resistance: intrinsic differences and cell cycle effects. *Carcinogenesis* 1988;9:1283-7.
259. Braun L, Goyette M, Yaswen P, et al. Growth in culture and tumorigenicity after transfection with the ras oncogene of liver epithelial cells from carcinogen-treated rats. *Cancer Res* 1987;47:4116-24.
260. Sinha S, Hockin LJ, Neal GE. Transformation of a rat liver cell line: neoplastic phenotype and regulation of gamma glutamyl transpeptidase in tumour tissue. *Cancer Lett* 1987;35:215-24.
261. Li Y, Leiberman MW. Two genes associated with liver cancer are regulated by different mechanisms in fasT24 transformed liver epithelial cells. *Oncogene* 1989;4:795-8.
262. Pankiv S, Møller S, Bjørkøy G, et al. Radiation-induced upregulation of γ -glutamyltransferase in colon carcinoma cells is mediated through the Ras signal transduction pathway. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760:151-7.
263. Hanigan MH, Ricketts WA. Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry* 1993;32:6302-6.
264. Rajpert-De Meyts E, Shi M, Chang M, et al. Transfection with gamma-glutamyl transpeptidase enhances recovery from glutathione depletion using extracellular glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;114:56-62.
265. Daubeuf S, Balin D, Leroy P, et al. Different mechanisms for gamma-glutamyltransferase-dependent resistance to carboplatin and cisplatin. *Biochem Pharmacol* 2003;66:595-604.
266. Hanigan MH. Expression of gamma-glutamyl transpeptidase provides tumor cells with a selective growth advantage at physiologic concentrations of cyst(e)ine. *Carcinogenesis* 1995;16:181-5.
267. Hanigan MH, Gallagher BC, Townsend DM, et al. γ -glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo. *Carcinogenesis* 1999;20:553-9.
268. Franzini M, Corti A, Lorenzini E, et al. Modulation of cell growth and cisplatin sensitivity by membrane γ -glutamyltransferase in melanoma cells. *Eur J Cancer* 2006;42:2623-30.
269. Kang YJ, Feng Y, Hatcher EL. Glutathione stimulates A549 cell proliferation in glutamine-deficient culture: the effect of glutamate supplementation. *J Cell Physiol* 1994;161:589-96.
270. Hanigan MH, Pitot HC. Gamma-glutamyl transpeptidase--its role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1985;6:165-72.
271. Friedman HS, Colvin OM, Kaufmann SH, et al. Cyclophosphamide resistance in medulloblastoma. *Cancer Res* 1992;52:5373-8.
272. Canada A, Herman L, Kidd K, et al. Glutathione depletion increases the cytotoxicity of melphalan to PC-3, an androgen-insensitive prostate cancer cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993;32:73-77.
273. Mares V, Lisa V, Malik R, et al. Cisplatin induced gamma-glutamyltransferase up-regulation, hypertrophy and differentiation in astrocytic glioma cells in culture. *Histol Histopathol* 2003;18:687-93.
274. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, et al. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1499-1503.
275. Bailey HH, Gipp JJ, Mulcahy RT. Increased expression of gamma-glutamyl transpeptidase in transfected tumor cells and its relationship to drug sensitivity. *Cancer Lett* 1994;87:163-70.
276. Del Bello B, Paolicchi A, Comporti M, et al. Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *FASEB J* 1999;13:69-79.
277. Karp DR, Shimooku K, Lipsky PE. Expression of gamma-glutamyl transpeptidase protects ramos B cells from oxidation-induced cell death. *J Biol Chem* 2001;276:3798-804.
278. Warren BS, Naylor MF, Winberg LD, et al. Induction and inhibition of tumor progression. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993;202:9-15.
279. Manzotti C, Pratesi G, Menta E, et al. BBR 3464: a novel triplatinum complex, exhibiting a preclinical profile of antitumor efficacy different from cisplatin. *Clin Cancer Res* 2000;6:2626-34.
280. Paolicchi A, Lorenzini E, Perego P, et al. Extra-cellular

- thiol metabolism in clones of human metastatic melanoma with different gamma-glutamyl transpeptidase expression: implications for cell response to platinum-based drugs. *Int J Cancer* 2002;97:740-5.
281. Perego P, Romanelli S, Carenini N, et al. Ovarian cancer cisplatin-resistant cell lines: multiple changes including collateral sensitivity to taxol. *Ann Oncol* 1998;9:423-30.
282. Stark AA, Russel JJ, Langenbach R, et al. Localization of oxidative damage by a glutathione- γ -glutamyl transpeptidase system in preneoplastic lesions in sections of livers from carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis* 1994;15:343-348.
283. Giommarelli C, Corti A, Supino R, et al. Cellular response to oxidative stress and ascorbic acid in melanoma cells overexpressing gamma-glutamyltransferase. *Eur J Cancer* 2008;44:750-9.
284. Daubeuf S, Leroy P, Paolicchi A, et al. Enhanced resistance of HeLa cells to cisplatin by overexpression of gamma-glutamyltransferase. *Biochem Pharmacol* 2002;64:207-16.
285. Paolicchi A, Sotiropoulou M, Perego P, et al. Gamma-glutamyl transpeptidase catalyses the extracellular detoxification of cisplatin in a human cell line derived from the proximal convoluted tubule of the kidney. *Eur J Cancer* 2003;39:996-1003.
286. Sandock DS, Seftel AD, Resnick MI. The role of gamma-glutamyl transpeptidase in the preoperative metastatic evaluation of renal cell carcinoma. *J Urol* 1997;157:798-9.
287. Simic T, Dragicevic D, Savic-Radojevic A, et al. Serum gamma glutamyl-transferase is a sensitive but unspecific marker of metastatic renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2007;14:289-93.
288. Morsi MI, Hussein AE, Mostafa M, et al. Evaluation of tumour necrosis factor-alpha, soluble P-selectin, gamma-glutamyl transferase, glutathione S-transferase-pi and alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma before and during chemotherapy. *Br J Biomed Sci* 2006;63:74-8.
289. Petersson B, Trell E, Henningsen NC, et al. Risk factors for premature death in middle aged men. *Br Med J* 1984;288:1264-8.
290. Strasak AM, Rapp K, Brant LJ, et al. Association of gamma-glutamyltransferase and risk of cancer incidence in men: a prospective study. *Cancer Res* 2008;68:3970-7.
291. Niida S, Kawahara M, Ishizuka Y, et al. Gamma-glutamyltranspeptidase stimulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression independent of its enzymatic activity and serves as a pathological bone-resorbing factor. *J Biol Chem* 2004;279:5752-6.
292. 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.
293. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;385:640-4.
294. Stievano L, Piovan E, Amadori A. C and CX3C chemokines: cell sources and physiopathological implications. *Crit Rev Immunol* 2004;24:205-28.
295. Asaba Y, Hiramatsu K, Matsui Y, et al. Urinary gamma-glutamyltransferase (GGT) as a potential marker of bone resorption. *Bone* 2006;39:1276-82.