

# Vyšetření funkce komplementu

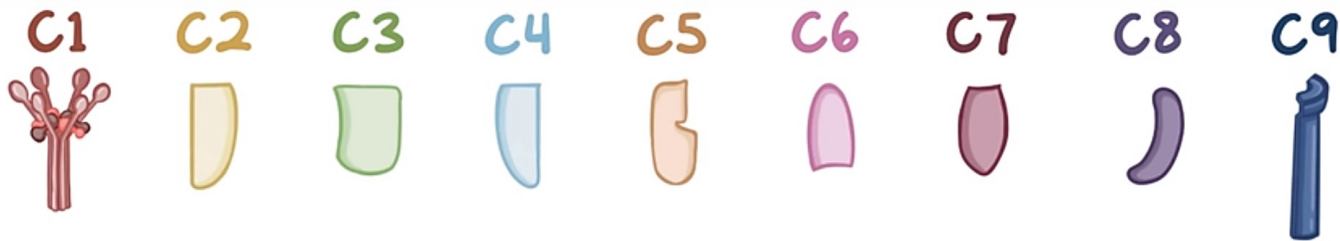
---

Mgr. Julie Štíhová

FN u Sv. Anny v Brně

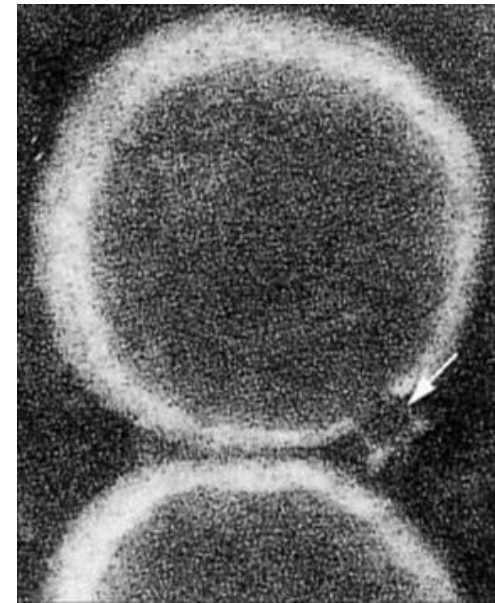
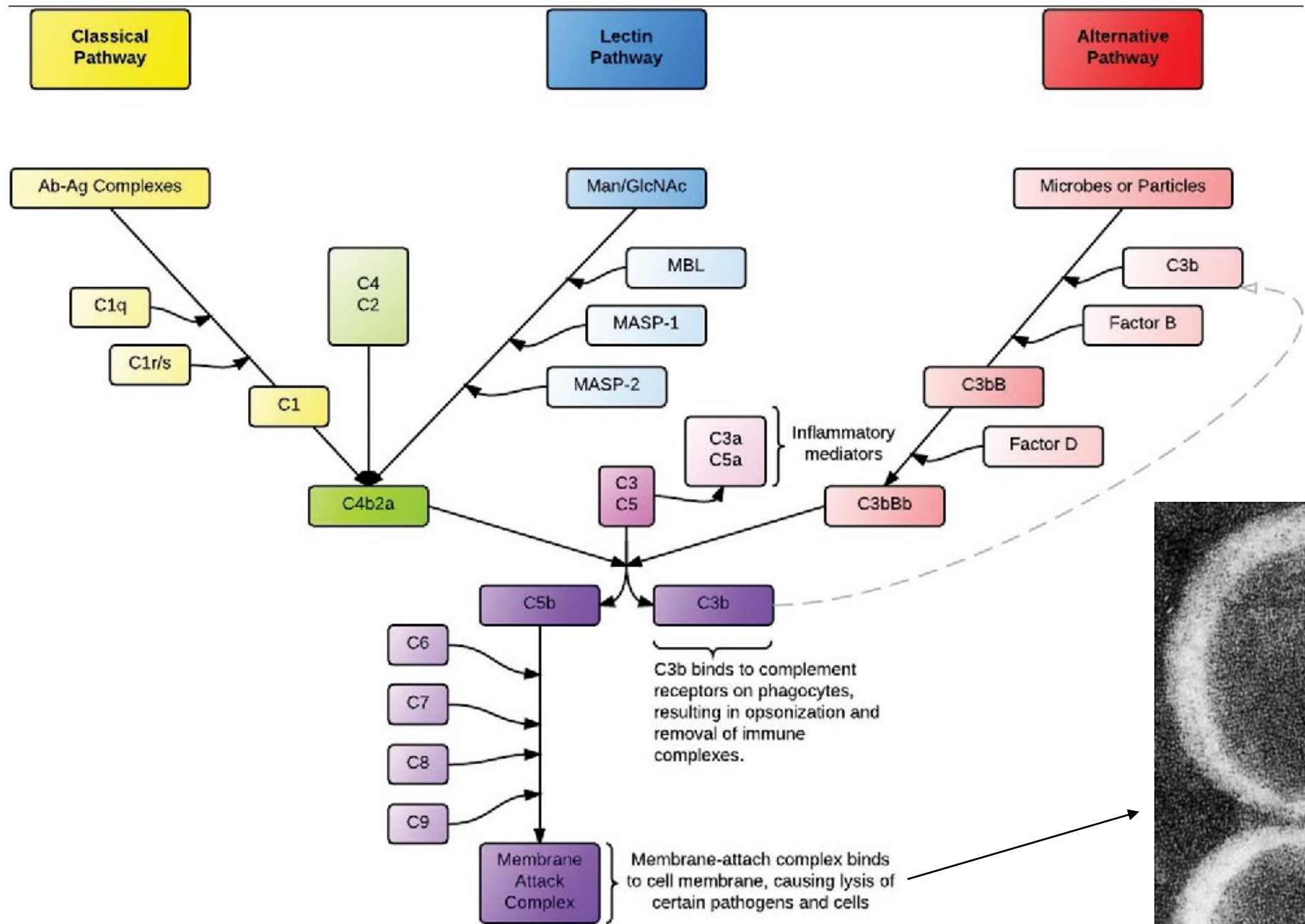
# Komplement

- 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



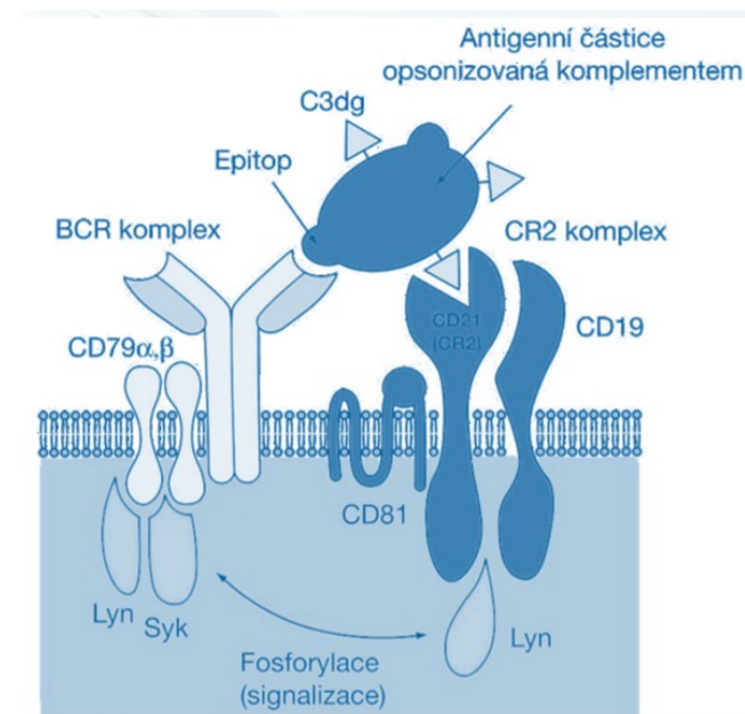
## Komplementový systém tvoří:

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



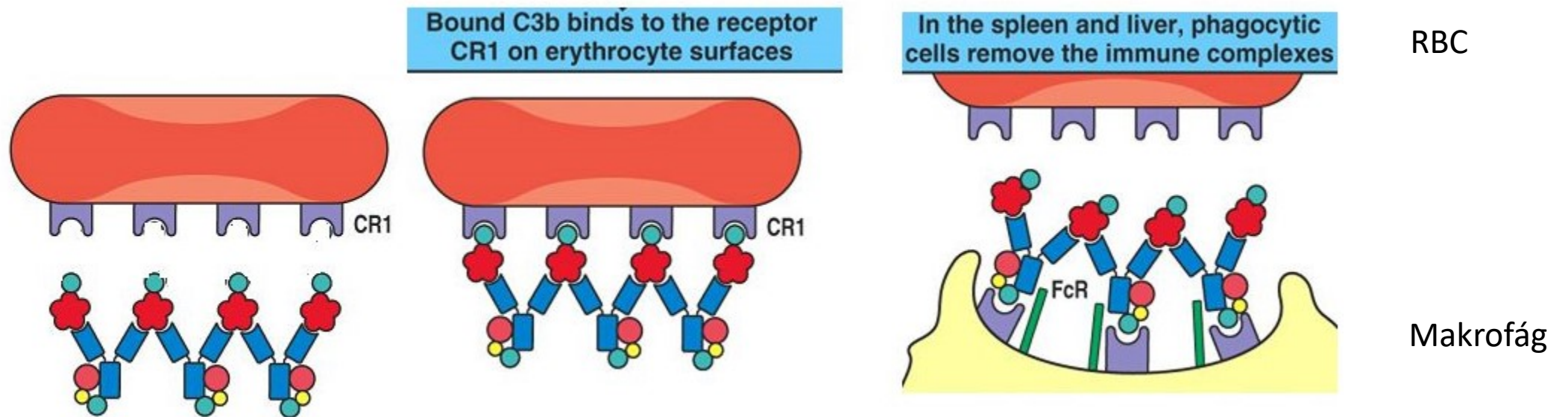
# Komplement - funkce

- Aktivovaný komplement podporuje:
  - Rozvoj zánětlivé reakce (anafylatoxiny – C3a, C4a, C5a)
  - Oponizace (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 diferenciaci 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)



# 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:

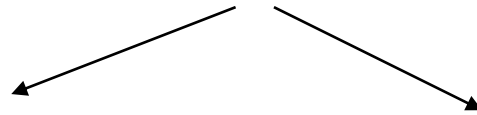
- **C1 inhibitor (C1INH)**
- Faktor H
- Faktor I

### b) Membránově vázané:

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

# 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 – preanalytická fáze

---

- 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
- Zájem o sníženou funkci komplementu
- Sérum nutno zpracovat do 1 h od odběru
- Proč CH50? → jednotka CH50

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

- Výsledky se vyjadřují v % aktivace

# 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)

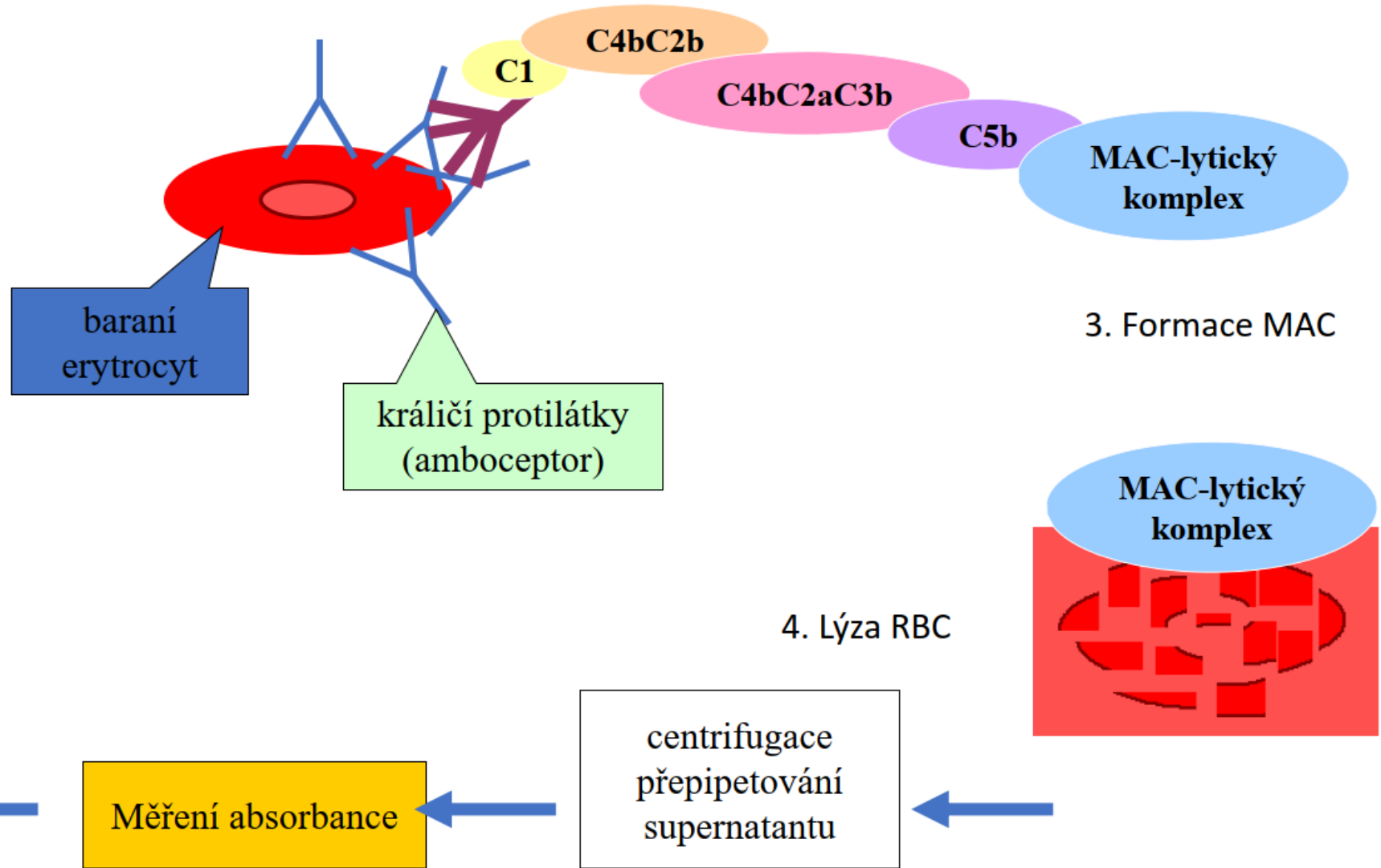
## Příprava hemolytického systému

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

Inkubace 15-30 min v lednici

# Princip testu CH50

1. Hemolytický systém:  
Beraní RBC+ králičí protiláka



# CH50 - vyhodnocení

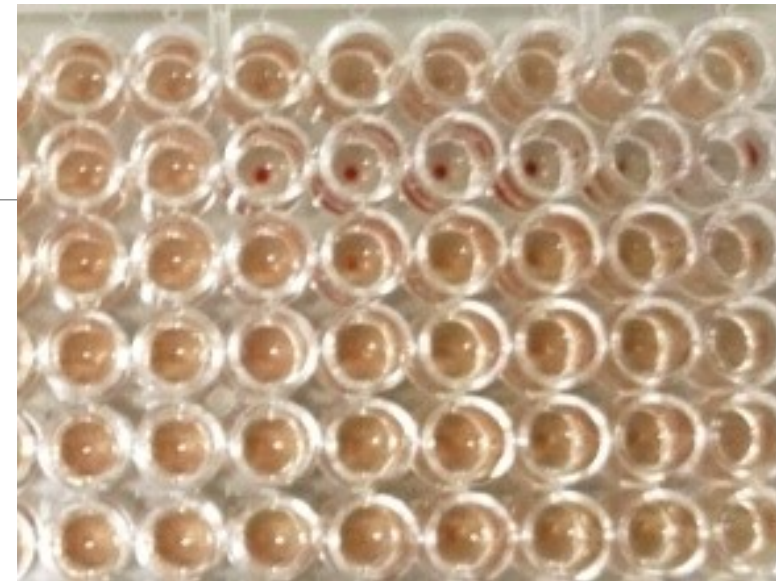
Jamka s fyziologickým roztokem = blank - 0% hemolýza (pozice 6H, 8H)

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

1) Z dubletů spočítat průměr absorbance pro každé ředění pacientova séra

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

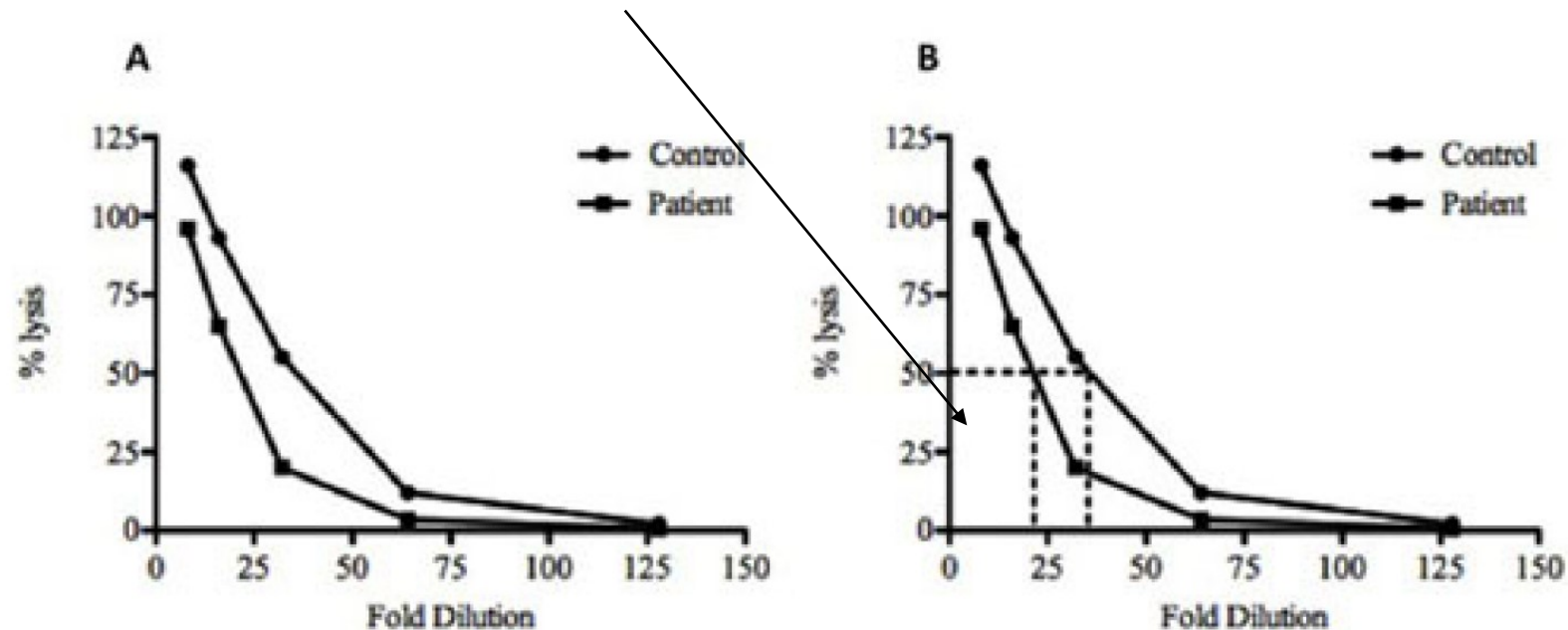
$$\frac{A \text{ daného ředění} - A \text{ blanku}}{A \text{ 100\% lýzy} - A \text{ blanku}} \times 100 = \% \text{ lýzy pro dané ředění}$$



# CH50 - hodnocení

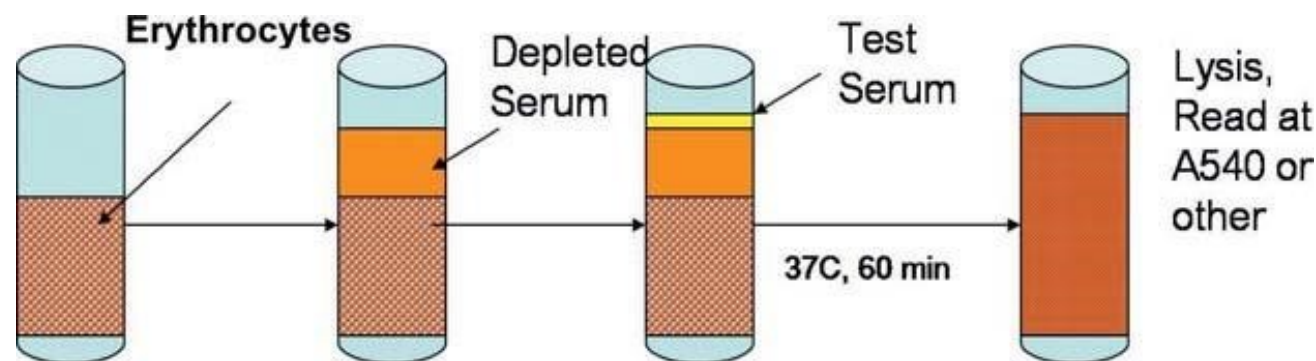
3) Graf – závislost procenta lýzy na ředění (kontrola i pacient)

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



# CH50 - souhrn

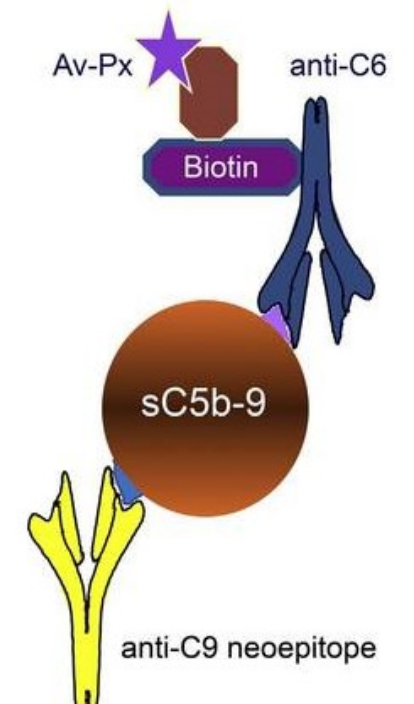
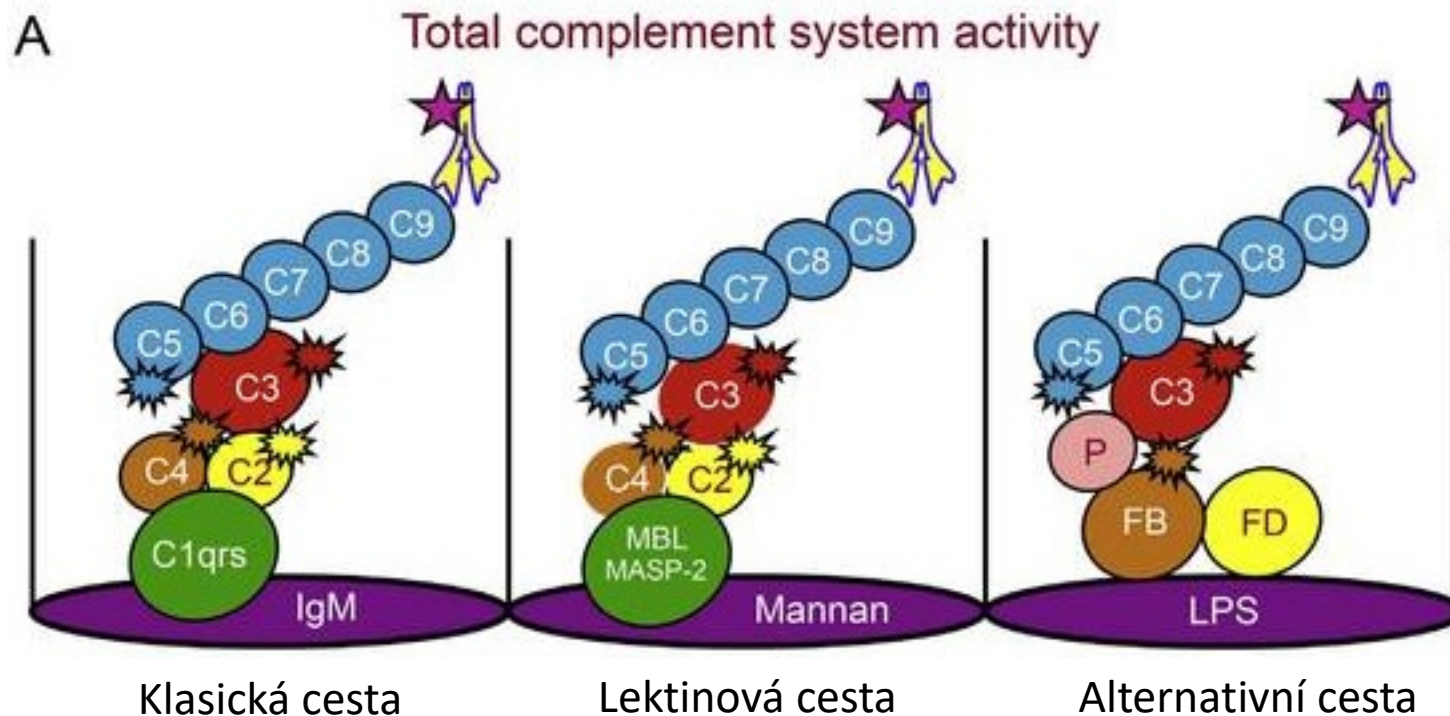
- Zjištění funkčnosti klasické (CH50) nebo alternativní (AH50) cesty komplementu
- Projeví se lýzou definované suspenze RBC → nárůst absorbance supernatantu v důsledku uvolnění hemoglobinu
- Výsledky se vyjadřují v % aktivace
- Pozor – se vzorkem pacienta nutno zpracovat i zdravou kontrolu, aby bylo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





# Alternativy: funkční test - ELISA

- Ve většině laboratoří CH50/AH50 nahrazeno ELISA metodou
  - Princip – na dně jamky aktivátor určité cesty komplementu → detekce neoepitopu při formaci membranolytického komplexu



# C1-INH funkční test - ELISA

---

- 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)
- Spektrofotometrie - 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 → screening → 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)
  - Náchyllost k pyogenním infekcím
- **Deficience C5-C9**
  - Náchyllost k pyogenním infekcím
  - Deficit C9 - Opakované infekce *Neisseria meningitidis*
- Deficience MBL – častější infekce u dětí

# Deficience inhibitorů komplementu

---

- Deficit C1-inhibitoru – **Hereditární 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



Paroxysmální noční hemoglobinurie



**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 bodies immune system

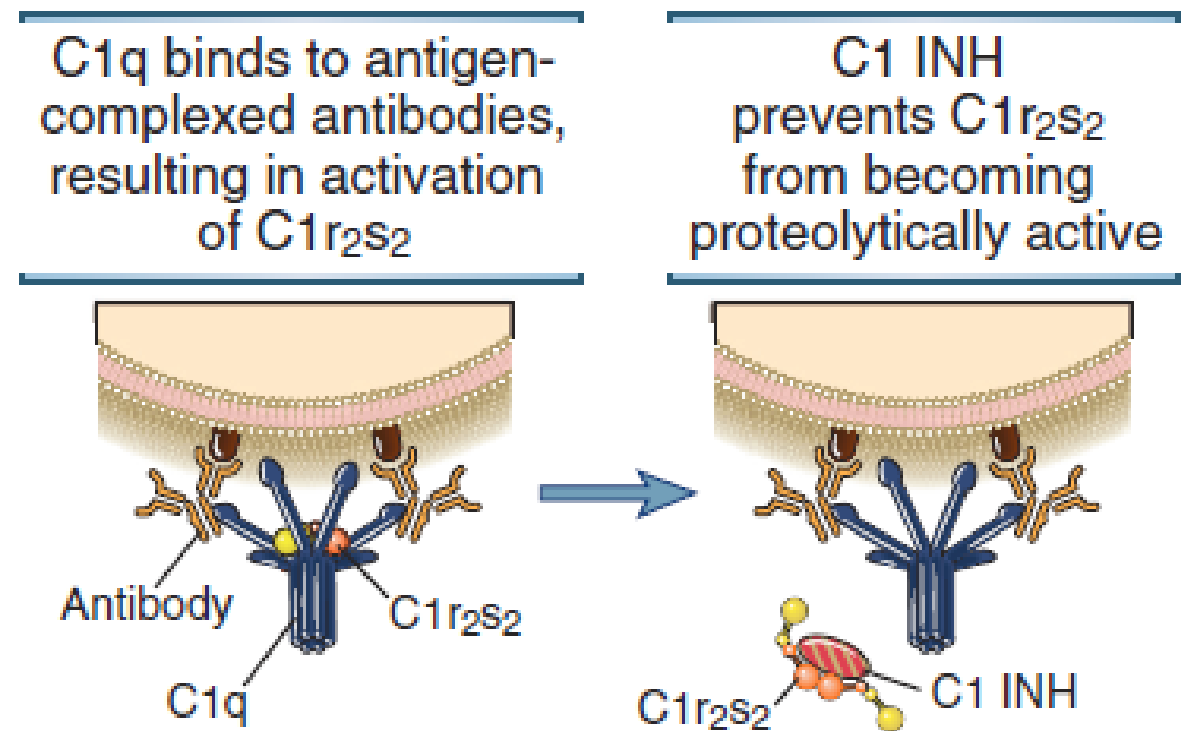


**PNH RBC Lysis (haemolysis)<sup>2</sup>**

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

# Hereditární angioedém

- Způsoben deficitem C1 inhibitoru (C1 INH)
- Serinová proteáza
- inhibuje C1r, C1s
- ireverzibilní vazba – C1 INH se spotřebovává



# Hereditární angioedém

Důsledek:

- 1) Aktivace klasické cesty komplementu – konzumpce složek, zejména C2 a C4
- 2) Nedostatečná regulace kininového systému (C1 INH inhibuje také kalikrein)

Mechanismus:

C1 INH není schopen dostatečně tlumit přeměnu

prekalikreinu na kalikrein →

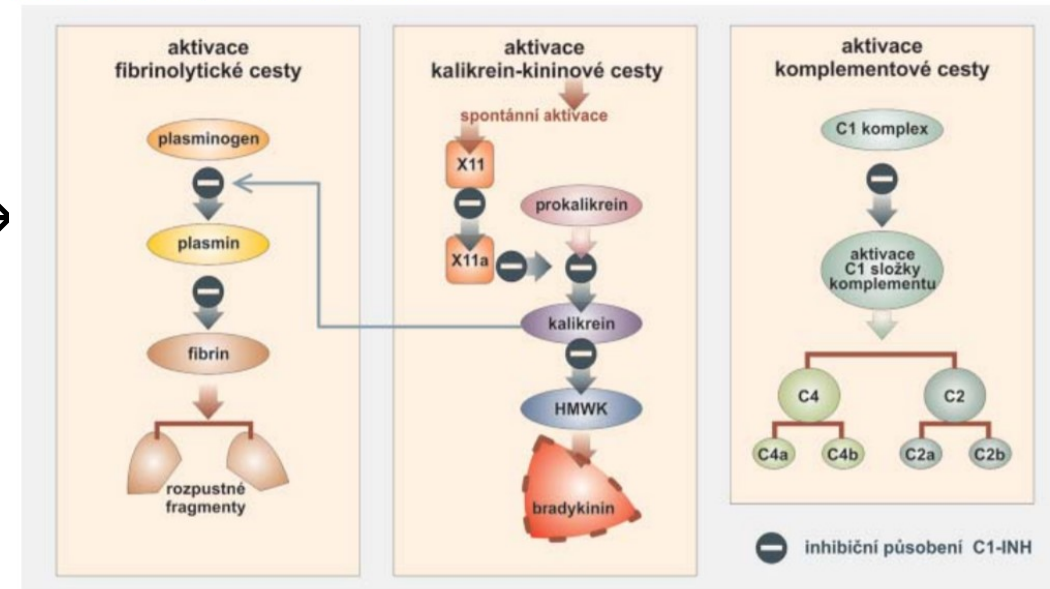
Kalikrein štěpí vysokomolekulární kininogen na **bradykinin** →

ten se váže na bradykininové receptory na endoteliích →

vazodilatace, zvýšená permeabilita cév (lokálně) →

vznik **nezánětlivého edému**

Obr. 1. Inhibiční působení C1 inhibitoru





# Hereditární angioedém

- Střídají se období
  - Klidová – **remise** – pacient bez klinických obtíží
  - **Ataka** – rozvoj angioedému
    - Různé provokující faktory:
      - menstruace
      - stres
      - zubní zákroky
      - Zranění



# 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

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

**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	↓

# Diferenciální diagnostika angioedémů

**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	↓

# 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 (Serping1) pro C1 INH

Metody	hodnoty	jednotky	rel. 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	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 <sup>3</sup>	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 <sup>9</sup> /l	4,0 - 10,0
Lymfocyty	20,0	%	20 - 40

HAE typ II → pacient v atace

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 <sup>§</sup>	> 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 <sup>9</sup> /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 <sup>9</sup> /l	4,0 - 10,0

Normální funkce klasické dráhy – pacient je mimo ataku

Zvýšený C1 inhibitor



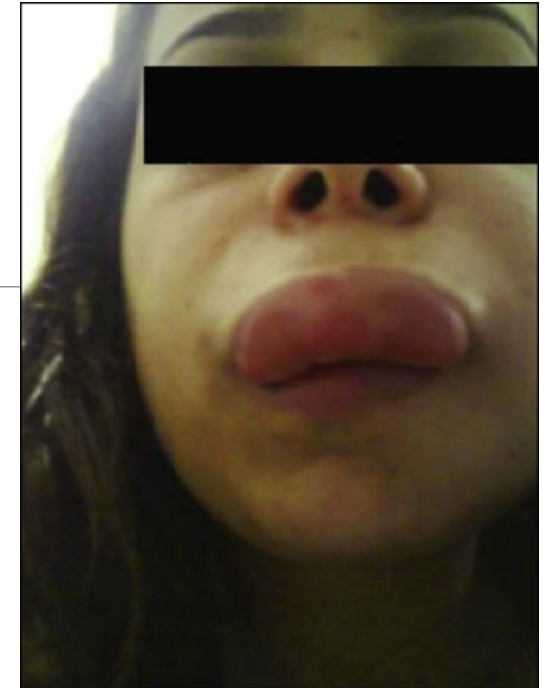
HAE typ II

Metody	Hodnoty	Jednotky	Ref. hodnoty
Oddělení laboratorní imunologie			
Primární materiál	krev		
Imunoglobuliny			
IgG	9,930	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 <sup>9</sup> /l	4,0 - 10,0
Lymfocyty	2,1	10 <sup>9</sup> /l	1,0 - 4,0

→ HAE typ I

# Kazuistika

- Žena, 35 let
- bere antikoncepci 9 let, 9 let se objevují edémy rtů



	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

# 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, zvažení 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 antagonist bradykininových B2 receptorů – kompetice o vazbu s bradykininem