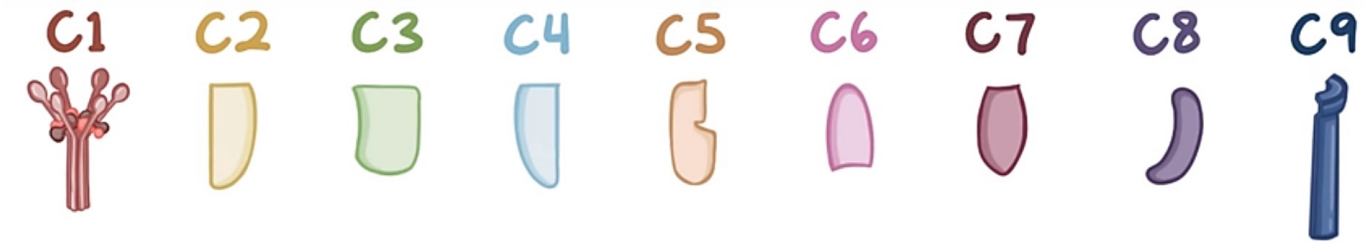
Vyšetření funkce komplementu

Mgr. Julie Štíchová

FN u Sv. Anny v Brně

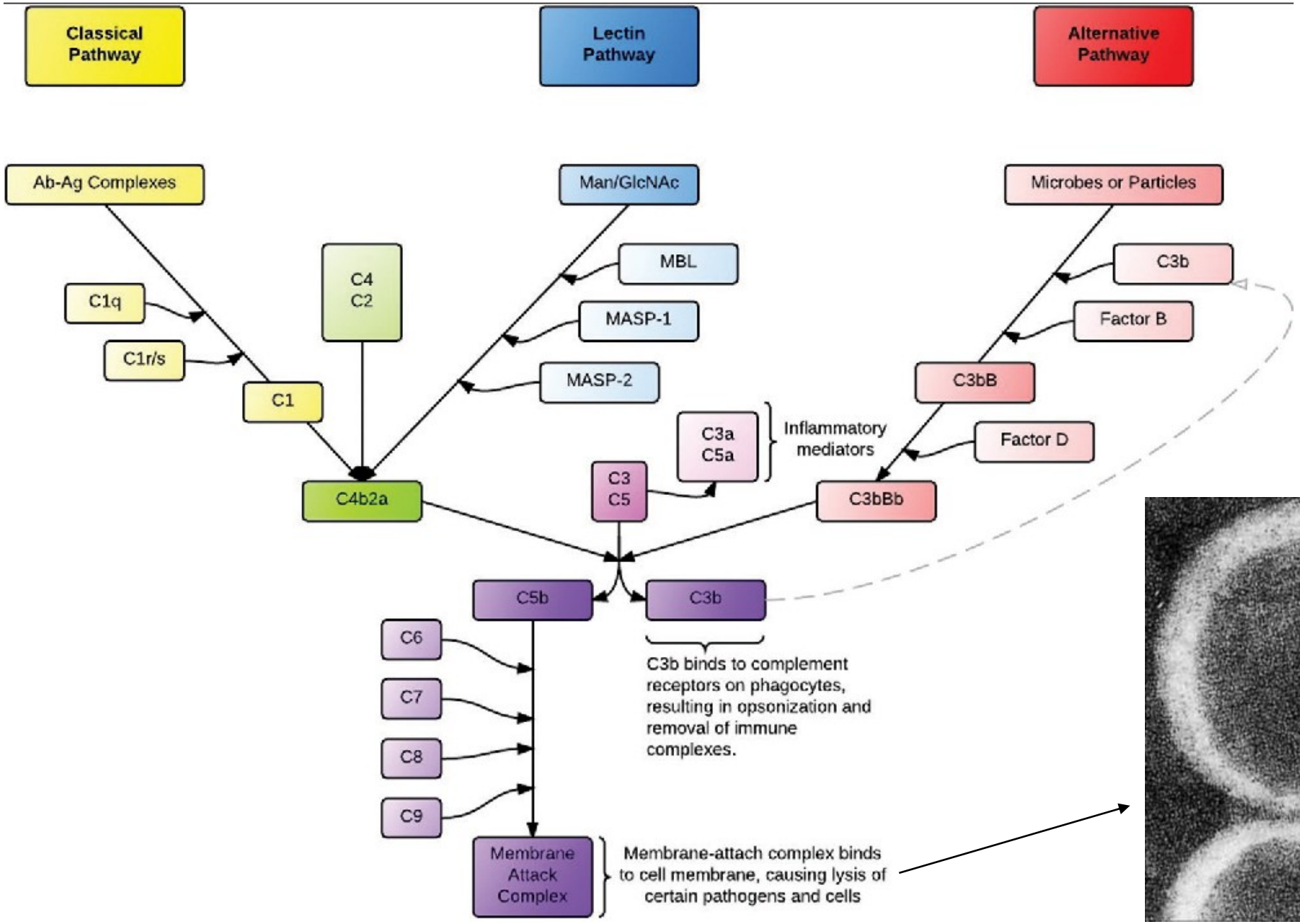
Komplement

- Objev – Jules Bordet – termolabilní substance v plazmě
- Složka nespecifické humorální imunity
- Systém několika desítek proteinů, většina tvořena v játrech
- Velmi rychlá aktivace
- Silné zánětotvorné a lytické účinky



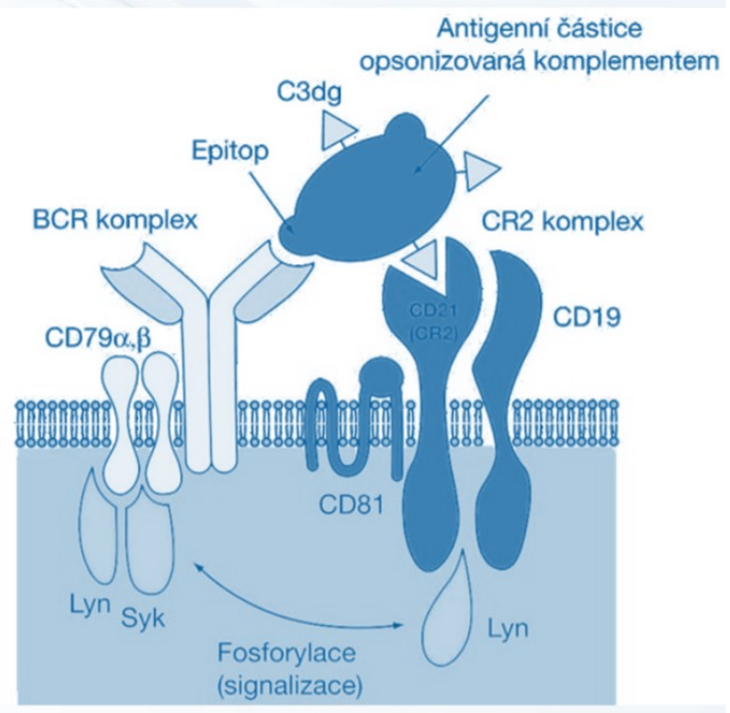
Komplementový systém tvoří:

- Centrální proteiny C1-C9
- Komplementové receptory na buňkách
- Stabilizátory komplementu
- Inhibitory komplementu
  - Solubilní
  - Membránově vázané


Classical Pathway
Lectin Pathway
Alternative Pathway
Ab-Ag Complexes
C1q
C1r/s
C1
C4
C2
C4b2a
Man/GlcNAc
MBL
MASP-1
MASP-2
Microbes or Particles
C3b
Factor B
C3bB
Factor D
C3bBb
C3a
C5a
Inflammatory mediators
C3
C5
C5b
C3b
C6
C7
C8
C9
C3b binds to complement receptors on phagocytes, resulting in opsonization and removal of immune complexes.
Membrane Attack Complex
Membrane-attach complex binds to cell membrane, causing lysis of certain pathogens and cells

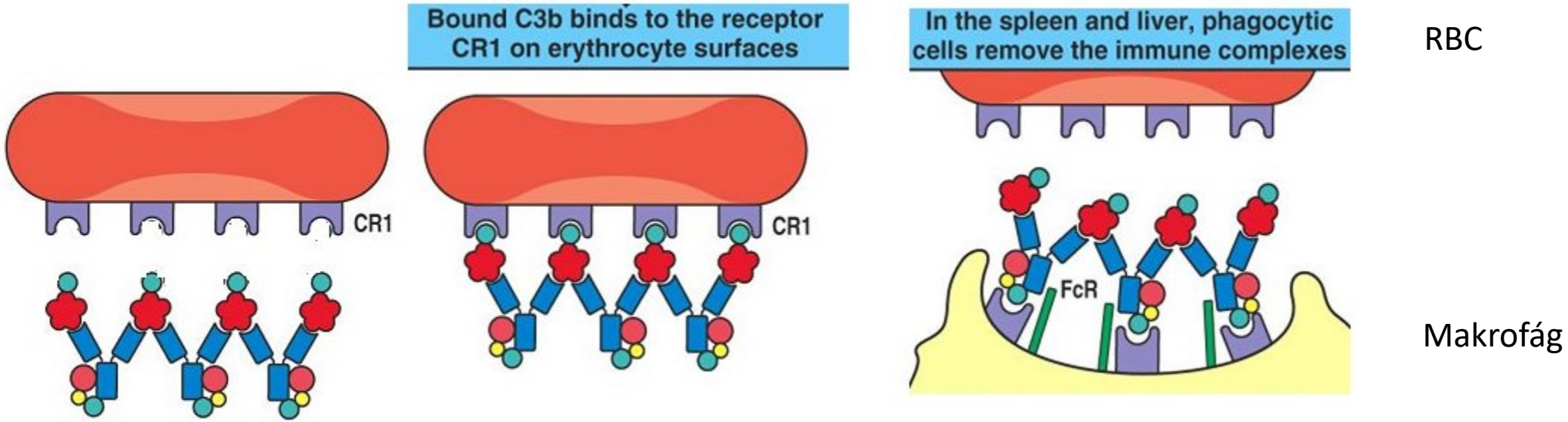
Komplement - funkce

- Aktivovaný komplement podporuje:
  - Rozvoj zánětlivé reakce (anafylatoxiny – C3a, C4a, C5a)
  - Opsonizace (C3b, C4b)
  - Chemotaxe (C3a, C5a, komplex C5,6,7)
  - Lýza buněčných membrán (C5b-C9 – MAC)
  - Imunokomplexy s C3dg – přemostění CD21 (komplementový receptor 2 – CR2) a BCR na B lymfocytech – zesílení signalizace, podpora diferenciace do plazmatických buněk



Komplement - funkce

- Odstraňování imunokomplexů z cirkulace (C3b) → vazba na CD35 (CR1) na RBC → zabránění tvorby velkých imunokomplexů→ likvidace ve slezině/játrech
- Napomáhá odstraňování apoptotických tělísek makrofágy (opsonizace)



Zdroj: Janeway Immunobiology 8th edition

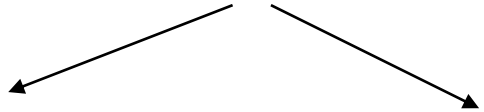
Regulace komplementu

- Aktivovaný komplement má amplifikační potenciál, nutná důsledná regulace

1) Regulátory pozitivní:
   - Properdin (faktor P) – stabilizace alternativní C3 konvertázy

2) Regulátory negativní
   a) Solubilní:
      - **C1 inhbitor (C1INH)**
      - Faktor H
      - Faktor I
   b) Membránově vázané:
      - Decay accelerating factor – DAF (CD55)
      - Membrane cofactor protein – MCP (CD46)
      - Protektin (CD59)

Komplement – přehled laboratorních testů



1. Kvantitativní testy
Stanovení koncentrace složek komplementu

2. Funkční testy
stanovení funkce komplementové kaskády nebo inhibitorů

1. Kvantitativní stanovení

- Vyjádření výsledků – koncentrace g/l, mg/l

1) **Nefelometrie – složky C3, C4, C1Q, C1-INH, MBL**
2) ELISA
3) **Radiální imunodifuze (RID)**
   - Stanovení **C2 a C5** složky komplementu
   - V gelu protilátka proti C2 nebo C5
   - Sérum pacienta difunduje do gelu
   - V zóně ekvivalence se vytvoří precipitační prstenec
   - Čím vyšší koncentrace C2/C5, tím větší průměr prstence

Komplement – normální hodnoty

- C1q (100-250mg/l)
- **C2 (10 – 30 mg/l)**
- **C3 (0,7 – 1,5 g/l)**
- **C4 (0,1 – 0,4 g/l)**
- C5 (80 – 170 mg/l)
- MBL (> 0,3mg/l)

- **C1 inhibitor (210 – 390 mg/l)**

2. Funkční vyšetření - odběry

- Některé složky komplementu jsou **termolabilní**, proto:
- Speciální odběrové zkumavky bez separátorů
- Vyvarovat se teplotním šokům při transportu
- Zpracovat krev do 60 min od odběru
- Sérum zamrazit (-20 °C max. týden, -70 °C libovolně dlouho beze ztráty aktivity)
- Sérum po rozmrazení nesmí být opětovně zamraženo

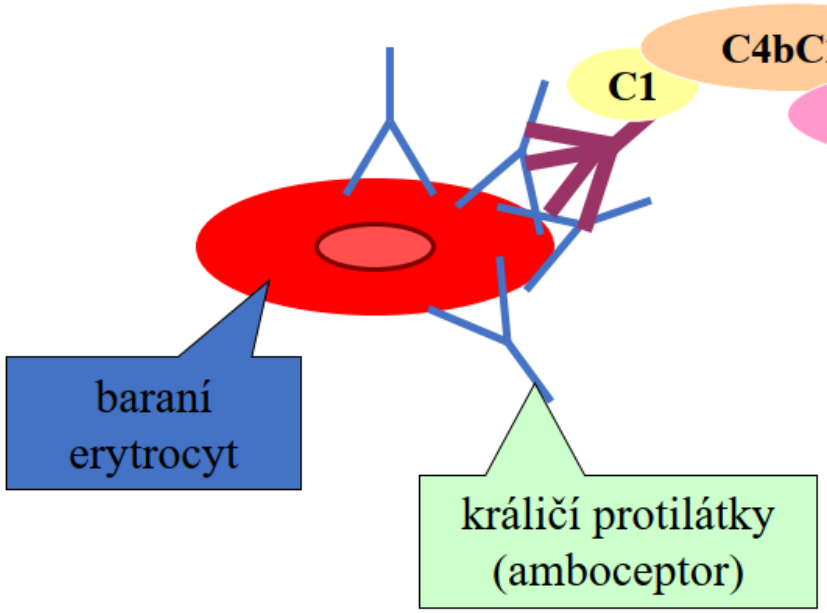
Hemolytický test CH50

- Screeningová metoda
- Zjištění funkčnosti klasické cesty aktivace komplementu → formace MAC
- Zájem o sníženou funkci komplementu
- Výsledky se vyjadřují v % aktivace
- Sérum nutno zpracovat do 1 h od odběru
- Proč CH50? → jednotka CD50

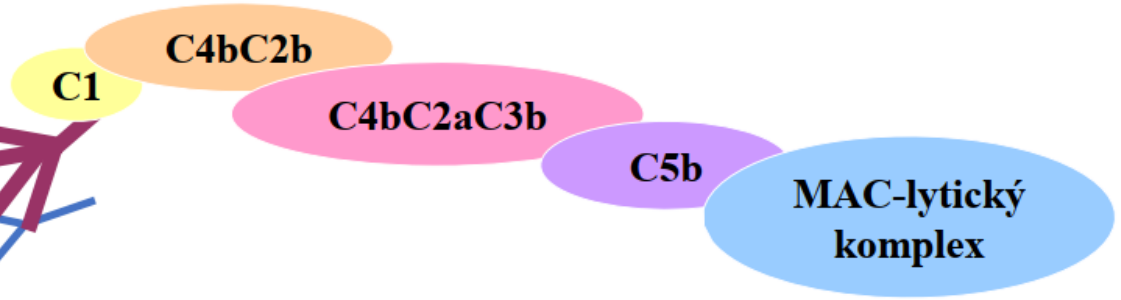
Množství séra, které za standardních podmínek způsobí 50% lýzu definované suspenze beraních erytrocytů – 30min, 37 stupňů

Princip testu CH50

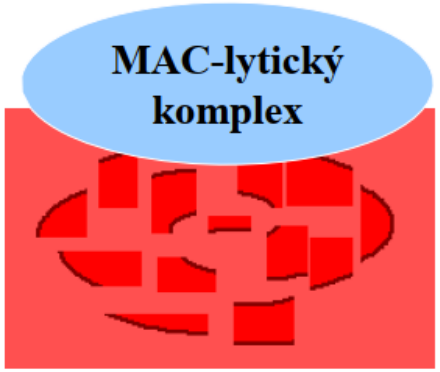
1.Hemolytický systém:
Beraní RBC+ králičí protiláka



2. Aktivace komplementu (C1)



3. Formace MAC



4. Lýza RBC

centrifugace
přepipetování
supernatantu

Měření absorbance

Výpočet, hodnocení

CH50

Reagencie:

1) 5% suspenze beraních erytrocytů
   - (Příprava: Beraní krev 3 krát proprat fyziologickým roztokem, naředit na 5%)

2) Amboceptor – králičí protilátka IgM proti beraním RBC
   - (Příprava: rozpustit lyofylizovaný prášek od výrobce v 1 ml destilované vody, poté naředit v poměru 1:1001 ve fyziologickém roztoku, např. 2 ul amboceptoru + 2 ml fyziol. Roztoku)

Příprava hemolytického systému

Do 5% suspenze RBC přidejte stejné množství amboceptoru (ne naopak!)

Inkubace 15-30 min v lednici

CH50 - vyhodnocení

Jamka s fyziologickým roztokem = blank - 0% hemolýza (pozice 6H, 8H)

Jamka s destilovanou vodou = 100% hemolýza (pozice 5H, 7H)

1) Z dubletů spočítat průměr absorbance pro každé ředění

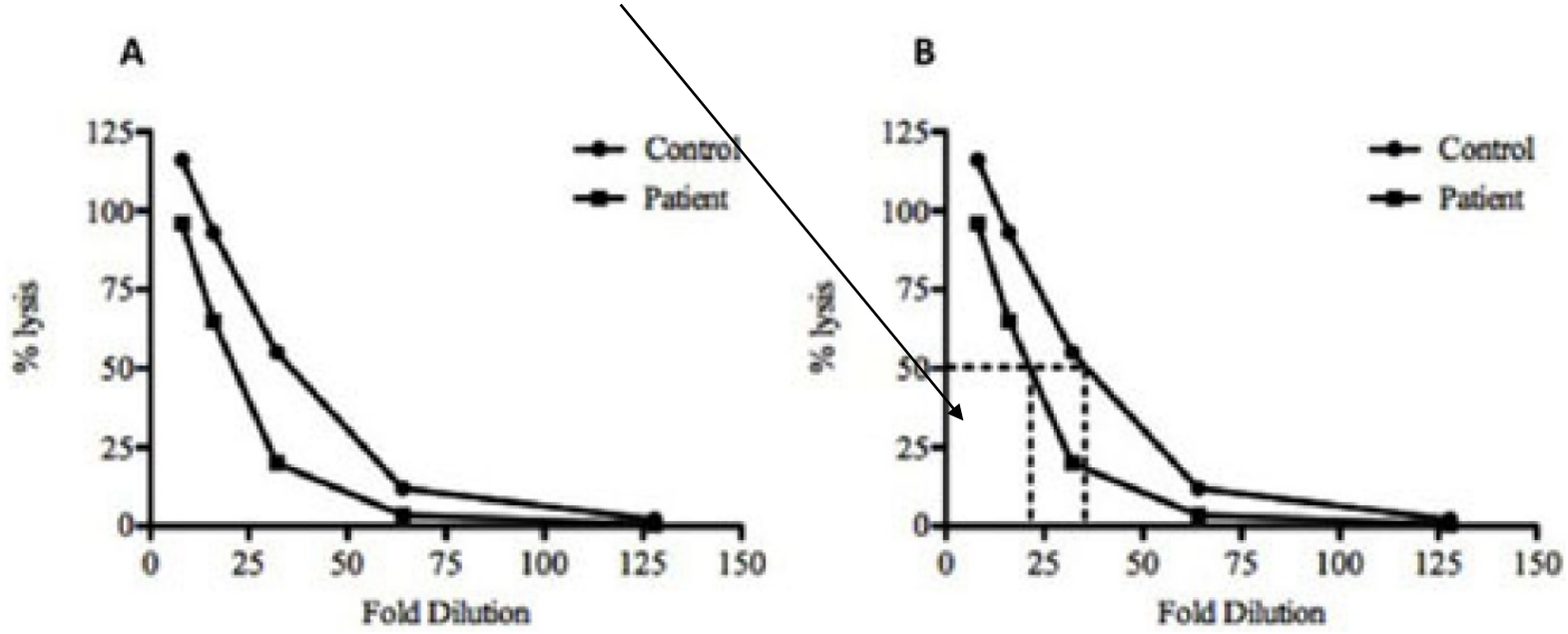
2) Z průměrné absorbance (A) spočítat % lýzy pro každé ředění dle vzorce:

$$\frac{\textbf{A daného ředění} - \textbf{A blanku}}{\textbf{A 100\% lýzy} - \textbf{A blanku}} \times \mathbf{100} = \%\ lýzy\ pro\ dané\ ředění$$

CH50 - hodnocení

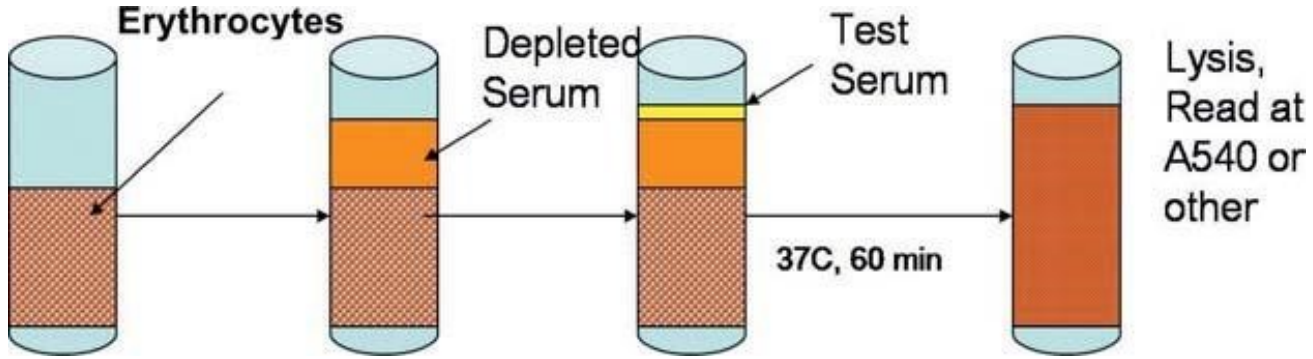
3) Sestrojit graf – závislost procenta lýzy na ředění (kontrola i pacient) – 1 graf

Odečíst ředění při 50% lýze → je aktivita komplementu u pacienta srovnatelná nebo nižší v porovnání s kontrolou?



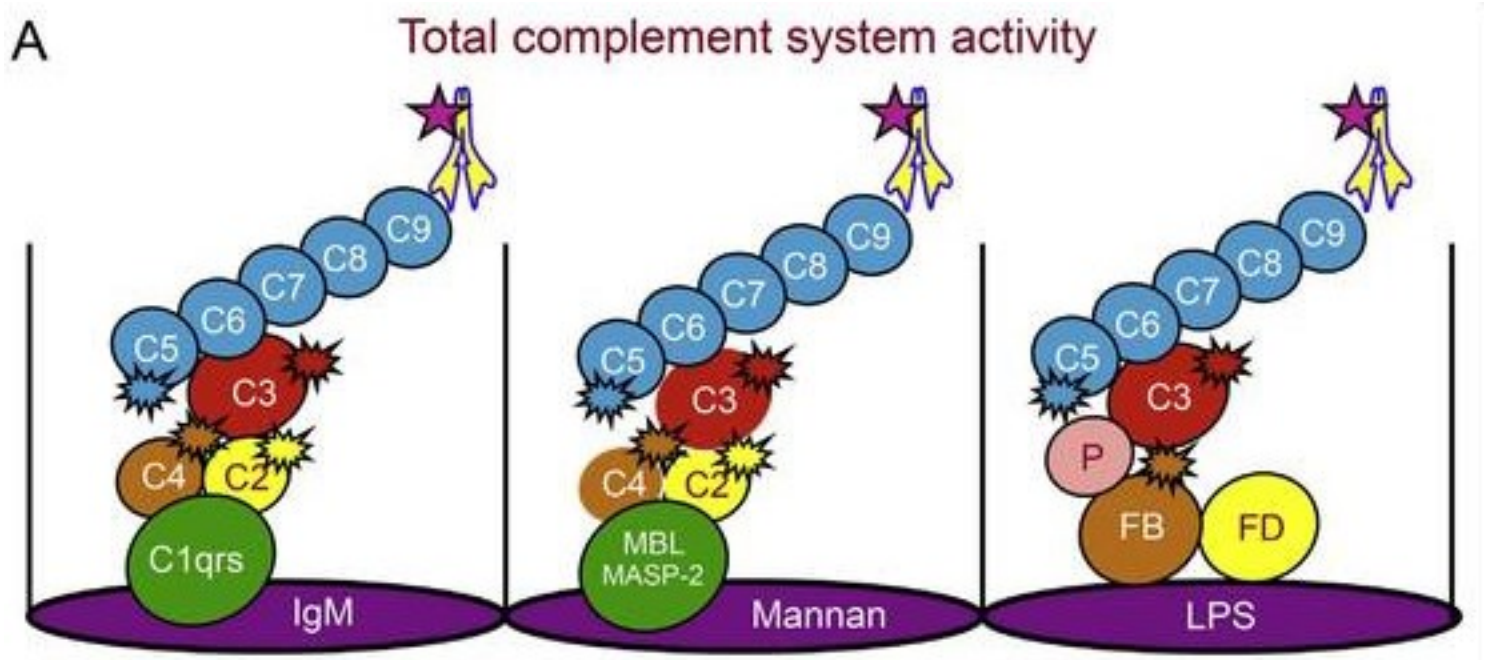
CH50 - souhrn

- Zjištění funkčnosti klasické (CH50) nebo alternativní (AH50) cesty komplementu
- Projeví se lýzou definované suspenze RBC → nárůst absorbance supernatantu v důsledku uvolnění hemoglobinu
- Výsledky se vyjadřují v % aktivace
- Pozor – se vzorkem pacienta nutno zpracovat i zdravou kontrolu, aby bylo pacienta s čím srovnat (u tohoto testu nejsou dány přesné referenční meze)

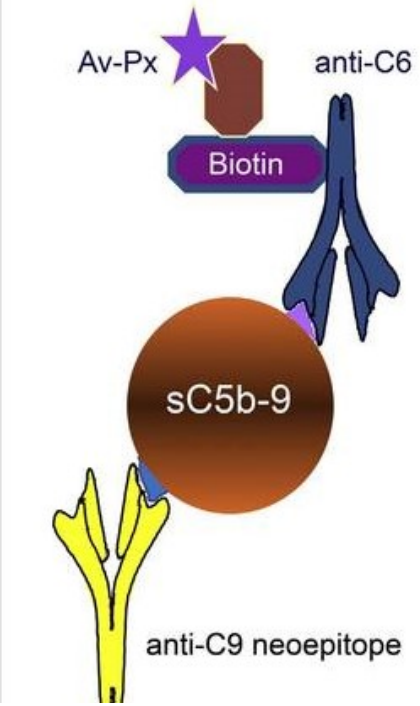


Alternativy CH50 - ELISA

- V některých laboratořích CH50/AH50 nahrazeno ELISA metodou
  - Princip – na dně jamky aktivátor určité cesty komplementu → detekce neoepitopu při formaci membranolytického komplexu



Klasická cesta | Lektinová cesta | Alternativní cesta



C1-INH funkční test

- Sérum nebo plazma se inkubuje s reaktantem - aktivovanou exogenní složkou C1s (je součástí setu), která je vazebným místem pro C1 INH
- Pokud je C1 INH funkční, naváže se na C1s
- Následuje odmytí nenavázaných složek
- Do jamky se následně přidá konjugát - kozí protilátka proti lidskému C1 INH - značená křenovou peroxidázou (přeměna substrátu na barevný produkt)
- Spektofotometrie - určí množství navázaného C1-INH
- Nefunkční C1 INH – ke zbarvení nedojde, protože se neutvořily detekovatelné komplexy C1s-C1INH

Indikace k vyšetření komplementu

- Podezření na funkční deficit komplementu
  - Testuje se CH50/AH50 → v případě nalezení patologie se stanoví koncentrace jednotlivých složek
- Monitorování zánětu
  - Složky komplementu se chovají jako pozitivní reaktanty akutní fáze – ↑↑ koncentrace
- Monitorování imunokomplexových chorob
  - Silná aktivace komplementu – dochází ke konzumpci jeho složek – ↓↓ koncentrace
- Podezření na poruchu regulátorů komplementu – C1 inhibitor + složky C3 a C4

Deficience složek komplementu

- **Deficience C1–C4** (podílí se na odstraňování imunokomplexů)
  - Častý výskyt imunokomplexových chorob (SLE-like)
  - Náchylnost k pyogenním infekcím
- **Deficience C5-C9**
  - Náchylnost k pyogenním infekcím
  - Opakované infekce ***Neisseria meningitidis***
- Deficience MBL – častější infekce u dětí

Deficience složek komplementu

- Deficit C1-inhibitoru – **Hereditální angioedém**
- Deficit membránových inhibitorů CD55 a CD59 – Paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH)
- Deficit sérových inhibitorů faktor H a faktor I – atypický hemolyticko-uremický syndrom (aHUS)

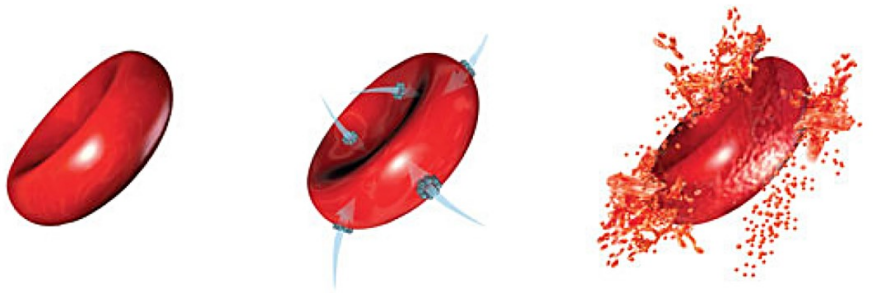
Když ochrana chybí…

- Mutace genu pro GPI kotvu v hematopoetické kmenové buňce → na povrchu BRC dochází k deficitu proteinů, které jsou normálně pomocí GPI kotvy vázány
  - DAF (CD55) – inhibice aktivace C3 a C5
  - Protektin (CD59) – inhibice aktivity MAC (C5b-C6-C7-C8-C9)

- RBC citlivé ke stopovým množstvím aktivovaného komplementu - hemolýza

↓

Paroxyzmální noční hemoglobinurie



PNH RBC[2]
PNH RBC's lack a specific component that is essential in protecting RBC's from destruction

Complement Attack[2]
Without this protein, some RBCs can be destroyed by complement, that is part of the bodies immune system

PNH RBC Lysis (haemolysis)[2]
PNH RBCs are destroyed, and the contents are released into surrounding plasma (yellow-coloured liquid component of blood).

Hereditální angioedém

- Způsoben deficitem C1 inhibitoru (C1 INH) – který inhibuje serinové proteázy C1r, C1s (ireverzibilní vazba – C1 INH se spotřebovává)
- Důsledek:

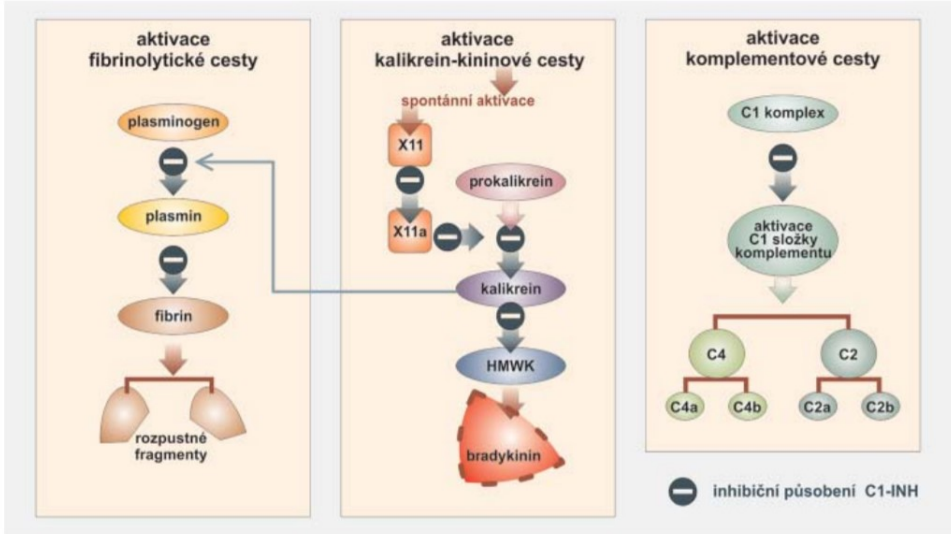
1) Aktivace klasické cesty komplementu – konzumpce složek, zejména C2 a C4 (provokující faktory – menstruace, stres, zubní zákroky….)
2) Nedostatečná regulace kininového systému (C1 INH inhibuje také kalikrein)

Mechanismus:

C1 INH není schopen dostatečně tlumit přeměnu prekalikreinu na kalikrein →
Kalikrein štěpí vysokomolekulární kininogen na **bradykinin** →

ten se váže na bradykyninové receptory na endoteliích →
vazodilatace, zvýšená permeabilita cév (lokálně) →
vznik **nezánětlivého edému**

Obr. 1. *Inhibiční působení C1 inhibitoru*



Hereditální angioedém

Klinický obraz:

- Epizodické otoky, edémy – podkoží, pod sliznicí
- Bledá barva otoků, nesvědivé, bez lokální zvýšené teploty
- Mohou být bolestivé – napětí ve tkáních
- Většinou se vyvíjejí postupně, během 12-36h
- **Otoky nereagují na antihistaminika, nedostatečně na kortikosteroidy**
- Klinické obtíže značně variabilní – dle výskytu otoku
- Otok v oblasti krku – nebezpečný – hrozí udušení
- Otok v oblasti břicha – připomíná akutní příhodu břišní
- Útlak močových cest, střeva → retence moči, střevní neprůchodnost

Hereditální angioedém

Typ 1: porucha tvorby C1INH, 85% nemocných

- Snížení C1INH na 12-50%, C3 v normě, snížené C2 a C4

Typ 2: Funkční porucha C1INH

- C1INH může být snížený, v normě i zvýšený, ale je funkčně neaktivní, snížené C2 a C4

Typ 3: estrogen dependentní – mutace FXII

- Bez abnormalit v množství a funkčnosti C1 INH

Obr. 4. *Složky komplementu u angioedémů indukovaných bradykininem*

komplement	HAE – ↓ koncentrace C1-INH	HAE – dysfunkce C1-INH	HAE s mutací genu pro f. XII	získaný angioedém / AAE
C1-INH kvantitativně	↓↓	↑ / N	N	N / ↓
C1-INH funkční	↓↓	↓↓	N	↓
C4	↓↓	↓↓	N	↓↓
C2	↓↓	↓↓	N	↓↓
C1q	N	N	N	↓

Pozn.

Existuje také získaný angioedém, na který je třeba v diferenciální diagnostice myslet – **snížení C1q**

1) Zvýšený katabolismus C1 INH – některá lymfoproliferativní onemocnění
2) Autoimunitní onemocnění – tvorba autoprotilátek, které blokují aktivní místo C1 INH → ztráta funkce

Vyšetření u hereditálního angioedému (HAE)

- Screeningový test HAE: **vyšetření C4 složky** → pokud je snížená následuje:
- Vyšetření koncentrace a funkce C1 INH
- Stanovení dalších složek komplementu: C2, C3, C5
- Vyloučení získaného angioedému: stanovení C1q

- Potvrzení diagnózy pro HAE typ I a II: Genetické vyšetření – mutace v genu pro C1 INH

Metody	Hodnoty	Jednotky	Ref. hodnoty
Oddělení laboratorní imunologie			
. Primární materiál	krev		
Imunoglobuliny			
IgG	12,800	g/l	7,510 - 15,600
IgA	1,860	g/l	0,820 - 4,530
IgM	0,515	g/l	0,460 - 3,040
IgE	66	kU/l	0 - 100
Proteiny akutní fáze			
C-reaktivní protein	1,06	mg/l	0,00 - 8,00
Alfa-1-antitrypsin	1,24	g/l	0,88 - 2,00
Orosomukoid	0,770	g/l	0,400 - 1,170
Ceruloplasmin	0,237	g/l	0,150 - 0,650
Alfa-2-makroglobulin	1,32	g/l	1,02 - 3,50
Transferin	1,94	g/l	1,50 - 3,50
Prealbumin	0,38	g/l	0,10 - 0,38
Komplementový systém			
Klasická cesta aktivace kompl.	52 ↓	%	> 70
Alter. cesta aktivace kompl.	72	%	> 30
C1 inhibitor	39 ↓	mg/l	210 - 390
C1 inhibitor - funkční test	42	%	> 68
C1q složka komplementu	122	mg/l	100 - 250
C2 složka komplementu	14,3	mg/l	10,0 - 30,0
C5 složka komplementu	142	mg/l	80 - 170
C3 složka komplementu	0,67	g/l	0,62 - 1,44
C4 složka komplementu	0,03 ↓	g/l	0,10 - 0,38
Diferenciální rozpočet leukocytů průtok.cytometrií			

→ HAE typ I

Metody	Hodnoty	Jednotky	Ref. hodnoty
Oddělení laboratorní imunologie			
· Primární materiál	krev		
Imunoglobuliny			
IgG	12,100	g/l	7,510 - 15,600
IgA	2,670	g/l	0,820 - 4,530
IgM	1,670	g/l	0,460 - 3,040
IgE	1010	kU/l	0 - 100
Protilátky proti bakteriálním antigenům			
IgG pl. anti-tetan.toxoid	1,474	IU/ml	> 0,120
IgG pl.anti-Haemophilus infl.b	1,794	mg/l	> 0,090
IgG pl. proti PCP	45,8	mg/l	> 15,4
Proteiny akutní fáze			
C-reaktivní protein	3,77	mg/l	0,00 - 8,00
Alfa-1-antitrypsin	1,23	g/l	0,88 - 2,00
Orosomukoid	0,750	g/l	0,400 - 1,170
Ceruloplasmin	0,337	g/l	0,150 - 0,650
Alfa-2-makroglobulin	1,56	g/l	1,02 - 3,50
Transferin	1,81	g/l	1,50 - 3,50
Prealbumin	0,20	g/l	0,10 - 0,38
Komplementový systém			
Klasická cesta aktivace kompl.	8 ↓	%	> 70
Alter. cesta aktivace kompl.	74	%	> 30
C1 inhibitor	37 ↓	mg/l	210 - 390
C1 inhibitor - funkční test	38 ↓	%	> 68
C1q složka komplementu	145	mg/l	100 - 250
C2 složka komplementu	16,5	mg/l	10,0 - 30,0
C5 složka komplementu	178 ↑	mg/l	80 - 170
C3 složka komplementu	1,05	g/l	0,62 - 1,44
C4 složka komplementu	0,03 ↓	g/l	0,10 - 0,38
Autoprotilátky			
Antinukleární pl. IF (ANA)	negativní	-	
Diferenciální rozpočet leukocytů průtok.cytometrií			
Leukocyty	7,8	10^9/l	4,0 - 10,0

→ HAE typ I

Metody	Hodnoty	Jednotky	Ref. hodnoty
Oddělení laboratorní imunologie			
Primární materiál	krev		
Imunoglobuliny			
IgG	9,250	g/l	7,510 - 15,600
IgA	3,220	g/l	0,820 - 4,530
IgM	0,532	g/l	0,460 - 3,040
IgE	181	kU/l	0 - 100
Proteiny akutní fáze			
C-reaktivní protein	1,73	mg/l	0,00 - 8,00
Alfa-1-antitrypsin	1,38	g/l	0,88 - 2,00
Orosomukoid	0,895	g/l	0,400 - 1,170
Ceruloplasmin	0,340	g/l	0,150 - 0,650
Alfa-2-makroglobulin	1,42	g/l	1,02 - 3,50
Transferin	2,61	g/l	1,50 - 3,50
Prealbumin	0,39	g/l	0,10 - 0,38
Komplementový systém			
Klasická cesta aktivace kompl.	117	%	> 70
Alter. cesta aktivace kompl.	71	%	> 30
C1 inhibitor	843 ↑	mg/l	210 - 390
C1 inhibitor - funkční test	74	%	> 68
C1q složka komplementu	183	mg/l	100 - 250
C2 složka komplementu	20,2	mg/l	10,0 - 30,0
C5 složka komplementu	223 ↑	mg/l	80 - 170
C3 složka komplementu	0,61 ↓	g/l	0,62 - 1,44
C4 složka komplementu	0,15	g/l	0,10 - 0,38
Diferenciální rozpočet leukocytů průtok.cytometrií			
Leukocyty	6,2	10^9/l	4,0 - 10,0

Normální funkce klasické dráhy – pacient je mimo ataku

Zvýšený C1 inhibitor

↓

HAE typ II

Metody	Hodnoty	Jednotky	Ref. hodnoty
Oddělení laboratorní imunologie			
· Primární materiál	krev		
Imunoglobuliny			
IgG	9,290	g/l	7,510 - 15,600
IgA	2,950	g/l	0,820 - 4,530
IgM	1,010	g/l	0,460 - 3,040
IgE	131	kU/l	0 - 100
Proteiny akutní fáze			
C-reaktivní protein	13,40	mg/l	0,00 - 8,00
Alfa-1-antitrypsin	1,48	g/l	0,88 - 2,00
Orosomukoid	1,190	g/l	0,400 - 1,170
Ceruloplasmin	0,305	g/l	0,150 - 0,650
Alfa-2-makroglobulin	1,24	g/l	1,02 - 3,50
Transferin	2,05	g/l	1,50 - 3,50
Prealbumin	0,25	g/l	0,10 - 0,38
Komplementový systém			
Klasická cesta aktivace kompl.	50 ↓	%	> 70
Alter. cesta aktivace kompl.	88	%	> 30
C1 inhibitor	675 ↑	mg/l	210 - 390
C1 inhibitor - funkční test	45 ↓	%	> 68
C1q složka komplementu	163	mg/l	100 - 250
C2 složka komplementu	13,5	mg/l	10,0 - 30,0
C5 složka komplementu	168	mg/l	80 - 170
C3 složka komplementu	0,66	g/l	0,62 - 1,44
C4 složka komplementu	0,07 ↓	g/l	0,10 - 0,38
Diferenciální rozpočet leukocytů průtok.cytometrií			
Leukocyty	9,2	10^9/l	4,0 - 10,0
Lymfocyty			

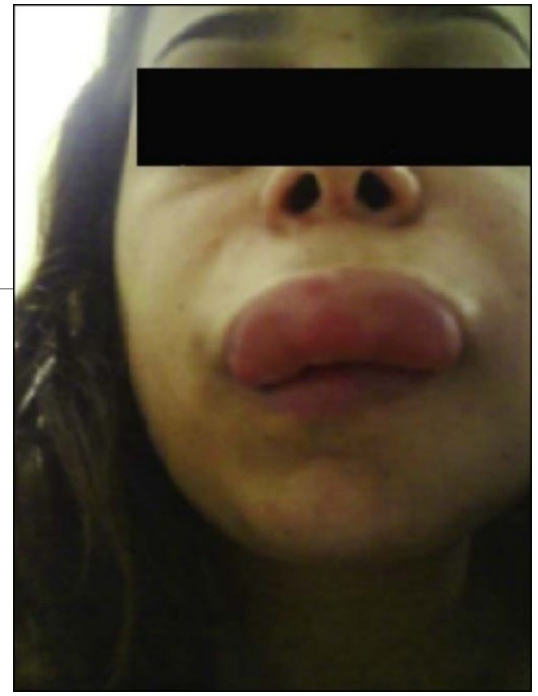
→ HAE typ II → pacient v atace

Metody	Hodnoty	Jednotky	Ref. hodnoty
Oddělení laboratorní imunologie			
Primární materiál	krev		
Imunoglobuliny			
IgG	9,930	g/l	7,510 - 15,600
IgA	2,060	g/l	0,820 - 4,530
IgM	0,600	g/l	0,460 - 3,040
IgE	69	kU/l	0 - 100
Protilátky proti bakteriálním antigenům			
IgG pl. anti-tetan.toxoid	1,116	IU/ml	> 0,120
IgG pl.anti-Haemophilus infl.b	1,714	mg/l	> 0,090
IgG pl. proti PCP	148,2	mg/l	> 15,4
Proteiny akutní fáze			
C-reaktivní protein	8,77	mg/l	0,00 - 8,00
Alfa-1-antitrypsin	1,46	g/l	0,88 - 2,00
Orosomukoid	1,040	g/l	0,400 - 1,170
Ceruloplasmin	0,281	g/l	0,150 - 0,650
Alfa-2-makroglobulin	0,93	g/l	1,02 - 3,50
Transferin	2,50	g/l	1,50 - 3,50
Prealbumin	0,30	g/l	0,10 - 0,38
Komplementový systém			
Klasická cesta aktivace kompl.	6 ↓	%	> 70
Alter. cesta aktivace kompl.	90	%	> 30
C1 inhibitor	60 ↓	mg/l	210 - 390
C1 inhibitor - funkční test	37 ↓	%	> 68
C1q složka komplementu	165	mg/l	100 - 250
C2 složka komplementu	4,1 ↓	mg/l	10,0 - 30,0
C5 složka komplementu	197	mg/l	80 - 170
C3 složka komplementu	0,96	g/l	0,62 - 1,44
C4 složka komplementu	0,03 ↓	g/l	0,10 - 0,38
Autoprotilátky			
Antinukleární pl. IF (ANA)	negativní	-	
Diferenciální rozpočet leukocytů průtok.cytometrií			
Leukocyty	14,6	10^9/l	4,0 - 10,0

→ HAE typ I

Kazuistika

- Žena, 35 let
- bere antikoncepci



	1
Initial age	26
Association with contraceptive	Yes
Association with pregnancy	-
Affected family members	No
Episodes of laryngeal edema	No
Response to corticosteroids and / or antihistamines	No
Hemogram	Thrombocytosis
Quantitative and Qualitative INHC1	Normal
C4	Normal

→ Po vysazení antikoncepce otoky zmizely

HAE typ III

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3760933/

Léčba HAE

- Snaha minimalizovat stresující faktory, které indukují edémy
  - Omezení sportu
  - Volba vhodného povolání

3 strategie léčebné terapie:

1. Dlouhodobá profylaxe – mimo ataku
2. Krátkodobá profylaxe – prevence vzniku edému během zákroků
3. Léčba akutní ataky

Léčba HAE

1. Dlouhodobá profylaxe
   - **Atenuované androgeny** – zvyšují syntézu C1 INH v játrech (nesmí se podávat dětem a těhotným ženám, zvážení užití u žen ve fertilním věku →negativní vedlejší účinky - viritizace)
   - **Kyselina tranexamová** – inhibuje plazmin, čímž se „šetří“ C1 INH
   - **Koncentrát C1 INH** – u lidí, kde výše zmíněné léky nelze podávat nebo u závažných forem HAE

2. Krátkodobá profylaxe – snaha zabránit vzniku edému během operací, endoskopií a zubních extrakcí
   - **Koncentrát C1 INH**

3. Léčba akutní ataky
   - **Koncentrát C1 INH –** derivát z plazmy nebo rekombinantní
   - **Icatibant –** kompetitivní antagonista bradykininových B2 receptorů – kompetice o vazbu s bradykininem