

Анализ нарушений системы комплемента

36

C1-ингибитор	376
Циркулирующие иммунные комплексы	377
Маннан-связывающий лектин, MASP-2	378
Пропердин (фактор P)	379
Продукты активации системы комплемента	379

NEW

сокращения раздела:

АО – ангионевротический отек
Квинке (НАО – наследственный,
ПАО – приобретенный)
ИК – иммунные комплексы
IL – интерлейкин
IFN – интерферон
МАК – мембраноатакующий комплекс

М-КСФ – макрофагальный колониес-
тимулирующий фактор
м.м. – молекулярная масса
РА – ревматоидный артрит
СК – система комплемента
СКВ – системная красная волчанка
ТСС – терминальный комплекс

ЦИК – циркулирующие иммунные
комплексы
С – компонент комплемента
(C1, C2 и т.д.)
Ig – иммуноглобулины
MBL – маннан-связывающий
лектин

Система комплемента (СК) имеет ключевое значение при развитии многих аутоиммунных и инфекционных заболеваний. К функциям СК относят, в первую очередь, элиминацию чужеродных клеток, а также блокировку антигена и регуляторную функцию в иммунном ответе. Существуют 3 пути активации комплемента (рис. 1): классический, альтернативный и, относительно недавно открытый, лектиновый.

Общий скрининг активации системы комплемента (3 пути: классический, альтернативный, лектиновый)

Классический путь активации – самый эффективный и наиболее специфичный, он включается только в том случае, если в крови присутствуют иммунные комплексы, содержащие иммуноглобулины (Ig) M, G1, G2 или G3*. Свободные формы перечисленных Ig, а также иммунные комплексы с другими классами и подклассами Ig (E, D, G4, A1 и A2) не активируют классический путь. При активации классического пути СК дополняет и усиливает антиген-блокирующее действие Ig. Фрагменты компонентов комплемента (такие как C3a, C4a, C5a), высвобождающиеся в плазму при активации СК, обладают хемотаксическим и анафилактическим действием, таким образом, они дополнительно активируют клеточное звено иммунной системы.

Альтернативный и лектиновый пути активируются и в отсутствие специфических антител. Для их активации достаточно определенной полисахаридной структуры, например, бактериальной клеточной стенки. Таким образом, альтернативный и лектиновый пути инициируют первичный иммунный ответ даже в той ситуации, когда антиген еще не распознан антителами или иммунокомпетентными клетками. Однако эти пути характеризуются довольно низкой специфичностью, и гиперактивация СК через эти пути может привести к развитию аутоиммунных поражений.

При дефиците отдельных компонентов наблюдается ослабление активности СК в целом, что служит причиной склонности к повторяющимся или внезапным тяжелым инфекциям. Дефицит компонента C3 или фактора В приводит к повышению чувствительности организма к гнойным инфекциям. Недостаточность терминальных компонентов C5, C6, C7 и C8, а также компонентов альтернативного пути – фактора

• см. раздел
Иммуноглобулины,
стр 386

D и пропердина, создает особую предрасположенность к инфекциям, вызываемым двумя видами *Neisseria* – *N. gonorrhoeae* и *N. meningitidis*. Дефицит некоторых компонентов классического пути (C1q, C1r и C1s, C4 или C2) ассоциирован с предрасположенностью к заболеваниям, которые обусловлены нарушениями в формировании и клиренсе иммунных комплексов, например, с возникновением системной красной волчанки (СКВ)*. Причиной аутоиммунного повреждения тканей и хронического воспаления может также стать неспецифическая, спонтанная активация комплемента.

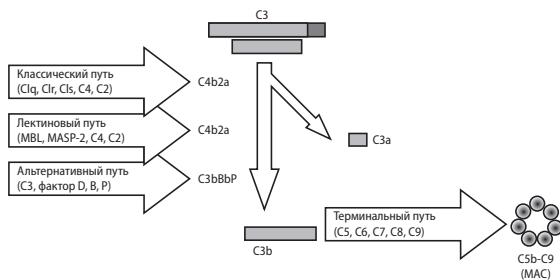


Рис. 1 Схема основных событий трех путей активации C3

Особенность диагностики нарушений СК состоит в том, что сывороточный уровень отдельных компонентов часто плохо коррелирует с клиническим состоянием пациента. Это связано с тем, что количественное определение концентрации того или иного компонента не позволяет судить о его функциональной активности. Кроме того, полный анализ нарушений в активации СК должен включать определение более десяти компонентов. Поэтому долгое время для скрининга использовался только гемолитический метод, который, однако, имел множество недостатков: невысокая чувствительность, плохая воспроизводимость, невозможность стандартизации.

«ЗАО БиоХимМак» предлагает диагностический набор, который является качественно новым уровнем в диагностике нарушений СК. Набор создан с использованием двух принципов: гемолитического метода учета активации СК и ИФА-метода определения терминального комплекса. В настоящее время – это наиболее оптимальный набор для общего скрининга нарушений СК.

В наборе в лунках микропланшета сорбированы специфические активаторы классического, альтернативного или лектинового путей. Образцы сыворотки пациентов разводятся одним из буферов, содержащих специфические блокаторы для обеспечения активации только одного пути. После инкубации раз-

денных образцов сыворотки и промывки лунок, образовавшийся [C5b-C9_n] (терминальный комплекс) выявляется специфическими антителами, конъюгированными со щелочной фосфатазой. Степень активации комплемента коррелирует с интенсивностью окрашивания и измеряется в значениях абсорбции.

C1-ингибитор СК (функциональная активность)

C1-ингибитор – является одним из важнейших блокаторов сериновых протеаз: C1r и C1s (субкомпонентов C1-эстеразы каскада СК), MASP-1 и MASP-2 (протеаз, активирующих лектиновый путь СК), а также плазмина, калликреина, фактора XIa, фактора XIIa. C1-ингибитор – полипептид с м.м. 76 кДа, состоящий из двух доменов, содержащих 113 остатков аминокислот в N-концевом домене и 365 – в C-концевом. **Нормальная концентрация C1-ингибитора в плазме – 0,2 г/л.**

C1-ингибитор является одним из классических белков острой фазы, синтез которого регулируется провоспалительными цитокинами**. Так, показано положительное влияние интерферонов ИФН-α, -β и -γ на синтез C1-ингибитора моноцитами и фибробластами кожи человека. ИЛ-6 (основной гепатостимулирующий фактор), действуя на клетки линий HepG2, индуцирует синтез C1-ингибитора, одновременное добавление к клеткам ИФН-γ приводит к синергизму действия двух цитокинов. ИЛ-1, действуя совместно с ИЛ-6, вызывает уменьшение синтеза C1-ингибитора, а с ИФН-γ – напротив, повышает его продукцию. М-КСФ увеличивает синтез C1-ингибитора моноцитами человека.

C1-ингибитор имеет первостепенную диагностическую важность для дифференциации природы отека Квинке (аллергического и псевдоаллергического происхождения). **Ангионевротический отек Квинке псевдоаллергической природы – тяжелое аутоиммунное заболевание, развивающееся при сниженном уровне C1-ингибитора. Псевдоаллергический ангионевротический отек может быть как врожденным (наследственный ангионевротический отёк), так и приобретенным (ПАО).**

ПАО характеризуется следующими клиническими симптомами: несистемной красной волчанкой, гломерулонефритом, а также эпизодическими подкожными и слизистыми отеками. У пациентов с несистемным волчаночным гломерулонефритом прогноз неблагоприятный. Через 8-20 лет после постановки диагноза отмечается прогрессирующая хроническая почечная недостаточность. Другое проявление несистемной красной волчанки с мембранопрлиферативным гломерулонефритом – развитие макроскопической гематурии, азотемии и васкулита.

* аутоиммунные заболевания – см. раздел «Диагностика аутоиммунных заболеваний», стр. 302

** Провоспалительные цитокины – см. раздел «цитокины», стр. 401

В 15% случаев дефицита С1-ингибитора его концентрация остается в норме, а снижена только его функциональная активность. Поэтому функциональная активность С1-ингибитора (ингибирующая способность) – наиболее ёмкий диагностический показатель. **Хромогенный метод**, предлагаемый компанией БиохимМак, позволяет определять активность С1-ингибитора по способности ингибировать С1-эстеразу.

Этиология ПАО связана, как правило, с появлением IgG аутоантител против С1-ингибитора. Аутоантитела другой специфичности играют, по-видимому, главную роль в приобретенной гемофилии и при гломерулонефрите. При дефиците С1-ингибитора патологическая активация СК, вызванная циркулирующими иммунными комплексами, криоглобулинами, парапротеинами, приводит к появлению крапивницы или ангиоэдемы. В настоящее время описаны случаи сочетанной СКВ и АО, СКВ-подобного состояния и гломерулонефрита. В литературе отмечают связь лимфопролиферативных процессов (лимфосептическая лейкемия, неходжкинская лимфома) с ПАО. Приобретенный дефицит С1-ингибитора может быть вызван инфекциями различной природы, например, парвовирусом. *Helicobacter pylori** также может приводить к дефициту С1-ингибитора и появлению симптомов ангионевротического отека. У больных с эхинококкозом, спустя 7 месяцев после оперативного вмешательства был обнаружен приобретенный дефицит С1-ингибитора.

Важно отличать этиологию несистемной и системной красной волчанки. При СКВ не обнаружено влияния аутоантител к С1-ингибитору на его функциональную активность *in vitro*. Было показано, что этиология дисфункции С1-ингибитора при СКВ отличается и от НАО, и от ПАО.

Циркулирующие иммунные комплексы, содержащие С3d

Иммунные комплексы антиген-антитело (ИК) образуются в организме постоянно. Формирование ИК представляет собой физиологический механизм защиты, приводящий к быстрой элиминации эндогенных или экзогенных агентов (например, микроорганизмы, вирусы, паразиты, растительные антигены, антигены грибов, пыльца или пищевых продуктов) через ретикуло-эндотелиальную систему. В норме образовавшиеся ИК не должны циркулировать, они быстро элиминируются по механизму, в котором задействована СК и макрофаги. При нарушении механизма клиренса уровень ИК в циркуляции (ЦИК) повышается. Высокий уровень ЦИК

в сыворотке и/или в других биологических жидкостях наблюдается при многих воспалительных и злокачественных заболеваниях. Клиренс ИК нарушается при дефицитах отдельных компонентов комплемента классического пути (С1q, С1r и С1s, С4 или С2). При недостатке компонентов комплемента ЦИК преципитируют и откладываются преимущественно на сосудистой стенке и на структурах, экспрессирующих Fc-рецепторы, например, на базальных мембранах (в том числе почечных). В результате развивается иммунокомплексная патология (реакция гиперчувствительности III типа). Преципитация ЦИК вызывает различные эффекты: активируется СК по классическому пути, вследствие чего выделяются анафилатоксины (С3а, С4а, С5а), активируются макрофаги, инициирующие развитие местного воспалительного процесса с привлечением тучных клеток и нейтрофилов.

ЦИК в повышенной концентрации выявляются у многих пациентов с СКВ и ревматоидным артритом (РА), особенно имеющих сосудистые осложнения. С преципитацией ЦИК связаны некоторые формы нефритов. Уровень ЦИК коррелирует с тяжестью перечисленных заболеваний.

Многие тесты для определения ЦИК основаны на преципитации полиэтиленгликоля, радиальной иммунодиффузии и на анализе функциональной активности клеточных линий (Raji). К сожалению, пока не существует ни одного метода, позволяющего определять все типы ЦИК.

Компания БиохимМак предлагает тест-систему для определения ЦИК по фрагменту комплемента С3d. Набор выявляет ЦИК, содержащие IgG и фрагмент С3d, т.е. ЦИК, активирующие классический путь СК. Поэтому определяемые классы ЦИК обладают наибольшей активностью и достоверно отражают клиническую картину аутоиммунных патологий.

Выявление ЦИК, по способности связываться с С1q

С1q (субкомпонент С1 компонента СК) взаимодействует с ИК, содержащими антитела двух классов: IgG и IgM. Для начала активации С1 необходимы минимум две молекулы IgG или одна молекула IgM (6-валентна), у которой, по крайней мере, две валентности должны прореагировать с антигеном. С1q присоединяется к СH2 домену IgG, или к СH4 домену IgM. Со свободными формами Ig С1q связывается очень слабо. Так, константа связывания С1q со свободным IgG меньше на четыре порядка константы связывания с агрегированным IgG или IgG в составе ИК. На принципе взаимодействия С1q с Ig

* *Helicobacter pylori* – см. разделы «Маркеры заболеваний желудочно-кишечного тракта», стр 151 и «Лабораторная диагностика инфекций», стр. 242.

базируется метод определения ЦИК методом ИФА. На полистироловом планшете сорбирован C1q, который связывает большинство типов ЦИК.

Антитела к C1q компоненту комплемента**

Лектиновый путь активации системы комплемента

Активность маннан-связывающего лектина, уровень MASP-2

Маннан-связывающий лектин (MBL) образует комплекс со специфичными сериновыми протеазами (MASP-1, -2, -3), из которых только MASP-2 обладает ферментативной активностью в отношении компонентов C2 и C4. Активация лектинового пути СК происходит только при том условии, что MBL, образовав комплекс с сериновой протеазой MASP-2, связывается со структурой, содержащей маннан или N-ацетилглюкозамин, например, с клеточной стенкой бактерий. Комплекс [MBL–MASP-2] запускает лектиновый путь активации СК подобно тому, как комплекс [C1q–(C1s–C1r)₂] активирует классический путь, а MASP-2 в составе комплекса выполняет функцию аналогичную протеазе C1s.

Лектиновый путь является антителонезависимым, что важно для формирования быстрого иммунного ответа в том случае, когда организм ещё не выработал антител против возбудителя. Нормальный уровень MBL находится в пределах от 10 до 5000 нг/мл. Среди европеоидов более 12% популяции имеют уровень MBL ниже 100 нг/мл. Уровень MBL ниже 100 нг/мл относят к одному из типов иммунодефицитов. Таким образом, около 10% предположительно здорового населения в действительности имеет дефицит MBL. Низкая активность MBL может приводить к различным клиническим проявлениям, таким как возвратные инфекционные заболевания, болезнь Крона. Пониженная активность MBL также ассоциирована с повышенным риском развития сепсиса, фиброза, аутоиммунных поражений (например, РА, СКВ) и привычного невынашивания беременности. При проведении диагностики необходимо учитывать, что в период инфекционного заболевания уровень MBL всегда повышается по сравнению с базовым. Важен уровень MBL и для прогноза в трансплантологии, при концентрации MBL ниже 100 нг/мл долгосрочный прогноз приживаемости почки и сердца значительно ухудшается. Напротив, относительно высокий уровень MBL (>1000 нг/мл) ассоциирован с риском сердечнососудистых заболеваний, инфаркта миокарда, особенно на фоне развития сахарного диабета.

MASP-2 расщепляет C2 и C4, образуя C3-конвертазу – C4b2a. По функциональной активности MASP-2

похожа на протеазу C1s. C1-ингибитор и α2-макрглобулин в физиологической концентрации полностью блокируют ферментативную активность комплекса [MBL–MASP-2]. В отсутствие ингибитора этот комплекс опсонизирует бактерии, резко ускоряя их гибель. **Нормальный уровень MASP-2 в сыворотке составляет 170-1200 нг/мл.** Пониженная концентрация MASP-2 говорит о высокой чувствительности к инфекционным заболеваниям. Кроме того, MASP-2 является прогностическим маркером развития злокачественной опухоли пищевода и прямой кишки, повышенный уровень этой протеазы – неблагоприятный фактор при онкологии.

В свою очередь активность наиболее эволюционно древней MASP-1 схожа с активностью тромбина, что позволяет предположить участие MASP-1 в защитных реакциях врождённого иммунитета, основанных на коагуляции. MASP-3, судя по литературным данным, не участвует в активации СК. Биологическая роль MASP-3 остается невыясненной, поскольку эта протеаза расщепляет лишь синтетический субстрат, а натуральный субстрат пока неизвестен.

«ЗАО БиоХимМак» предлагает три ИФА-набора для всесторонней оценки лектинового пути :

1. Оценка активности MBL по связыванию с маннаном
2. Количество MASP-2 (тест-система, не имеющая аналогов в мире)
3. Общая активность комплекса MBL–MASP-2 по способности расщеплять компонент C4 (тест-система, не имеющая аналогов в мире)

Уровень MBL обычно коррелирует со способностью депонировать C4b, однако, при одном и той же концентрации MBL величина депонирования может варьировать в 3 раза. Количество депонированного C4b – лучший количественный показатель активации лектинового пути, поскольку это одновременная оценка активностей MBL и MASP-2 при функционировании в комплексе.

Альтернативный путь активации комплемента

В активации альтернативного пути участвуют шесть белковых факторов: В, D, Р, Н, I и компонент C3, общий для всех путей. Причем некоторые белки альтернативного пути активации являются функциональными аналогами белков классического пути. Фактор D действует аналогично C1s: если C1s активирует компонент C2, то фактор D подобным образом воздействует на В фактор. Фактор В в альтернативном пути активации при формировании C3-конвертазы и C5-конвертазы играет роль,

* см. раздел Аутоиммунные заболевания, стр. 302

аналогичную компоненту C2. Ключевая стадия альтернативного пути СК – формирование C3/C5-конвертазы альтернативного пути - [C3b_nBb]. Дефицит любого белка альтернативного пути СК проявляется повышенной чувствительностью к инфекционным заболеваниям. Из дефицитов компонентов альтернативного пути описан дефицит фактора D у 3 пациентов с повторными инфекциями, вызванными нейссериями, а также дефицит пропердина более, чем у 70 пациентов. Около 45% пациентов с дефицитами пропердина перенесли менингококковую инфекцию, при этом летальность составила более 25%.

Фактор D (Адипсин)

Фактор D (Адипсин) – сериновая протеаза, необходимая для формирования C3/C5-конвертазы альтернативного пути. Фактор D очень специфичный фермент, его единственным естественным субстратом является фактор В. Причем для расщепления фактора В необходимо, чтобы он был связан с фрагментом C3b, тогда при участии фактора D происходит отщепление фрагмента Va и формирование C3/C5-конвертазы - [C3b_nBb]. Фактор D экспрессируется различными типами клеток: моноцитами, макрофагами, миоцитами, клетками эндометрия, почек, тонкого кишечника, а в особенности адипоцитами. Катаболизм фактора D непосредственно связан с функцией почек. В случае почечной недостаточности уровень циркулирующего фактора D значительно возрастает. Напротив, практически все случаи дефицитов фактора D являются врожденными, а не приобретенными. Вероятно, при ускоренном катаболизме факторов альтернативного пути прежде всего происходит истощение фактора В и компонента C3, а фактор D практически не расходуется при активации. Поскольку обычно дефициты фактора D являются наследуемыми, то имеет смысл проводить скрининг среди родственников пациента с этим дефицитом. Все случаи дефицита фактора D ассоциированы с низкой сопротивляемостью организма против патогенов бактериальной природы. Особое внимание требуется обратить на пациентов, подверженных частым заболеваниям менингитом. Пациенты с врожденным гомозиготным и гетерозиготным дефицитом фактора D характеризуются повышенной чувствительностью к менингиту. Исследования показывают плохую опсонизацию клеток *N. meningitidis* факторами альтернативного пути, из-за чего не происходит нейтрофильный фагоцитоз патогенов. В этом случае искусственное введение препарата фактора D восстанавливает нормальную опсонизирующую функцию комплемента против патогена.

Фактор P (Пропердин)

Фактор P (Пропердин) играет стабилизирующую роль в сохранении активности C3/C5-конвертаз альтернативного пути, увеличивая период полураспада в 10 раз. Пропердин в крови существует в неактивной форме. Его активация происходит в результате контакта с C3bBb и, по-видимому, обусловлена конформационными изменениями молекулы. Активированный пропердин связывается с C3b или C3b-подобным белком в конвертазе и стабилизирует ее, тем самым, индуцируя активацию альтернативного пути, продлевая время существования конвертаз. Нормальная концентрация пропердина в сыворотке - 20 мкг/мл, молекулярная масса – 220 кДа. Пропердин, как правило, используют как маркер повышенного риска заболевания менингококковой инфекцией.

Продукты активации системы комплемента (ТСС, фрагменты C3a-desArg, C4a-desArg и C5a-desArg)

Заключительная фаза атаки мембраны начинается с расщепления компонента C5 на два фрагмента C5a и C5b. Этот процесс осуществляет C5-конвертаза (одного из путей активации), которая отщепляет фрагмент C5a от N-конца α-цепи молекулы C5. Образующийся фрагмент C5a обладает очень сильной анафилактической активностью, а также способностью осуществлять хемотаксис. В результате активации классического пути образуется всего три анафилатоксина (фрагменты C3a, C4a, C5a). Эти же анафилатоксины образуются и при активации СК по другим механизмам: при активации альтернативного пути – C3a, C5a, при активации лектинового пути – C4a, C5a. Фрагменты C3a и C4a несколько уступают по хемотаксическому и анафилатогенному действию фрагменту C5a. В отсутствие механизма регуляции действие анафилотоксинов может привести к анафилактическому шоку – чрезвычайно опасному состоянию с риском летального исхода. Быстрая инактивация анафилотоксинов C3a, C4a и C5a достигается удалением аргинина с карбоксильного конца этих пептидов с помощью специального сывороточного фермента – карбокси-пептидазы В. При этом образуются формы C3a-desArg, C4a-desArg и C5a-desArg. Таким образом, фрагменты C3a-desArg, C4a-desArg и C5a-desArg являются маркерами анафилактической реакции, воспаления и риска отторжения трансплантата.

Все три пути активации СК ведут к сборке терминального (ТСС) или мембраноатакующего (МАК) комплекса (корректнее рассматривать, что МАК – частный случай ТСС, когда сборка произошла именно на клеточной мембране). После расщепления компонента

C5 на фрагменты C5a и C5b происходит быстрый неферментативный процесс образования C5b-C6-C7-C8-C9_n – цитолитического комплекса на клеточной мембране атакуемой клетки. Молекулы компонента C9 (от 12 до 21 молекул на комплекс) прошивают насквозь клеточную мембрану, формируя цилиндрический канал. Образующееся отверстие диаметром около 100 Å позволяет низкомолекулярным веществам свободно проходить внутрь клетки. Образовавшийся МАК действует настолько эффективно, что для лизиса прокариотической клетки может быть достаточно одного комплекса [C5b-C9_n]. М.м. [C5bC9_n] порядка 1700 кДа (550 кДа – масса C5b-8 и 1100 кДа – средняя масса поли-C9-структуры).

Сборка комплекса [C5b-C9_n] может происходить и в жидкой фазе при участии S-белка (витронектина) – фактора гомологичной рестрикции, который защищает клетки организма от аутоиммунной агрессии. А некоторые клетки (например, нейтрофилы человека) способны защищаться от лизиса путем локального выпячивания мембраны, которое затем полностью отделяется от клетки в виде везикулы, унося на себе МАК. Так или иначе, даже в здоровом организме растворимые формы ТСС присутствуют, поскольку активация СК происходит постоянно. Но в случае инфекционного заболевания, воспалительного процесса мощность активации СК резко повышается, соответственно возрастает и уровень ТСС, который служит надежным маркером воспаления.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА



Кат. №	Производитель	Наименование, количество/упаковка
5345003	Technoclone	C1-ингибитор, 60 (детекция при 405 нм)
EK-C1C	Buhlmann	Циркулирующие иммунные комплексы C1q, 96
CG59221	IBL	Циркулирующие иммунные комплексы C3d, 96
416-5490	Orgentec	Антитела к C1q компоненту комплемента, 96
HK323	HBT	MBL (маннан-связывающая активность лектина), 192
HK327	HBT	MBL (определение активности по депонированию C4b), 192
HK326	HBT	MASP-2 (MBL-ассоциированная сериновая протеиназа), 192
HK328	HBT	ТСС (терминальный комплекс комплемента или мембраноатакующий комплекс, МАК), 192
COMPL300	BCM Diagnostics	Общий скрининг системы комплемента (3 пути: классический, альтернативный, лектиновый), 96
900-058	BCM Diagnostics	Комплемент C3a-desArg, 96
900-059	BCM Diagnostics	Комплемент C4a-desArg, 96
900-033	BCM Diagnostics	Пропердин (Factor P), 96
DFD00	R&D	Factor D (adipsin), 96