

# Vyšetření funkce komplementu

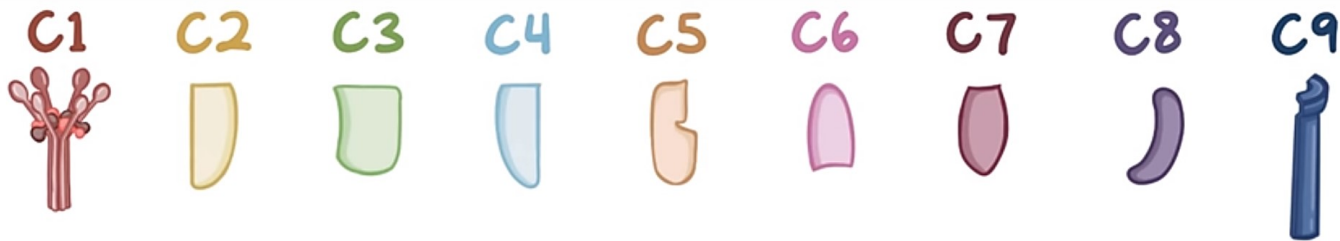
---

Mgr. Julie Štíhová

FN u Sv. Anny v Brně

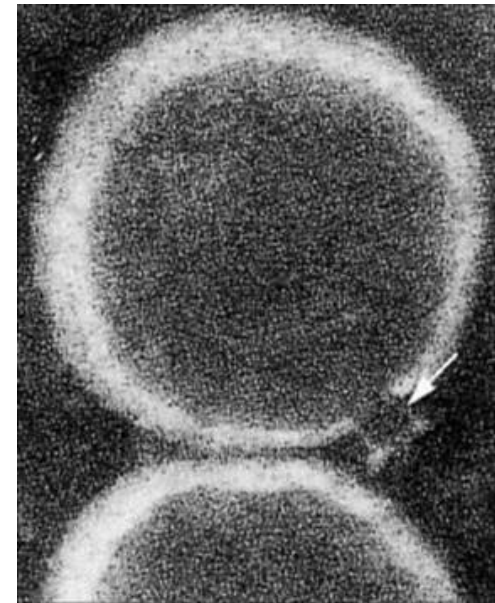
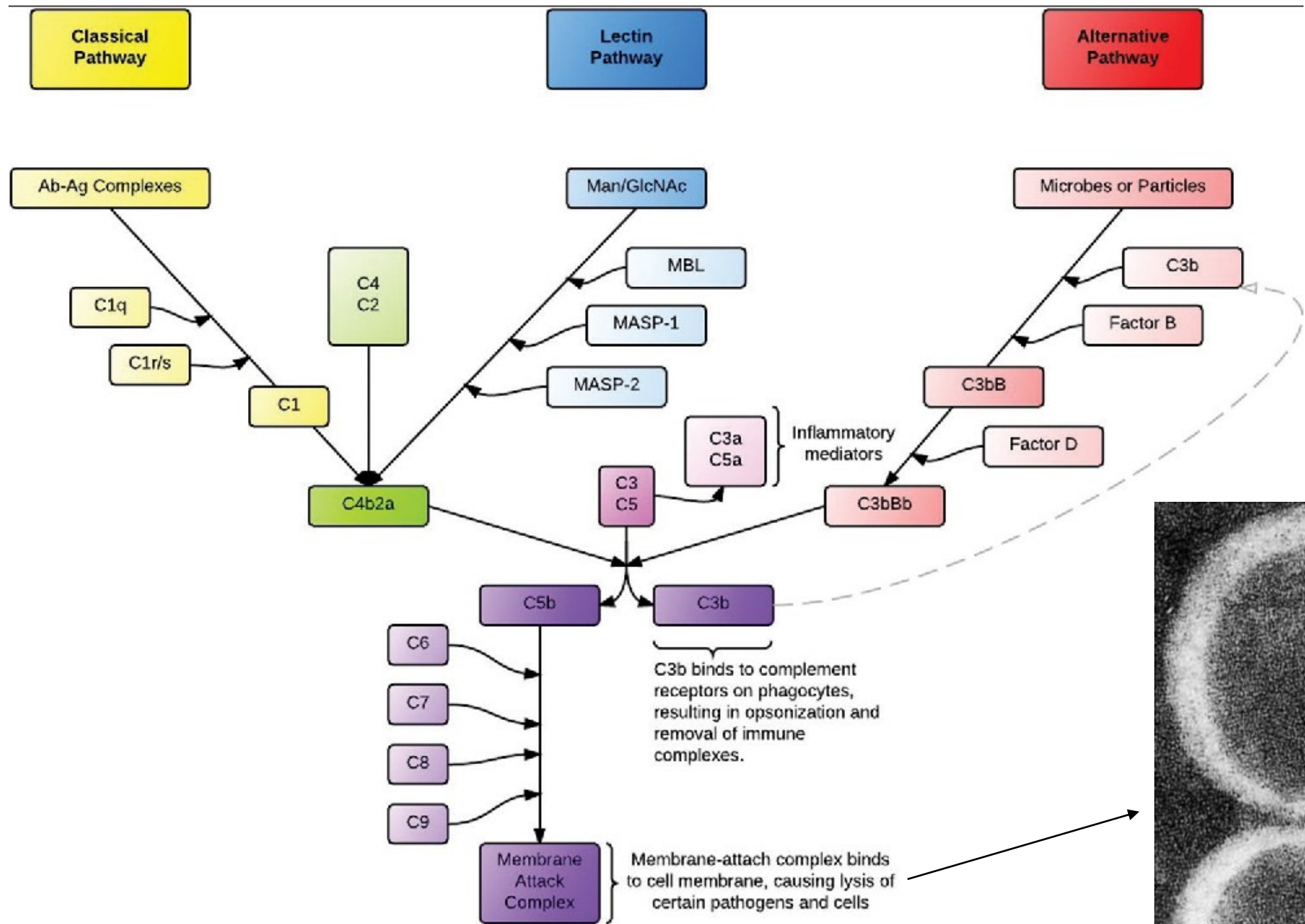
# Komplement

- 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



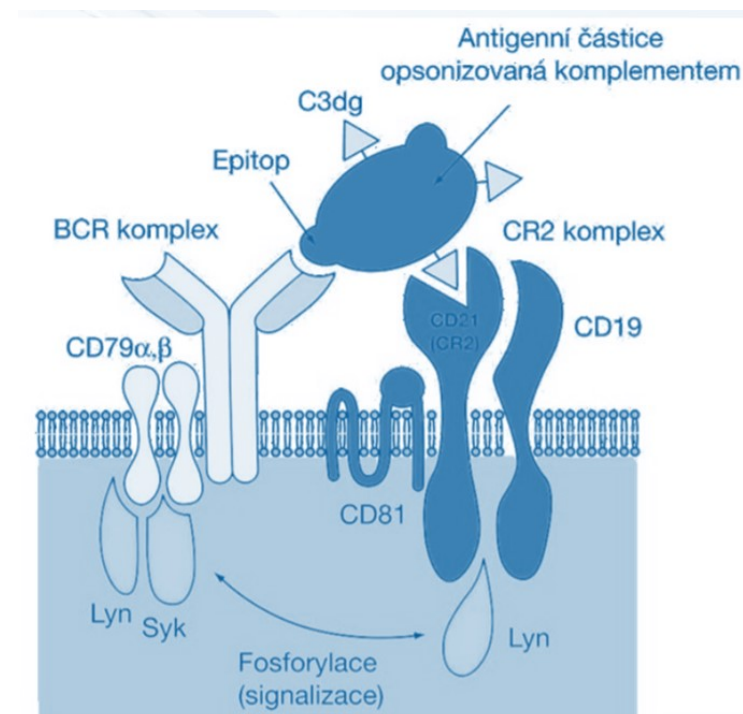
## Komplementový systém tvoří:

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



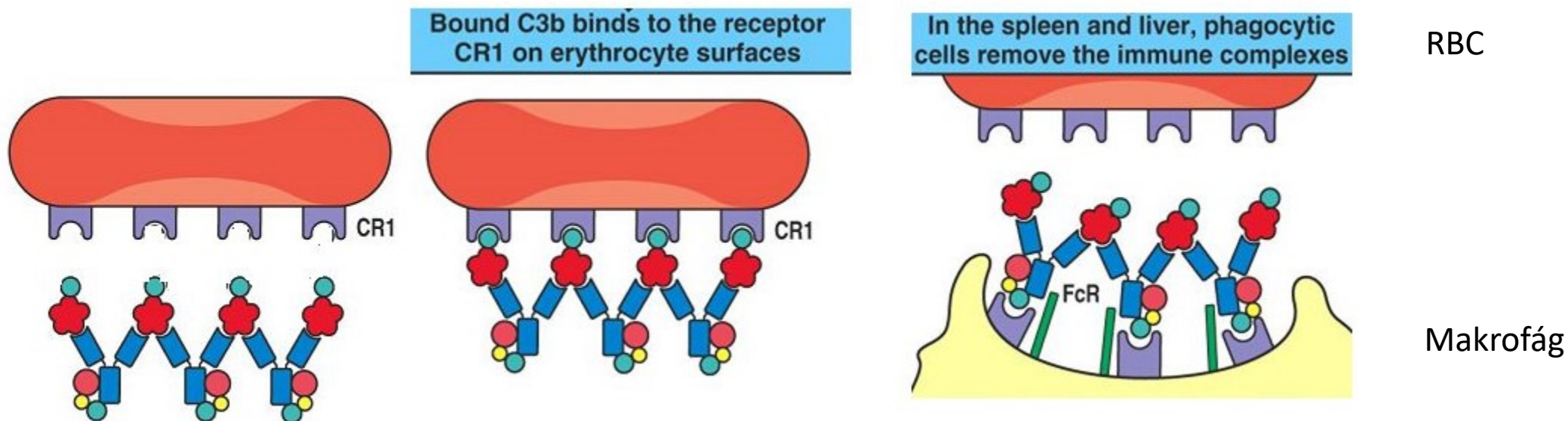
# Komplement - funkce

- 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:

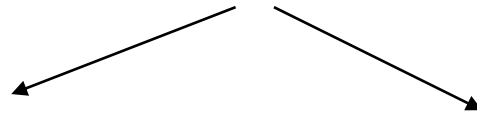
- **C1 inhibitor (C1INH)**
- Faktor H
- Faktor I

### 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 - 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

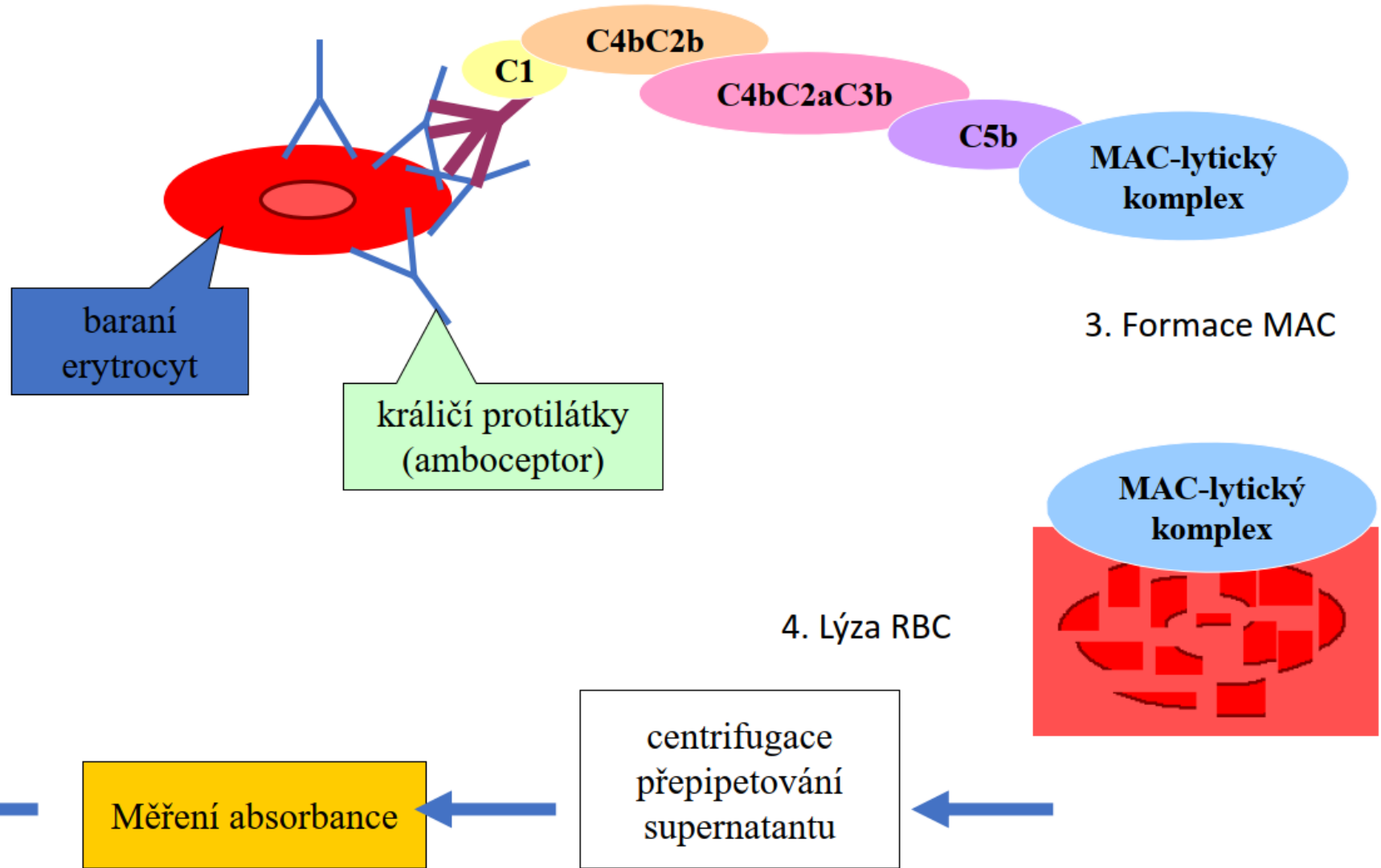
---

- 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



# 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

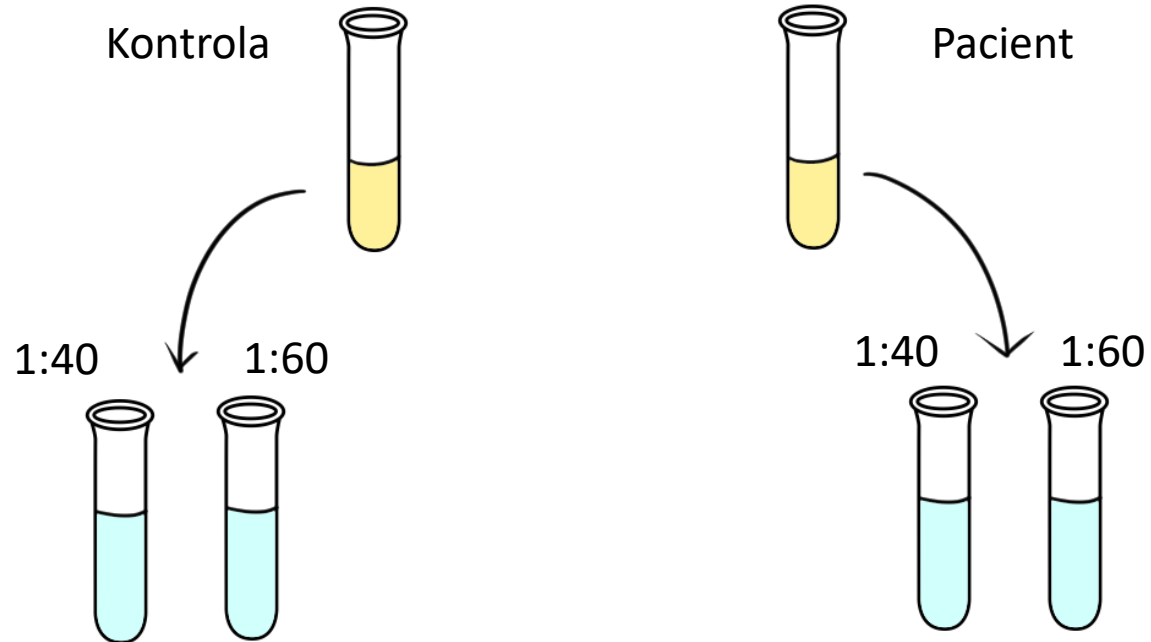
# CH50

Krok 2:

Naředte kontrolu a pacienta ve dvou ředěních:

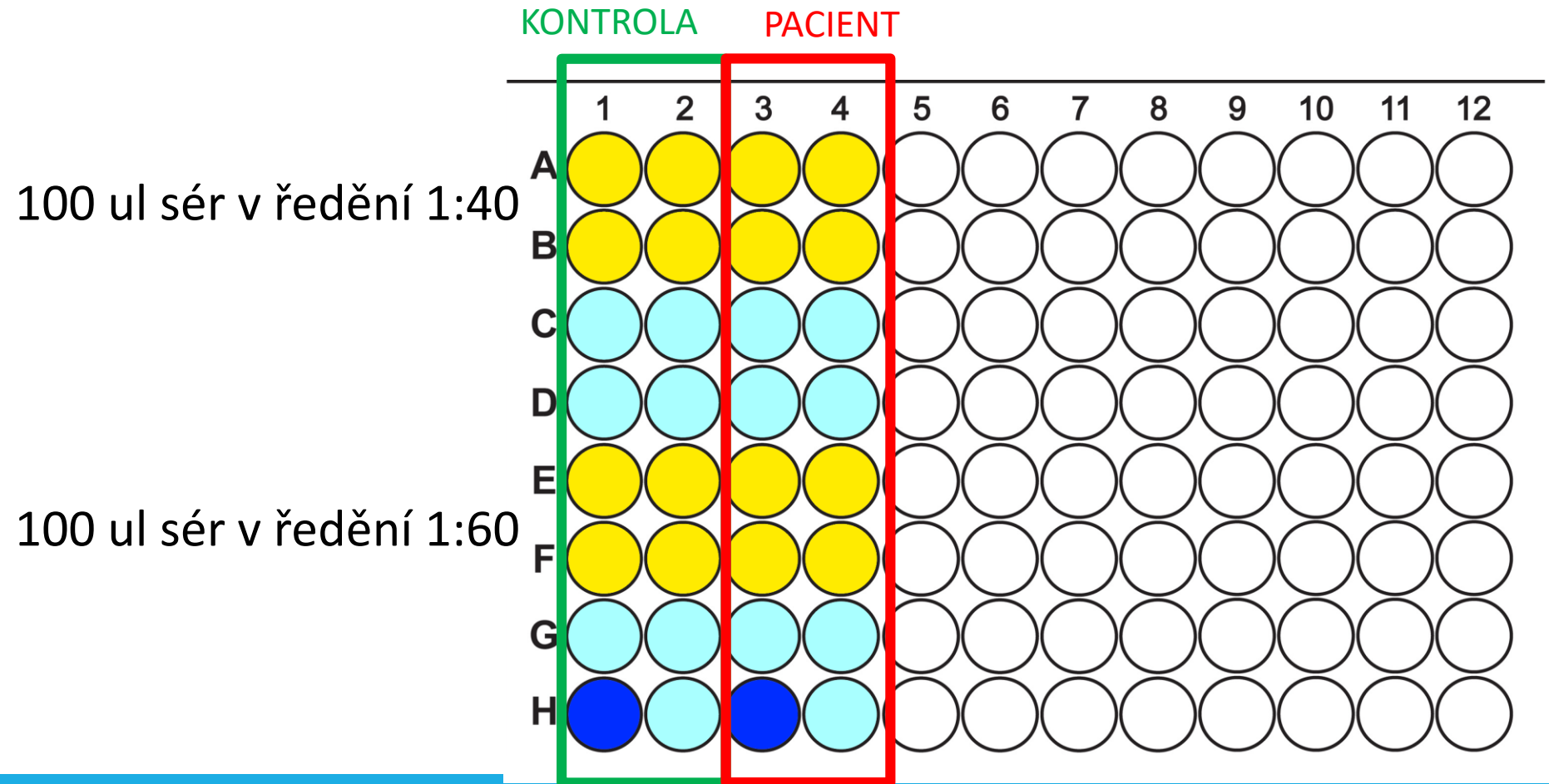
Ředění 1:40  
**25** ul séra + **975** ul fyziol.  
roztoku

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





# CH50





# CH50

Výsledné  
ředění

1:40

1:80

1:160

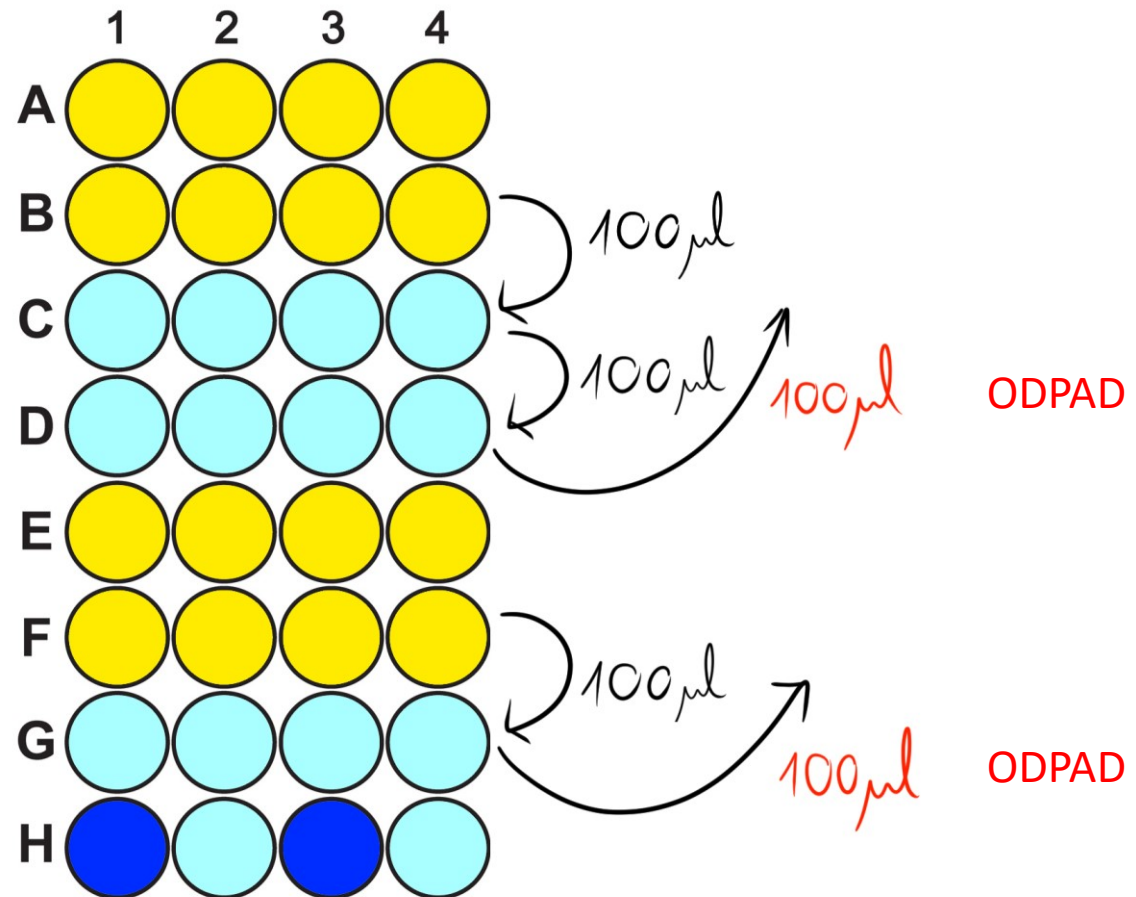
1:320

1:60

1:120

1:240

X



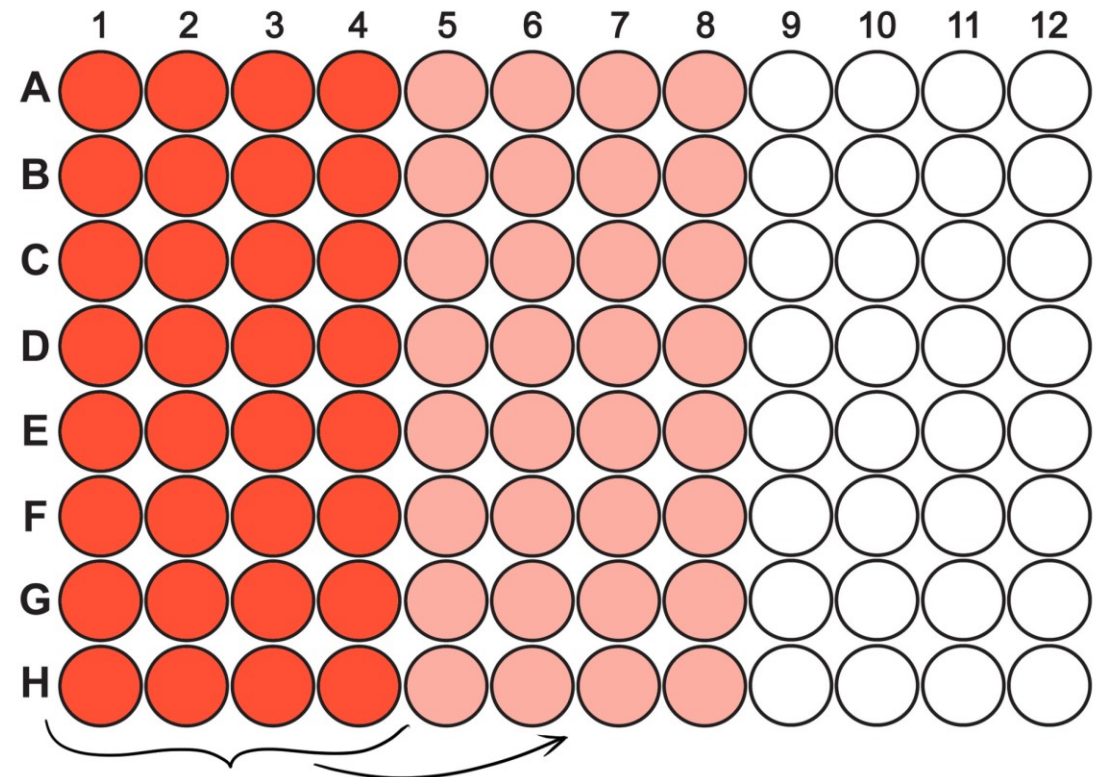


# CH50

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

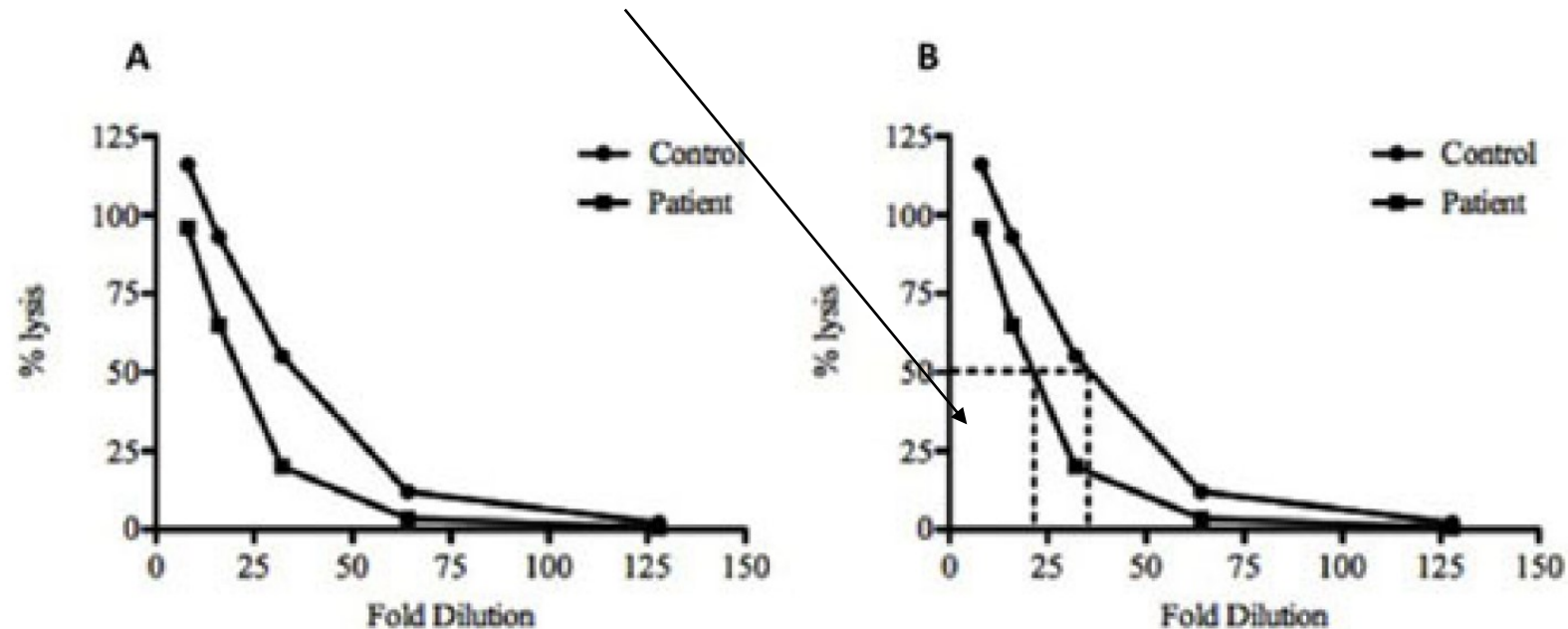
2) Z průměrné absorbance (A) spočítat % lýzy pro každé ředění dle vzorce:

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

# CH50 - hodnocení

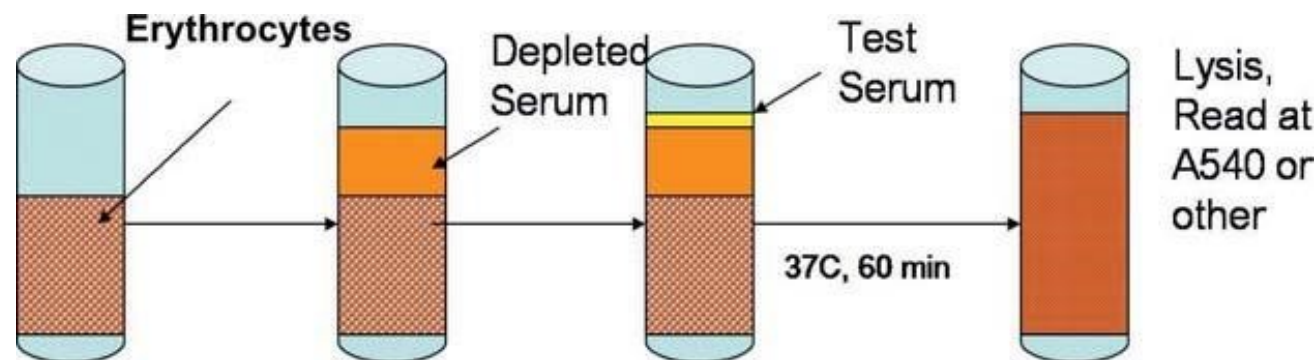
3) Sestrojit graf – závislost procenta lýzy na ředění (kontrola i pacient) – 1 graf

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



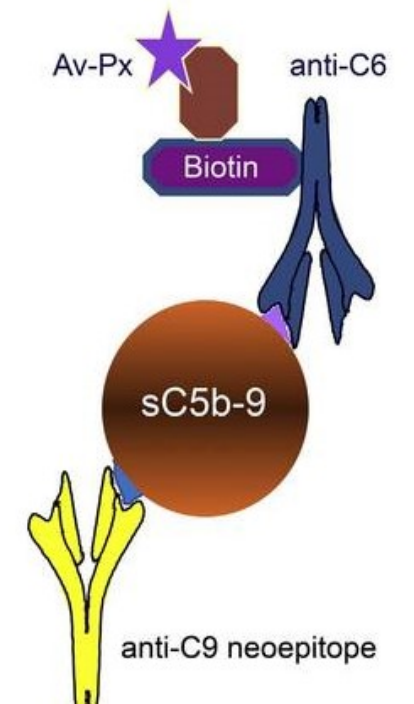
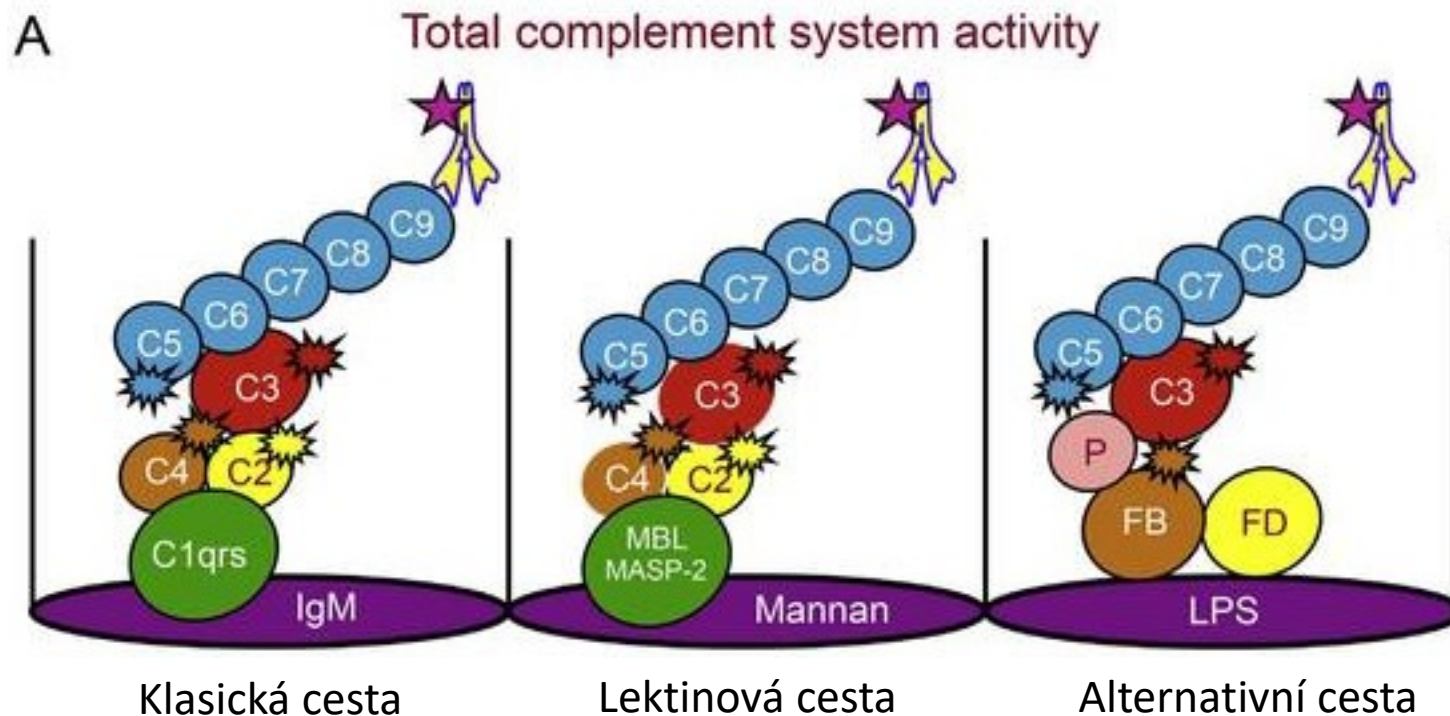
# CH50 - souhrn

- 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 membranolýtického 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 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 → 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
- Opakované infekce *Neisseria meningitidis*

- Deficience MBL – častější infekce u dětí

# Deficience složek 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) – 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)

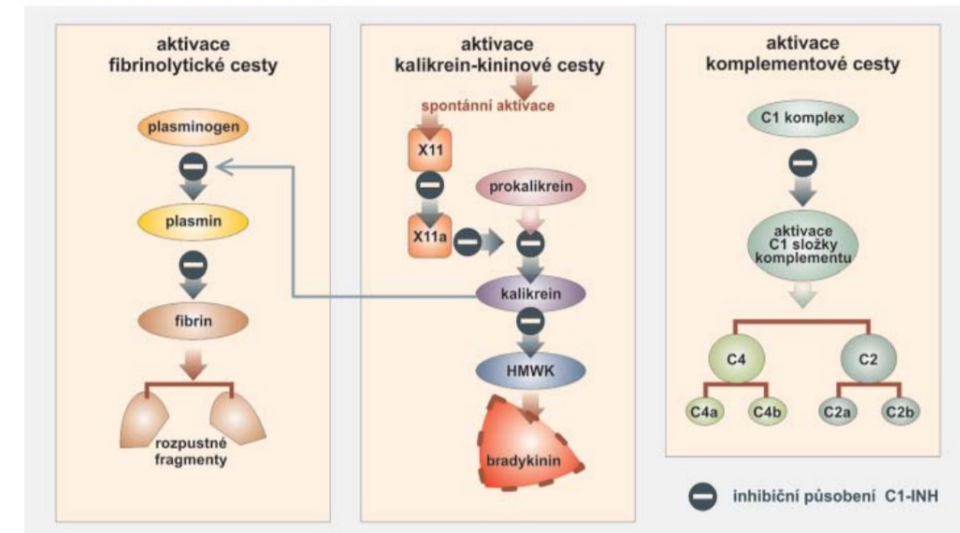
Mechanismus:

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

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	↓

# 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



# 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