

Průkaz makro AST v běžné klinické praxi

Komrsková J.¹, Hejlová I.², Kubíček Z.¹, Bartošová K.¹, Jabor A.^{1,3}, Franeková J.^{1,3}

¹Pracoviště laboratorních metod, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

²Klinika hepatogastroenterologie, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

³3. Lékařská fakulta UK, Praha

SOUHRN

Cíl studie: Prokázat přítomnost makroenzymu AST jako příčiny dlouhodobě izolované elevace enzymu AST.

Typ studie: původní práce

Název a sídlo pracoviště: Institut klinické a experimentální medicíny, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4

Materiál a metody: Precipitace patientského séra s polyethylenglykolem 6000 (PEG 6000, Sigma Aldrich) v objemovém poměru 1:1, centrifugace, následné stanovení aktivity enzymu AST v supernatantu na analyzátoru Architect ci16200 firmy Abbott a porovnání získané hodnoty aktivity AST s hodnotou v patientském séru naředěném fyziologickým roztokem v objemovém poměru 1:1. Porovnání vzorků testovaných pacientů s dvěma kontrolními vzorky se zvýšenou aktivitou AST bylo hodnoceno na základě výpočtu procenta precipitační aktivity polyethylenglykolu (PEG-precipitable activity, % PPA) dle Davidsona a Watsona. Séra pacientů a kontrol byla dále skladována při 4°C po dobu 144 hodin a monitorování aktivity enzymu AST bylo prováděno každých 24 hodin.

Výsledky a závěr: U obou vyšetřovaných pacientů bylo po precipitaci s PEG 6000 potvrzeno podezření na výskyt makroenzymové formy AST v séru (% PPA 92 a 79), na rozdíl od techniky skladování vzorku při 4°C, kde pokles aktivity AST nebyl prokázán. Použití poměrně jednoduchého a finančně nenáročného laboratorního průkazu makroenzymové formy AST mohou zamezit dalším nákladným invazivním vyšetřením a diagnostickým chybám.

Klíčová slova: makroenzymy, makro AST, precipitace polyethylenglykolem, polyethylenglykol.

SUMMARY

Komrsková J., Hejlová I., Kubíček Z., Bartošová K., Jabor A., Franeková J.: Laboratory detection of macro-AST in routine clinical practice

Objective: Detection of the AST macroenzyme in blood serum as a cause of long-term isolated elevation of the AST enzyme.

Design: Original paper

Settings: Institute of Clinical and Experimental Medicine, Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4

Materials and Methods: Sera of two tested patients were precipitated with polyethylene glycol 6000 (PEG 6000, Sigma Aldrich) in a volume ratio of 1:1. After centrifugation, AST enzyme activity in the supernatant was determined (Architect ci16200, Abbott). AST enzyme activity values were compared to those of the patient sera, which were diluted with saline (NaCl 9 g/L) in a volume ratio of 1:1. The results of comparing of the tested patient samples with the two control samples were evaluated as a percentage of PEG-precipitable activity (%PPA). The patient and control sera were stored at 4°C for 144 hours and AST enzyme activity was monitored after each 24 hours.

Results and Conclusions: The presence of macro-AST as the most probable cause of permanently increased activity of AST in serum was confirmed. PEG-precipitable activities in tested patients were 92 and 79 %, respectively. In contrast, the comparative method of storing samples at 4°C did not reveal any decline of AST activity. These relatively simple and inexpensive laboratory methods of macro-AST detection can save on unnecessary examinations as well as prevent diagnostic errors.

Keywords: macroenzymes, macro-aspartate aminotransaminase (macro-AST), polyethylene glycol precipitation, polyethylene glycol.

Úvod

Stanovení aktivity aspartátaminotransferázy (AST) v séru nebo plazmě patří k základním biochemickým vyšetřením, určeným ke screeningu, diagnostice a monitorování především jaterních onemocnění, ale také k diagnostice poškození příčně pružovaného svalu. Izolované zvýšení tohoto enzymu však nemusí být pouze výsledkem uvedených onemocnění, v ojedinělých případech může být způsobeno i atypickou strukturou enzymu, přítomností tzv. makro AST [1].

Makroenzymy mohou vznikat buď navázáním enzymu na molekulu imunoglobulinu (makroenzymy typu 1, např. makro AST, CK, LDH, amyláza), nebo polymerizací enzymu či vazbou enzymu na jinou transportní bíl-

kovinu (zejména na lipoproteinovou částici) či membránové fragmenty (makroenzymy typu 2). Příkladem této skupiny makroenzymu jsou GGT, leucin aminopeptidáza nebo 5'-nukleotidáza. Některé enzymy mohou vytvářet obě možné vazby, např. ALP a amyláza. Enzymový makrokomplex se vyznačuje vysokou molekulovou hmotností a delším biologickým poločasem, což způsobuje jeho dlouhodobě zvýšenou sérovou aktivitu bez klinické příčiny. Pacienti s neobjasněnou elevací enzymu v séru bývají často v rámci diferenciální diagnostiky dále vyšetřováni včetně invazivních a finančně náročných vyšetření.

Výskyt makrokomplexů byl popsán u pacientů s autoimunitním onemocněním, zhoubnými nádory i jinými onemocněními, nárůst je zaznamenáván i s vyš-

ším věkem pacienta [2-4]. Patogeneze vzniku makroenzymů není prozatím objasněna, předpokládají se teorie založené na autoimunitním podkladě za tvorby protilátek proti enzymům v kombinaci s celkovou dysregulací imunologické tolerance a přítomností jiných autoimunitních onemocnění. U části popsaných případů však žádné poruchy imunity ani jiná onemocnění popsány nebyly [3].

Makroformu enzymu AST jsme prokazovali u dvou mladých pacientek s izolovanou elevací aktivity AST, které byly asymptomatické, a u kterých jsme podrobným vyšetřením včetně biopsie jater neprokázali virovou hepatitidu, autoimunitní hepatitidu nebo jiné jaterní onemocnění, neprokázali jsme ani poruchu funkce štítné žlázy, celiakii či svalové onemocnění. U jedné z pacientek byla nalezena mírná steatóza jater na podkladě metabolických změn, bez známek steatohepatitidy, která neobjasňovala elevaci aktivity AST. Negativní nálezy provedených vyšetření vedly k podezření na výskyt makroformy enzymu AST.

Materiál a metody

Stanovení na průkaz makroenzymu AST v séru u dvou vyšetřovaných pacientů (A, B) s izolovaným zvýšením AST bylo provedeno metodou precipitace s PEG 6000 dle Davidsona a Watsona [5] a dále metodou analýzy v čase při skladování vzorku podle Castielly [6].

Precipitace polyethylenglykolem 6000

Vyšetření byla provedena ze séra pacientů a kontrolních vzorků získaných centrifugací srážlivé krve po dobu 10 minut při 2200 g. Sledovali jsme aktivitu AST, ALT, CK a koncentraci celkové bílkoviny, albuminu, imunoglobulinů IgG, IgM a IgA. Pracovali jsme se třemi typy vzorků:

- Biologický materiál bez úpravy, tj. vzorek pacientů nebo kontrolní vzorek
- Biologický materiál s přidavkem PEG 6000, tj. vzorek pacientů nebo kontrolní vzorek s přidavkem PEG 6000 240 g/l v NaCl 9 g/l v poměru objemů 1 : 1
- Biologický materiál s přidavkem roztoku NaCl 9 g/l (dále označovaný jako blank), tj. vzorek pacientů nebo kontrolní vzorek v poměru objemů 1 : 1

Kontrolní vzorky č. 1 a č. 2 byly připraveny smícháním patientských sér, jejichž zvýšené aktivity AST byly způsobeny onemocněním jater. Výsledné aktivity AST v připravených kontrolních sérech přibližně odpovídaly hodnotám AST ve vyšetřovaných patientských vzorcích. Schéma námi prováděného vyšetření uvádí Tabulka 1.

Ředěné vzorky (s PEG 6000 nebo blanky) byly ponechány minimálně 1 minutu při pokojové teplotě a následně byly centrifugovány po dobu 10 minut při 1500 g. Po centrifugaci byly v supernatantu stanoveny všechny sledované analyty.

Všechna stanovení byla provedena na analyzátoru Architect ci16200 firmy Abbott s metrologickou návazností na referenční metody IFCC.

Z naměřených hodnot aktivity AST ve vzorcích pacientů a v kontrolních vzorcích bylo vypočítáno procento precipitační aktivity polyethylenglykolu (%PPA) pro AST dle následujícího vztahu:

$$\% \text{PPA} = 100 \cdot [\text{aktivita}_{\text{blank}} - \text{aktivita}_{\text{PEG}}] / \text{aktivita}_{\text{blank}} \quad [5]$$

Referenční rozmezí %PPA pro makroformy AST je udáváno mezi 18-53 %, hodnoty %PPA nad toto rozmezí svědčí o přítomnosti makrokomplexu AST [5].

Analýza skladování vzorku při 4°C

Průkaz přítomnosti makroenzymových komplexů analýzou v čase byl proveden skladováním séra vyšetřovaných pacientů A a B a námi připravených kontrol v lednici při 4°C [6]. Vždy po 24 hodinách, po dobu 144 hodin byla měřena u všech těchto vzorků aktivita enzymu AST.

Výsledky

Precipitace s PEG 6000

Stanovení makro AST bylo provedeno u dvou pacientek (A a B) s dlouhodobě izolovanou elevací aktivity AST v séru. Naměřené hodnoty AST, ALT, CK, celkové bílkoviny, albuminu a imunoglobulinů v séru, blanku a po precipitaci s PEG 6000 jsou uvedeny v Tabulce 2. %PPA u AST bylo vyhodnoceno dle referenčního rozmezí uváděného Davidsonem a Watsonem [5].

Vypočítané %PPA pro AST bylo u patientských vzorků 79 % (A) a 92 % (B), což potvrzuje dle udávaných referenčních mezí přítomnost makroenzymu AST. %PPA pro kontrolní sérum č. 1 bylo 20 %, pro kontrolní sérum č. 2 bylo 15 %, nacházejí se tedy u dolní hranice udávaného referenčního rozmezí. Po reakci séra s PEG 6000 došlo u patientských vzorků k vysrážení kolem 85 % IgG, 92 % IgM a 50 % IgA.

Z Tabulky 2 je zřejmý i efekt PEG 6000 na ostatní analyty – především imunoglobuliny. U ALT a CK nebyly makroenzymové formy u vyšetřovaných pacientů prokázány – pro průkaz makro CK je nutné %PPA minimálně 37 % a pro průkaz makro ALT minimálně 76 % [5].

Table 1. Overview of the detection method for the determination of the macroenzyme complexes using precipitation technique with PEG 6000

	Patient serum (mL)	Patient serum – blank (mL)	Control serum (mL)	Control serum – blank (mL)
Patient serum or control serum	0.5	0.5	0.5	0.5
PEG 6000	0.5	-	0.5	-
9 g/L NaCl	-	0.5	-	0.5

Table 2. Measured activities and concentrations of selected compounds before and after precipitation with PEG 6000 in patients A and B

	Serum (A)	Blank (A)	Serum + PEG (A)	%PPA	Serum (B)	Blank (B)	Serum+ PEG (B)	% PPA
AST ($\mu\text{kat/L}$)	2.62	1.40	0.29	79	5.60	2.79	0.21	92
ALT ($\mu\text{kat/L}$)	0.36	0.22	0.17	23	0.80	0.45	0.28	38
CK ($\mu\text{kat/L}$)	1.74	0.99	0.74	25	1.18	0.67	0.49	27
Total protein (g/L)	69.8	40.6	29.7	27	78.2	47.5	27.9	41
Albumin (g/L)	45.4	28.0	26.6	5	47.1	30.1	25.1	17
IgG (g/L)	10.50	6.05	<1.08	82	14.44	8.86	<1.08	88
IgM (g/L)	0.88	0.51	<0.05	90	1.73	1.06	<0.05	95
IgA (g/L)	1.41	0.91	0.48	47	2.16	1.36	0.64	53

Analýza skladování vzorku při 4°C

Vzorky dvou patientských sér byly dále zpracovávány dle Castielly [6], kde je v případě přítomnosti makrokomplesů popsán pokles aktivity enzymu AST o 65 % z původní aktivity enzymu při uchování vzorku při 2-8 °C po dobu pěti dnů, zatímco kontrolní séra vykazovala podle autorů snížení aktivity AST pouze o 2 % za stejný časový interval.

Námi testované patientské vzorky sér A a B spolu s námi připravenými kontrolami č. 1 a 2 byly ponechány v lednici při 4°C po dobu 144 hodin, přičemž každých 24 hodin byla v těchto vzorcích měřena aktivita enzymu AST. Obr. 2 znázorňuje námi naměřené hodnoty aktivit enzymu AST ve výše zmíněných vzorcích v čase. V našem případě nedošlo k poklesu aktivit AST ve vzorcích.

Diskuse

Makroenzymová forma AST byla poprvé popsána Konttinenem [7], který uvádí případy dvou mladých asymptomatických žen, s dlouhodobou izolovanou elevací enzymu AST. Sturk popsal dalších 20 případů makroenzymu AST u pacientů s různými diagnózami: karcinomem plic s jaterními metastázemi, akutní či chronickou hepatitidou, kolitidou [8], dále byla popsána i řada případů přítomnosti makro AST u zdravých dětí a dospělých.

Dodnes zůstává prevalence makroenzymu AST v populaci neznámá, ze souboru pacientů (7273) bylo testováno 11 pacientů s izolovaným zvýšením aktivity enzymu AST metodou precipitace vzorku s PEG 6000. Makroenzymová forma AST byla prokázána u jednoho z těchto 11 pacientů [9].

Table 3. Activities of AST in the control sera No. 1 and 2

AST ($\mu\text{kat/L}$)	Serum	Serum - blank	Serum - PEG	%PPA
Control serum 1	5.37	2.74	2.18	20
Control serum 2	3.64	1.86	1.58	15

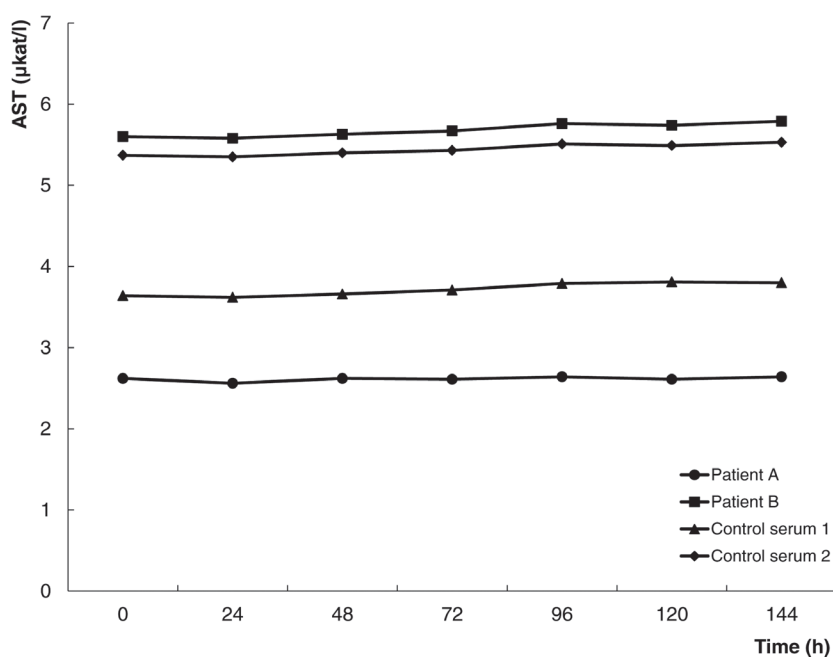


Fig. 1: Activity of AST stored at +4 °C during 6 days

Pro předpokládanou nízkou prevalenci makroenzymových forem je na ně často zapomínáno a pacienti jsou pak podrobováni rozsáhlým a mnohdy invazivním vyšetřením. Stanovení makroenzymových forem na základě precipitace vzorku s PEG 6000 umožňuje poměrně nenáročnou, finančně dostupnou a rychlou analýzu, která může zabránit náročným a invazivním vyšetřením u pacientů s nejasnou příčinou elevace nejen enzymu AST. Tato metoda má poměrně vysoký potenciál pro zavedení do rutinního provozu laboratoře jako screeningová metoda enzymových makrokomplexů. Metodu lze navíc použít i pro průkaz makrokomplexů jiných enzymů, ale se specifickými cut-off hodnotami procenta precipitační aktivity polyethylenglykolu; modifikovaná metoda se používá i pro průkaz makroprolaktinémie [10]. V našem sledování se nám metodou skladování vzorku při teplotě +4 °C po dobu 6 dnů nepodařilo prokázat přítomnost makrokomplexu AST. Chtíou podobně jako v našem experimentu efektivitu této metody pro průkaz makroforem AST neprokázal [11], zatímco Beşer popsal pokles aktivity AST o 52 až 67 % u 8 dětí s izolovaným zvýšením AST bez prokázané klinické příčiny [12]. Mbagaya testoval pokles aktivity AST v případě přítomnosti makro AST prokázané gelovou filtrací, podstatně vyšší pokles aktivity AST zaznamenal při 4 °C a malý pokles při -20 °C [13].

Kromě metody precipitace séra s PEG 6000 a metody skladování vzorků při 2 – 8 °C lze ke stanovení makroenzymů použít i náročnější techniky, jako jsou elektroforéza s následnou imunoprecipitací či gelová permeační chromatografie [14]. Tyto metody mohou přispět k průkazu makroenzymů v případech, kdy přetrvává podezření na přítomnost makroenzymu a jiná použitá metoda vykazuje neurčitý výsledek nebo je podezření na falešně pozitivní výsledek (může být diagnosticky zavádějící) nebo falešně negativní výsledek (povede ke zbytečnému vyšetřování pacienta).

Závěr

Včasný záchyt makrokomplexových forem enzymů pomocí precipitace séra či plazmy s PEG 6000 může zabránit náročným nákladným a invazivním vyšetřením.

Literatura

1. **Loupatty, F. J., Wener, R. R. L., Schouten, W. E. M., Slaats, E. H.** Macro-aspartate aminotransferase, a surprising outcome for clinicians. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk*, 2011, roč. 36, č. 4, s. 256-257.
2. **Čepelak, I., Čvorišćec, D.** Why is it necessary to recognize macroenzymes? *Biochemia Medica*, 2007; roč. 17, č. 1, s. 52-59.
3. **Remaley, A.T., Wilding, P.** Macroenzymes: biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. *Clin Chem.*, 1989, roč. 35, č. 12, s. 2261-2270.
4. **Turecky, L.** Macroenzymes and their clinical significance. *Bratisl Lek Listy.*, 2004, roč. 105, č. 7-8, s. 260-263.
5. **Davidson, D. F., Watson, D. J.** Macroenzyme detection by polyethyleneglycol precipitation. *Ann Clin Biochem*, 2003, roč. 40, č. 5, s. 514-520.
6. **Castiella, A., Aguayo, F. J., Rueda, M., Fernandez, J., Zapata, E.** Macroaspartate aminotransferase (Macro-AST) a rare cause of hypertransaminasemia: another way to diagnosis? *J Clin Gastroenterol.*, 2006, roč. 40, č. 7, s. 655.
7. **Konttinen, A., Murros, J., Ojala, K., Salaspuro, M., Somer, H., Räsänen, J.** A new cause of increased serum aspartate aminotransferase activity. *Clin Chim Acta*, 1978, roč. 84, č. 1-2, s. 145-147.
8. **Sturk, A., Sanders, G.T.** Macro enzymes: prevalence, composition, detection and clinical relevance. *J Clin Chem Clin Biochem.*, 1990, roč. 28, č. 2, s. 65-81.
9. **Patteet, L., Simoons, M., Piqueur, M., Wauters, A.** Laboratory detection of macro-aspartate aminotransferase: case report and evaluation of the PEG-precipitation method. *Clin Biochem.*, 2012, roč. 45, č. 9, s. 691-693.
10. **Guclu, M., Cander, S., Kiyici, S., Vatasever, E., Hacıhasanoğlu, A.B., Kisakol, G.** Serum macroprolactin levels in pregnancy and association with thyroid autoimmunity. *BMC Endocr Disord.*, 2015. doi: 10.1186/s12902-015-0025-2.
11. **Chtioui, H., Mauerhofer, O., Günther, B., Dufour, J.F.** Macro-AST in an asymptomatic young patient. *Annals of Hepatology*, 2010, roč. 9, č. 1, s. 93-95.
12. **Beşer, Ö. F., Laçinel, S., Gülcü, D., Kutlu, T., Çokuğraş, F. Ç., Erkan, T.** An easy method for diagnosing macro-aspartate aminotransferase: A case series. *Turk J Gastroenterol.*, 2014, roč. 25, č. 5, s. 568-570.
13. **Mbagaya, W., Foo, J., Luvai, A. et al.** Persistently raised aspartate aminotransferase (AST) due to macro-AST in a rheumatology clinic. *Diagnosis*, 2015, roč. 2, č. 2, s. 137-140.
14. **Nagamine, M., Okochi, K.** Complexes of immunoglobulins A and G with aspartate aminotransferase isoenzymes in serum. *Clin Chem.*, 1983, roč. 29, č. 2, s. 379-381.

Do redakce došlo 5. 10. 2015

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Janka Franeková, Ph.D.
Pracoviště laboratorních metod
Institut klinické a experimentální medicíny
Václavská 1958/9
140 21 Praha 4
e-mail: jafa@ikem.cz