

Glutasyon S-Transferazların Klinik ve Toksikolojik Önemi

CLINICAL AND TOXICOLOGICAL IMPORTANCE OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES

Hilmi ORHAN*, Gönül ŞAHİN"

* Uzm.Ecz.Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji ABD,

** Doç.Dr.Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji ABD, ANKARA

ÖZET

Glutasyon S-transferazlar (GST) glutasyon (GSH) ile geniş bir grup elektrofilik kimyasal bileşiğin konjugasyonunu katalize ederek detoksifiye olmalarını sağlayan bir grup enzimdir. Hücrede sitozolde ya da mikrozomal kısımlarda bulunabilir. İnsan sitozolik GST'leri, et, u, TI ve o olmak üzere dört gruba ayrılırlar. GST'lerin fonksiyonları iki genel grupta toplanabilir. Ana ve en önemli fonksiyonları ksenobiyotik metabolizmasında açığa çıkan reaktif ara ürünlerin detoksifikasyonudur. Oksidatif stres sırasında oluşan zararlı ürünlere karşı koruma sağlamaları oldukça ilgi çekmektedir. Bu ürünler arasında 4-hidroksialk-2-enaller olduğu kadar lipitlerden ve DNA'dan oluşan hidroperoksitler de sayılabilir. İkinci olarak suda çözünürlüğü az olan bir grup bileşiği bağlarlar ve bunların hücre içinde transportlarında rol oynarlar.

GST'lar memeli tümör hücrelerinde normalin üzerindeki düzeylerde saptanmışlardır. Enzim düzeylerindeki bu artış çoklu Haç rezistansından (MDR) sorumlu mekanizmalardan biridir. Son yıllarda bazı neoplazi türlerinin, böbrek ve karaciğer hasarının ve bazı endüstriyel ve çevresel kimyasal bileşiğe maruziyetin belirlenmesinde bir biyomarkör olarak kullanılabilecekleri ileri sürülmektedir. Tüm bu alanlarda araştırmalar yoğun ve kapsamlı olarak sürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Glutasyon S-transferaz, Detoksikasyon, Biyomarkör, Elektrofilik ksenobiyotik

T Klin Tıp Bilimleri 1995, 15: 303-315

Geliş Tarihi: 25.01.1995

Yazışma Adresi: Gönül ŞAHİN
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji ABD,
06100 Samanpazarı, ANKARA

T Klin Tıp Bilimleri 1995, 15

SUMMARY

Glutathione S-transferases (GST) are a complex group of detoxification enzymes that catalyse the conjugation of glutathione (GSH) with a broad spectrum of electrophiles. They can be found in the cytosol or in microsomes. Human cytosolic GST's are divided in class a, u, n and o. The functions of GST's may be classified into two general categories. The main and most important function of the enzymes is believed to be detoxification of reactive intermediates in the metabolism of xenobiotics. Interest has also focused on the ability of these proteins to protect against harmful products formed during oxidative stress, such as hydroperoxides from lipids and DNA, as well as 4-hydroxyalk-2-enals. Secondly, they bind a number of amphipathic compounds that they do not metabolize (nonsubstrate ligands) and have been suggested to act as intracellular transport proteins for compounds that have limited solubility in water.

GST's have been found at high levels in mammalian tumor cells. As a result it is one of the mechanisms responsible for multidrug resistance (MDR). These enzymes recently have been suggested as a biomarker for detection of different types of neoplasia liver and kidney damage and exposure to some industrial and environmental chemicals. All these areas are currently and extensively investigated.

Key Words: Glutathione S-transferase, Detoxication, Biomarker, Electrophilic xenobiotic

T Klin J Med Sci 1995, 15: 303-315

Hızlı endüstrileşme ve kentleşme ile insan ve diğer canlılar her geçen gün artan sayıda ve genel olarak ksenobiyotik adı verilen birçok kimyasal maddeye maruz kalmaktadır. Hızla artan nüfusa paralel olarak artmayan tarımsal üretim nedeniyle olası açlık tehlike-

sine karşı koyabilmek amacıyla yaygın kullanılan pestisitler, yine besinlerin başta tüketim dönemlerini uzatmak amacıyla kullanılan gıda katkı maddeleri, sigara, alkol, ayrıca hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılan ilaçlar maruz kalınan kimyasal bileşiklerin çok önemli bir kısmını oluşturur.

Ksenobiyotiklerin çoğu lipofiliktir ve kolayca absorbe edilirler. Faz I ve faz II reaksiyonları olarak iki ana grupta toplanan ve enzimler aracılığıyla gerçekleşen biyotransformasyon mekanizmaları her zaman geçerli kural olmamakla birlikte çoğunlukla daha polar metabolitlerin oluşmasını sağladığından ksenobiyotiklerin organizmadan uzaklaştırılmasında önemlidir (1). Faz II reaksiyonları doğrudan ksenobiyotiklerin veya faz I reaksiyonları sonucu oluşan metabolitlerinin endojen bir madde ile bağlanma reaksiyonlarıdır. Maruz kalınan kimyasal maddeleri organizmadan uzaklaştırmada, dolayısıyla organizmanın korunmasında faz II reaksiyonlarının önemi büyüktür. Çoğunlukla detoksifikasyonla sonuçlanan faz II reaksiyonları arasında glutatyonla (GSH) konjugasyon organizmayı son derece reaktif elektrofilik maddelerin ataklarından korur. GSH konjugasyon reaksiyonlarının büyük kısmı glutatyon S-transferazlar (GST) olarak adlandırılan enzimler aracılığı ile gerçekleşir (1-4).

GST'lar redükte glutatyon ile elektrofilik bileşikler arasında konjugasyonu sağlayan bir izoenzim ailesidir. Merkaptürik asit biyosentezi reaksiyonlarına aracılık ederler (1,5,6).

GST'lar hayvan ve bitkilerde çok yaygın dağılım gösterirler, insanda, bitkilerde, sinekte, salyangozda, köpekbalığında ve hatta bazı bakterilerde tanımlanmışlardır (1,5,7,8). Hücre bileşenlerinin çözünür fraksiyonunda yer alırlar. En yüksek aktivite karaciğer ve testislerde, en düşük aktivite ise laktasyon döneminde olmayan dişi üreme organlarında saptanmıştır (1,5,9,10).

GST'lar farklı monomerlerin değişken kombinasyonlarından oluşan ve molekül ağırlıkları 20.000-25.000 dalton arasında değişen dimerik izozimlerin oluşturduğu bir enzim ailesidir. Uzun yıllar isimlendirme konjuge substratın tipine göre yapılmıştır. Yani dikloro-nitrobenzen substratı için glutatyon S-aril transferaz, metil iyodür için glutatyon S-alkiltransferaz vb. (1,7). Belli sayıda farklı GST izozimi bulunduğu ve bazı substratlar birkaç enzim tarafından kullanıldığından substratın elektrofilik merkezinin kimyasal özellikleri üzerine kurulu bir sınıflamanın yeterli ve uygun olmadığı görülmüştür. Takiben isimlendirme enzimlerin karboksimetil-selüloz (CM-cellulose) kolonundan elüsyon sırasına göre yapılmıştır (7). Ancak sıçan karaciğeri glutatyon S-transferazları alt üniteleri farklı molekül ağırlıklarında ve izozimler homodimer ve heterodimerlerden oluşurlar. Bu yüzden alt üniteleri temel alan bir isimlendirmenin izozimlerin bütün olarak adlandırılmasından daha uygun olduğu kabul edilmiştir. Özellikle fare ve sıçanda

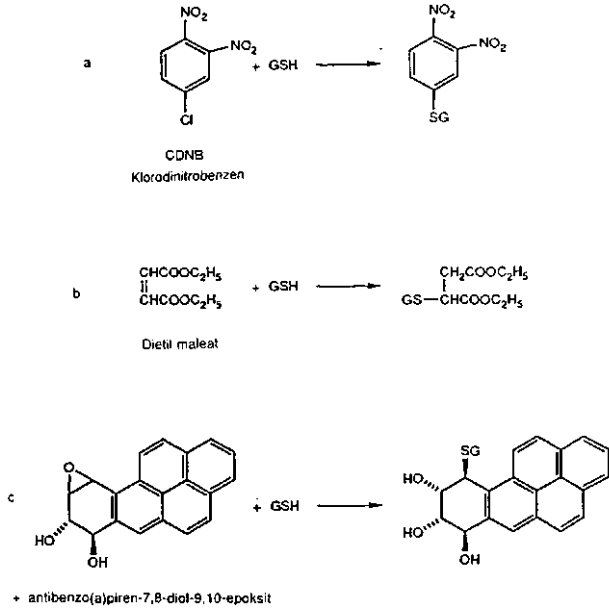
GST alt üniteleri için Ya, Yb, Yc sembolleri kullanılmaktadır. İsimlendirme alt ünitelere izolasyon ve karakterizasyonlarıyla ilişkili olarak Arap numaraları verilerek standardize edilmiştir. Alt üniteler birbirlerinden molekül ağırlığı, izoelektrik noktaları ve farklı substrat özgüllükleriyle ayrılırlar (1,7,9,10).

Sonraki yıllarda sıçan, fare ve insan sitozolik GST izozimlerinin benzer yapısal ve katalitik özellikleri paylaştıkları gösterildi. Kinetik özellikler ve immünokimyasal reaksiyonlar sonucu saptanan aminoasit sırası temel alınarak izozimler bu üç memeli türünde alfa (a), mü (u) ve pi (n) olarak adlandırılan üç sınıfta toplanır (1,5,9,11-15). Bununla birlikte son yıllarda teta (e) ile gösterilen yeni bir sitozolik GST sınıfı ileri sürülmüştür. Bu izozim hem sıçan, hem insan karaciğerinde bulunur ve DCNB ile aktivite göstermez, ayrıca glutatyon afinitesi matriksine tutunmaz. 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan, p-nitrobenzil klorür, p-nitrofenil bromür, kümen hidroksiperoksit ve diklorometan ile aktivite gösterir, a, H ve TI sınıfı GST'lar ile o izoziminin aminoasit dizilişi arasındaki benzerlikler çok sınırlıdır. Yapısal farklılıklar ise çok büyüktü, bu yüzden o ile gösterilen farklı bir sınıfı oluşturduğu ileri sürülmektedir (1,16).

Alfa sınıfı kümen hidroperoksitle verdiği yüksek aktivite ile, u sınıfı trans-4-fenil-3-buten-2-on, bromosülfaf-talein ya da 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB) ile ve n sınıfı etakrinik asit ile verdiği yüksek aktivite ile karakterdedir (1,5,17). Alfa sınıfı GST'lar aynı zamanda organik hidroperoksitlere karşı glutatyon peroksidaz aktivitesi de gösterir, bu aktivite lipitlerin hasara uğramasını sınırlayan önemli bir detoksifikasyon mekanizmasının kanıtıdır (1,17-26). GST izozimlerinden o, u ve n için ortak olan substrat ise 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'dir. Genel bir kural olarak çalışılan türlerin herbirinde n sınıfı altüniteleri en düşük, a sınıfı orta düzey ve u sınıfı alt üniteleri ise en yüksek molekül ağırlığına sahiptirler (1).

Sitozolik GST'ların yanısıra böbrek, testis, akciğer, dalak, sperm ve beyin membran fraksiyonlarında, karaciğer mikrozom ve mitokondrilerinde mikrozomal GST (mGST) olarak adlandırılan bir form saptanmıştır. mGST'in molekül ağırlığı 17,200 dalton olan üç alt üniteden oluştuğu düşünülmektedir. Primer yapısı 154 aminoasitten oluşur. Aminoasit sıralaması bilinen sitozolik GST alt üniteleri ile benzerlik göstermez. Ancak yapısal benzerlik olmamasına karşın mikrozomal ve sitozolik GST'lar çakışan substrat özgüllükleri, inhibitör duyarlılıkları ve fonksiyonel özellikleri açısından benzerlikler göstermektedir.

GST'lar antibiyotik, vazodilatör, analjezik, antikanser ilaçlar ve herbisit, intektisit ve karsinojenlerin bulunduğu çok geniş bir elektrofilik substrat grubunun metabolizmasında rol oynarlar (1,27-30). Reaksiyon Şekil 1'de görüldüğü gibi nükleofilik yer değiştirme, Michael eklenmesi ve konfigürasyonu değişmiş oksiran halkasına nükleofilik atak şeklinde olur. Glutatyonla enzimatik



Şekil 1. Elektrofiliik substrat metabolizmasında glutatyon S-transferazların rolü (1)

a: Nükleofilik yer değiştirme

b: Michael ekleme

c: Konfigürasyonu değişmiş oksiran halkasına nükleofilik atak

yolla konjuge olan bileşikler içerisinde epoksitler, haloalkanlar, nitroalkanlar, alkanlar, metil sülfoksit bileşikleri, organofosfatlar, aromatik halo ve nitro bileşikleri sayılabilir (1).

GST'ların spesifik organ dağılımı incelendiğinde a sınıfının insan karaciğerinde, a ve u'nün sıçan karaciğerinde ve fare karaciğerinde ise her üç izozimin de baskın olduğu görülmektedir. Farklı türlerde benzer substrat özgülüğüne sahip homolog enzimlerin aynı sınıfının doku dağılımları arasında bile büyük farklar vardır (1).

GLUTATYON S-TRANSFERAZLARIN FONKSİYONLARI

Glutatyon S-transferazlar organizmada üç ana işlev gösterirler;

1. Detoksifikasyondaki rolü
 - a. Konjugasyon
 - i) Katalitik konjugasyon
 - ii) Katalitik olmayan konjugasyon
 - b. İndirgeme özelliği
2. Hücre içi taşıyıcı protein olarak rolleri
3. Organa özğü toksisite oluşumuna katkı

Detoksifikasyonda GST'lar konjugasyon ve indirgemeye dayalı reaksiyonlarda rol alırlar. Konjugasyon katalitik ve katalitik olmayan iki ayrı mekanizma ile gerçeleştirilir. İkinci anr. işlevleri bazı endojen ve eksojen kaynaklı maddeleri katalitik olmayan yolla bağlaya-

rak bunların hücre içinde taşınımını sağlamak, üçüncü işlevleri ise ksenobiyotiklerin organa özğü toksisitelelerini oluşumundaki rolleridir (2,4,6,7,17,27,31-40).

LDetoksifikasyon

a.Konjugasyon

i.Katalitik konjugasyon

GST'lar elektrofiliik merkez içeren birçok ksenobiyotik ve faz I reaksiyonları sonucu oluşan aynı özelliikteki ara ürünlerin endojen bir tripeptit olan GSH ile konjugasyonunu katalize ederler (3,4,27).

GST'ın katalizörülüğündeki bu reaksiyon basit olarak aşağıda şematize edilmiştir:



Bu 1.tip reaksiyonda GSH'un elektrofiliik bir merkeze nükleofilik atağı ile dayanıklı bir GSH konjugatı oluşur.

İkinci tip reaksiyonda redüklenmiş bir ara ürün ve okside glutatyon (GSSG) oluşur. Önce (2a) dayanıklı olmayan bir GS-R ara ürünü enzimatik olarak oluşur, enzimatik olmayan yolla devam ederek ikinci bir GSH molekülünün atağı ile son ürün ve GSSG oluşur (2b).



GSH bu son tip reaksiyonda substrattan çok bir koenzim olarak davranır (7).

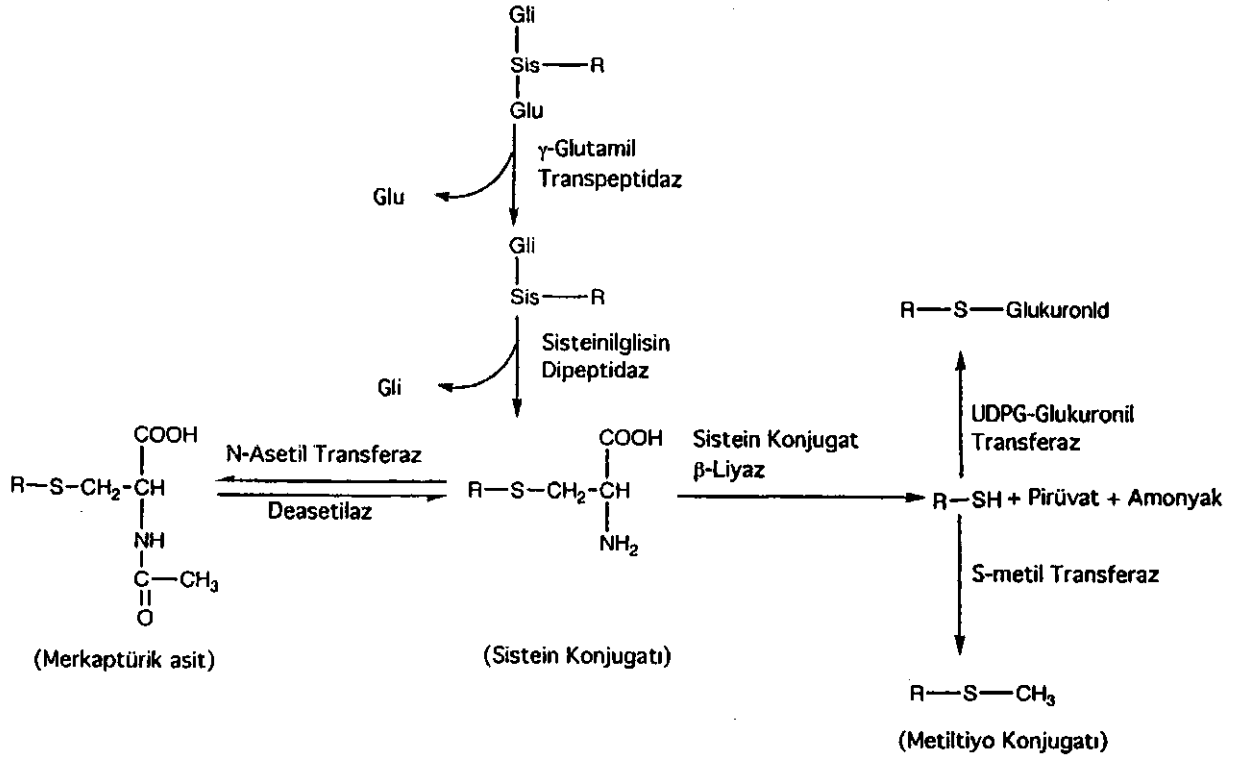
GSH konjugatları glutamat ve glisin ayrılmasıyla birçok ksenobiyotiğin klasik bir itrah yolu olan sistein konjugatına dönüşür. Başlangıçta bir glutatyon konjugatı oluşur, sonra γ -glutamiltanspeptidaz tarafından glutamik asidin ayrılmasıyla sisteinil glisin konjugatına dönüşür. Bunu sisteinil glisin dipeptidaz ya da aminopeptidaz M tarafından glisin ayrılmasıyla sistein S-konjugatının, yani pre-merkaptürik asitin oluşumu izler. Sistein S-konjugatının, yani pre-merkaptürik asit oluşur ya da Sistein S-konjugatı p-liyaz (C-S lyase) aracılığıyla reaktif türevlere dönüşür (1,5). Şekil 2 GSH konjugatlarının olası metabolizmasını göstermektedir (6).

ii) Katalitik olmayan konjugasyon

GST'lar hücresele protein ve makromoleküllerin inaktivasyonu ve yıkımına yol ağan reaktif bileşiklerle doğrudan kovalan bağlanabilirler (41). Elektrofiliik bileşiklerle doğrudan kovalan bağlanarak hücre bileşenlerini korumada en büyük payı GST B veya Ligandin olarak bilinen GST enzim sınıfı almaktadır. Ligandinlerin başladığı eksojen maddeler arasında azo-boyar maddeler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve aromatik aminler gibi karsinojen özelliikte olanlar önemli yer tutmaktadır (27,42,43).

Glutatyon S-transferaz Aracılıktı Biyoaktivasyon

GST'ların katalize ettiği GSH konjugasyonu sonucu elektrofiliik bileşikler genelde detoksifiye edilse de



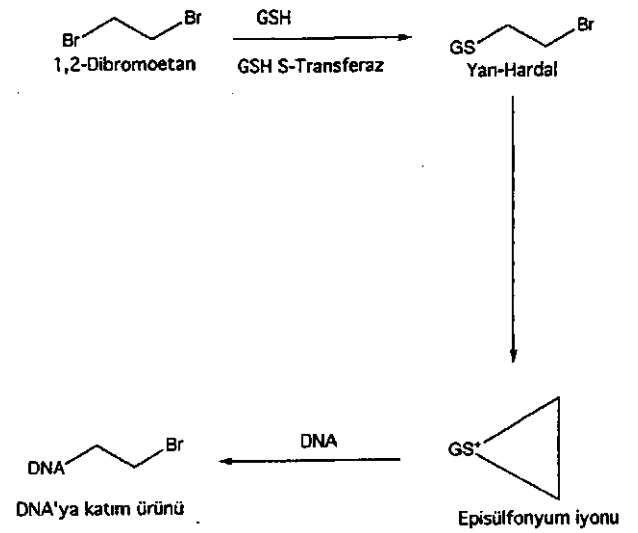
Şekil 2. Glutatyon konjugatlarının metabolizması (6)

bazı bileşiklerin GSH konjugatları toksisiteye neden olabilmektedir. Bu bileşiklerin toksisiteleri dayanıklı olmayan tiyollerin oluşumu sonucu ortaya çıkar. Dayanıklılı olmayan tiyoller alkilleyici ajanlara ya da dayanıklı toksik metabolitlere dönüşebilmektedir (6).

GSH ve sistein konjugatlarının toksisitelerini açıklamaya yönelik iki farklı mekanizma kurulmuştur. Birinci mekanizmada bazı ksenobiyotiklerin GSH konjugatları doğrudan alkilleyici ajan olarak rol oynarlar ve toksik etkileri molekülün sülfür yarı-hardal (sülfür half-mustard) oluşturabilmesine bağlıdır. Şekil 3'te GST katalizör-lüğünde 1,2-dibromoetan'ın GSH'la konjugasyonu sonucu sülfür yarı-hardal oluşumu gösterilmiştir (6).

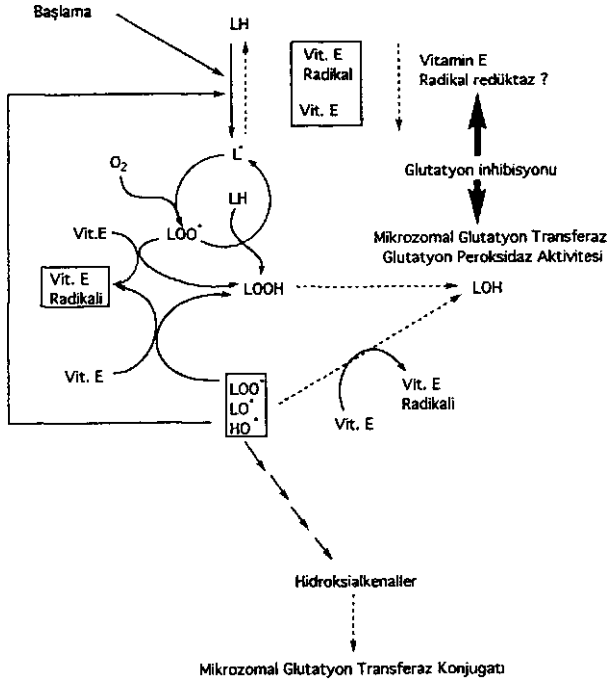
İkinci mekanizmada ise faz III metabolizma olarak adlandırılan yine bazı GSH konjugatlarının ileri metabolizması sonucu özellikle nefrotoksite gözlenebilir (1,6). Bazı haloalkan ve alkenlerin sistein konjugatının β -liyaz aracılığı ile böbreklerde ağır toksisiteye yol açtığı bilinmektedir (1). Bu konu "Organa özgü toksisite oluşumunda GST'ların rolü" bölümünde ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

b. Glutatyon S-transferazların indirgeme Özelliği
GST'ların indirgeyici işlevinin önemli bir örneği membran bileşenlerini lipid peroksidasyonundan korumalarıdır. Lipid peroksidasyonu ürünü olan kolesterol a-okstitin bir GST substratı olduğunun gösterilmesi bu açıdan önemlidir. Ayrıca lipid peroksidasyonunun aldehit



Şekil 3. 1,2-Dibromoetan'ın GSH ile konjugasyonu sonucu sülfür yarı-hardal oluşumu (1,6)

yapıda ürünleri olan 4-hidroksi alkenaller GSH ile konjuge olurlar. Mikrozomal fraksiyonda bulunan GST'lar da peroksidaz aktivitesiyle lipid peroksitlere karşı koruma sağlar (17-26,44,45). Şekil 4 lipid peroksidasyonundan GST aracılığı korunmanın olası mekanizmasını şematize etmektedir (46).



Şekil 4. Lipit peroksidasyonundan glutatyon S-Transferaz aracılığıyla korunmanın olası mekanizması (46)

Lipit peroksidasyonundan koruyucu rolü açısından iki tip GSH-peroksidaz (GSH-Px) ayırt edilebilir (18,47). Bunlardan ilki selenyum-bağımlı GSH-Px (Se-bağımlı GSH-Px), ikincisi ise GST aktivitesi de gösteren Se-bağımsız GSH-Px'dir. Se-bağımlı olan birinci tip çevresel baskı altındadır ve Se eksikliğinde aktivitesi azalır (47,48). GST'ların in vitro olarak da lipit peroksidasyonunu önledikleri bildirilmiştir (10).

GSH-Px ayrıca prostaglandin biyosentezinde rol alır ve prostasiklin oluşumunda düzenleme yapmaktadır (25,32,49).

Günümüzde hücre toksisitesi altında yatan önemli nedenlerden biri olan lipit peroksidasyonundan koruyucu rolüne paralel olarak GSH konjugasyonu GST aracılığıyla olarak lökotrienlerin, özellikle lökotrien AV'den bilinen en etkin anafilaktik şok yapıcı maddelerden biri olan lökotrien Gt'ün oluşumunu sağlar. Bu dönüşüm lökotrien sentetaz olarak bilinen mGST ile yürür (50-56).

2. Hücre İçi Taşıyıcı Protein Olarak Önemli Roller

GST'ların enzimatik işlevlerinin yanısıra kan plazmasındaki albüminin hücre içi eşdeğeri olarak birçok hidrofobik bileşiği bağlama ve bunların hücre içi taşınımında fonksiyonları vardır (5).

Katalitik olmayan konjugasyonda olduğu gibi hücre içinde ligand olarak bilinen endojen bazı maddeleri bağlama fonksiyonundan da büyük ölçüde ligandin sınıfı GST'lar sorumludur. Enzim üzerinde bu maddelerin

bağlandığı spesifik olmayan hidrofobik bir bağlama bölgesi vardır (57).

Ligandinlerin çeşitli bileşikleri bağlayarak bunların plazmadan karaciğer hücrelerine taşınımını sağladıkları ileri sürülmüştür (32-42). Endojen maddelerin taşınımında gösterdikleri fonksiyona yeni sentezlenen Hem'i bağlayarak mitokondriden endoplazmik retikuluma taşınmaları örnek verilebilir. Hem sentezinin son enzimatik kademesi (ferroşelataz reaksiyonu) mitokondri iç membranında olmaktadır. Hem'in bu aşamada hemoglobin oluşturmak üzere mitokondriyel membrandan sitoplazmaya geçmesi gerekir. Mitokondri iç membranı serbest Hem için önemli bir engeldir ancak bağlı Hem için engel oluşturmaz. Hem'in karaciğer ve retikülosit mitokondrilerinden salınımında sitozolik bir proteinin rol alabileceği ileri sürülmüştür (58). Sıçanda yapılan çalışmalarda GST B olarak da bilinen ligandin'in Hem'in mitokondriden sitoplazmaya transferini sağladığı saptanmıştır. Eritrosit GST formu olan ro (p) ise Hem ile sıçan ligandin ya da insan karaciğer GST'ına eşit bir afinite ile bağlanmaktadır (58).

Endojen maddelerin hücre içi taşınımına bir başka örnek bilüribin için verilebilir. Substrat olmayan bir ligand olan ve karaciğerden itrah edilen bilübirinin karaciğer GST'ına yüksek afinite ile bağlandığı, buna karşın eritrosit GST'ına çok daha düşük afinite ile bağlandığı saptanmıştır (58).

3. Organa Özgü Toksikite Oluşumunda Glutasyon S-transferazların Rolü

GST'ların üçüncü fonksiyonları ksenobiyotiklerin organa özgü toksisite oluşturmalarındaki rolleridir. GST izozimlerinin nitel ve nicel dağılımları dokudan dokuya oldukça farklılık gösterir. Bu durum her bir organın GST ile etkileşen toksik ajana yanıtının farklı olmasına yol açar. Bu yönüyle bakıldığında GST'lar organa özgü toksisite oluşumunda önemli rol oynarlar.

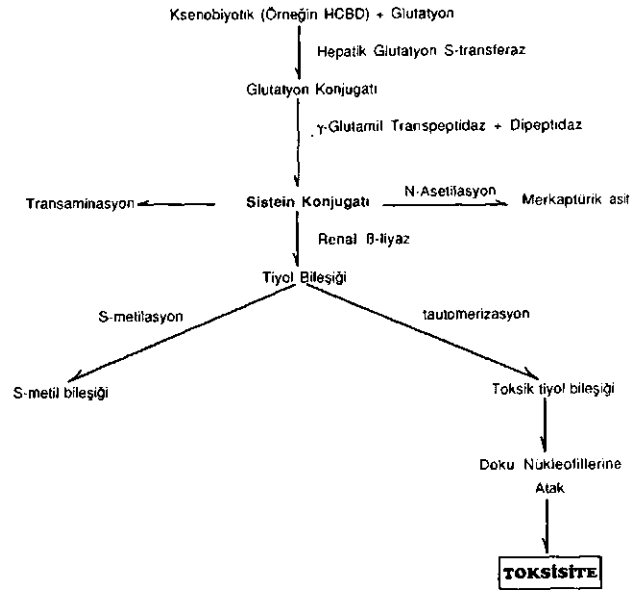
Toksik maddelerin belirli organlarda toksik etki oluştururken diğer bazı organlarda nasıl olup da toksisite oluşturmadıkları her zaman ilgi çeken ve araştırılan bir konudur. Bu durum açıkça toksik ajanın toksikokinetiğine, duyarlı dokularda spesifik alım mekanizmalarının varlığına, hedef organın aktivasyon detoksifikasyon yapan enzim içeriğine ve dokunun toksik ajanın oluşturduğu hasarı onarma yeteneğine bağlıdır (1).

Fizyolojik ve anatomik faktörler çeşitli dokularda önemli enzimlerin hücresel heterojenik dağılımlarını kontrol etmektedir. Örneğin karaciğer her ne kadar göreceli olarak ksenobiyotik metabolize edici enzim içeriği bakımından en zengin ve en homojen organ olsa da antikorlarla immünohistokimyasal boyama yöntemiyle incelendiğinde enzimlerin asıl olarak parenkimal hepatositlerde yer aldığı kuppfer ve endotelial hücrelerin enzim içeriğinin ise daha az olduğu gösterilmiştir (1).

Birçok ksenobiyotik toksisitesi için böbrek önemli bir hedef organdır. Bu ksenobiyotiklerin içinde halojenli alken grubundan heksakloro-1,3-butadien (HCBD) çok önemlidir. Bu maddeye akut temasta hüresel nekroz proksimal tübülün P3 segmentindedir. Bu durum spesifik böbrek alım (uptake) mekanizması ve nefrotoksisiteden sorumlu reaktif metabolitin bölgeye özel metabolizma sonucu oluşmasından kaynaklanmaktadır. HCBD metabolizması organlarda kompleks oluşumu ve farklı enzimlerin aktif katılımı ile olur. Başlangıçta HCBD hepatic GST aracılığıyla GSH ile konjuge olur. Bu konjugatı oluşturan mikrozomal form GST sitozolik enzimlerden çok daha aktiftir. Bu glutatyon konjugatı (S-pentaklorobutadienil-glutatyon) safraya itrah edildikten sonra intestinal ve/veya renal γ -glutamiltransferaz ve sisteinilglisin dipeptidaz ile sistein konjugatına dönüşür. Oluşan sistein konjugatı aktif böbrek alım mekanizması (probenesid-duyarlı) için çok önemli bir ara üründür. Böbrek tarafından bir kez alındıktan sonra bu konjugat N-asetilasyon (merkaptürik asit oluşumu), oksidatif transaminasyon ve sistein konjugatı p-iyaz için bir substrat işlevi görür, p-iyaz, tiyol (1,2,3,4,4-pentaklorobutadienil tiyol) metaboliti oluşturan toksikolojik açıdan önemli bir enzimdir. Bu metabolit bir tiyo-metilasyon reaksiyonu ya da tautomerizasyon reaksiyonu sonucunda reaktif tiyonobutenoil bileşiğine dönüşür. Tiyonobutenoil bileşiği tiyo-açılleyici bir ajan olduğundan doku nükleofilleri ile kovalan etkileşerek toksisite oluşturur (1,59,60). Her ne kadar glutatyon S-konjugatları ana olarak karaciğerde oluşsa da böbreğe olan seçici toksisite S-konjugatlarının böbrekte konsantrasyon olmalarıyla ve/veya toksik S-konjugatlarının biyosentezinin proksimal tübül hücrelerinde gerçekleşmesi ve bu hücrelerin p-iyaz içermesiyle açıklanabilir (1,61). Şekil 5 HCBD'nin olası renal toksisite mekanizmasını göstermektedir (1). Böbreğe karşı olan bu seçici toksisite nedeniyle izole böbrek hücreleriyle yapılan çalışmalarda bazı glutatyon ve sistein konjugatlarının sitotoksikite mekanizmaları araştırılmıştır. Bu çalışmalar etkin nefrotoksik sistein konjugatlarının primer hedefinin mitokondri olduğu göstermiştir (6). Örneğin S-(1,2-diklorovinil)-L-sistein böbrek mitokondriyal yapısını bozarak oksidatif solunum inhibisyonuyla gelişen mitokondriyal enerji metabolizmasında önemli bozukluklara neden olur (6). Tetrakloroetilenin GSH konjugatının da renal toksisiteye neden olduğu ve hücre DNA'sı ile etkileşerek mutajenik ve karsinojenik etki gösterdiği bildirilmektedir (62).

GST organ dağılımında ilk sırayı alan karaciğer yüksek oranda peroksidaz aktivitesi de gösteren α sınıfı GST açısından zengindir (63,64).

Karaciğerin periportal lobunda yaygın olarak asidik form enzim saptanmıştır (1). Sıçanda testisler karaciğerden sonra GST açısından en zengin organdır. Böbreküstü bezinin GST içeriği cinsiyete göre farklılık gösterir. Adrenal ve meme bezi GST içeriği açısından oldukça benzerdir. Erkek sıçanda GST içeriği dişiye



Şekil S. Hekzaklorobutadien'in renal toksisite mekanizması (1)

oranla daha fazladır (64). Son yıllarda nazal epitel hücreleri enzim içeriği açısından incelenmiş ve diğer bazı önemli enzimlerin yanısıra GST'ların da önemli düzeylerde olduğu görülmüştür (65,66).

Nazal epitelin zengin GST içeriği pulmoner toksisite açısından önemlidir. İnhalasyonla alınan madde nazal kavitede biyoaktivasyona uğruyorsa lokal toksik etkiler oluşturmaya, detoksifikasyona uğruyorsa da pulmoner toksisitenin solunum yolunun başlangıcından itibaren önlenmesi söz konusudur (67,68).

GLUTATYON S-TRANSFERAZ AKTİVİTESİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

GST'ların aktivitesini etkileyen faktörleri şu alt başlıklar altında toplayabiliriz:

1. Bireysel faktörlerin ve fizyolojik dönemlerin etkisi
2. Ksenobiyotiklerin etkisi
3. Bazı patolojik durumların etkisi

1. Bireysel Faktörlerin ve Fizyolojik Dönemlerin Etkisi

İnsanda GST düzeyleri fizyolojik dönemlerden etkilenmektedir. GST'lar fütal dokularda erken gelişmektedirler, ancak ne fütal dokularda, ne de yetişkin dokularında GST aktivitesi ile yaş arasında bir korelasyon saptanamamıştır. Ancak dokudan dokuya farklı dağılım gösterirler (69). Herhangi bir doku incelendiğinde GST içeriğinin gelişme, seksüel olgunlaşma, indüksiyon, tümör başlangıcı ve gelişimi ile değiştiği görülür (38). Yapılan çalışmalarda fütus karaciğeri ve diğer dokularında

GST aktivitesi yetişkine göre daha düşük bulunmuştur. Fötal akciğer sitozolünde GST aktivitesi karaciğere nazaran 1.6 kez yüksektir. Oysa yetişkinde bağırsaklarla birlikte akciğer en düşük aktiviteye sahiptir. GST'lar insan fötusunda erken gelişirler, ayrıca iyi dağılım gösterirler. Toksikiteye neden olan ksenobiyotiklerin ve/veya reaktif metabolitlerinin inaktivasyonunda GSH konjugasyonu rol oynadığından GST'ların yaygın dağılımı fötusun korunması açısından son derece önemlidir (69).

GST aktivitesinin cinsiyete göre farklılıkları çeşitli nedenlerle ölen insan nekropsi materyallerinde araştırılmış ve substrat olarak CDNB kullanılarak yapılan çalışmada aktivitede cinsiyete bağlı önemli bir fark saptanmamıştır (41).

GSH-Px'in önemli etnik varyasyon gösterdiği bildirilmiştir (70). GST'ların u izoziminin Avrupa popülasyonunun %40'ında saptanamamış olması bir diğer önemli bulgudur (17).

2. Glutasyon S-transferaz Aktivitesini Etkileyen Ksenobiyotikler

İlaç metabolize edici diğer sistemler gibi GST'lar da birçok ksenobiyotikten etkilenir. Bu etki indüksiyon, aktivasyon ya da inhibisyon şeklindedir. Bu konuda çalışmalar en çok karaciğer enzimleriyle yapılmıştır. İlaç metabolize edici enzim genel indükleyicileri olan fenobarbital, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve bazı organoklorlu bileşikler hepatik GST'ları da indüklerler (5,71).

Fenobarbitalin uygulanmasını takiben sıçanda GST B için spesifik fonksiyonel mRNA'da hızlı bir artış olduğu gösterilmiştir. Bu mRNA sıçanda Ya altünitesinin sentezini düzenler ve Ya altünitesi fenobarbital tarafından selektif olarak artırılır. Oysa Yc altünitesi nispeten etkilenmez. Benzer olarak GST B indüksiyonu polisiklik aromatik hidrokarbonlarla da gözlenmiştir. 3-metil kolantrien ise büyük olasılıkla Ya altünitesi sentezini artırıcı etki yapar (72,73).

Fare karaciğeri mikrozomal GST'ları üzerinde inhibisyona neden olan maddeler üç gruba ayrılmışlardır. Bunlar; aktive ve aktive olmayan enzim formları üzerinde eşit İKso (enzim aktivitesini %50 değerine indiren inhibitör madde konsantrasyonu) değerine sahip olanlar, aktive olmayan form üzerinde aktive forma oranla oldukça yüksek İK50 değerine sahip olanlar ve düşük konsantrasyonda aktivasyon yaparken yüksek konsantrasyonda inhibisyon yapan maddelerdir. Aynı çalışmada indometazin, trifeniltin klorür ve tribültin asetat ilk gruptadır. Rose bengal ve cibacron blue ikinci grupta, bromosülfotalein (BSP) ise üçüncü gruptadır. Yüksek konsantrasyonda gözlenen inhibisyonun BSP'nin enzim üzerinde ikinci bir bölgeye bağlanarak düşük konsantrasyonlardan aktivasyonu ortadan kaldırmasına bağlı olduğu ileri sürülmektedir (74). Aynı çalışmada N-etilmaleimid (NEM) saflaştırılmış enzimle farklı konsantrasyon ve sürelerde 0°C'de in vitro inkübe edilmiş ve 10 mM

NEM ile 8-10 saat inkübasyon sonucu enzimin aktive olduğu saptanmıştır. Aktivasyonun dilüsyon sonucu kaybolması enzimin CDNB ile aktivitesini artıran kovalan bir modifikasyona uğradığını göstermektedir (74). Ancak NEM'in eritrosit izozimi üzerinde inhibisyon yaptığı bildirilmiştir (İKso- 20.1 ±1.4 uM) (11).

Klorlu hidrokarbon türevi olan endosülfan yengeç GST'larına etkisi yönünden in vivo incelenmiştir. Subletal dozlarda çalışılan endosülfanın yengeç hepatopankreasında GST aktivitesindeki önemli indüksiyona yol açtığı bildirilmektedir. İndüksiyon zamana bağımlıdır ve en yüksek değerine ilk temastan 96-192 saat sonra ulaşmaktadır (75).

Yapıca farklı toplam on herbisit fare karaciğeri ksenobiyotik metabolize edici enzimleri üzerine etkisinin incelendiği bir in vivo çalışmada trifluralin, bentiyokarb, molinat ve alaklor sitozolik GST'lar üzerinde substrat olarak CDNB kullanıldığında aktivitede önemli artışa neden olmuştur (76).

Farelerde yapılan in vivo bir çalışmada 2,3-t-butilhidroksianisol, kafestol palmitat, fenobarbital ve transstilbenoksit'in sitozolik GST aktivitesi üzerinde indüksiyon yaptığı bildirilmektedir (77).

Sentetik antioksidanlar olan butilhidroksianisol (BHA) ve butilhidroksitoluen (BHT)'in benzopirenlerin (BP) indüklediği karsinogenezi inhibe ettiği bildirilmiştir (78-82). Bu maddelerden özellikle BHT GST üzerinde çarpıcı bir indüksiyona neden olmaktadır (79-82). BP'in karsinogenez başlatıcı etkilerinin BHT tarafından inhibisyonunun, BHT'nin GST'ı indüklemesi sonucu BP yıkımının artmasına bağlı olduğu öne sürülmüştür (78).

Fenoksiasetik asit türevi herbisitlerden olan 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve 2,4,5-triklorofenoksiasetik asit (2,4,5-T) bilinen tüm insan karaciğeri GST izozimlerini ve eritrosit izozimini inhibe eder (83,84).

Peroksizom proliferasyonuna neden olan hipolipidemik siprofibrat sıçan karaciğeri GST'ı üzerinde hem in vivo, hem in vitro kompetitif olmayan şekilde inhibisyon yapmaktadır. Sıçan karaciğeri GST'ı içinde en yüksek inhibisyon, ligandin sınıfındadır (85).

Antiinflamatuar gruptan indometazin de sıçan karaciğeri GST'ı üzerinde inhibisyon yapmaktadır (86,87). Ancak indometazin insan eritrosit izozimi olan p aktivitesinde in vitro çalışmalarda artışa neden olmaktadır (88). Aynı gruptan meklofenamik asit kompetitif bir inhibitördür. Metal kolloidlerin yapımında, plastik üretiminde, organik sentezlerde kullanılan ve sitotoksik bir ilaç olan siklofosfamidin teratojenik metaboliti akrolein hem fötal, hem de yetişkin izoenzimleri için güçlü bir inhibitördür (89).

Organofosfatlı insektisitlerden monokrotofos ve iki türevinin GSH ve GST üzerine etkisi hem in vivo, hem de in vitro incelenmiştir. Her üç bileşiğin hepatik ve ekstra hepatik dokularda GSH depleksiyonu yaptığı ve GST inhibisyonuna neden olduğu saptanmıştır (90).

GST aktivitesine etkilerinin araştırılması açısından çeşitli steroid türevleriyle yapılan çalışmada inhibisyon etkisi artan sıra ile pregnolon sülfat, östradiol-17-sülfat, dehidroizoandrosten sülfat, östradiol-3,17-disülfat ve östradiol-3-sülfat şeklinde saptanmıştır. Sıçan karaciğer izozimleri ile substrat olarak CDNB kullanılarak yapılan çalışmada östradiol disülfatın transferaz A ve C üzerinde transferaz B (ligandin)'ye göre farklı kinetik mekanizmayla inhibisyon yaptığı bildirilmiştir (91). Antiinflamatuvar ilaçlara ek olarak sülfasalazin, diüretik ilaçlardan etakrinik asit, furosemid ve bumetanidin sıçan izozimlerini inhibe ettiği gösterilmiştir (14). Metal bileşiklerinden kadmiyum iyodür, kadmiyum klorür, civa klorür, civa asetat, bakır klorür ve kurşun asetatın da hepatik GST'lar üzerinde inhibitör etkileri bildirilmiştir (14).

İn vitro çalışmamızda alüminyum, kurşun ve kadmiyumun yüksek konsantrasyonlarda eritrosit izozimini inhibe ettiği saptanmıştır (92). Sigara dumanında en önemli bağımlılık yapıcı ajan olan nikotinin çeşitli formları nikotin baz, nikotin hidrojen tartarat ve nikotinin ana metaboliti olan kotinin ve etanolün eritrosit izozimini inhibe ettiği belirlenmiştir (88,93). Ayrıca nikotin ve etanolün aynı zamanda eritrosit izozimine çok benzer plasantal GST'ı da (EC.2.5.1.18) inhibe ettiği in vitro çalışmamızda belirlenmiştir (88).

Selenyuma yüksek miktarlarda maruziyette ya da deneysel Se yüklemesi sonucu Se-bağımlı GSH-Px aktivitesi çalışmaları ilginç sonuçlar göstermiştir. Kan düzeyi ve enzim aktivitesi arasında bir ilişki bulunmadığı gibi, tavuklarda kronik Se maruziyeti ile kan ve karaciğer GSH-Px aktivitesinde azalma saptanmıştır (94). Araştırmacılar Se yüklemesine rağmen aktivitedeki azalmanın enzim inhibisyonuna bağlanması için daha çok veriye gereksinim olmakla birlikte gözardı edilemeyeceğini bildirmektedirler (94). Hepatik GSH-Px aktivitesindeki bu azalma %60 oranında bakır tarafından indüklenmektedir (95). Karaciğer ve kan GSH-Px aktivitesi azalmasının aksine Se yüklemesi sonucu eritrosit GSH-Px aktivitesinde artış saptanmıştır (96).

3. Bazı Patolojik Durumlarda GST Aktivitesi

Hemolitik anemili 513 hastada eritrosit GST aktivite ilişkisi araştırılmış ve anemi ile GST eksikliği arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Eritrositleri hücre hasardan korumada rol alan GST düzeyleri azaldıkça hücre stabilitesinin azaldığı ve anemi riskinin arttığı bildirilmiştir (97).

Preeklampsi gelişen hamilelerde reaktif oksijen türlerine karşı koruma sağlayan GSH-Px düzeylerinin çok arttığı bildirilmiştir (98).

Deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda mikrozoomal epoksit hidrolaz (EH) ve sitozolik glutatyon S-transferaz aktivitesi incelenmiş, EH aktivitesinde önemli düşüş olurken GST aktivitesinde belirgin olmamakla

birlikte kontrole oranla ~%20 gibi bir düşüş olduğu bildirilmiştir (99). 10 gün süre ile insülin tedavisi sonucu her iki enzim aktivitesi kontrol düzeyine ulaşmıştır (99). Down sendromlu çocuklarda Se yüklemesi sonucu eritrosit GSH-Px aktivitesinde azalma olması ve yükleme sonrası dönemde eski değerine ulaşmaması şaşırtıcı bir sonuçtur. Araştırmacılar bu durumu Down sendromlu çocuklarda hücre içi Se tüketiminin yüksek olmasına bağlamaktadırlar (96).

3.1 Çoklu İlaç Rezistansında (Multidrug Resistance, MDR) Glutatyon S-transferazların Rolü

Elektrofiik atağa karşı organizmanın savunucusu durumunda olan GST'ların organizma açısından son derece yararlı bu fonksiyonlarına karşın aynı mekanizmayla biyoaktivasyonun yanısıra yolaçtıları bir başka sorun vardır. Bu durum GST'ların klinikte çoklu ilaç rezistansı (MDR) olarak bilinen sorunla ilişkilidir (100). MDR günümüzde kanser tedavisinde en büyük engeli oluşturmaktadır. Tümör hücresi tek bir sitotoksik ajana kronik olarak maruz kaldığında bir süre sonra yapıcı benzer olmayan birçok antineoplastik ajanın letal dozlarına da rezistan yeteneği kazanmaktadır. MDR tek bir mekanizma ile açıklanamamaktadır. Ana olarak ileri sürülen mekanizmalardan ilki hücreye ilaç akışında rol alan membran P-glikoproteinlerinin modifikasyonu, ikincisi ise düzenlenmeleri değişmiş faz I faz II reaksiyonlarına bağlı olarak GSH sisteminin modifikasyonudur (100,101).

GST'ın kazanılmış rezistansla ilişkisinin düşünülmesi tümör hücrelerinde GST jt'nin aşırı artmasından kaynaklanmaktadır (100). Bir çalışmada adriyamisine rezistan meme kanseri hücrelerinde GST aktivitesi normalin 45 katı fazla bulunmuştur (6). Bu yüzden GST it'nin çeşitli dokularda karsinogenez başlangıcı ve sonrası için iyi bir biyogösterge olabileceği ileri sürülmüştür (10,102-111).

MDR temelinde yatan ana mekanizmalar olarak ileri sürülen membran P-glikoproteinlerinin ve GST n düzeylerinin artması birbiri ile ilişki halindedir, çünkü her iki protein genleri birbirine bağlı yolla ifade edilmektedir (110). Aynı zamanda klinikte kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerin çoğu GSH konjugasyonu ile inaktive edilmektedir (102-111).

3.2. Bazı Patolojik Durumlarda Biyogösterge Olarak Glutatyon S-transferazlar

Son yıllarda a ve n sınıfı GST'ların bilinen fonksiyonlarına ek olarak çeşitli dokularda hasarın erken, duyarlı ve güvenilir bir göstergesi olabilecekleri ileri sürülmektedir. İnsanda uterus serviks lezyonları, göğüs kanseri, kolon adenokarsinoma ve medullablastomasını belirlemede GST'ların güvenilir bir belirleyici olduğu bildirilmektedir (112-117). Proksimal ve distal nefron hasarında üriner GST içeriğinde aşırı artış olduğu ve hasarın belirleyicisi olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (118,119).

Çeşitli akciğer kanser vakalarında plazma n GST aktivitesinde artış ve akciğerden alınan biyopsi örneklerinde immünohistokimyasal boyama ile yine JC GST ekspresyonunda artış bildirilmiştir (120-122). Akciğer kanserli olan ve olmayan, her ikisi de sigara içen bireylerden oluşan iki ayrı grupta yapılan çalışmada grupların mononükleer lökositlerinde trans-stilben oksit substratı kullanılarak u GST aktivitesi saptanmıştır. Kontrol grubunda u GST aktivitesi %59 iken kanserli hastalarda %35 olarak bulunmuştur. Bu sonuç akciğer kanserine duyarlılıkta u GST içeriğinin önemli bir belirleyici olduğunu göstermiştir (47,116,123,124). Yine u GST enzimini genetik olarak içermeyen ve sigara tiryakisi olan bireylerde sitogenetik hasarın arttığı bildirilmiştir (125).

Çeşitli etkenlere bağlı karaciğer hasarında plazma da a GST düzeylerinin çarpıcı biçimde arttığı gösterilmiştir (126,127). Hepatik sitozolik proteinlerin %5'ini oluşturan GST'lar karaciğer hasarını izleyen dönemde hızlı bir şekilde kan dolaşımına salınırlar (128-130).

Karaciğer fonksiyonlarının biyokimyasal değerlendirilmesinde genellikle plazma ya da serumda aspartat aminotransferaz (AST) veya alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesi ölçülür. Bu sitozolik enzimler de karaciğer hasarını takiben sirkülasyona salınırlar. Ancak kronik karaciğer rahatsızlığı olan hastalarda aktiviteleri normal olabildiğinden karaciğer fonksiyonlarını belirlemede bu aminotransferazların izlenmesinin güvenilirliği düşüktür (128-130). Bazı karaciğer patolojilerinde hasarın saptanmasında aminotransferazların zayıf bir duyarlılık göstermelerinin altında kısmen karaciğerdeki dağılımları yatmaktadır. Periportal hepatositler en yüksek oranda aminotransferazları içerirken, hipoksi ya da alkol ve parasetamol gibi ksenobiyotiklere bağlı hasara karşı çok daha duyarlı olan sentrilobüler hepatositlerde aminotransferazlar bulunmaz (9,127,131).

Yetişkin karaciğeri baskın olarak bazik ya da a sınıfı GST içerir. Aminotransferazlarla kıyaslandıklarında karaciğer hasarı için daha duyarlı bir belirleyici olan hepatik GST'ların bir özelliği karaciğerdeki yaygın dağılımlarıdır, insanda fötüs, yenidoğan ve yetişkinde yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda bazik ve asidik GST'lar periportal ve merkezi lob hepatositlerinin her ikisinde de eşit oranda saptanmış ve tanımlanmıştır (9). Bu nedenle halotan hepatotoksitesi, otoimmün kronik aktif hepatit, doğuma bağlı asfiksi ve parasetamol zehirlenmesi gibi çeşitli klinik ve benzeri vakalarda hepatoselüler hasarı saptamada hepatik a GST'ların aminotransferazlara nazaran daha üstün oldukları ileri sürülmektedir (127,131-133). Ayrıca akut karaciğer hasarı ve kronik hepatitdeki çalışmalar transaminaza kıyasla GST aktivitesinin histolojik anomalilerle daha iyi bir korelasyon gösterdiğini kanıtlamıştır (28,134).

KAYNAKLAR

1. Hodgson E, Levi PE. Introduction to Biochemical Toxicology. Connecticut: Appleton&Lange, 1994.
2. Hussey AJ, Hayes JD, Beckett GJ. The Polymorphic Expression of Neutral Glutathione S-transferase in Human Mononuclear Leucocytes as Measured by Specific Radioimmunoassay. *Biochem Pharmacol* 1987; 36:4013-5.
3. Hayes JD, McLellan LJ, Stockman PK, Chalmers J, Beckett GJ. Glutathione S-transferases in man: The relationship between rat and human enzymes. *Biochem Soc Trans* 1987; 15:721-5.
4. Awasthi YC, Dao DD, Saneto RP. Interrelationship between anionic and cationic forms of glutathione S-transferases of human liver. *Biochem J* 1980; 191:1-10.
5. Boyer TD, Kenney WC. Preparation, characterization and properties of glutathione S-transferases. In: Zakim D, Vessey DA, eds. *Biochemical pharmacology and toxicology: Methodological aspects of drug metabolizing enzymes*. New York: John Wiley&Sons Inc, 1985:297-363.
6. Pickett CB, Lu AYH. Glutathione S-transferases: Gene structure, regulation and biological function. *Annu Rev Biochem* 1989; 58:743-64.
7. Boyer TD. The glutathione S-transferases. *Hepatology* 1989; 9:486-96.
8. Clark AG, Smith JN, Speir TW. Cross specificity in some vertebrate and insect glutathione-transferases with methyl parathion, 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene, and S-Crotonyl-N-acetylcysteamine as substrates. *Biochem J* 1973; 135:385-92.
9. Hiley C, Fryer A, Bell J, Hume R, Strange RC. The human glutathione S-transferases, Immunohistochemical studies of the developmental expression of alpha- and PI-Class isoenzymes in liver. *Biochem J* 1988; 254:255-9.
10. DeJong JL, Morgenstern R, Jorvall H, DePierre JW, Tu CPO. Gene expression of rat and human microsomal glutathione S-transferases. *J Biol Chem* 1988; 263:8430-36.
11. Hirrell PA, Collins MF, Nimmo IA, Strange RC. The human glutathione S-transferases. Studies on the kinetic, stability and inhibition characteristics of the erythrocyte enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1987; 913:92-6.
12. Tahir MK, Guthenberg C, Mannervik B. Inhibitors for distinction of three types of human glutathione transferase. *FEBS Lett* 1985; 181:249-52.
13. Howle AF, Hayes JD, Beckett GJ. Purification of acidic glutathione S-transferases from human lung, placenta and erythrocyte and the development of a specific radioimmunoassay for their measurement. *Clin Chim Acta* 1988; 177:65-76.
14. Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases-structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem* 1988; 23:283-337.
15. Ahmad H, Medh RD, Singh SV, Caccuri AM, Ansari GAS, Awasthi YC. Anionic glutathione S-transferases of human erythrocytes, placenta and lung. Evidence for structural differences. *Enzyme* 1989; 42:129-35.

16. Mannervik B. Glutathione transferases-design of detoxication enzymes by evolution and by protein engineering. *Biyokimya Dergisi*, Ek XVII:L:03.
17. Mannervik B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol* 1985; 57:357-417.
18. Tan KH, Meyer DJ, Gillies N, Ketterer B. Detoxification of DNA hydroperoxide by glutathione transferases and the purification and characterization of glutathione transferases of the rat liver nucleus. *Biochem J* 1988; 254:841-5.
19. Tan KH, Meyer DJ, Belin J, Ketterer B. Inhibition of microsomal lipid peroxidation by glutathione and glutathione transferases B and AA. *Biochem J* 1984; 220:243-52.
20. Tinmenstein MA, Reed DJ. Role of a partially purified glutathione S-transferase from rat liver nuclei in the inhibition of nuclear lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1989; 995:174-80.
21. Alin P, Danielson UH, Mannervik B. 4-hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase. *FEBS Lett* 1985; 179:267-70.
22. Mannervik B. The roles of different classes of glutathione transferase in the detoxication of reactive products of oxidative metabolism. *Chem Scripta* 1987; 27:121-3.
23. Vos RME, Rietjens MCM, Alink GM, Van Bladeren PJ. Methyl linoleate ozonide: A substrate for rat glutathione S-transferases. *Eur J Drug Met Pharmacokin* 1987; 12:275-7.
24. Mannervik B. Glutathione and the evolution of enzymes or detoxication of products of oxygen metabolism. *Chem Scripta* 1986; 26:281-4.
25. Atrosli F, Sankari S, Rizzo A, Westermarck T, Parantainen J. Prostaglandins, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in relation to inflammation in bovine mastitis. In: Emerit I ed. *Antioxidants in therapy and preventive medicine*. New York: Plenum Press, 1990: 203-7.
26. Harris CM, Stone WL. The effects of in vitro lipid peroxidation on the activity of rat liver microsomal glutathione S-transferase from rats supplemented or deficient in antioxidants. *Life Sci* 1988; 42:415-20.
27. Smith GJ, Ohi VS, Litwack G. Ligandin, the glutathione S-transferases, and chemically induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1977; 37:8-14.
28. Bass NM, Kirsch RE, Tuff SA, Saunders SJ. Radioimmunoassay of plasma ligandin, A sensitive index of experimental hepatocellular necrosis. *Gastroenterol* 1978; 75:589-94.
29. Baars AJ, Mukhtar H, Zoetermelk CEM, Jansen M, Brelmer DD. Glutathione S-transferase activity in rat and human tissues and organs. *Comp Biochem Physiol* 1981; 70:285-8.
30. Morgenstern R, Lundqvist G, Hancock V, De Pierre JW. Studies on the activity and activation of rat liver microsomal glutathione transferase, in particular with a substrate analogue series. *J Biol Chem* 1988; 263:6671-75.
31. Meister A, Anderson M. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983; 52:711-60.
32. Kamisaka K, Habig WH, Ketley JN, Arias JM, Jakoby WB. Multiple forms of human glutathione S-transferase and their affinity for bilirubin. *Eur J Biochem* 1975; 60:153-61.
33. Sato K. Glutathione transferases as markers of preneoplasia and neoplasia. *Adv Cancer Res* 1989; 52:205-55.
34. Taylor JB, Pemble SE, Cowell IG, Dixon KH, Ketterer B. Molecular biology of glutathione transferases. *Biochem Soc Trans* 1987; 15:578-81.
35. Jagt DLV, Dean VL, Wilson SP, Royer RE. Regulation of the glutathione S-transferase activity of bilirubin transport protein (ligandin) from human liver. *J Biol Chem* 1983; 258:5689-94.
36. Alin P, Jansson H, Cederlund E, Jorvall H, Mannervik B. Cytosolic glutathione transferases from rat liver. *Biochem J* 1989; 261:531-9.
37. Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jansson H, Tahir MK, Warholm M, Jorvall H. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:7202-06.
38. Abramovitz M, Listowsky I. Developmental regulation of glutathione S-transferases. *Xenobiotica* 1988; 18:1249-54.
39. Warholm M, Guthenberg C, Von Bahr C, Mannervik B. Glutathione transferases from human liver. *Meth Enzymol* 1985; 113:499-504.
40. Alin P, Mannervik B, Jorvall H. Structural evidence for three different types of glutathione transferase in human tissues. *FEBS Lett* 1985; 319-22.
41. Chasseaud LF. The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv Cancer Res* 1979; 29:175-255.
42. Lotlikar PD, Raj HG, Prasanna HR, Jhee EC, Ho LL, Magee PN. Role of glutathione (GSH) and GSH S-transferases in conjugation of reactive metabolites of chemical carcinogens. *Indian J Biochem Biophys* 1987; 24:36-43.
43. Morgenstern R, Guthenberg C, Mannervik B, DePierre JW, Ernster L. Benzo(a)pyrene metabolism by rat liver microsomes: Effects of adding purified glutathione S-transferases A, B and C. *Cancer Res* 1982; 42:4215-21.
44. Rietjens MCM, Lemming HH, Alink GM, Van Bladeren PJ. The role of glutathione and glutathione S-transferases in fatty acid ozonide detoxification. *Chem Biol Interactions* 1987; 62:3-14.
45. Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Garcia KB, Royer RE. Isolation and characterization of the multiple glutathione S-transferases from human liver. *J Biol Chem* 1985; 260:11603-610.
46. Mosialou E, Morgenstern R. Activity of rat liver microsomal glutathione transferase toward products of lipid peroxidation and studies of the effect of inhibitors on glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1989; 275:289-94.

47. Ketterer B. Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 1988; 202:343-61.
48. Rudolph N, Wong SL. Selenium and glutathione peroxidase activity in maternal and cord plasma and red cells. *Pediatr Res* 1978; 12:789-92.
49. Ujihara M, Tsuchida S, Satoh K, Sato K, Urade Y. Biochemical and immunological demonstration of prostaglandin D₂, E₂ and F_{2a} formation from prostaglandin H₂ by various rat glutathione S-transferase isozymes. *Arch Biochem Biophys* 1988; 264:428-37.
50. Weller PF, Longworth DL, Jaffe JJ. Leukotriene C₄ synthesis catalyzed by *drofilaria immitis* glutathione S-transferase. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40(2):171-5.
51. Yoshimoto T, Soberman RJ, Spur B, Austen KF. Properties of highly purified leukotriene C₄ synthase of guinea pig lung. *J Clin Invest* 1988; 81:866-71.
52. Chang M, Rao MK, Reddanna P, Li CH, Tu CD, Corey EJ, Reddy CC. Specificity of the glutathione S-transferases in the conversion of leukotriene A₄ to leukotriene C₄. *Arch Biochem Biophys* 1987; 259:536-47.
53. Abe M, Hara N, Muranishi H, Ikeda T, Nagata N, Shigematsu N. Enhanced leukotriene C₄ synthase activity in thiolglycollate-elicited peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171:1344-52.
54. Mannervik B, Jansson H, Alin P, Omring L, Hammarstrom S. Transformation of leukotriene A₄ methyl ester to leukotriene C₄ monomethyl ester by cytosolic rat glutathione transferases. *FEBS Lett* 1984; 174:289, 293.
55. Back MK, Brashler JR, Peck RE, Morton DR. Leukotriene C synthetase, a special glutathione S-transferase: Properties of the enzyme and inhibitor studies with special reference to the mode of action of U-60, 257, A selective inhibitor of leukotriene synthesis. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74:353-7.
56. Abe M, Hugel TE. Characterization of leukotriene C₄ synthetase in mouse peritoneal exudate cells. *Biochem Biophys Acta* 1988; 959:386-98.
57. Vessey DA, Boyer TD. Characterization of the activation of rat liver glutathione S-transferases by nonsubstrate ligands. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 93:275-80.
58. Harvey J, Beutler E. Binding of heme by glutathione S-transferase: A possible role of the erythrocyte enzyme. *Blood* 1982; 60:1227-30.
59. Oesch F, Wolf CR. Properties of the microsomal and cytosolic glutathione transferases involved in hexachloro-1,3-butadiene conjugation. *Biochem Pharmacol* 1989; 38:353-9.
60. Dekant W, Vamvakas S, Anders MW. Bioactivation of hexachlorobutadiene by glutathione conjugation. *Fd Chem Toxicol* 1990; 28:285-93.
61. Koob M, Dekant W. Bioactivation of xenobiotics by formation of toxic glutathione conjugates. *Chem Biol Interact* 1991; 77:107-36.
62. Dekant W, Martens G, Vamvakas S, Metzler M, Henschler D. Bioactivation of tetrachloroethylene, role of glutathione S-transferase catalyzed conjugation versus cytochrome P-450-dependent phospholipid alkylation. *Drug Metab Dispos* 1987; 15:702-9.
63. Corrigan AV, Kirsch RE. Glutathione S-transferase distribution and concentration in human organs. *Biochem Int* 1988; 16:443-8.
64. Ketterer B, Meyer DJ, Coles B, Taylor JB. Tissue distribution of glutathione transferases. In: Miners J, Birkett DJ, Drew R, McManus M ed. *Microsomes & Drug Oxidations*. New York: Taylor & Francis, 1988:305-12.
65. Reed CJ. Drug metabolism in the nasal cavity: Relevance to toxicity. *Drug Met Rev* 1993; 25:173-205.
66. Minchin RF, Boyd MR. Localization of metabolic activation and deactivation systems in the lung. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1983; 23:217-38.
67. Bend JR, Singh CJ, Philpot RM. The pulmonary uptake accumulation and metabolism of xenobiotics. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1985; 25:97-125.
68. Gervasi PG, Longo V. Drug metabolism in respiratory tract. 14th European Workshop on Drug Metabolism. Paris, 1994: 50.
69. Pacifici GM, Franchi M, Collizi C, Giuliani L, Rane A. Glutathione S-transferase in humans: Development and tissue distribution. *Arch Toxicol* 1988; 61:265-9.
70. Beutler E, Matsumoto F. Ethnic variation in red cell glutathione peroxidase activity. *Blood* 1975; 46:103-10.
71. Davies MH, Schnell RC. Comparison of basal glutathione S-transferase activities and of the influence of phenobarbital, butylated hydroxy-anisole or 5,5'-diphenylhydantoin on enzyme activity in male rodents. *Comp Biochem Physiol* 1987; 88:91-3.
72. Baars AJ, Jansen M, Breimer DD. The influence of phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on glutathione S-transferase activity of rat liver cytosol. *Biochem Pharmacol* 1978; 27:2487-94.
73. Gibson GG, Skett P. Introduction to drug metabolism. London: Univ Press Cambridge, 1986:189.
74. Andersson C, Söderström M, Mannervik B. Activation and inhibition of microsomal glutathione transferase from mouse liver. *Biochem J* 1988; 249:819-23.
75. Yadwad VB. Effect of endosulfan on glutathione S-transferase and glutathione content of the pre-moult field crab, *Paratelphusa hydrodromus*. *Bull Environ Contam Toxicol* 1989; 43:597-602.
76. Moody DE, Narloch BA, Shull LR, Hammock BD. The effect of structurally divergent herbicides on mouse liver xenobiotic-metabolizing enzymes (P-450-dependent mono-oxygenases, epoxide hydrolases and glutathione S-transferases) and carnitine acetyltransferase. *Toxicol Lett* 1991; 59:175-85.
77. Simplicio P, Jansson H, Mannervik B. Effects of inducers of drug metabolism on basic hepatic forms of mouse glutathione transferase. *Biochem J* 1989; 263:679-85.

78. Chen LH, Shiau CA. Induction of glutathione S-transferase activity by antioxidants in hepatocyte culture. *Anticancer Res* 1989; 9:1069-72.
79. Benson AM, Batzinger RP, Ou SL, Bueding E, Chag Y, Talalay P. Elevation of hepatic glutathione S-transferase activities and protection against mutagenic metabolites of Benzo(a)pyrene by dietary antioxidants. *Cancer Res* 1978; 38:4486-95.
80. Benson AM, Bueding E, Helne HS, Talalay P. Elevation of extrahepatic glutathione S-transferase and epoxide hydrolase activities by 2-(3)-ter-Butyl-4-hydroxyanisole. *Cancer Res* 1979; 39:2971-77.
81. Pearson WR, Windle JJ, Morrow JF, Benson AM, Talalay P. Increased synthesis of glutathione S-Transferases in response to anticarcinogenic antioxidants. *J Biol Chem* 1983; 258:2052-62.
82. Benson AM, Hunkeler MJ, York JL. Mouse hepatic glutathione transferase isoenzymes and their differential induction by anticarcinogens. *Biochem J* 1989; 261:1023-9.
83. Vessey DA, Boyer TD. Differential activation and inhibition of different forms of rat liver glutathione S-transferase by the herbicides 2,4-Dichlorophenoxyacetate (2,4-D) and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetate (2,4,5-T). *Toxicol Applied Pharmacol* 1984; 73:492-9.
84. Singh SV, Awasthi YC. Inhibition of human glutathione S-transferases by 2,4-Dichlorophenoxyacetate (2,4-D) and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetate (2,4,5-T). *Toxicol Applied Pharmacol* 1985; 81:328-36.
85. Awasthi YC, Singh SV, Goel SK, Reddy JK. Irreversible inhibition of hepatic glutathione S-transferase by ciprofibrate, peroxisome proliferator. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123:1012-8.
86. Nicholls FA, Ahokas JT. Inhibition of purified glutathione S-transferases by indomethacin. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 119:1034-8.
87. Wu C, Mathews KP. Indomethacin inhibition of glutathione S-transferases. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 112:980-5.
88. Orhan H. Sıklıkla maruz kalınabilen ya da ilaç olarak kullanılan bazı kimyasal maddelerin insan eritrosit glutatyon S-transferaz aktivitesine etkilerinin in vitro incelenmesi. *Ankara: Bilim Uzmanlığı Tezi*, 1994.
89. Scott TR, Kirsch RE. Inhibition of rat liver glutathione S-transferase isoenzymes by acrolein. *Biochem Int* 1988; 16:439-42.
90. Siddiqui MKJ, Mahboob M, Mustafa M. Hepatic and extra hepatic glutathione depletion and glutathione S-transferase inhibition by monocrotophos and its two thiol analogues. *Toxicol* 1990; 64:271-9.
91. Ohi SV, Litwack G. Selective inhibition of glutathione S-transferases by 17 β -estradiol disulfate. *Arch Biochem Biophys* 1977; 180:186-90.
92. Orhan H, Şahin G, Duru S. The effect of aluminium, lead and cadmium on the erythrocyte GST activity. *Toxicol Lett* 1994 (Suppl 70); 4:59.
93. Şahin G, Orhan H, Duru S. The effect of nicotine and cotinine on the erythrocyte GST activity. *14th European Workshop on Drug Metabolism, Paris, 1994:63.*
94. Valentine JL, Faraji B, Kang HK. Human Glutathione peroxidase activity in cases of high selenium exposures. *Environ Res* 1988; 45:16-27.
95. Arthur JR, Morrice PC, Nicol F, Beddows SE, Boyd R, Hayes JD, Beckett GJ. The effect of selenium and copper deficiencies on glutathione S-transferase and glutathione peroxidase in rat liver. *Biochem J* 1987; 248:539-44.
96. Anneren G, Gebre-Medhin M, Gustavson KH. Increased plasma erythrocyte selenium concentrations but decreased erythrocyte glutathione peroxidase activity after selenium supplementation in children with Down syndrome. *Acta Paediatr Scand* 1989; 78:879-84.
97. Beutler E, Dunning D, Dabe IB, Forman L. Erythrocyte glutathione S-transferase deficiency and hemolytic anemia. *Blood* 1988; 72:73-7.
98. Uotila J, Tuimala R, Pyykkö K. Erythrocyte glutathione peroxidase activity in hypertensive complications of pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* 1990; 29:259-62.
99. Thomas H, Schladt L, Knehr M, Oesch F. Effect of diabetes and starvation on the activity of rat liver epoxide hydrolases, glutathione S-transferases and peroxisomal α -oxidation. *Biochem Pharmacol* 1989; 38:4291-7.
100. Moscow JA, Cowan KH. Multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst* 1987; 80:14-20.
101. Waxman DJ. Glutathione S-transferases: role in alkylating agent resistance and possible target for modulation chemotherapy. *Cancer Res* 1990; 50:6449-54.
102. Howle AF, Forrester LM, Glancey MJ, Schlager JJ, Powis G, Beckett GJ, Hayes JD, Wolf CR. Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase expression in normal and tumour human tissues. *Carcinogenesis* 1990; 11:451-8.
103. Peters WHM, Nagengast FM, Wobbes T. Glutathione S-transferases in normal and cancerous human colon tissue. *Carcinogenesis* 1989; 10:2371-4.
104. Singh SV, Haque AK, Ahmad H, Medh RD, Awasthi YC. Glutathione S-transferase isoenzymes in human lung tumors. *Carcinogenesis* 1988; 9:1681-5.
105. Nitsuy Y, Takahashi Y, Saito T, Hirata Y, Arisato N, Maruyama H, Kohgo Y, Listowsky I. Serum glutathione S-transferase-n as a tumor marker for gastrointestinal malignancies. *Cancer* 1989; 63:317-23.
106. Tsuchida S, Sekine Y, Shineha R, Nishihira T, Sato K. Elevation of the placental glutathione S-transferase form (GST- γ) in tumor tissues and the levels in sera of patients with cancer. *Cancer Res* 1989; 49:5225-9.
107. Sheba TC, Kelley SL, Henner WD. Identification of an anionic form of glutathione transferase present in many human tumors and human tumor cell lines. *Cancer Res* 1988; 48:527-33.
108. Wang AL, Tew KD. Increased glutathione S-transferase activity in a cell line with acquired resistance to nitrogen mustard. *Cancer Treat Rep* 1985; 69:677-82.

109. Buller AL, Clapper ML, Tew KD. Glutathione S-transferases in nitrogen mustard-resistant and -sensitive cell lines. *Mol Pharmacol* 1987; 31:575-8.
110. Holmes J, Wareing C, Jacobs A, Hayes JD, Padua RA, Wolf CR. Glutathione S-transferase pI expression in leukemia: a comparative analysis with *mdr-1* data. *Br J Cancer* 1990; 62:209-12.
111. Yusa K, Hamada H, Tsuruo T. Comparison of glutathione S-transferase activity between drug-resistant and sensitive human tumor cells: is glutathione S-transferase associated with multidrug resistance? *Cancer Chemother Pharmacol* 1988; 22:17-20.
112. Shiratori Y, Soma Y, Maruyama H, Sato S, Takano A, Sato K. *Immunohistochemical* 1988; 22:17-20.
113. Shea TC, Clafflin G, Comstock KE, Senderson BJS, Burslein NA, Keenan EJ, Mannervik B, Henner WD. Glutathione transferase activity and isoenzyme composition in primary human breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50:6848-53.
114. Peters WHN, Roelofs HMJ. Time-dependent activity and expression of glutathione S-transferases in the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Biochem J* 1989; 264:613-6.
115. Friedman HS, Skapek SX, Colvin ON, Ellison GB. Melphalan transport, glutathione levels and glutathione S-transferase activity in human medullablastoma. *Cancer Res* 1988; 48:5397-402.
116. Seldegard J, Pero RW, Markowitz MM. Isoenzyme of glutathione transferase (Class Mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow-up study. *Carcinogenesis* 1990; 11:33-6.
117. Soma Y, Satoh K, Kato K. Purification and subunit-structural and immunological characterization of five glutathione S-transferases in human liver, and the acidic form as a hepatic tumor marker. *Biochim Biophys Acta* 1986; 869:247-58.
118. Bass NM, Kirsch RE, Tuff SA, Campbell JA. Radioimmunoassay measurement of urinary ligandin excretion in nephrotoxin-treated rats. *Clin Sci* 1979; 56:419-26.
119. Bombard E, Maruhn D, Vogel O, Mager H. Determination of urinary glutathione S-transferase and lactate dehydrogenase for differentiation between proximal and distal nephron damage. *Arch Toxicol* 1990; 64:269-78.
120. Elmoto H, Tsutsumi M, Nakajima A. Expression of the glutathione S-transferase placental form in human lung carcinomas. *Carcinogenesis* 1988; 9:2325-7.
121. Howie AF, Douglas JG, Fergusson RF, Beckett GJ. Measurements of glutathione S-transferase P1 isoenzyme in plasma, a possible marker for adenocarcinoma of the lung. *Clin Chem* 1990; 36:453-6.
122. Ilo CD, Bocchio GD, Aceto A. Elevation of glutathione transferase activity in human lung tumor. *Carcinogenesis* 1988; 9:335-40.
123. Carmichael J, Forrester LM, Lewis AD, Hayes JD, Hayes PC, Wolf CR. Glutathione S-transferase isoenzymes and glutathione peroxidase activity in normal and tumour samples from human lung. *Carcinogenesis* 1988; 9:1617-21.
124. Wiencke JK, Kelsey KT, Lamella RA, Toscano WA. Human glutathione S-transferase deficiency as a marker of susceptibility to epoxide-induced cytogenetic damage. *Cancer Res* 1990; 50:1585-90.
125. Poppel G, Vogel N, Bladeren J, Kok FJ. Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme u. *Carcinogenesis* 1986; 13:303-5.
126. Beckett GJ, Hayes PC, Hussey AJ, Bouchier IAD, Hayes JD. Plasma glutathione S-transferase measurements in patients with alcoholic cirrhosis. *Clin Chem Acta* 1987; 169:85-90.
127. Hayes PC, Hussey AJ, Keating J, Bouchier IAD, Williams R, Beckett GJ, Hayes JD. Glutathione S-transferase levels in autoimmune chronic active hepatitis: a more sensitive index of hepatocellular damage than aspartate transaminase. *Clin Chem Acta* 1988; 172:211-6.
128. Soloway RD, Summerskill WHJ, Baggenstoss AH. Clinical, biochemical and histological remission of severe chronic active liver disease: controlled study of treatments and early prognosis. *Gastroenterology* 1972; 63:820-33.
129. Schmidt E, Schmidt FW. Rationale diagnosis von Leberkrankungen. *Dtsch Med Wochenschr* 1976; 101:457-9.
130. Mannes GA, Stelland F, Paumgartner G. Increased serum bile acids in cirrhosis with normal transaminases. *Digestion* 1982; 25:217-21.
131. Hussey AJ et al. Impaired hepatocellular integrity during general anaesthesia, as assessed by measurement of plasma glutathione S-transferase. *Clin Chem Acta* 1986; 161:19-28.
132. Beckett GJ, Hussey AJ, Laing I, Howie AF, Hayes JD, Strange RC. Measurements of glutathione S-transferase B1 in plasma after birth asphyxia: an early indication of hepatocellular damage. *Clin Chem* 1989; 35:995-9.
133. Beckett GJ, Foster GR, Hussey AJ, Oliveira DBG, Donovan JW, Prescott LF, Proudfoot AT. Plasma glutathione S-transferase and F-protein are more sensitive than alanine aminotransferase as markers of paracetamol-induced liver damage. *Clin Chem* 1989; 35:2186-9.
134. Sherman M, Bass NM, Campbell JAH, Kirsch RE. Radioimmunoassay of human ligandin. *Hepatology* 1983; 3:162-9.