

# IMUNOLÓGIA PRAKTICKÉ CVIČENIE – 5. TÝŽDEŇ

## KOMPLEMENT

### Komplement

- objavený v 1893 Julesom Bordetom a nazvaný „alexín“
- v 1899 ho Paul Ehrlich premenoval na komplement (kompletizuje funkciu protilátok)
- netvorí ho jedna látka ale komplex rôznych molekúl



### Nomenklatúra

- zložky komplementu sa označujú písmenom C + číslo v poradí, v akom boli objavené
- C1 má 3 podjednotky (C1q, 2xC1r a 2xC1s)
- fragmenty proteolytického štiepenia zložiek sa označujú „a“ (menší fragment) a „b“ (väčší fragment) – výnimka C2
- ďalšia degradácia fragmentu b sa označuje c, d, ...
- zložky komplementu resp. komplex zložiek označené nad svojím názvom vodorovnou čiarou majú enzýmovú aktivitu (napr. C4b2b)
- zložky označené ako faktory (faktor B, D, P, H, I) patria k alternatívnej ceste aktivácie alebo k regulačným proteínom

Bielkoviny komplementu sú zložkami prirodzeného (vrodeneho) imunitného systému a predstavujú systém asi 40 regulačných a efektorových glykoproteínov, z ktorých niektoré sa nachádzajú v sére, iné na bunkových povrchoch, kde tvoria rôzne receptory. Komplementové glykoproteíny sa nachádzajú v sére v inaktívnej forme a môžu byť aktivované nasledujúcimi cestami: klasickou, alternatívnou, lektínovou a cestou tvorby komplexu atakujúceho membrány (MAC), ktorý je spoločným výsledkom aktivácie prvými 3 spôsobmi a je zodpovedný za poškodenie cieľových buniek.

### Klasická cesta aktivácie

- objavená ako prvá
- závislá na protilátkach a ich reakcii s antigénom
- Spúšťaná retrovírusmi, mykoplazmami, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, pneumokokovým polysacharidom, polyaniónmi (heparín, protamín, dextran)
- dochádza k časovému posunu naštartovania o 4-5 dní
- CRP má niektoré podobné vlastnosti ako protilátky (opsonizuje cudzorodé častice a spúšťa aj klasickú cestu aktivácie) a vzniká do 1-2 dní

Klasická cesta aktivácie komplementu sa skladá zo zložiek C1, C4, C2 a C3, pričom väčšina týchto zložiek je zodpovedná i za aktiváciu lektínovou cestou. Komponenty C5b, C6, C7, C8 a C9 participujú v tvorbe komplexu atakujúceho membrány. Individuálne komponenty sú aktivované postupne, väčšinou pôsobia ako proteolytické enzýmy, časť z nich má však aj iné funkcie ako kofaktory alebo rôzne bioregulačné pôsobky.

### Lektínová cesta aktivácie

- objavená ako posledná
- makrofágy po požití baktérií produkujú cytokíny, ktoré indukujú tvorbu zápalových proteínov v pečeni
- kolektín MBP (manose binding protein) sa viaže na sacharidy vo forme tetraméru alebo hexaméru (analog C1q)
- následne sa viažu MASP-1 a MASP-2 (MBP associated serine protease sú analógy C1r a C1s)
- zvýšok lektínovej cesty je rovnaký ako klasická cesta
- proteíny lektínovej cesty sú fylogeneticky staršie

Lektínová cesta je veľmi podobná klasickej ceste. Začína sa väzbou manózu viažuceho lektínu (MBL) na bakteriálne povrchy s polysacharidmi obsahujúcimi manózu (manany). Väzba MBL na patogén má za následok asociáciu dvoch serínových proteáz MASP-1 a MASP-2 (to sú serínové proteázy

asociované s MBL). MASP-1 a MASP-2 sú obdobou C1r a C1s a MBL je obdobou C1q. Vytvorením komplexu MBL/MASP-1/MASP-2 dôjde k aktivácii MASP a následnému štiepeniu C4 na C4a a C4b. fragment C4b sa viaže na membránu a fragment C4a sa uvoľňuje do mikroprostredia. Aktivované MASP tiež štiepia C2 na C2a a C2b. Fragment C2a sa viaže na membránu a spája sa s C4b. Fragment C2b sa uvoľňuje do mikroprostredia. Výsledný komplex C4bC2a je C3 konvertáza, ktorá štiepi C3 na C3a a C3b. Fragment C3b sa viaže na membránu a spája sa s C4b a C2a. Fragment C3a sa uvoľňuje do mikroprostredia. Výsledný C4bC2aC3b je C5 konvertáza. Vytvorením C5 konvertázy sa končí časť lektínovej cesty. Biologické aktivity a regulačné proteíny lektínovej cesty sú rovnaké ako v klasickej ceste.

### Alternatívna cesta aktivácie

Schopnosť aktivácie ihneď po vstupe cudzorodých buniek

- agregovanými IgG, IgA a IgE
- polysacharidmi (dextrán, zymozán, inulín, agar)
- LPS (G-), kys. teichoovou (G+)
- polyaniónmi, DNA
- vírusmi
- hubami (kvasinky, plesne)
- parazitmi
- mnohými nádorovými bunkami

Vyžaduje sa prítomnosť C3b (môže byť aj hydrolyzovaná forma C3(H<sub>2</sub>O) resp. C3(NH<sub>2</sub>))

Alternatívna cesta začína aktiváciou C3 a vyžaduje faktory B a D a Mg<sup>2+</sup> katióny, všetky sa normálne nachádzajú v sére. V sére dochádza v malej miere k spontánnej hydrolýze C3 a k tvorbe C3i. Alternatívna cesta predstavuje nástroj nešpecifickej imunity proti infekcii bez účasti protilátok, a preto poskytuje prvú líniu obrany proti množstvu infekčných vyvolávateľov.

Mnohé gramnegatívne a niektoré grampozitívne baktérie, určité vírusy, parazity, heterológne červené krvinky, agregované imunoglobulíny (najmä IgA) a niektoré ďalšie proteíny (napr. proteázy, produkty koagulácie) môžu aktivovať alternatívnu cestu.

Biologické účinky komplementu	Komplement
<i>Lýza buniek</i>	C5b-C9, MAC
<i>Zápalová odpoveď</i>	
degranulácia mastocytov a bazofilov	C3a, C4a, C5a
degranulácia neutrofilov	C5a
degranulácia eozinofilov	C3a, C5a
extravazácia a chemotaxia leukocytov v mieste zápalu	C3a, C5a, C5b67
agregácia trombocytov	C3a, C5a
uvoľňovanie neutrofilov z kostnej drene	C3c
uvoľňovanie hydrolytických enzýmov z neutrofilov	C5a
zvýšenie expresie CR1 a CR3 na neutrofiloch	C5a
opsonizácia, stimulácia fagocytózy	C3b, C4b, iC3b
neutralizácia vírusov	C3b, MAC
solubilizácia a odstraňovanie imunokomplexov	C3b

## ■ Poruchy komplemetu-ochorenia

## Vrodené poruchy komplemetu

Deficiencia	Choroba	Dedičnosť
C1q	SLE, glomerulonefritída, CHPI	AR
C1r	SLE, CHPI	AR
C4	SLE, Sjogrenov syndróm, CHPI, autoimunitné choroby	AR
C2	SLE, juvenilná reumatoidná artritída, glomerulonefritída	AR + HLA
C3	CHPI, glomerulonefritída, reumatoidná artritída	AR
C5	SLE, chronické neisseriové inf.	AR
C6-8	SLE, chronické neisseriové inf.	AR
C9	sklerodermia, purpura	AR
C1Inh	hereditárny angioedém	AR
P, D, I	CHPI	AR

SLE systémový lupus erythematosus, CHPI chronické pyogénne infekcie

- prejavujú sa zníženou obranyschopnosťou organizmu
- zvýšený sklon k recidivujúcim infekciám pyogénnymi baktériami
- sklon k imunokomplexovému ochoreniu

- Deficiencie komplemetu sa môžu týkať jednotlivých zložiek, faktorov alebo regulačných glykoproteínov systému.

- Väčšina primárnych deficiencií je autozomálne recesívne dedičná. Nedostatok prvých komponentov klasickej cesty (C1q, C1r, C4, C2) sa manifestuje ako SLE (systémový lupus erythematosus) like syndróm.

- Najzávažnejšia je deficiencia C3 zložky, ktorá sa manifestuje chronickými pyogénnymi infekciami. Deficiencie terminálnych zložiek C5-C9 sa prejavujú zvýšenou náchylnosťou na infekcie neissériami.

- Najzávažnejšou deficienciou regulačných proteínov je deficiencia C1 inhibítora, ktorá rezultuje do hereditárneho angioedému.

- Znížené hladiny komplemetu sa vyskytujú pri infekciách a autoimunitných chorobách a sú vyvolané fixáciou a spotrebou komplemetu.

- Poškodzujúce efekty na vlastné tkanivá sa uplatňujú v tých imunopatologických reakciách, ktoré sú indukované cirkulujúcimi imunokomplexami a cyto-toxickými autoprotílátkami.

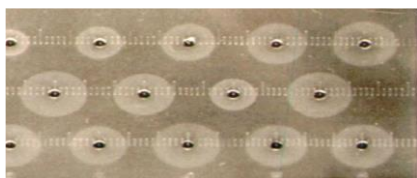
### PRAKTICKÉ STANOVENIE ZLOŽIEK KOMPLEMENTU

Po aktivácii komplemetu klasickou, alternatívnou alebo lektínovou cestou prebieha kaskádová reakcia veľmi rýchlo a jednotlivé zložky komplemetu majú len krátky polčas a väčšinou nízku koncentráciu v sére. Preto stanovenie jednotlivých zložiek predstavuje problém. Na vyšetrenie sa posieľa zrazená krv 5 ml v deň odberu, treba zabezpečiť rýchly transport pacientovej krvi do laboratória. **V praxi sa väčšinou stanovujú iba dve kľúčové zložky komplemetu C3 a C4.** Pri vyšetrení sa využívajú metódy reakcie proteínu so špecifickým antisérom. Môže sa použiť jednoduchá radiálna imunodifúzia alebo ELISA metódy. V súčasnej dobe sa často využíva nefelometria. Zložky C3 a C4 majú síce určené normálne hodnoty, ale tie sú ešte modifikované laboratóriami v závislosti od použitých metód a antisér. Hodnoty pre C3 zložku sa uvádzajú v rozmedzí 0,8 – 1,2 g/l a pre C4 zložku 0,15 – 0,4 g/l.

### **Stanovenie zložiek komplemetu pomocou jednoduchej radiálnej imunodifúzie**

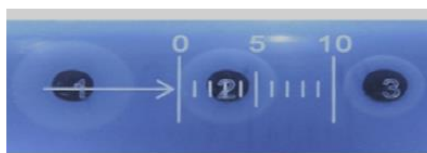
**Postup:** Jednoduchá radiálna imunodifúzia sa robí na sklenených alebo plastových platniach, na ktoré sa vylieva horúci (okolo 50 °C) roztok agarózy alebo agaru zmiešaný so špecifickou protílátkou proti hľadanej zložke (zjednodušene antigénu). Po ochladení gélový roztok agarózy stuhne. Do stuhnutej gélovej vrstvy sa vyrežú podľa predlohy v dostatočných vzdialenostiach okrúhle otvory. Do otvorov sa napipetuje antigén. Časť otvorov sa naplní štandardnými roztokmi zo známou

koncentráciou antigénu (napr. C3). Do ostatných otvorov sa napipetujú vzorky vyšetřovaného séra, v ktorom sa hľadá daná zložka komplementu (teda napr. C3). Platňa sa potom vo vodorovnej polohe vloží do vlhkej komôrky, aby počas reakcie nedošlo k vysušeniu a následnému popraskaniu gélu. V tomto systéme difunduje iba jedna zložka a tou je v tomto prípade antigén (jednoduchá imunodifúzia). Protilátka, ktorá sa rovnomerne rozmišala v géli, nemôže difundovať. Antigén difunduje z otvoru všetkými smermi do gélu (radiálna – dvojrozmerná imunodifúzia), pričom reaguje s protilátkami a vytvára precipitačný prstenec. **Priemer precipitačného prstenca je tým väčší, čím je väčšia koncentrácia antigénu.** Pri metóde podľa Manciniovovej a spol. (1965) sa po skončení imunodifúzie zmerajú priemery precipitačných prstencov. Najskôr sa zmerajú priemery precipitačných prstencov okolo otvorov, kde sa pipetovali známe koncentrácie antigénu.



**Obr. 15** Precipitačné prstence v géli.

(<http://jeeves.mmg.uci.edu/immunology/Assays/RadImmDiff.htm>)

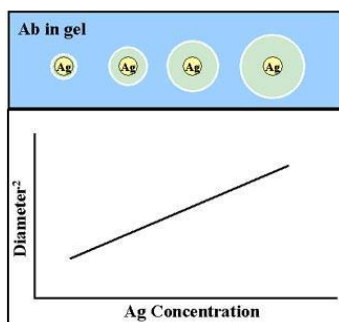


**Obr. 16** Precipitačné prstence pri jednoduchej radiálnej imunodifúzii

(<http://www.idbiotech.com/rid-srid-kit-test-radial-immunodiffusion/57-horse-igg-idr-rid.html>)

Z týchto údajov sa graficky znázorní analytickou čiarou závislosť priemeru prstenca od koncentrácie antigénu. Vtedy je priemer prstenca (alebo jeho druhá mocnina) priamo úmerný koncentrácii antigénu (obrázok 17).

**Výsledok:** Pomocou vytvoreného grafu sa po zmeraní priemeru precipitačného prstenca vyšetřovanej vzorky určí koncentrácia antigénu vo vzorke. **Jednoduchá radiálna imunodifúzia je základnou metódou na kvantitatívne stanovenie antigénov.** Citlivosť tejto metódy pre proteínové antigény je 0,02 mg/ml. Precipitačné prstence sa odčítavajú priamo alebo po zafarbení farbivami špecificky reagujúcimi s proteínmi (napr. coomassie blue).



**Obr. 17** Analytická čiara pri jednoduchej radiálnej imunodifúzii

(<http://bookcoverimqs.com>)

#### **Indikácie na vyšetřenie C3 a C4**

Indikácie na vyšetřenie C3 a C4 sú pri podozrení na imunokomplexové ochorenia, defekt v komplementovom systéme, na zhodnotenie aktivity ochorení, pri ktorých dochádza ku spotrebe komplementu: reumatická choroba, niektoré chronické infekcie, chronická hepatitída, SLE

(systémový lupus erythematosus). Pokles obidvoch zložiek je prognosticky nepriaznivým znamením pri septických stavoch.

**Znížené hodnoty C3** sa vyskytujú pri SLE s glomerulonefritídou, akútnej sérovej chorobe, akútnej glomerulonefritíde, imunokomplexových chorobách, cirhóze pečene, infekčnej endokarditíde, myastenia gravis, diseminovanej intravaskulárnej koagulopatii, hereditárnom angioedéme, hereditárnom deficite C2, lymfosarkóme, zmiešanej kryoglobulinémii. Pacienti s deficitom majú vysoké riziko vzniku vážnych bakteriálnych infekcií spôsobených grampozitívnymi aj gramnegatívnymi baktériami.

**Zvýšené hodnoty C3** sa vyskytujú pri obštrukčnom iktere, tyreoiditíde, akútnej reumatickej horúčke, reumatoidnej artritíde, nodóznej polyarteritíde, akútnom infarkte myokardu, ulceróznej kolitíde, dne, diabete, Reiterovom syndróme.

**Hodnoty C4** bývajú znížené pri ochoreniach spojených s tvorbou imunokomplexov: SLE, reumatoidná artritída, glomerulonefritída, chronická hepatitída, kryoglobulinémia.

#### ZDROJE:

Neuschlová Martina, Elena Nováková, Jana Kompaníková: Návody na praktické cvičenia z imunológie. Multimediálna podpora výučby klinických a zdravotníckych disciplín :: Portál Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského [online] , [cit. 26. 03. 2020]. Dostupný z WWW: <https://portal.jfmed.uniba.sk//clanky.php?aid=348>. ISSN 1337-7396.

<http://www.microbiologybook.org/Slovak-immunol/slovak-imm2.htm>[http://www.klinickabiochemia.sk/download/infolist\\_33.pdf](http://www.klinickabiochemia.sk/download/infolist_33.pdf)