

# Vyšetření funkce komplementu

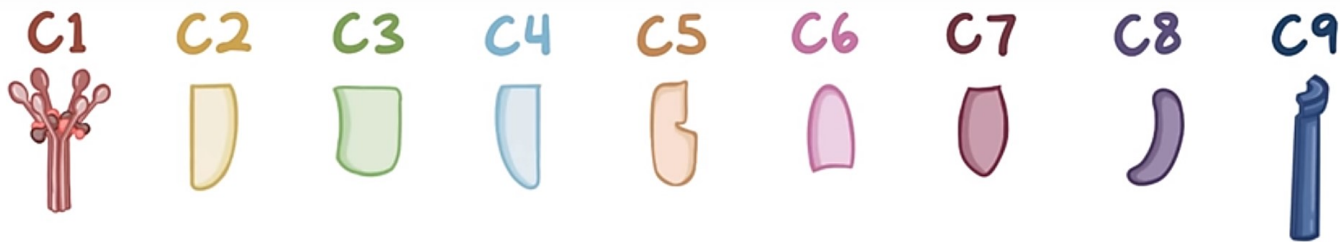
---

Mgr. Julie Štíhová

FN u Sv. Anny v Brně

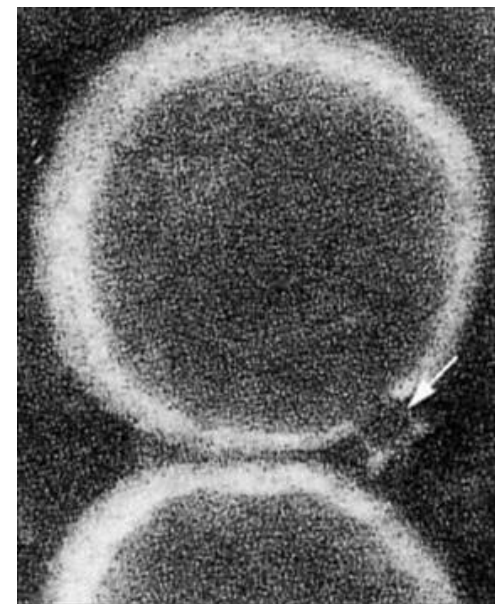
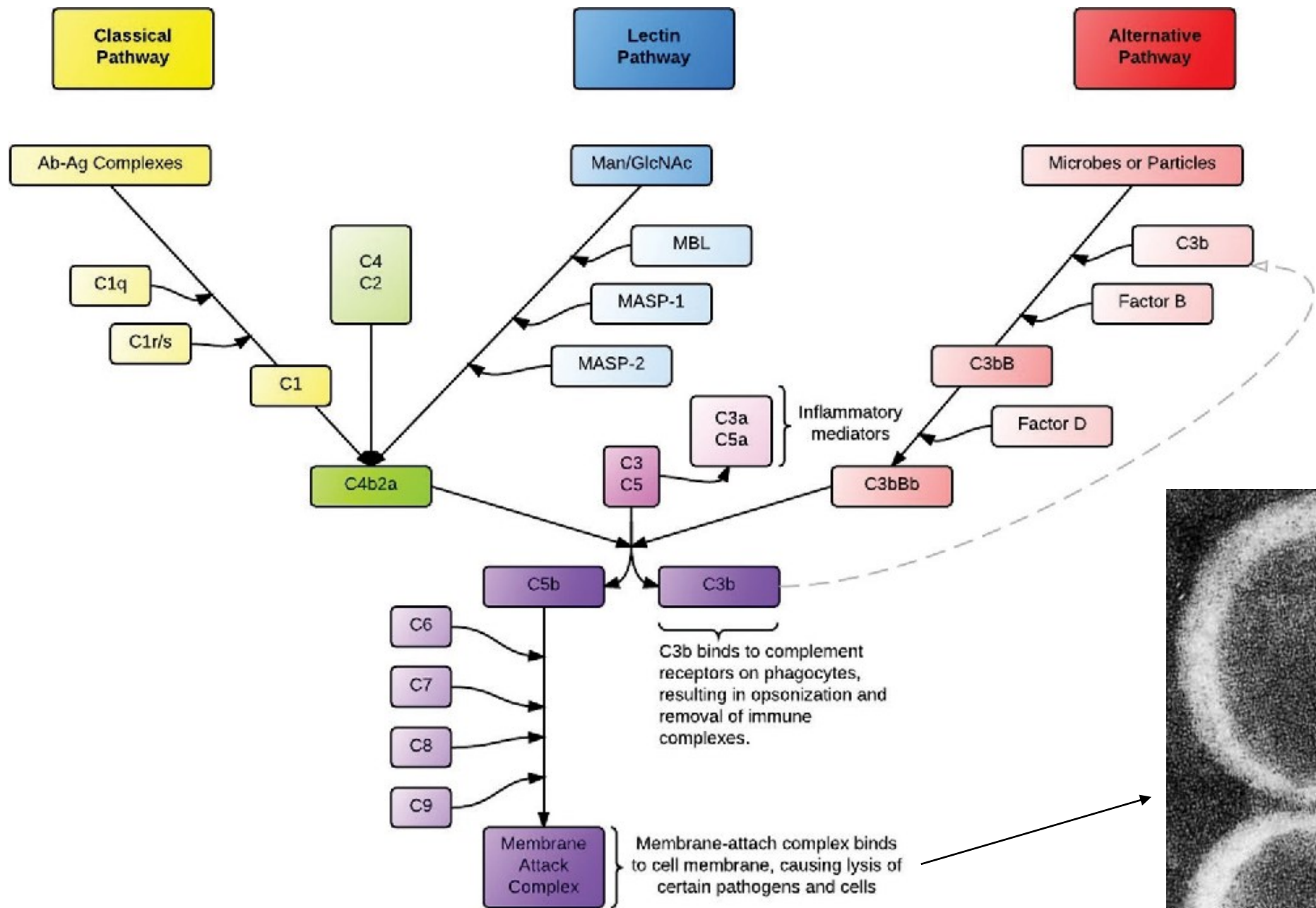
# Komplement

- 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



# Komplement

---

- Aktivovaný komplement podporuje:
  - Rozvoj zánětlivé reakce (anafylatoxiny – C3a, C4a, C5a)
  - Oponizace (C3b, C4b)
  - Chemotaxe (C3a, C5a)
  - Lýza buněčných membrán (C5b-C9 – MAC)
- Odstraňování imunokomplexů z cirkulace (C3b, C4b)

# 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 inhibitor (C1INH)**
- Faktor H
- Faktor I

### b) Membránově vázané:

- Decay accelerating factor – DAF (CD55)
- Membrane cofactor protein – MCP (CD46)
- Protektin (CD59)

# Když ochrana chybí

- Onemocnění paroxyzmální noční hemoglobinurie
- Mutace genu pro GPI kotvu v hematopoetické kmenové buňce
- na povrchu RBC deficit proteinů, které jsou normálně pomocí GPI kotvy vázány
  - DAF (CD55) – inhibice C3 a C5
  - Protektin (CD59) – inhibice formace MAC
- RBC citlivé ke stopovým množstvím aktivovaného komplementu → lýza



**PNH RBC<sup>2</sup>**

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



**Complement Attack<sup>2</sup>**

Without this protein, some RBCs can be destroyed by complement, that is part of the body's immune system



**PNH RBC Lysis (haemolysis)<sup>2</sup>**

PNH RBCs are destroyed, and the contents are released into surrounding plasma (yellow-coloured liquid component of blood).

# Vyšetření komplementu

- **Kvantitativní stanovení** jednotlivých složek komplementu
- 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

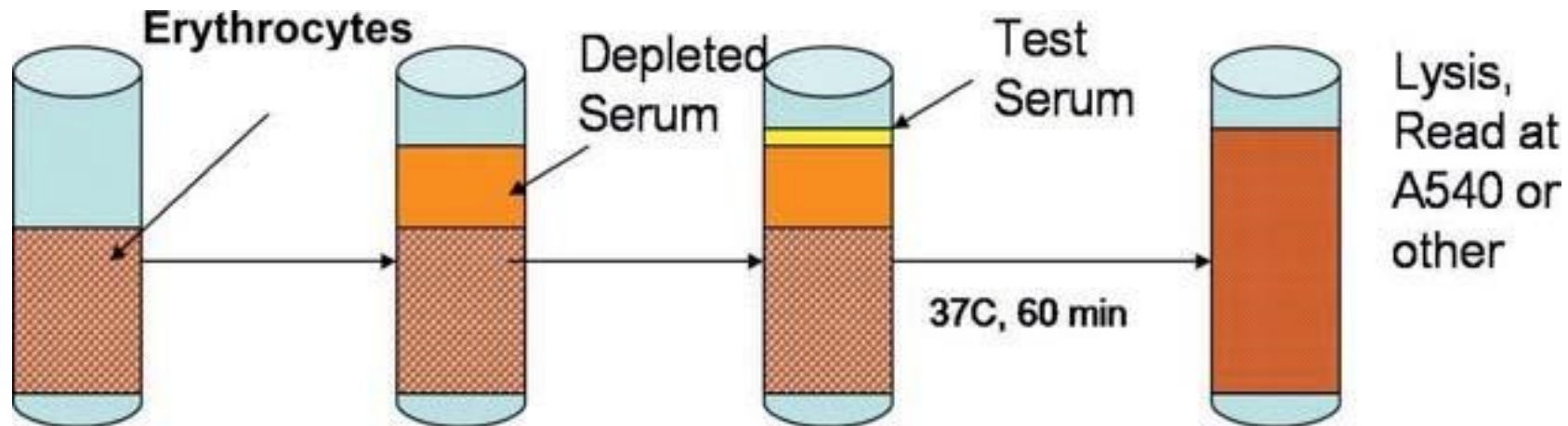
---

- 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)**



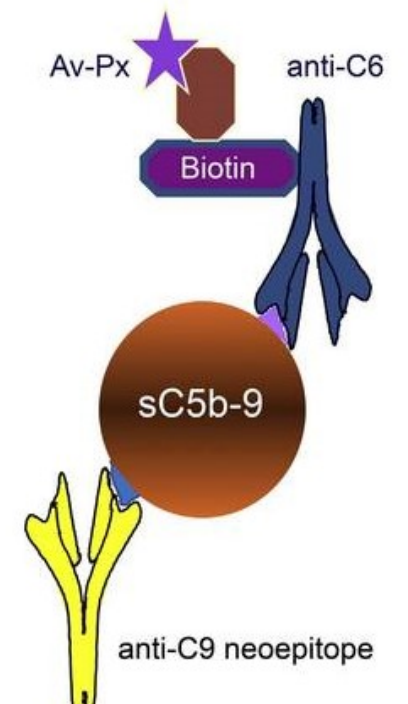
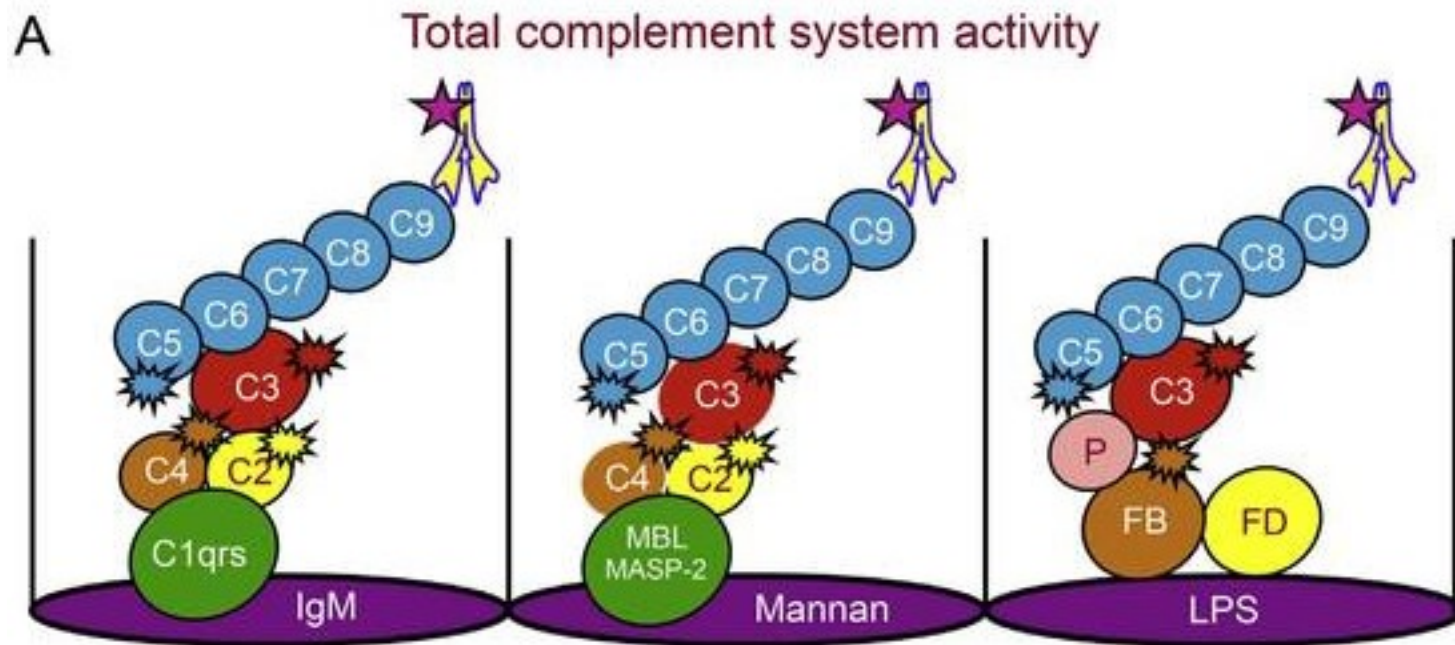
# Funkční vyšetření komplementu

- Funkční hemolytické testy – CH50, AH50
  - Zjištění funkčnosti klasické (CH50) nebo alternativní (AH50) cesty komplementu
  - Lýza definované směsi beraních RBC komplementem → nárůst absorbance v supernatantu vlivem uvolněného Hb
  - Výsledky se vyjadřují v % aktivace



# Funkční vyšetření komplementu

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



# 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 C1INH 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)
- Spektrofotometrie - určí množství navázaného C1-INH
- Nefunkční C1INH – 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 (C3, C4)

- **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 C3-C9**
  - Náchylnost k pyogenním infekcím
  - **Deficit C9** – typicky opakované **neisseriové infekce** – meningokoková meningitida
- **Deficience MBL** – častější infekce u dětí

# Hereditární 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)

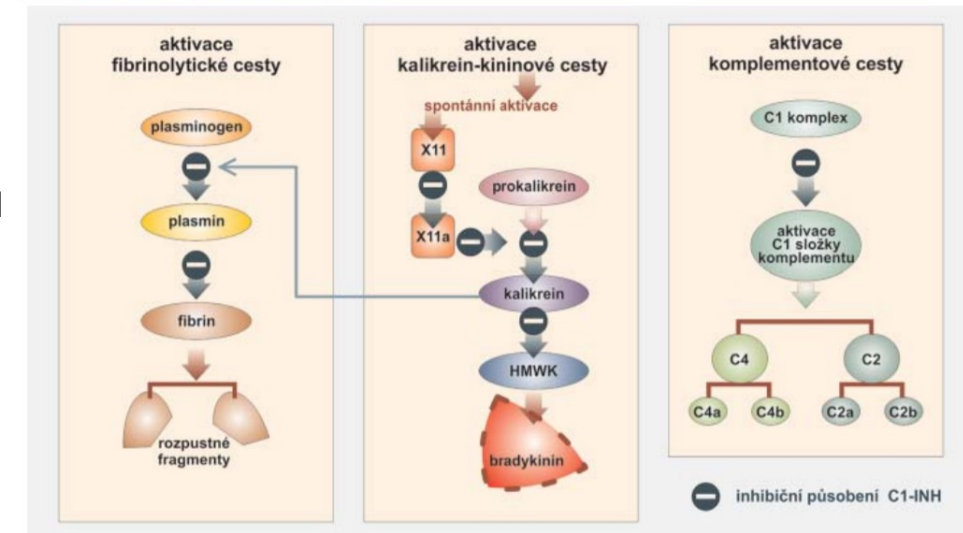
Mechanismus:

C1 INH není schopen dostatečně tlumit přeměnu prekalikreinu na kalikrein →

Kalikrein štěpí vysokomolekulární kininogen na **bradykinin** →

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

Obr. 1. Inhibiční působení C1 inhibitoru





# Hereditární 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



# Hereditární 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



# Vyšetření u hereditárního angioedému (HAE)

---

- Screeningový test HAE: **vyšetření C4 složky** → pokud je snížena 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

# Hemolytický test CH50

---

- Screeningová metoda
- Zjištění funkčnosti klasické cesty aktivace komplementu
- Detekce **snížené** funkce komplementu
- Výsledky se vyjadřují v % aktivace
- Sérum zpracovat do 1 hodiny
  
- Proč CH50?

## Jednotka CH50

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

# 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 1:100 ve fyziologickém roztoku, např. 10 ul amboceptoru + 990 ul fyziol. Roztoku)

## Krok 1: Příprava hemolytického systému

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

Inkubace 15-30 min v lednici

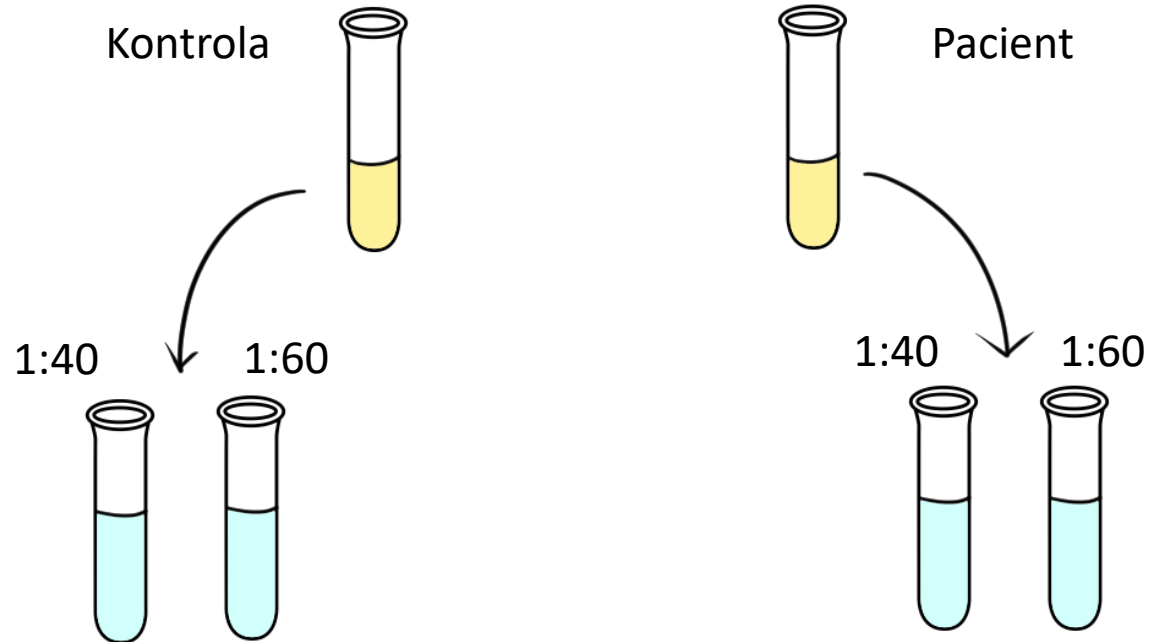
# CH50

Krok 2:

Naředte kontrolu a pacienta ve dvou ředěních:

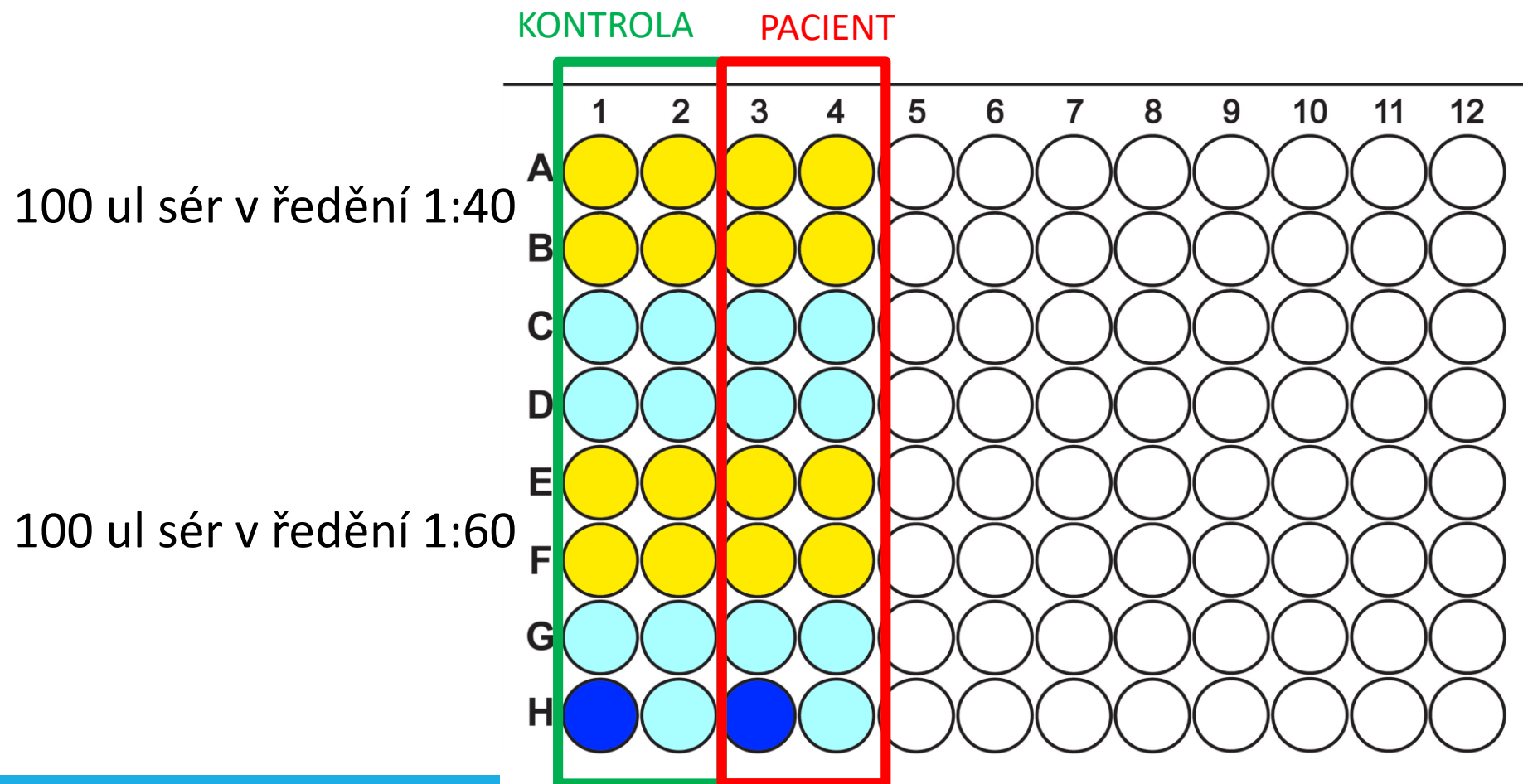
Ředění 1:40  
**25** ul séra + **975** ul fyziol.  
roztoku

Ředění 1:60  
**15** ul séra + **885** ul fyziol.  
roztoku





# CH50



# CH50

Výsledné  
ředění

1:40

1:80

1:160

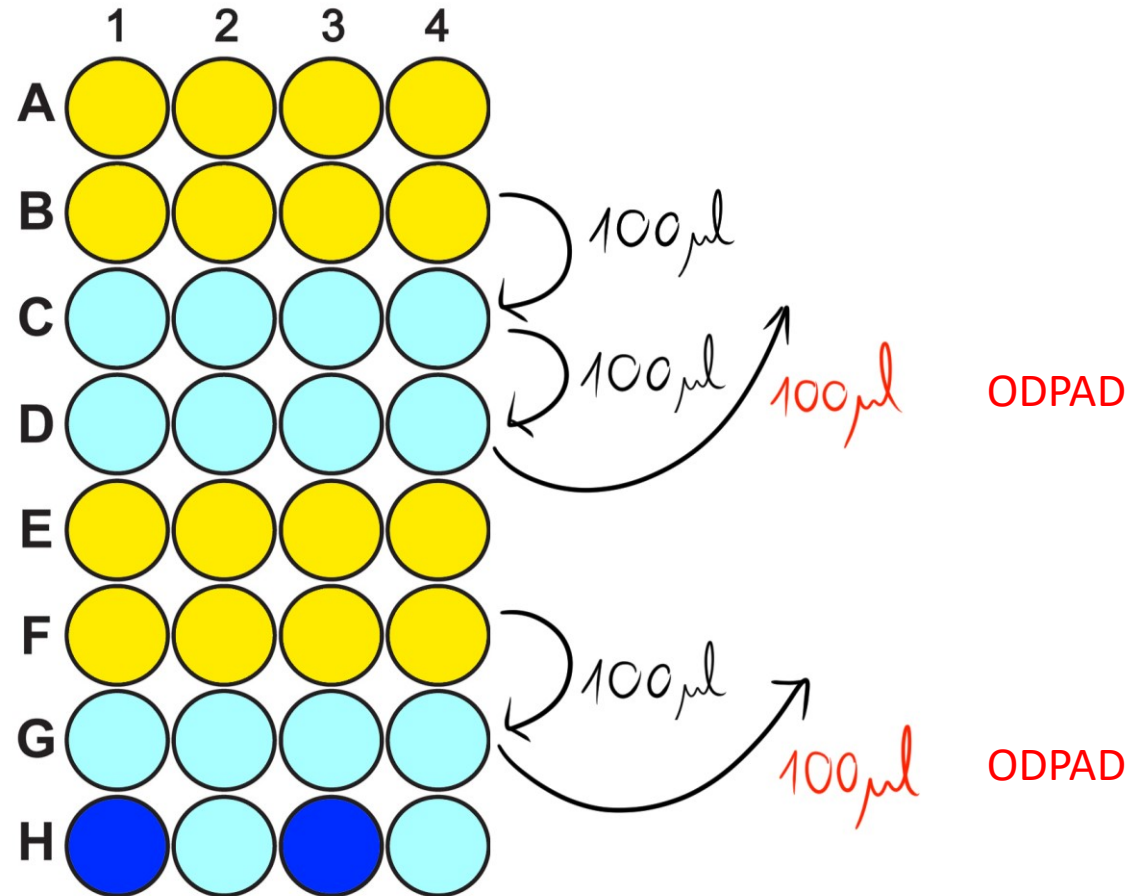
1:320

1:60

1:120

1:240

X





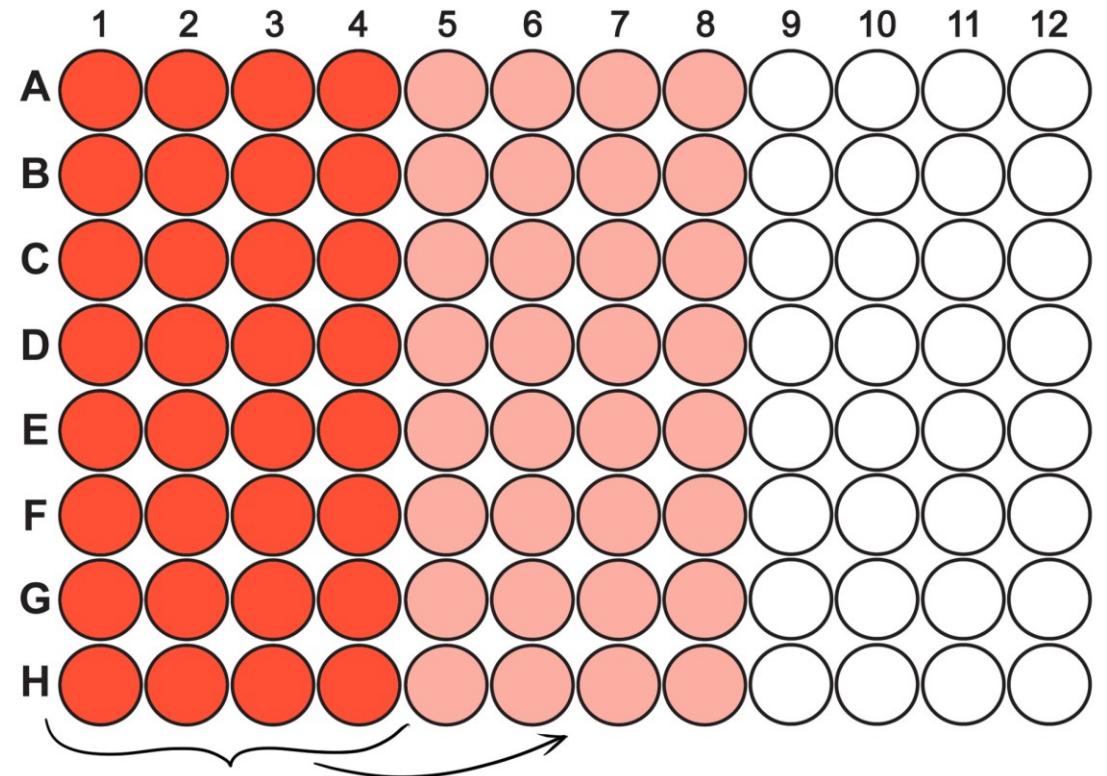


# CH50

Krok 7: Po centrifugaci přeneste 100 ul supernatantu z každé jamky do nové (sloupec 5-8)

Pozor, nesmí se nabrat pelet na dně jamek!

Krok 8: Měření absorbance na ELISA readeru - program CH50



# 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

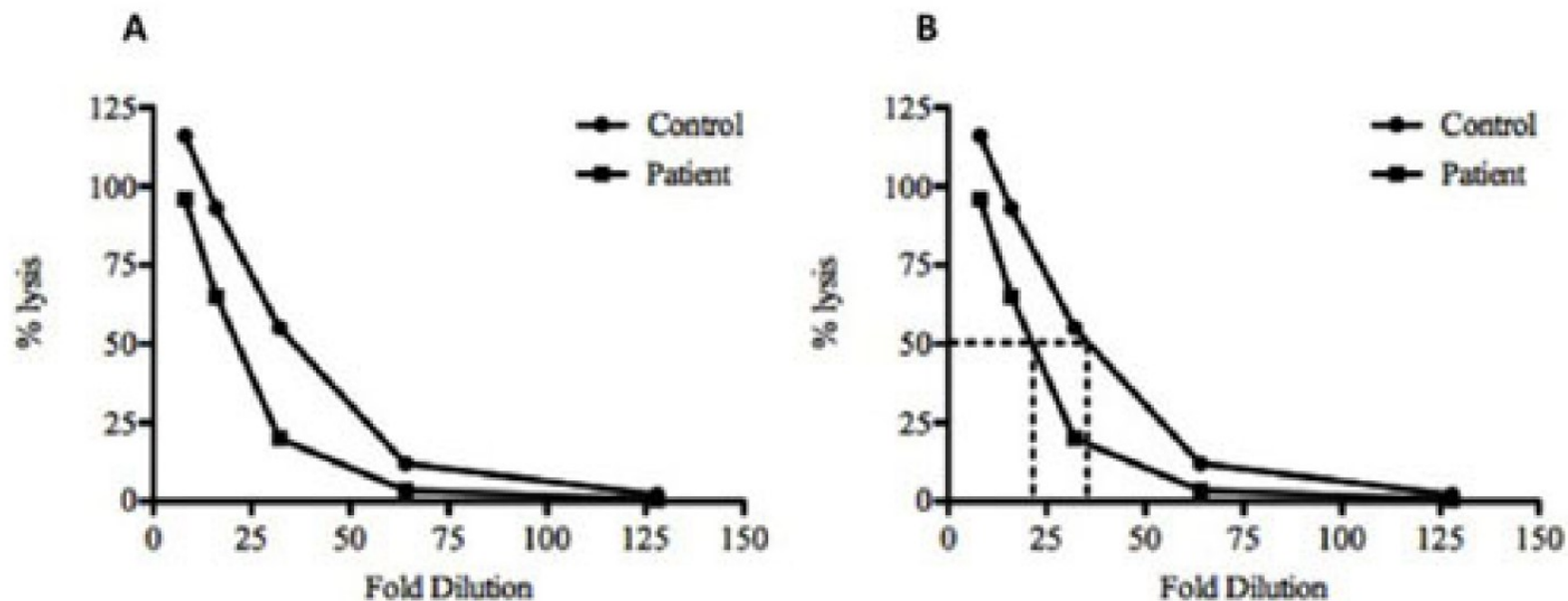
2) Z průměrné absorbance (A) spočítat % lýzy pro každé ředění dle vzorce:

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

# 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 - protokol

---

- 1) Úvod – co je to komplement, jak se stanovuje
- 2) CH50 – princip metody
- 3) Pomůcky
- 4) Stručně popsat pracovní postup
- 5) Výsledky – výpočty, graf
- 6) Interpretace výsledků
  
- 7) K protokolu přiložit list s naměřenými absorbancemi