

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2021**

**Tereza Houšková**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

**Tereza Houšková**

Studijní obor Zdravotní laborant 5345R020

**METODY VYUŽÍVANÉ PRO STANOVENÍ AKTIVITY  
KOMPLEMENTU**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2021

# ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tereza HOUŠKOVÁ**  
Osobní číslo: **Z17B0086P**  
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Metody využívané pro stanovení aktivity komplementu**  
Zadávající katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

### Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury na vybrané téma
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační formu

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

### Seznam doporučené literatury:

- HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J.: Základy imunologie – 2. vydání, Triton, Praha, 2002
- BARTŮŇKOVÁ, J, VERNEROVÁ, E.: Imunologie a alergologie. Triton, Praha, 2002
- FUČÍKOVÁ, T.: Klinická imunologie v praxi. Galén, Praha, 1997, 2. přepracované vydání
- KREJSEK, J., KOPECKÝ, O.: Klinická imunologie. Nucleus, HK, 2004
- ELGERT, K. (2009). Immunology: understanding the immune system. Chichester: John Wiley.

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Bc. Tomáš Vlas**

Katedra záchranářství, diagnostických oborů  
a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **18. června 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2021**



**PhDr. Lukáš Štich, MBA**  
děkan



**Mgr. Stanislava Reichertová**  
vedoucí katedry

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 29. 3. 2021.



vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Houšková Tereza

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Metody využívané pro stanovení aktivity komplementu

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 45

Počet stran – nečíslované: 16

Počet titulů použité literatury: 26

Klíčová slova: komplement, ELISA, RID, CH50, AH50

### **Souhrn:**

Tato bakalářská práce se zabývá porovnáváním metod stanovujících celkovou aktivitu komplementového systému. Teoretická část popisuje komplementový systém, jeho důležitou funkci v imunitním systému a typy aktivačních cest. V další části bude provedena analýza poruchy komplementových složek, diagnostiky a následně léčby komplementu. Nejčastější vyšetření komplementu, které se používá pro stanovení testu AH50 (pro alternativní cestu) a CH50 test (pro klasickou cestu), se měří pomocí metody ELISA nebo RID. Obě tyto metody jsou v praktické části této bakalářské práce popsány a porovnány z hlediska časové náročnosti, složitosti na přípravu a ekonomických nákladů pro laboratoře. V praktické části je také uveden statistický popis jednotlivých metod a vypočten korelační koeficient. Korelační koeficient metod ELISA a RID je pro test AH50 roven 0,879 a pro test CH50 0,860. Tyto koeficienty značí, že i přes odlišnou přípravu a zpracování jsou metody ELISA a RID v analýze výsledků podobné.

## **Abstract**

Surname and name: Houšková Tereza

Department: Department of Rescue, Diagnostics and Public Health

Title of thesis: Methods used to determine complement activity

Consultant: Ing. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 45

Number of pages – unnumbered: 16

Number of literature items used: 26

Keywords: complement, ELISA, RID, CH50, AH50

### Summary:

This bachelor thesis deals with comparing methods determining the overall activity of the complement system. The theoretical part describes the complement system, its important function in the immune system and types of activation pathways. In the next part, the analysis of complement components disorder, diagnosis and subsequent treatment of complement is performed. The most commonly used complement examination to determine the AH50 test (for the alternative pathway) and the CH50 test (for the classical pathway) are measured using ELISA or RID methods. Both of these methods are described and compared in the practical part of this bachelor's thesis in terms of time, complexity of preparation and economic costs for laboratories. In the practical part there is a statistical description of individual methods and a correlation coefficient is calculated. The correlation coefficient for ELISA and RID methods is 0,879 for the AH50 test and 0,86 for the CH50 test. These coefficients indicate that, despite the different preparation and processing, the ELISA and RID methods are similar in analyzing the results.

## **Předmluva**

Téma, které jsem si vybrala pro svoji bakalářskou práci, pojednává o problematice komplementového systému. I přesto, že byl komplement objeven až koncem 19. století, je důležitou součástí vrozeného imunitního systému. Jeho nedostatečná funkce má za následek řadu onemocnění a pro vyšetření celkového komplementového systému nebo jen jednotlivých složek se stále zavádí nové testy.

Cílem této bakalářské práce je porovnání obou metod, z hlediska náročnosti na přípravu a správnosti metod. Závěrem je vyhodnocení ekonomického rozdílu mezi využitím metody ELISA a RID.

## **Poděkování**

Děkuji panu Ing. Tomáši Vlasovi za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálních podkladů.



# OBSAH

SEZNAM GRAFŮ .....	11
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	12
SEZNAM TABULEK .....	13
SEZNAM ZKRATEK .....	14
ÚVOD.....	15
TEORETICKÁ ČÁST .....	16
1 IMUNITNÍ SYSTÉM.....	16
1.1 Buňky imunitního systému .....	17
1.2 Protilátky.....	18
2 NESPECIFICKÁ HUMORÁLNÍ IMUNITA .....	20
2.1 Komplement.....	20
2.2 Ostatní proteiny akutní fáze .....	22
2.2.1 CRP – C- reaktivní protein .....	23
2.2.2 SAA – Sérový amyloid A.....	23
2.2.3 PCT – Prokalcitonin .....	23
2.3 Interferony .....	24
3 AKTIVACE KOMPLEMENTU .....	25
3.1 Klasická cesta .....	25
3.2 Alternativní cesta .....	26
3.3 Lektinová cesta .....	27
3.4 Terminální (lytická) fáze .....	28
4 ONEMOCNĚNÍ U PORUCH KOMPLEMENTU.....	29
4.1 Hereditární angioedém.....	29
4.2 Deficity jednotlivých složek komplementu .....	30
4.2.1 Deficity složek klasické cesty.....	30
4.2.2 Deficity složek alternativní cesty .....	31
4.2.3 Deficity složek lektinové cesty.....	31
5 DIAGNOSTIKA PORUCH KOMPLEMENTU .....	33
5.1 Vyšetření jednotlivých složek komplementu.....	33
5.1.1 Vyšetření C3 a C4 složek .....	34
5.1.2 Vyšetření C1-INH .....	35
5.2 Vyšetření celkové aktivity komplementu .....	35
5.2.1 Test CH50.....	36
5.2.2 Test AH50 .....	36
6 LÉČBA ONEMOCNĚNÍ KOMPLEMENTU.....	38

6.1	Cílená léčba.....	38
6.2	Substituční léčba .....	39
PRAKTICKÁ ČÁST .....		40
7	CÍL A ÚKOLY PRÁCE .....	41
8	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY .....	42
9	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU .....	43
10	METODIKA PRÁCE .....	44
10.1	Test CH50 a AH50 stanoven metodou ELISA .....	44
10.2	Test CH50 stanoven metodou RID .....	46
10.3	Test AH50 stanoven metodou RID .....	49
11	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	51
11.1	Korelace mezi stanovením testu AH50 metodou ELISA a RID .....	51
11.2	Korelace mezi stanovením testu CH50 metodou ELISA a RID .....	51
11.3	Statistický popis jednotlivých metod .....	52
11.4	Ekonomické náklady .....	54
DISKUZE .....		56
ZÁVĚR.....		59
12	SEZNAM LITERATURY .....	60

## **SEZNAM GRAFŮ**

Graf 1 Korelace testu AH50 metodou ELISA a RID .....	51
Graf 2 Korelace testu CH50 metodou ELISA a RID .....	52

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 RID destička.....	47
-----------------------------	----

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Výsledné hodnoty pro test AH50 metodou RID .....	53
Tabulka 2 Výsledné hodnoty pro test AH50 metodou ELISA .....	53
Tabulka 3 Výsledné hodnoty pro test CH50 metodou RID.....	54
Tabulka 4 Výsledné hodnoty pro test CH50 metodou ELISA .....	54
Tabulka 5 Hodnota bodů pro vyšetření metodou RID .....	55
Tabulka 6 Hodnota bodů pro vyšetření metodou ELISA .....	55

## **SEZNAM ZKRATEK**

aHUS .....	atypický hemolyticko-uremický syndrom
APP .....	proteiny akutní fáze
C1-INH .....	C1 inhibitor
CRP .....	C-reaktivní protein
HAE .....	Hereditární angioedém
HDL .....	vysokodenzitivní protein
HSV2 .....	Virus herpes simplex typu 2
INF .....	Interferony
IS .....	Imunitní systém
MAC .....	Komplex aktivující membrány
MBL .....	Lektin vázající manózu
PCT .....	Prokalcitonin
PNH .....	Paroxysmální noční hemoglobinurie
RA .....	Revmatoidní artritida
RID .....	Radioimunodifúze
SAA .....	Sérový amyloid A
SLE .....	Systémový lupus erytematodes

## ÚVOD

Komplementový systém je nedílnou součástí vrozeného imunitního systému. Jedná se o humorální složku, která stojí v první obranné linii při napadení organismu patogenními agens. Finální produkty komplementu napadají cizorodé látky a poškozené buňky, které poté likvidují. Komplementový systém je složen z řady proteinů, a proto je důležitá správná funkce jednotlivých složek komplementu a jejich regulačních mechanismů. Porucha komplementu způsobuje především bakteriální infekce, ale může vyvolat také virové nebo pyogenní choroby. Při nadměrné tvorbě některých složek může komplement napadat vlastní buňky organismu a vyvolat autoimunitní onemocnění. Systém komplementu může být aktivován třemi cestami - klasickou, alternativní nebo lektinovou. Tyto cesty se od sebe liší počáteční fází, která pomocí kaskádového mechanismu vede ke vzniku C5 konvertázy. Tato konvertáza je důležitou složkou spouštějící konečnou lytickou fázi, která je pro všechny tři cesty společná. Laboratorními testy stanovujeme jednotlivé složky komplementu nebo jeho celkovou aktivitu. Nejčastějšími složkami, které můžeme vyšetřit, jsou proteiny C3 a C4 nebo inhibitor C1 (C1-INH). Dále se pro celkovou aktivitu komplementu využívají testy CH50 pro klasickou cestu a AH50 pro alternativní cestu. Tyto testy lze vyšetřit metodou ELISA nebo radioimunodifúzí (RID), jejichž výhody a nevýhody porovnávám v praktické části této bakalářské práce.

Na začátku teoretické části se věnuji imunitnímu systému a konkrétně se zaměřuji na nespecifickou humorální imunitu. Dále popisuji jednotlivé cesty pro aktivaci komplementového systému a onemocnění, která jsou způsobena nedostatečnou funkcí komplementu. Na závěr teoretické části se zabývám vyšetřením a léčbou komplementového systému.

V praktické části této bakalářské práce popisuji a srovnávám metody ELISA a RID, které se rutinně využívají v laboratořích pro stanovení celkové aktivity komplementového systému. V této části popisuji postupy laboratorních vyšetření a zabývám se konkrétně správností metody, interpretací výsledků a vyhodnocení ekonomického rozdílu mezi těmito metodami.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 IMUNITNÍ SYSTÉM

Během života jsme neustále vystavováni působení infekčních agens, a přesto jsme ve většině případů schopni odolávat infekcím. Je to náš imunitní systém, který nám umožňuje odolávat nakažám. Jednobuněčné organismy jsou například bakterie, prvoci a houby, jsou schopny využívat nejstarší obranný mechanismus, kterým je fagocytóza. I když u těchto organismů plní spíše funkci přijímání potravy. (Ferenčík, a další, 2005)

Imunitní systém člověka je složen z několika typů buněk a velkého množství látek, které mají schopnost rozpoznat a zničit choroboplodné zárodky mikroorganismů a naopak dokážou rozeznat a snášet prospěšné mikroby. Stejně to funguje i při rozpoznávání vlastních normálních buněk a patologických buněk, tj. nádorové buňky nebo buňky, které jsou napadeny virem. Tyto základní úlohy jsou udržovány regulačními mechanismy, jejich porucha může způsobit, že některé složky IS začnou napadat vlastní struktury, buňky a tkáně. Tehdy se jedná o imunopatologické reakce (alergie, autoimunitní onemocnění). (Ferenčík, a další, 2005)

Rozpoznané molekuly nazýváme antigeny. Za fyziologických podmínek přítomnost cizích nebo odcizených antigenů spouští imunitní reakci. Imunitní reakce může probíhat formou tvorby protilátek, cytokinů nebo buněk zabezpečující imunitu. (Ferenčík, a další, 2005)

V některých případech může dojít k nepřiměřené nebo nedostatečné imunitní reakci na antigeny a jiné podněty. Tento imunopatologický stav se nazývá imunodeficience. Projevuje se především zvýšenou náchylností k infekcím. Vrozená (primární) imunodeficience je geneticky podmíněna. Způsobuje závažnější, v některých případech život ohrožující, onemocnění. Získaná imunodeficience, označovaná také jako sekundární, vyvolává oproti vrozené imunodeficienci, méně závažnější onemocnění. (Ferenčík, a další, 2005)

Pokud imunitní systém odpovídá nepřiměřeně velkou reakcí na určitý antigen, označujeme antigen jako alergen. V tomto případě jde o přecitlivělou imunitní reakci, která způsobuje hypersenzitivní a alergické stavy. (Ferenčík, a další, 2005)



Jednou z důležitých vlastností IS je paměť. Složky imunitního systému jsou schopné si při prvním kontaktu s patogenem zapamatovat jeho antigen. A při dalším kontaktu s tímto antigenem složky imunitního systému reagují rychleji a s větší intenzitou. (Ferenčík, a další, 2005)

Další vlastností je specifická. Imunitní systém spouští imunitní reakci i proti malé části antigenu. Tento úsek molekuly se nazývá epitop nebo antigenní determinant. Poté, co vznikne protilátka proti určitému determinantu, bude protilátka obvykle reagovat pouze s tímto epitopem a s determinantem izolovaným z kompletního antigenu. Izolovaný determinant má funkci haptenu, nemůže navodit tvorbu protilátek, ale je schopen se navázat na protilátky, jejichž tvorbu vyvolal kompletní antigen. (Ferenčík, a další, 2005)

Poslední důležitou vlastností imunitního systému je jeho rozmanitost. I přesto, že se s některými epitopy za celý život nesešel, vytváří mnoho imunitních odpovědí na tyto antigenní determinanty. (Ferenčík, a další, 2005)

## **1.1 Buňky imunitního systému**

Po vniknutí cizorodé látky do organismu se na imunitní odpovědi podílí buňky imunitního systému, známé jako leukocyty. Dalšími buňkami, které se účastní imunitní reakce, jsou podpůrné a nápomocné buňky. (Ferenčík, a další, 2005)

Leukocyt neboli bílá krvinka je krevní buňka se schopností bojovat proti virům, bakteriím a ostatním patogenům. Tvorba leukocytů probíhá v kostní dřeni z kmenových pluripotentních buněk. Rozdílný vývoj leukocytů vedl k jejich diferenciaci. Diferenciace má za následek vznik několika typů bílých krvinek lišících se tvarem, velikostí, strukturou i funkcí. Bílé krvinky se rodí na dvě základní linie. (Hořejší, a další, 2005)

V rámci myeloidní linie vznikají erytrocyty a trombocyty, které můžeme zařadit mezi pomocné buňky IS, přestože nepatří mezi leukocyty. Dále se z myeloidní linie vyvíjí monocyty a granulocyty. Charakteristickým znakem granulocytů jsou granula obsažené v cytoplazmě. Granulocyty dělíme na eosinofily, neutrofile a basofily. Všechny buňky vznikající z myeloidní linie jsou schopné fagocytózy a jsou součástí nespecifického imunitního systému. (Hořejší, a další, 2005)

Z lymfoidní linie vznikají B-lymfocyty podílející se na specifické humorální imunitě. Po kontaktu s antigenem se B-lymfocyty přemění na plazmatické buňky, které tvoří protilátky. T-lymfocyty jsou další buňky vznikající z lymfoidní linie. Název T-lymfocytů

je odvozený od slova thymus neboli brzlík, kde dochází k jejich vývoji. T-lymfocyty nejsou schopny tvořit protilátky, pouze usměřňují a podporují funkci protilátek. (Hořejší, a další, 2005)

Poslední buňky z lymfoidní linie jsou NK-buňky. NK-buňky představují základní buňky přirozené obrany. Nespecifickým způsobem zabíjí nádorové buňky nebo buňky napadené virem. (Ferenčík, a další, 2005)

Důležité součásti imunitního systému jsou i protilátky, HLA-molekuly, cytokiny nebo imunohormony. Jedná se o molekuly imunitního systému, které mají důležitou roli v bezprostřední obraně proti patogenním mikroorganismům nebo mohou řídit a regulovat průběh imunitních reakcí. (Ferenčík, a další, 2005)

## 1.2 Protilátky

Protilátky jsou známy už od konce 19. století, kdy je tak pojmenoval německý chemik a lékař Paul Ehrlich. Protilátky jsou bílkoviny, které vznikají v mízní tkáni. Jejich funkci v těle plní glykoproteiny, které označujeme jako imunoglobuliny. Molekuly všech imunoglobulinů mají stejnou základní strukturu. Skládají se ze dvou lehkých a dvou těžkých identických řetězců a společně vytváří tvar „Y“. Na konci obou ramének rozlišujeme oblast hypervariabilní, kde dochází k rozpoznávání antigenu a kam antigen zapadá ve formě „klíč-zámek“. Tato variabilní oblast se také nazývá jako antigen navazující fragmenty, tzv. Fab a skládá se z lehkého a těžkého řetězce. Každý antigen má vlastní specifickou protilátku, proto se protilátka napojí pouze na svůj antigen. Díky této vlastnosti může vznikat mnoho variant protilátek. Na druhém konci „nožičky“ imunoglobulinu, který je tvořen dvěma těžkými řetězci, je tzv. Fc fragment. Tento Fc fragment se váže s Fc receptory na bílých krvinkách. (Ferenčík, a další, 2005)

Imunoglobuliny se rozdělují do pěti tříd. Nejčastěji v krvi cirkulují protilátky IgM a IgG. IgM protilátky se vyskytují v séru převážně jako pentamer, v některých tělních sekretch a na povrchu B-lymfocytů. Tvoří se při první reakci s antigeny a to zejména s antigeny cizích erytrocytů nebo s buňkami bakterií. Tato třída protilátek slouží také jako dobrý aktivátor komplementu. Naopak IgG protilátky vznikají až při druhém nebo dalším kontaktu, navazují se tedy s antigeny, které jsou již organismu známy. Tyto protilátky jsou přítomny hlavně v séru a tkáňovém moku ve formě monomeru. IgG protilátky jako jediné prochází placentou, to jim umožňuje chránit plod s ještě nevyvinutým imunitním systémem před patogenními zárodky. Tvorbu těchto dvou typů protilátek spouští cizorodé částice,

které se prostřednictvím krve dostanou do sekundárních lymfatických orgánů. To znamená, že IgM a IgG protilátky jsou součástí celkové neboli systémové imunitní reakce. Protilátky třídy IgA se účastní místní čili lokální imunitní reakce. Protilátky třídy IgA vznikají pouze tehdy, pokud se antigeny dostanou do těla povrchem sliznice. V slzách, slinách a dalších sekretech sliznic nacházíme i jinou formu IgA, kterou označujeme jako sekreční – sIgA. Její největší funkcí je ochrana sliznice. V nízké koncentraci se v séru vyskytuje třída IgD. Její funkce typické protilátky je omezená, může tvořit membránové proteiny mladých B-lymfocytů a je součástí antigenních receptorů. Nízkou koncentraci v séru mají protilátky IgE, vyskytují se na membráně bazofilních granulocytů a žírných buněk. Původně byla jejich funkce důležitá hlavně na obranu proti parazitům, nyní jsou známé především jako protilátky vytvářející imunitní reakci na různé typy alergenů. (Ferenčík, a další, 2005)

## 2 NESPECIFICKÁ HUMORÁLNÍ IMUNITA

Podle reakce IS na přítomnost a rozpoznání antigenu v organismu rozlišujeme dva typy imunity. (Hořejší, a další, 2005)

Nespecifická neboli vrozená imunita vytváří přirozenou imunitní odpověď. Jedná se o evolučně starší typ mechanismu a je založený především na buňkách a molekulách, které působí proti mnoha různým antigenům. Složky vrozené imunity jsou schopné na škodliviny reagovat během několika minut, proto jsou součástí první obranné linie proti infekci. Naproti tomu specifická neboli získaná imunita, která pomocí vysoce specifických molekul a buněk působí na cizorodou strukturu, se teprve po setkání s daným antigenem aktivuje a vytvoří tak získanou imunitní odpověď. Tento proces je charakteristický imunologickou pamětí a trvá několik dní až týdnů, než dojde k úplnému rozvoji této imunitní reakce. (Hořejší, a další, 2005)

Oba typy imunitního systému jsou tvořeny buněčnými a humorálními složkami. Do buněčné složky přirozené imunity patří především fagocytující buňky a „přirození zabíječi“ NK-buňky, dále se zapojují i endotelové a epitelové buňky nebo žírné buňky. Humorálních mechanismů nespecifické imunity se účastní komplementový systém, interferony, mnohé cytosiny, sérové proteiny a jiné molekuly. (Hořejší, a další, 2005)

Důležitou součástí jsou i neimunitní obranné mechanismy, které se také podílejí na vrozené imunitě. Patří mezi ně mechanické, fyziologické a biochemické překážky, které zabraňují vniknutí škodlivých látek do těla. Pohyb řasinek, mastné kyseliny na kůži, pH v žaludku a další enzymy a jiné látky na sliznicích chrání organismus před infekcí a následným tkáňovým poškozením. (Ferenčík, a další, 2005)

Všechny mechanismy vrozené imunity, buněčné, humorální i neimunitní, působí nespecificky proti různým patogenním zárodkům a předpokládá se, že jsou schopné zlikvidovat 80-90 % infekčních příhod, s nimiž se celý život setkáváme. (Ferenčík, a další, 2005)

### 2.1 Komplement

Komplement byl objeven koncem 19. století jako tepelně nestálá složka čerstvého krevního séra. Společně se specifickými protilátkami se přidával k suspenzi bakterií a zvyšoval tak usmrcení a lýzu oněch bakterií. Nejdříve byla tato část séra nazývána alexin, tento odborný výraz zavedl Jules Bordet, původní objevitel tohoto jevu. Později byl Paulem

Ehrlichem zaveden termín komplement a to díky jeho schopnosti doplňovat (komplementovat) protilátky při usmrcování bakterií. (Ferenčík, a další, 2005)

Komplement byl objeven jako „doplňěk“ antibakteriální aktivity protilátek. V následujících letech bylo zjištěno, že se může komplement aktivovat na počátku infekce sám i bez přítomnosti protilátek. V současné době je velmi pravděpodobné, že se komplement vyvinul jako součást vrozeného imunitního systému, ve kterém stále hraje důležitou roli. (Janeway, a další, 2001)

Komplement je směs více látek, proto ho lze nazývat i jako komplementový systém. Jedná se o soubor 40 sérových a membránových proteinů. Tyto proteiny se vyskytují v krevním séru a na povrchu buněk, kde se pak vytváří různé receptory. (Ferenčík, a další, 2005)

Většina složek komplementu vzniká v tělesných tekutinách bez škodlivých účinků, cirkulují v séru ve funkčně neaktivní formě tzv. zymogeny. Teprve až v místě infekce se komplementový systém pomocí enzymů aktivuje. Kaskádovitým mechanismem se poté štěpí první složky komplementu. Pomocí tohoto mechanismu pak každá následující enzymatická reakce silně zesiluje aktivaci proteinů komplementového systému. Po aktivování komplementového systému by docházelo k rychlé tvorbě nepřiměřené odpovědi, a proto jsou důležitou součástí i některé regulační mechanismy. Ty zabraňují nekontrolovatelné aktivaci komplementu. (Janeway, a další, 2001)

Nezanedbatelné množství odlišných plazmatických proteinů mezi sebou navzájem reaguje a podporuje tak jednu z hlavních funkcí komplementu – opsonizaci. Opsonizace je proces, kdy se na patogen navážou látky, které usnadňují vazbu patogenu a fagocytující buňky a zvyšují tak účinnost její fagocytózy. Komplement se dále podílí na indukci řady zánětlivých reakcí, které pomáhají v boji proti infekci. (Janeway, a další, 2001)

Kromě opsonizace existují ještě další dva způsoby, jakými komplementový systém bojuje s infekcí. Některé komponenty jsou proteolytickým štěpením rozděleny na malé fragmenty, které dokážou stimulovat chemotaxi. Tyto fragmenty chemotaxi povolávají do místa zánětu fagocytující buňky a aktivují je. (Janeway, a další, 2001)

Třetím způsobem boje proti infekci je poškození buňky vytvořením pórů na její cytoplazmatické membráně. Vzniklými póry do buňky proudí voda a zvětšuje tak její objem. Následně dojde k prasknutí a vnitřní obsah buňky se uvolní do organismu. Komplex,

který tímto způsobem umí ničit bakterie a další cizorodé látky se nazývá komplex aktivující membrány – MAC. (Ferenčík, a další, 2005)

Mezi nejdůležitější složky komplementového systému patří sérové proteiny C1 – C9. Vznikají v jaterních buňkách a makrofágách, odkud jsou poté uvolňovány do krevního oběhu. Aby byly aktivovány jednotlivé proteiny komplementu, musí být nejdříve přeměněna první složka C1. Neaktivní forma C1 se změní na aktivní proteolytický enzym, ten je schopný poté štěpit molekulu na dva fragmenty (a,b). Fragmenty „a“ jsou menší a mají jinou biologickou aktivitu, většinou slouží jako anafylatoxiny, zvyšují propustnost cév a vyvolávají stahy hladkého svalstva. Fragmenty značené „b“ se podílí na proteolytické aktivitě, štěpí následující složky a dále tak aktivují komplementový systém. (Ferenčík, a další, 2005)

Glykoprotein C3 je ústřední komponent, jeho fragment C3b se pomocí kovalentních vazeb pevně váže na membránu mikroorganismů. V této kaskádovité reakci vzniká množství meziproduktů, které mají různé biologické funkce jako opsonizace nebo chemotaxe. Koncovou složkou je již zmiňovaný komplex atakující membrány MAC, který ničí membránu mikroorganismů a způsobuje tak jejich smrt. (Ferenčík, a další, 2005)

## **2.2 Ostatní proteiny akutní fáze**

Při poškození tkáně nebo rychlým nárůstem nádorových buněk se rozvíjí reakce akutní fáze. Během tohoto fyziologického děje se z buněk uvolňují látky, které vyvolávají rychlé změny při tvorbě některých proteinů a výrazně tak mění jejich koncentraci v plazmě. (Maruna, c2004)

Proteiny akutní fáze – APPs jsou další důležitou součástí vrozené humorální imunity. Tyto proteiny jsou syntetizovány především jaterními buňkami a vytváří odpověď na aktivaci imunitního systému. Jejich hlavní funkce se vztahuje především k obraně proti patogenům a zahrnuje i obnovu vnitřního prostředí. Za normálního stavu je jejich hladina v séru velmi nízká, v některých případech ji nedokážeme ani změřit. (Maruna, c2004) (Bartůňková, a další, 2011)

Mezi reaktanty akutní fáze patří všechny proteiny, které při zánětlivé reakci změni svou sérovou koncentraci o 25%. Dělíme je na pozitivní a negativní APPs. Nejdůležitější pozitivní protein je C-reaktivní protein, jehož plazmatická koncentrace má rychlý a vysoký nárůst. Dále do této skupiny patří také sérový amyloid A nebo prokalcitonin . Tyto reaktan-

ty akutní fáze označujeme jako pozitivní APPs, protože jejich koncentrace se v přítomnosti zánětu zvyšuje. Zvýšená tvorba pozitivních APPs se využívá jako citlivý indikátor zánětu. Naopak koncentrace negativních proteinů, jako je třeba prealbumin, albumin nebo transferrin, v séru klesá. (Racek, c2006)

### **2.2.1 CRP – C- reaktivní protein**

Jeho hlavní funkcí je rozeznat cizorodé nebo toxické látky, které jsou uvolňovány z místa poškození. Dokáže se navázat nejen s C-polysacharidem streptokoků, odtud se odvozuje jeho název, ale i s dalšími polysacharidy na povrchu některých bakterií. Poté co je navázán se spustí klasická cesta komplementu. (Racek, c2006)

Patří mezi nejdůležitější reaktanty akutní fáze, protože jeho hladina se může zvýšit už po čtyřech hodinách po navození akutní fáze a během prvních dnů jeho koncentrace vzroste až stonásobně. Při takovém rychlém a vysokém navýšení hladiny CRP se většinou jedná o bakteriální nebo mykotické onemocnění. (Zima, 2007)

### **2.2.2 SAA – Sérový amyloid A**

SAA je skupina lipoproteinů vážících se na lipoproteiny s vysokou hustotou – HDL. SAA je schopný chemotaxe k zánětlivým buňkám a dokáže vychytávat zbytky lipidů a snižovat tak přenos cholesterolu do jater. Na druhou stranu jeho nadměrně dlouhodobé vylučování způsobuje sekundární amyloidózu. S rostoucím onemocněním roste i hladina SAA, která se zvyšuje také u některých maligních onemocnění. (Racek, c2006)

### **2.2.3 PCT – Prokalcitonin**

PCT je prekurzor hormonu kalcitoninu a za normálních podmínek tvoří buňky štítné žlázy. Při bakteriálním napadení nebo sepsi je produkován dalšími buňkami např. monocyty nebo makrofágy. Pokud je prokalcitonin vylučován těmito buňkami, nemění se poté na kalcitonin. (Liu, a další, 2015)

Hladina prokalcitoninu se změní už po dvou hodinách a navýšená koncentrace PCT vydrží až tři dny. (Racek, c2006)

Mezi další proteiny akutní fáze patří C3 a C4 složky komplementu. Hladina těchto reaktantů akutní fáze se změní až po třech dnech a maximální koncentrace dosáhnou po 6-7 dnech. Ze všech složek komplementu se právě C3 komponent vyskytuje v plazmě v největší koncentraci. Tyto komponenty jsou měřitelné, a proto jsou v klinické praxi stanovo-

vány. Převážně jsou produkovány jaterními buňkami, ale toxin, který je vylučován bakteriemi, indikuje jejich tvorbu také v monocytech a fibroblastech. (Racek, c2006)

### **2.3 Interferony**

Interferony jsou proteiny, které se účastní imunitní odpovědi, tzv. cytokiny a jsou tak produkovány různými buňkami IS během zánětlivé reakce na infekci. Poprvé byly objeveny téměř před 50 lety, jako molekuly se silnými antivirovými vlastnostmi. Kromě antivirových účinků se INF účastní také protinádorové odpovědi a zvyšuje obranyschopnost organismu. (Kline, a další, 2006)

Interferony  $\alpha$  a  $\beta$  se řadí do skupiny interferony typu I. Tvorba INF-I je vyvolána především virovou infekcí. Buňky, které jsou napadeny virem, zejména tzv. plazmacytoidní dendritické buňky, uvolňují do organismu INF-1. Vyprodukované interferony jsou poté schopné navázat se na receptory zdravých i napadených buněk a vyvolat v nich tzv. antivirový stav. Při antivirovém stavu se vyvolá produkce některých enzymů, které jsou schopné ztlumit množení virů. INF-I byly jako první vyrobeny pomocí technologie rekombinantní DNA a byly využity při léčbě rakoviny, autoimunitního onemocnění i virové infekce. (Hořejší, a další, 2005) (Kline, a další, 2006)

Do skupiny interferonů typu II patří pouze jedna složka, interferon  $\gamma$ . Jeho hlavní funkcí je kontrola nemocí vyvolaná vnitrobuněčnými bakteriemi a parazity. Je schopný aktivovat fagocyty a zvyšuje schopnost ničit cizorodé mikroorganismy a nádorové buňky. Jedná se také o důležitou součást formulace imunitní odpovědi při plicních onemocněních. (Kline, a další, 2006)



### 3 AKTIVACE KOMPLEMENTU

Aktivace komplementu je pomocí enzymatického štěpení založena na kaskádovém mechanismu. Neaktivní prekurzor enzymu se přemění na katalytický enzym, který je schopný štěpit jednotlivé složky komplementu na fragmenty (a, b). Komplement se může aktivovat třemi cestami: klasickou, alternativní nebo lektinovou. Nejdůležitější stupeň, podle kterého dělíme aktivaci komplementu do těchto typů cest, je rozštěpení C3 – složky na fragmenty C3a a C3b. Klasická a alternativní cesta poté vede k produkci C5 konvertázy a C5b fragmentu. C5 konvertáza je podstatná pro tvorbu membránového útočného komplexu (MAC), který se účastní společné lytické fáze. (Mayer, 2017)

#### 3.1 Klasická cesta

Klasickou cestu spouští přítomnost protilátek IgM a některých podtříd IgG. Tyto protilátky reagují s antigenem a na jejich Fc oblast se připojí první složka komplementu protein C1. Protein C1 se navazuje na protilátku až potom, co vznikne vazba mezi protilátkou a antigenem, čímž se vytvoří komplex antigen-protilátka. C1 je složen ze tří podjednotek (C1q, C1r, C1s). Po vytvoření silné vazby s protilátkou pozmění svůj tvar a získá schopnost proteolytické aktivity. (Mayer, 2017)

Když se C1q spojí s protilátkou, aktivuje se C1r a touto reakcí se následně aktivuje C1s protein. Výsledným produktem je enzym, který štěpí C4 na C4a a C4b fragmenty. Kratší fragment C4a je uvolněn do prostředí a slouží v organismu jako anafylatoxin. Jedná se o látku, která zvyšuje cévní propustnost, aktivuje bazofily a mastocyty a může vyvolat anafylaxii. Fragment C4b se připojí k cílové membráně a je důležitý pro vytvoření dalšího komplexu. (Mayer, 2017)

Aktivovaný protein C1 také dokáže štěpit složku komplementu C2. Při tomto štěpení vznikne fragment C2a, který se na cíleném povrchu napadené buňky váže s C4b a tvoří konvertázu C3. C3 konvertáza je důležitá pro další průběh této kaskádové reakce. Druhý vzniklý fragment se uvolňuje do prostředí, kde slouží jako prokinin, který v aktivní formě vede ke vzniku edému. (Mayer, 2017)

C3 konvertáza neboli C4bC2a je další důležitá část komplementového systému. C3 konvertáza štěpí protein C3 na fragmenty C3a a C3b. C3a fragment je kratší a funkcí se podobá C4a, dokáže vyvolat zánětlivou reakci. Na druhé straně C3b fragment nasedá ke C4b a C2a složce a společně vytváří C5 konvertázu. (Mayer, 2017)

Závěrem klasické cesty je právě C5 konvertáza, jedná se o poslední proteolytický enzym v této kaskádě. Na jeho rozštěpený fragment C5b, který se napojuje na membránu, se okamžitě navazují poslední složky komplementu a vzniká MAC. (Ferenčík, a další, 2005)

Klasická cesta je náročná a trvá poměrně dlouho, proto je důležité, aby byla správně regulována tvorba všech složek komplementu. Důležitou součástí regulace tohoto procesu jsou některé faktory, inhibitory a další látky. Například porucha inhibitoru C1 (C1-INH) je spojena s geneticky podmíněným onemocněním hereditárního angioedému. (Ferenčík, a další, 2005)

### **3.2 Alternativní cesta**

Druhý způsob, jak aktivovat komplementový systém, je pomocí alternativní cesty. Proces je velmi rychlý, složky komplementu se spustí ihned po kontaktu s látkami navozujícími jeho aktivitu. Mezi tyto látky patří polysacharidy, velké viry, některé nádorové buňky a další mikroorganismy. Důležitým stupněm je opět aktivace proteinu C3. V tomto případě je ale protein C3 spouštěn pomocí faktorů B a D, čímž se tato cesta odlišuje od cesty klasické. (Ferenčík, a další, 2005)

Zpočátku je v minimální míře a frekvenci samovolně štěpena složka C3 na C3a a C3b. Větší fragment C3b se rychle naváže silnou kovalentní vazbou na povrch mikroorganismu nebo i na membránu své vlastní buňky. Teprve po vzniku tohoto spojení je aktivována další kaskáda reakcí. Faktor B je štěpen faktorem D na Ba a Bb, kdy fragment Bb se napojí na již navázaný fragment C3b. (Hořejší, a další, 2005)

Po této reakci vzniká na povrchu buňky komplex C3bBb, jehož nazýváme alternativní C3 konvertáza, který je stabilizován faktorem P (properdin). Alternativní C3 konvertáza má stejné vlastnosti jako C3 konvertáza v klasické cestě. Dokáže velmi účinně štěpit protein C3 na C3a a C3b fragmenty. Opět se opakuje stejná reakce, C3a fragmenty jsou uvolňovány do mikroprostředí, kde se účastní dalších biologických funkcí. Zatímco C3b částice mnohonásobně zvyšují tvorbu alternativní C3 konvertázy, ze kterých se tvoří složitější komplexy. Fragmenty C3b, které nejsou součástí C3 konvertázy se připojí na aktivní komplex a slouží jako opsoniny. Štěpením proteinu C5 pomocí C5 konvertázy vznikají složky C5a a C5b, které se účastní poslední lytické fáze. (Hořejší, a další, 2005)

Jedná se o reakci, která může probíhat i bez přítomnosti protilátek. Alternativní cesta proto patří mezi složky první linie imunitního systému proti infekčnímu napadení. Tuto reakci mohou spustit bakterie, viry, paraziti, ale i další proteiny, např. proteázy nebo produkty koagulace. (Hořejší, a další, 2005)

I v tomto způsobu aktivace komplementového systému je zapotřebí několika regulačních proteinů. Jejich role je důležitá, protože alternativní cesta komplementového systému je spouštěn spontánním nespecifickým způsobem a může reagovat i s vlastními buňkami, což by mohlo vést k poškození zdravých buněk organismu. (Hořejší, a další, 2005)

Mezi významné regulační proteiny patří faktor H. Faktor H je rozpustný glykoprotein, jehož fyziologická hladina v séru se pohybuje mezi 0,3 – 0,5 mg/ml. Jeho hlavní funkcí je regulace a kontrola nadbytku alternativní cesty komplementu. Faktor H potlačuje aktivitu C3b fragmentu, který je součástí klíčové složky C3 a alternativní C3 konvertázy. Faktor H reguluje alternativní cestu vazbou na C3b fragment, vytěsněním Bb složky z komplexu C3bBb nebo spuštěním kofaktoru, štěpící fragment C3b. Aktivní forma faktoru H se vyskytuje v tekuté fázi i na povrchu buněk, kde je vázaná na fragment C3b. (Liszewski, a další, 1996)

### **3.3 Lektinová cesta**

Lektinová cesta je podobná klasické cestě. Rozdíl je už na začátku, kdy není spouštěna složkou C1, ale sérovým lektinem. Přesněji se jedná o lektin vázající manózu – MBL, glykoprotein, který je schopný vázat se na sacharidy na povrchu mikrobů. Po vytvoření vazby je schopný štěpit složky C4 a C2. Funkcí, ale i jeho strukturou, se tak podobá C1 proteinu. (Hořejší, a další, 2005)

Aktivace lektinové cesty začíná vazbou MBL na patogen. Vytvořená vazba vyvolá tvorbu MASP-1 a MASP-2. To jsou enzymy obsahující serin, který štěpí některé bílkoviny. Tyto, tzv. serinové proteázy, můžeme přirovnat k C1r a C1s složkám z klasické cesty komplementu. MASP-1 a MASP-2 se napojí na MBL a vznikne komplex, který vyvolá další reakci. Celý komplex se nazývá MASP, jedná se o obdobu proteinu C1. Stejně jako C1 dokáže MASP štěpit C2 a C4 složky. (Mayer, 2017)

Dále proces probíhá stejně jako u klasické cesty. Tvoří se produkty, které se vylučují do prostředí a účastní se dalších biologických reakcí, nebo se následně vážou na mikroby a spouštějí tak další kaskádu reakcí. (Mayer, 2017)

### **3.4 Terminální (lytická) fáze**

Závěrečnou fází komplementového systému, kdy dochází k rozpadu a tedy usmrčení buňky (lýze), je terminální lytická fáze. Všechny cesty jsou ukončeny produkcí C5 konvertázy, která štěpí složku C5 na C5a a C5b. Fragment C5b se naváže se složkami C6 a C7 a včlení se do membrány napadené buňky. Nakonec se navážou poslední složky komplementového systému C8 a C9 a vytvoří se finální membránový útočný komplex MAC (C5bC6C7C8C9). Pomocí komplexu MAC vzniknou v membráně atakované buňky póry, kudy vytéká veškerý obsah buňky. Osmotická rovnováha je narušena a buňka podléhá lýze. (Mayer, 2017)

## 4 ONEMOCNĚNÍ U PORUCH KOMPLEMENTU

Porucha komplementového systému je vyvolána nedostatkem jeho jednotlivých složek. Lidé s poruchou komplementu trpí klinickými problémy projevujícími se různým způsobem. Mezi nejčastější klinické příznaky patří opakované bakteriální a pyogenní infekce a angioedémy vyvolávající genetické onemocnění, hereditární angioedém. Poruchy komplementu mohou vést k onemocnění ledvin, vaskulitidě nebo autoimunitnímu onemocnění. Příznaky, kterými se projevuje nedostatek komplementu, závisí na špatné funkci konkrétní složky. (Immune Deficiency Foundation, 2015)

Infekce způsobené některými bakteriemi souvisí především se špatnou funkcí C1, C2 a C4 složky. Porucha těchto složek může v některých případech vést k onemocnění, jako je systémový lupus erythematosus (SLE), který je vyvolán nedokonalým odstraňováním komplexu antigen – protilátka. Kromě bakteriálního onemocnění může deficeence komplementu, konkrétně složky C3, způsobit i hnisavé infekce. Zbylé poškozené složky C5 – C9 jsou schopné vyvolat chronické onemocnění, které v horších případech vede k zánětu mozkových blan. (Ferenčík, a další, 2005)

Poruchy se netýkají pouze složek klasické cesty, ale i faktorů v cestě alternativní. V tomto případě se jedná o deficeence velmi vzácné. (Ferenčík, a další, 2005)

### 4.1 Hereditární angioedém

Hereditární angioedém (HAE) je velmi vzácné a geneticky podmíněné onemocnění. Pacienti touto chorobou trpí už od dětství, ale diagnostikována je převážně až v pozdním věku. HAE je typický zejména velkými otoky, které v některých případech ohrožují pacienta na životě. (Campos, a další, 2020)

Hereditární angioedém postihuje přibližně 1:50 000 lidí a je klasifikován do tří typů. Do těchto typů se dělí na základě nedostatečné funkce nebo úplné nepřítomnosti C1-INH. C1-INH je proteáza, která reguluje klasickou dráhu komplementového systému. Hlavní funkcí C1-INH je utlumení proteolytické aktivity C2 a C4 složek. Dále je C1-INH schopný inhibovat koagulační faktor XII a tvorbu plazminu a bradykininu. Bradykinin je hlavní mediátor angioedémů. Nízká hladina C1-INH v séru nebo jeho nedostatečná funkce způsobují nadměrnou produkci bradykininu, který se hromadí ve tkáních a vytváří otoky. (Miranda, a další, 2013)

Opakované záchvaty angioedému jsou nejčastějším klinickým příznakem HAE. Zvýšená permeabilita cév usnadňuje průnik tělní tekutiny do okolních tkání, kde se tekutina ukládá a vytváří otoky. Angioedémy vyskytující se zejména na končetinách, mohou být bolestivé a omezovat pacienta při pohybu. Mnohem závažnější bývají angioedémy na horních cestách dýchacích, které vedou k udušení. (Campos, a další, 2020)

HAE je autozomálně dominantní onemocnění a je řazen do tří typů. Nejčastější HAE typu I se vyskytuje přibližně u 85 % pacientů postižených touto nemocí. HAE typu I je způsoben zejména sníženou tvorbou C1-INH. Snížená produkce C1-INH snižuje jeho funkční aktivitu na 5 – 40 % normálu. Hereditárním angioedémem typu II trpí 15 % postižených pacientů. Při tomto typu HAE je hladina C1-INH v séru naměřena ve fyziologických hodnotách, v některých případech i zvýšená. Příčinou HAE typu II je nedostatečná aktivita C1-INH. (Patel, a další, 2019)

Třetí typ HAE byl popsán roku 2000 a vyskytuje se převážně u žen s normální hladinou C1-INH. Proto ho nazýváme jako angioedém s normální aktivitou C1 nebo estrogen-dependentní dědičný angioedém. Třetí typ HAE má stejné klinické příznaky jako typ I a II. V některých ověřených případech je HAE typu III způsoben zvýšenou hladinou estrogenu. Hladinu estrogenu zvyšuje užívání perorální antikoncepce nebo těhotenství. (Miranda, a další, 2013)

## **4.2 Deficity jednotlivých složek komplementu**

Poruchy komplementu bývají ve většině případů dědičné. Nejčastějším typem dědičnosti je autozomálně recesivní forma, zahrnující nízkou hladinu složky C1 – C9 a lektin vázající manózu. Nedostatek komplementu může být také způsoben autoimunitou, nadměrnou spotřebou komplementu, nepřiměřenou tvorbou proteinových složek nebo vysokými katabolickými stavy. (Mollah, a další, 2020)

### **4.2.1 Deficity složek klasické cesty**

Klasická cesta je odpovědná za rychlé odstraňování umírajících buněk a komplexů antigen-protilátka, tzv. imunokomplexy. Tyto komplexy jsou poté v játrech navazovány na receptory komplementu, které se vyskytují na makrofágech. V případě, kdy jsou složky komplementu C1q, C1r, C1s a C4 poškozené neplní svoji funkci ničit tyto imunokomplexy. Imunokomplexy nabývají větších rozměrů a stávají se z nich nerozpustné usazeniny. Velké komplexy se pak ukládají do tkání a míst, kde se posléze začínají projevovat první známky zánětu. Snížená likvidace umírajících buněk vede ke změně vlastního antigenu, na

který se mohou navazovat autoprotilátky. Tyto protilátky při patologickém stavu bojují proti vlastnímu organismu a mohou vést ke vzniku autoimunitního onemocnění. Nedostatek C1q, C1r, C1s a C4 složky je úzce spojen s revmatoidní artritidou a systémovým lupus erythematoses. Tyto onemocnění jsou částečně vyvolány poruchou komplementu, který není schopný odstranit vzniklé imunokomplexy a poškozené buňky. (Immune Deficiency Foundation, 2015)

U dětských pacientů s častým výskytem infekcí horních dýchacích cest byl zjištěn nedostatek proteinu C2. V tomto případě je zánět dýchacích cest nejčastěji vyvolán bakterií *Streptococcus pneumoniae*. Děti s poruchou komplementové složky C2 trpí nachlazením a opakovanými záněty ucha. (Immune Deficiency Foundation, 2015)

#### **4.2.2 Deficity složek alternativní cesty**

Properdin neboli faktor P se účastní alternativní cesty komplementu. Jedná se o jediný protein komplementového systému, který je vázán na chromozom X. Faktor P je syntetizován monocyty, granulocyty a T-lymfocyty. A jeho hlavní funkcí je stabilizace alternativní konvertázy. Snížená aktivita alternativní cesty, vyvolaná nedostatečnou funkcí faktoru P, vede k častým bakteriálním infekcím. Následkem této bakteriální infekce je závažná nemoc meningitida, která je způsobena bakterií *Neisserie meningitidis*. (Immune Deficiency Foundation, 2015)

Dysfunkce nebo úplný nedostatek regulačního faktor H vede k nepřiměřené aktivitě alternativní cesty a k úbytku C3 složky. Nedostatečná funkce faktoru H způsobuje bakteriální onemocnění. Dále je spojena s atypickým hemolyticko-uremickým syndromem (aHUS) a dalšími formami onemocnění ledvin. (Immune Deficiency Foundation, 2015)

Faktor D a B se také podílí na aktivaci alternativní cesty komplementu. Ovšem nedostatky těchto faktorů jsou velmi vzácné a vyskytují se jen ojediněle. (Immune Deficiency Foundation, 2015)

#### **4.2.3 Deficity složek lektinové cesty**

Dysfunkce MBL v lektinové cestě postihuje přibližně 5 – 30 % jedinců. V některých případech bylo potvrzeno, že dítě je v prvních měsících na funkci lektinu závislé. Přesněji se jedná o období, kdy dítě nemá dostatek vlastních protilátek a hodnota protilátek získaná od matky klesá. V tuto dobu je důležitá schopnost lektinové cesty, která napomáhá organismu bojovat s bakteriálními infekcemi. U pacientů s nedostatkem MBL se také často

vyskytuje infekce způsobená HSV-2 nebo je zvýšená náchylnost k viru chřipky A.  
(Immune Deficiency Foundation, 2015)



## 5 DIAGNOSTIKA PORUCH KOMPLEMENTU

Při podezření na poruchu komplementu se využívají testy spojené s kvantifikací jednotlivých složek komplementu, testy stanovující hladinu C1-INH nebo screeningové testy celkové aktivity komplementového systému. Jedná se o vyšetření, která jsou běžně dostupná v diagnostických laboratořích. Analýza komplementu se dále rozšířila zavedením nových testů detekující produkty, které aktivují komplement a genetickým testováním. Genetické testy byly zavedeny, protože jsou schopné odhalit mutace a polymorfismy, které vyvolávají určité choroby spojené s nedostatkem komplementu. (Mollnes, a další, 2007)

Při analýze komplementu jsou nejprve funkčními testy vyšetřeny celkové aktivační cesty. Pomocí tohoto testování zjistíme, která cesta komplementového systému je poškozená. Dále se přímou analýzou měří hladina a funkční aktivita jednotlivých proteinů komplementu. Nejčastěji se měří hodnoty C3 a C4 složky nebo C1-INH. (Mollnes, a další, 2007)

Pro přesnou diagnostiku komplementu je velmi důležité správné odebrání a skladování vzorku. Důvodem je velmi nízká koncentrace komplementových složek v normální plazmě in vivo, která se ale velmi rychle zvyšuje in vitro. Důležité je ke krvi odebranou do zkumavek přidat Futhan. Oproti citrátu a heparinu Futhan účinně snižuje aktivaci komplementu. Nakonec se vzorek ochladí a oddělí se plazma, která je skladována při  $-70^{\circ}\text{C}$ . (Mollnes, a další, 2007)

### 5.1 Vyšetření jednotlivých složek komplementu

Při infekčních onemocněních, kdy tělo napadá cizorodé látky, se mění koncentrace jednotlivých složek komplementu. Změna hladiny během zánětlivých stavů zejména složek C3 a C4 je hlavním důvodem, proč můžeme tyto proteiny řadit mezi reaktanty akutní fáze. Ovšem nález zvýšené koncentrace C3 a C4 složek v séru neposkytuje více informací než elevace ostatních proteinů akutní fáze. (Jeseňák, a další, 2014)

Mnohem významnějším nálezem je snížená hladina složek komplementového systému, která může upozornit na onemocnění spojené s tvorbou imunokomplexů. Nízká koncentrace komplementových složek v séru může být vyvolána třemi podněty. Prvním impulsem je zvýšená spotřeba komplementu při imunopatologickém procesu. Další příčinou snižující hladinu komplementu je jeho nedostatečná syntéza a posledním podnětem je zvýšená přeměna komplementu in vitro. Nález snížené koncentrace komplementových složek slou-

ží k diagnostice vážných onemocnění, jako SLE, kryoglobulinémie nebo další imunokomplexové choroby. (Jeseňák, a další, 2014)

Vyšetření komplementu pomáhá při určování diagnózy i při posuzování terapeutické odpovědi. Z praktického hlediska se v klinické praxi stanovují především dva proteiny komplementového systému, a to C3 a C4. Důvodem, proč lze stanovit pouze tyto dvě složky, je velmi nízká koncentrace v séru a krátký poločas rozpadu ostatních látek komplementu. (Jeseňák, a další, 2014)

Komplementový systém by měl být vyšetřen pokaždé, když se v rodinné anamnéze vyskytne geneticky podmíněné onemocnění spojené s poruchou komplementu, např. hereditární angioedém, komplementové imunodeficience nebo aHUS. Dalšími podněty pro stanovení komplementu je onemocnění s účastí imunokomplexů, častá onemocnění způsobená bakterií *Neisseria* nebo opakující se otoky s neznámou příčinou. (Jeseňák, a další, 2014)

### **5.1.1 Vyšetření C3 a C4 složek**

Složka C3 je důležitým proteinem v komplementovém systému. Štěpení složky C3 na fragmenty C3a a C3b, je společným stupněm pro všechny cesty aktivující komplementovou kaskádu. Komplementové složky C3 a C4 mají vyšší koncentraci v séru než ostatní proteiny a proto můžeme hodnoty těchto složek naměřit. (Jeseňák, a další, 2014)

Pomocí vyšetření C3 a C4 složky je možné určit, zda jejich nedostatky nebo dysfunkce v komplementovém systému vyvolávají nebo přispívají k onemocnění člověka. Správná funkce C3 a C4 složky je pro organismus stejně důležitá, proto se tyto složky většinou vyšetřují společně. (Lab tests online, 2020)

Pro vyšetření jednotlivých složek komplementu, zejména C3 a C4 proteinu, se využívají standardní imunochemické metody. Pro správné sdělování výsledků je důležité, aby byly známé a ověřené referenční meze. Fyziologické hodnoty složek komplementu se mění s věkem. Proto je potřeba brát na vědomí rozdíl při analýze kojeneckého nebo dospělého vzorku. (Mollnes, a další, 2007)

Hladinu složek komplementového systému stanovujeme testy, jejichž princip je založený na tvorbě imunokomplexů. Nejčastější metody používané pro vyšetření složek komplementu jsou nefelometrie, turbidimetrie nebo radioimunodifúze. Při těchto testech je důležitá volba protilátek. Běžně jsou využívány polyklonální protilátky, které jsou schopné

stanovit různé proteinové varianty. Při měření tyto protilátky neberou v potaz funkční aktivitu testovaných složek. Metody stanovují složky C3 a C4 v jejich přirozeném, nezměněném stavu, ale i rozpustné fragmenty komplementových složek vytvořené v průběhu aktivace. Testy nejsou příliš citlivé na aktivaci složek komplementu in vitro, což může být považováno za výhodu. (Mollnes, a další, 2007)

Snížená hladina obou složek komplementového systému může být příčinou jejich vysoké spotřeby při imunopatologických reakcích. Naměřená nízká hodnota C3 a C4 složky je často spojována s autoimunitními onemocněními např. SLE. Pokud je snížená hladina pouze u složky C3, jedná se o onemocnění vyvolaná houbami nebo parazity, např. malárie. V případě, že v organismu probíhá akutní nebo chronický zánět, tak se hodnoty C3 a C4 složky zvyšují. Nastane-li tento případ, měří se vhodnější proteiny akutní fáze, např. CRP. Zvýšené hladiny složek komplementu můžeme pozorovat i při leukémiích, nádorovém onemocnění nebo ulcerózní kolitidě. (Lab tests online, 2020)

### **5.1.2 Vyšetření C1-INH**

C1 inhibitor je nejvýznamnější regulační protein komplementového systému, který kontroluje aktivaci složky C1. Inhibitor složky C1 váže C1s a C1r složky. Následkem této reakce je disociace složky C1q, která zůstává vázána na patogenu. Tímto způsobem je omezena doba, kdy aktivní složka C1s je schopna štěpit C4 a C2 proteiny. Nedostatek C1-INH se pojí s dědičným onemocněním hereditárního angioedému. (Janeway, a další, 2001)

Funkční test C1-inhibitoru je využíván k diagnostice hereditárního angioedému. Tento test se provádí pomocí běžně dostupných kvantitativních chromogenních testů. Testy pro stanovení C1-INH jsou založeny na principu, při kterém C1-INH slouží jako inhibitor pro enzym a následně je přidán chromogenní substrát. V případě podezření na hereditární angioedém jsou funkční testy pro vyšetření C1-INH povinné. Pokud pacienti trpí HAE typu I je hodnota C1-INH snížena. Naopak lidé s podezřením na HAE typu II mají hladiny C1-INH zvýšené nebo v normálu. (Mollnes, a další, 2007)

## **5.2 Vyšetření celkové aktivity komplementu**

Kromě stanovení jednotlivých složek komplementu můžeme vyšetřit i celkovou funkci komplementu. Pro stanovení celkové aktivity komplementové kaskády se využívají funkční testy CH50 a AH50. Pomocí testu CH50 hodnotíme klasickou cestu komplementu od začátku až po lytickou fázi. Pro alternativní cestu používáme test AH50. Oba testy fungují na stejném principu. Na závěr hodnotíme stupeň hemolýzy senzibilizovaných erytro-

cytů přidaných do séra. Funkční testy jsou velmi užitečné, pomocí těchto testů jsme schopní stanovit nedostatky komplementové kaskády a na základě vyhodnocení testů určit další specifické analýzy. Testy CH50 a AH50 jsou screeningové testy citlivé na nedostatečnou funkci, nepřítomnost nebo na sníženou hladinu jednotlivých složek komplementu. (Jeseňák, a další, 2014)

### **5.2.1 Test CH50**

Test CH50 je běžná metoda využívaná ke stanovení celkové aktivity klasické cesty komplementu. Jedná se o lytický test používající ovčí erythrocyty citlivé na protilátky. Tyto erythrocyty slouží jako aktivátor pro spuštění klasické cesty. Pro toto testování je požadována alespoň 50% lýza, a proto se testované sérum několikrát ředí. Po proběhnutí celkové reakce se procento hemolýzy měří spektrofotometricky. Protože komplex aktivující membránu se přímo podílí na naměřené hemolýze, je test CH50 nepřímým měřítkem pro hladinu komplexu aktivující membránu. (Costabile, 2010)

Pokud jsou hodnoty CH50 testu zvýšené, mohou být indikována vážná zdravotní onemocnění spojená s akutními nebo chronickými infekcemi. Vysokou hladinu CH50 může vyvolat také rakovina nebo ulcerózní kolitida. Ovšem tyto případy jsou spíše ojedinělé a zvýšená hladina testu CH50 není častým nálezem při vyšetření celkové aktivity komplementu. Mnohem častěji se při poruchách v komplementové kaskádě naměřují nízké hodnoty testu CH50. Snížená hladina CH50 je způsobena několika faktory. Pokud je naměřena nízká hodnota CH50 testu z důvodu nepřítomnosti některé ze složek komplementu, může to vést k rozvoji autoimunitního onemocnění. Snížená hladina komplementu může být vyvolána dědičným onemocněním, například hereditární angioedém. Další onemocnění spojené s nízkou hladinou testu CH50 je glomerulonefritida, SLE nebo cirhóza jater. U novorozenců v prvních měsících je nízká hodnota hemolýzy fyziologická. (Castro, a další, 2010)

### **5.2.2 Test AH50**

Funkční aktivitu alternativní cesty komplementového systému stanovují hemolytické testy. Tyto testy obecně fungují na stejném principu. Nařaděné testované vzorky jsou inkubovány s erythrocyty živočišného původu senzibilizovaných na protilátky. (Kirschfink, a další, 2003)

Test AH50 se využívá při podezření na poruchu v alternativní cestě. Tento test hodnotí celkovou aktivitu alternativní cesty komplementu a jako cílové buňky používá

králičí nebo kuřecí erythrocyty. Průběh testu probíhá stejně jako u testu CH50, liší se pouze ve spouštěcím mechanismu. Na králičí nebo kuřecí erythrocyty se naváže odštěpený fragment C3b. Poté je zahájena komplementová kaskáda, jejíž finální produkt způsobuje lýzu erythrocytů. (Kirschfink, a další, 2003)

Hodnota AH50 je v častých případech v normálních mezích. Jen ojediněle je naměřena nižší hladina properdinu a tento test musí být nahrazen jiným, specifitějším vyšetřením. Pacienti s nižší hladinou properdinu trpí častějším zánětlivým onemocněním. (Kirschfink, a další, 2003)

## 6 LÉČBA ONEMOCNĚNÍ KOMPLEMENTU

Poruchy komplementu jsou spojovány s řadou onemocnění. Jedná se o onemocnění, jejichž primární příčinou je nedostatečná funkce komplementu nebo o onemocnění, při kterých porucha komplementu vzniká až reakcí na poškození tkáně. Nedostatky komplementových složek vyvolané genetickými mutacemi se vyskytují velmi vzácně a bývají často spojovány s infekcemi nebo imunokomplexními onemocněními, zatímco nadměrná aktivace komplementu vede k zánětlivým, autoimunitním a degenerativním chorobám. Důležité je, že onemocnění vyvolaná dysregulací komplementového systému představují cíl pro farmaceutické společnosti, které vyvíjejí léky inhibující komplement. (Morgan, a další, 2015)

### 6.1 Cílená léčba

Už před 50 lety byly vydány stovky článků popisující výhody antikomplementové léčby v preklinických modelech. Přesto se do klinické studie dostala menšina léčivých přípravků, které neprošly ani první fází. Nedávný zájem farmaceutických společností o vývoj léků regulující komplement vzrostl až po zjištění, že poruchy komplementu jsou spojené s běžnými i genetickými onemocněními. (Morgan, a další, 2015)

Jedním z mála léků, který prošel klinickým testováním až na trh, je eculizumab. Eculizumab je lék používaný k léčbě paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH). Jedná se o vzácné onemocnění projevující se přerušovanou hemolýzou. PNH postrádá regulační protein komplementového systému CD59. Tento protein chrání červené krvinky před MAC. Eculizumab je monoklonální protilátka, která dlouhodobě působí na složku C5. Eculizumab inhibuje štěpení složky C5 a tím zabrání jejímu rozpadu na fragmenty C5a a C5b. Kvůli nedostatku fragmentu C5b není aktivovaná lytická fáze a nedochází k tvorbě MAC. U pacientů trpících PNH tento lék značně snižuje hemolýzu. Vedlejším účinkem eculizumabu u pacientů s PNH je zvýšená náchylnost k infekcím vyvolané bakterií *Neisseria meningitidis*, proto by ještě před podáním léku měli být proti zmiňované bakterii očkováni. (Dubois, a další, 2009)

Dalšími běžně dostupnými léky jsou Berinert a Cinryze. Uvedené léky jsou vyrobeny z lidské plazmy a obsahují účinnou látku C1-INH. Proto jsou tyto léky podávány hlavně k léčbě HAE. V současné době jsou klinické studie více zaměřeny na vývoj a testování

vání nových inhibitorů, které by mohly být využity při léčbě poruch komplementového systému. (Zipfel, a další, 2019)

Při klinickém studiu již využívaných léků byly zjištěny specifické problémy. Tyto problémy jsou spojené především s vývojem léčiv cílených na komplement. Komplementové složky v plazmě, na kterých je založený celý kaskádový mechanismus, mají rychlý poločas rozpadu a fyziologické hladiny se pro jednotlivé složky liší. Stejně tak se liší i celková hladina komplementu v populaci. Z tohoto důvodu může být dávkování inhibitoru poměrně náročné. S dalším problémem, se kterým se setkávají farmaceutické společnosti při výrobě inhibitorů, je schopnost inhibitorů dostat se do místa onemocnění. Onemocnění vyvolaná komplementem mohou napadat cévní systém nebo jiné tkáně. Proto je potřeba, aby podávané léky pronikaly až do poškozeného místa. (Morgan, a další, 2015)

## 6.2 Substituční léčba

I přes rozsáhlý vývoj léčivých přípravků jsou nedostatky jednotlivých komplementových složek léčeny převážně symptomaticky. Nedostatečná funkce komplementu zvyšuje riziko infekcí způsobené především opouzdřenými bakteriemi, jako je *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* nebo *Haemophilus influenzae* typu b. (Jeseňák, a další, 2014)

U pacientů trpících nedostatkem komplementu je důležité preventivní opatření. Imunizace proti určitým mikrobům zvyšuje imunitní odpověď na pozdější vyvolané infekční onemocnění. V případě akutní fáze je nejvhodnější léčba antibiotiky. U opakovaných nebo dlouhodobě přetrvávajících infekcí se podávají profylaktická antibiotika. Časem si většina pacientů proti bakteriím způsobující dané onemocnění vytvoří protilátky. Autoimunitní choroby vyvolané poruchou komplementu se v mnoha případech léčí stejným způsobem, jako u pacientů s normální funkcí komplementu. (Immune Deficiency Foundation, 2015)

Přímá léčba komplementu je teprve na počátku rozvoje. Proto je potřeba zvýšené pozornosti při vyšetření a rychlé reakce při léčbě diagnostikovaných problémů. Pro zachycení reakce organismu na špatně nebo dobře zvolenou léčbu, je nutné stále sledovat hladinu komplementu v plazmě. Nesmí se také zapomínat na celkovou rodinnou anamnézu, která nás může upozornit na jistá genetická onemocnění. (Immune Deficiency Foundation, 2015)

# PRAKTICKÁ ČÁST



## **7 CÍL A ÚKOLY PRÁCE**

Praktická část této bakalářské práce obsahuje vyšetření celkové aktivity komplementu. Celková aktivita komplementu je stanovena testy AH50 a CH50 metodami radioimunodifúze nebo ELISA. Cílem praktické části je porovnat tyto dvě metody, z hlediska přípravy a zpracování vzorku, dále pak bude hodnocena interpretace výsledků a ekonomická náročnost vyšetření. Praktická část také zahrnuje pracovní postupy daných metod a grafické vyhodnocení četnosti pozitivních výsledků.

## **8 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY**

1. Jak velká je korelace mezi metodami RID a ELISA, při stanovení celkové aktivity komplementu pomocí CH50?
2. Jak velká je korelace mezi stejnými metodami, použitými na stanovení celkové aktivity komplementu pomocí testu AH50?
3. Jaká metoda, pro vyšetření celkové aktivity komplementu, je pro laboratoře ekonomicky výhodnější?

## **9 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU**

Všechny výsledky testovaných pacientů byly naměřeny v Ústavu imunologie a alergologie Fakultní nemocnice v Plzni. Pro vyšetření alternativní cesty aktivace komplementu pomocí testu AH50 bylo odebráno 35 vzorků. Pro stanovení testu CH50, tedy aktivaci komplementu klasickou cestou, bylo odebráno 45 vzorků od pacientů. Každý vzorek byl poté testován metodou RID i metodou ELISA.

## 10 METODIKA PRÁCE

### 10.1 Test CH50 a AH50 stanoven metodou ELISA

Testy CH50 a AH50 jsou založené na stejném principu. Liší se pouze aktivací komplementu a inhibitory. Při testu CH50 jsou jako cílové buňky využity ovčí erytrocyty a pro blokování klasické cesty se přidává EGTA. Tato látka vyvazuje vápenaté ionty, které jsou důležité pro aktivaci klasické cesty. V případě stanovení testu AH50 se používají králičí erytrocyty, na které se dále vážou protilátky za přítomnosti optimální koncentrace hořečnatých iontů.

MicroVue CH50 Eq EIA je test, který se provádí in vitro a měří celkovou aktivitu klasické cesty komplementového systému. Tento test detekuje nedostatky jednotlivých složek komplementu C1- C9.

Vazba první složky komplementu C1 s imunokomplexem spouští klasickou cestu komplementu. Následuje kaskáda enzymatických i neenzymatických reakcí a výsledkem je komplex aktivující membrány. Za standardních podmínek je možné naměřit hladinu tohoto konečného komplexu. A naměřenou hladinu lze kvantitativně vyjádřit jako celkovou aktivitu klasické cesty komplementu v séru.

MicroVue CH50 Eq EIA stanoví množství vytvořených komplexů aktivující membránu a přímo naměří celkovou aktivitu klasické cesty komplementu. Aby byl MAC zachycen a naměřen, jsou při tomto testování využity monoklonální protilátky proti jedinečnému neoantigenu. Výsledek je vyjadřován v CH50 ekvivalentních jednotkách na mililitr, protože toto testování je závislé na tvorbě komplexů a korelaci. Referenční rozmezí se pohybuje mezi 31,6 – 57 U/ml.

#### **Princip metody**

MicroVue CH50 Eq EIA je složen ze tří základních postupů. Prvním krokem v tomto testu je aktivace klasické dráhy komplement. Do jamek mikrotitrační destičky jsou k aktivátoru přidány neředěné vzorky lidského séra a kontroly. Poté během inkubace je aktivována klasická cesta komplementu a začínají se vytvářet komplexy aktivující membránu. Ve druhém kroku dochází k ředění aktivovaného séra a společně se standardy se z jamek nebo testovacích zkumavek přenášejí přímo na destičku, která je určena pro mikroanalýzu. Povrch jamek mikrotestu je pokrytý monoklonálními protilátkami. Tyto protilátky

se poté vážou s komplexy aktivující membránu, obsažených v aktivovaném séru. Závěrečným krokem je promytí destičky a přidání HRP-konjugátu neboli proteinu A, který je vázán na již navázaný MAC. Následuje další promytí a před inkubací se přidá substrát - chromogenní enzym. Nakonec se zastaví vývoj barvy přidáním činidla.

Pomocí spektrofotometrie se měří hodnota absorbance kontrol, standardů soupravy a testovacích vzorků. Výsledná intenzita reakční směsi je přímo úměrná koncentraci přítomného MAC a CH50 jednotkám.

### **Skladování vzorku**

Pro stanovení celkové aktivity klasické cesty komplementu metodou ELISA je nutné použít sérum. Testovací vzorky mohou být při pokojové teplotě skladovány až dvě hodiny. Pokud sérum ponecháme na ledu, jedná se o dobu čtyř hodiny a pro dlouhodobé skladování se vzorky ukládají do prostředí nižšího než  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **Příprava reagensí**

Před zahájením testování je zapotřebí připravit si potřebné reagensie, se kterými se bude následně pracovat. Aby nedošlo k chybnému vyšetření, je nutné tyto reagensie skladovat a zpracovávat podle předepsaných podmínek.

Jednou z připravovaných reagensí je promývací roztok. Koncentrát promývacího roztoku je potřeba nejprve řádně promíchat opakovaným převrácením lahve. Poté je celá lahev koncentrátu promývacího roztoku zředěna jedním litrem destilované nebo deionizované vody. Připravený a důkladně promíchaný promývací roztok může být skladován po dobu 30 dnů v čisté nádobě při  $2 - 8^{\circ}\text{C}$ .

Dalším krokem je rozmrazení testovaného séra ve vodní lázni při  $37^{\circ}\text{C}$  a přípravy lahviček s kontrolami. Ke kontrolám se přidá  $100\mu\text{l}$  destilované vody, lahvičky se promíchají a nechají 15 minut stát. Závěrem se na mikrotitrační destičce určí jamky požadované pro test. Označené jsou vždy dvě jamky pro blank, kontrolu a standardy soupravy.

### **Postup**

Pro stanovení celkové aktivity komplementu testem CH50 metodou ELISA bylo otestováno 45 vzorků od pacientů. Prvním krokem, byla aktivace testovaných vzorků a kontrol. Do označených jamek bylo přidáno  $86\mu\text{l}$  předem promíchaného aktivátoru.

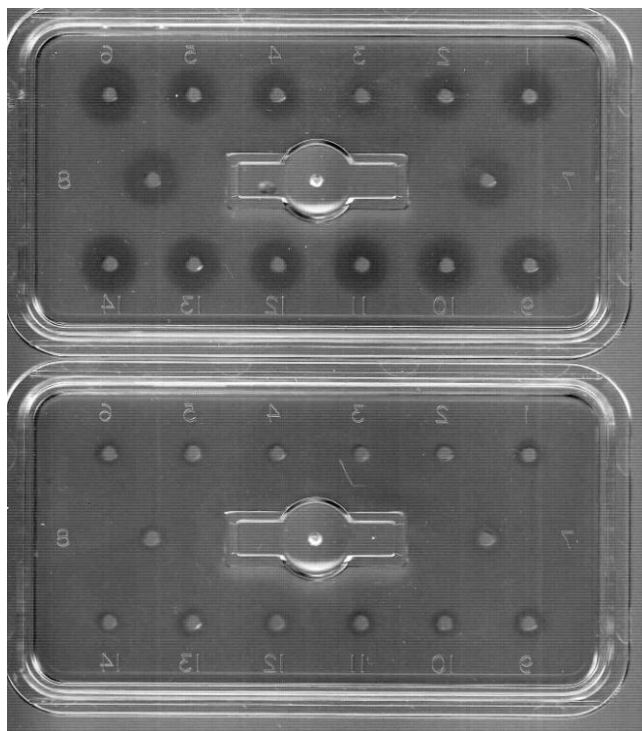
K aktivátoru se dále napipetovalo 14 $\mu$ l neředěného séra, normální nebo nízké kontroly. Vše se krátce promíchalo a po dobu jedné hodiny nechalo při 37°C inkubovat. Dále se pokračovalo ředěním aktivovaných vzorků a kontrol. Vzorky byly naředěny v nepoužitých jamkách ředícím roztokem v poměru 1:200. Destičku určenou pro testování jsem promyla promývacím roztokem, nechala inkubovat a na konec destičku vysušila. Do jamek připravené destičky označené jako blank jsem napipetovala 100 $\mu$ l ředícího roztoku. Do dalších dvou jamek jsem přidala 100 $\mu$ l již naředěného standardu. A stejně byla přidána i normální a nízká kontrola po 100 $\mu$ l do dalších dvou označených jamek. Na závěr ve stejném množství byly také napipetovány naředěné vzorky ve dvou duplikátech do zbylých mikrotestovacích jamek. Celá řádně napipetovaná destička se při pokojové teplotě inkubovala hodinu.

Po inkubaci byla testovací destička několikrát promývána promývacím roztokem. Dále bylo do všech jamek včetně blanku přidáno 50  $\mu$ l konjugátu a opět nastala hodinová inkubace s následným promýváním testovací destičky. Bezprostředně po promývací proceduře bylo do všech jamek včetně blanku přidáno 100 $\mu$ l substrátu, který se inkuboval 15 minut. Nakonec se do každé jamky přidalo činidlo, které zastavilo enzymatickou reakci. Jemným poklepáním na destičku se v jamkách rovnoměrně rozptýlil vývoj barev. Do jedné hodiny by měla být pro každou jamku stanovena hodnota absorbance při 450 nm.

## **10.2 Test CH50 stanoven metodou RID**

Další metodou, kterou lze naměřit hladinu testu CH50 je radioimunodifúze. Touto metodou se měří celková hemolytická aktivita komplementu v lidském séru. Pomáhá při diagnostice imunologických poruch v klasické cestě komplementového systému.

Obrázek 1 RID destička



Zdroj: vlastní

### **Princip metody**

Hlavní součástí metody je RID destička. Obecným principem je tvorba komplexů antigen-protilátka v agaru na destičce. Vytvořené komplexy jsou důležité pro vznik viditelného prstence. Princip metody RID pro stanovení hladiny testu CH50 je založený na vazbě ovčích erytrocytů v agarózovém gelu s protilátkou nazývanou hemolyzin. Hemolyzin je protilátka proti ovčím erytrocytům, která zvyšuje jejich citlivost. Sérum s aktivovanými složkami komplementu je přidáno do cylindrických jamek, které radiálně difundují gelem při teplotě 2-6°C. Během difúze hemolyzin upevňuje první složku komplementového systému C1. Následuje inkubace, při které je aktivována komplementová kaskáda a konečný komplex lyzuje ovčí erytrocyty. Okolo jamky se na agaru začíná vytvářet čirá zóna neboli prstenec, jehož velikost je závislá na aktivitě komplementového systému v séru. Zónu hemolýzy lze změřit pomocí lupy nebo pro přesnější stanovení můžeme použít digitální čtečku. Naměřené průměry hemolytických zón (v mm), jsou proti známé komplementové aktivitě (v %) zaneseny do grafu a je sestrojena kalibrační křivka. Vzorky s neznámou aktivitou komplementu jsou odečteny z kalibrační křivky pomocí naměřeného prstence.

## **Skladování a zpracování vzorku**

Špatné skladování a zacházení se vzorkem vede k předčasné aktivaci komplementu a dochází k chybnému stanovení výsledku. Pro vyšetření celkové aktivity klasické cesty komplementu metodou RID je nejlepší zpracovávat čerstvé vzorky séra. Krev odebraná ze žíly je koagulována po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě. Následně je vzorek centrifugován a sérum se odebírá do čistých zkumavek, ve kterých ho lze skladovat 4 hodiny při 2-8°C. Pro delší dobu skladování je možné vzorky zamrazit.

## **Příprava reagensí**

Základem pro stanovení testu CH50 radioimunodifúzí je RID destička. Před nakanáním jednotlivých reagensí a testovaných vzorků do jamek je důležité, aby se z jamek odpařila veškerá kondenzace. Z tohoto důvodu je doporučováno, aby se destička po vynášení z obalu nechala ještě 15 minut stát při pokojové teplotě. Před použitím kalibrátoru a kontroly je potřeba tyto dvě reagensie rozpustit v destilované vodě. Potřebný objem destilované vody je uveden na štítku lahvičky. Obě reagensie musí být řádně rozpuštěné a vychlazené při 2-8°C. Po celou dobu procesu je vyžadováno udržovat všechny reagensie a testované vzorky v chladu. V chladném prostředí komplementové složky snadněji udržují svoji celistvost. Kalibrátory použité při stanovení jsou nařaděny podle doporučení v návodu od výrobce a slouží vytvoření kalibrační křivky.

## **Postup**

Kontroly, kalibrátory a testované vzorky byly před pipetováním jemně promíchány. Po 5  $\mu$ l byly do každé jamky přidány tři ředění kalibrátoru, kontroly a 45 testovaných vzorků. Po napipetování byla RID destička překryta, což zabránilo vysoušení gelu. Pak nastává proces, při kterém byly látky napipetované do jamek a difundovaly do agarózního gelu. Tento děj probíhal nejméně 6 hodin při 2-6°C, aby se lytické zóny stihly dostatečně vytvořit. Následně jsem vzorky nechala půlhodiny inkubovat při 37°C. Na závěr jsem změřila průměr vytvořeného prstence a sestavila kalibrační křivku. Změřený průměr je následně přepočítán na konečná procenta v softwaru IMAGINEJ 1.52a.



## 10.3 Test AH50 stanoven metodou RID

### Princip

Metoda RID je pro stanovení testu AH50 stejná jako pro stanovení testu CH50. Rozdíl je v agarózním gelu, který u testu AH50 obsahuje kuřecí erytrocyty. Během difúze při 2-6°C difundují přidané aktivní složky komplementu do gelu a fragment C3b se váže na povrch membrány. Tato vazba umožní tvorbu C5 konvertázy. Při inkubaci je spuštěna komplementová kaskáda, která způsobuje lýzu kuřecích erytrocytů. Inkubace probíhá při 37°C. Na závěr se postupuje stejně jako u testu CH50. Změří se průměr vytvořených prstenců a je sestavena kalibrační křivka. Pomocí vzorků se známou komplementovou aktivitou a naměřenými zónami se stanoví komplementová aktivita neznámého vzorku.

### Skladování vzorku a reagensí

Pro stanovení testu AH50 se nejčastěji používají čerstvá séra zpracovaná na ledu. V případě zamrazení vzorku je možnost i dlouhodobého skladování. Neotevřená sada s reagensii může být skladována v chladu při 2-6°C až do doby expirace. V chladném prostředí jsou uchovávány i RID destičky s kuřecími erytrocyty. Agarázový gel i složení jednotlivých reagensí by mohlo být narušeno v prostředí s velmi nízkou teplotou, proto je zapotřebí se vyhnout zamrazování RID destiček a dalších souprav.

### Příprava reagensí

Kontroly, kalibrátory a RID destičku jsou připravené stejným způsobem jako při testu CH50. Reagencie se promíchají a rozpustí v destilované vodě. Kalibrátor se naředí ve stejných poměrech a destička určená k testování je vysušena od veškeré kondenzace. Vše se udržuje v chladném prostředí, aby byla zachována integrita komplementových složek.

### Postup

Do jamek testovací destičky jsem přidala 5 µl od všech reagensí, z naředěných kalibrátorů, kontrol a testovaných sér. Pro test AH50 bylo odebráno 35 testovaných vzorků. Po napipetování všech látek byla destička ukložena do chladu, kde aktivní složky komplementu difundují do gelu a vytváří hemolytické prstence. Důležité je, aby difúze probíhala v chladném prostředí. Za podmínek, kdy je teplota vyšší než 6°C může být lýza přerušena a vytváří se nedostatečné prstence. Po difúzi následovala inkubační doba trvající dvě hodiny a probíhající při 37°C. Inkubace, která by trvala déle jak 6 hodin, vede k nedostatečnému

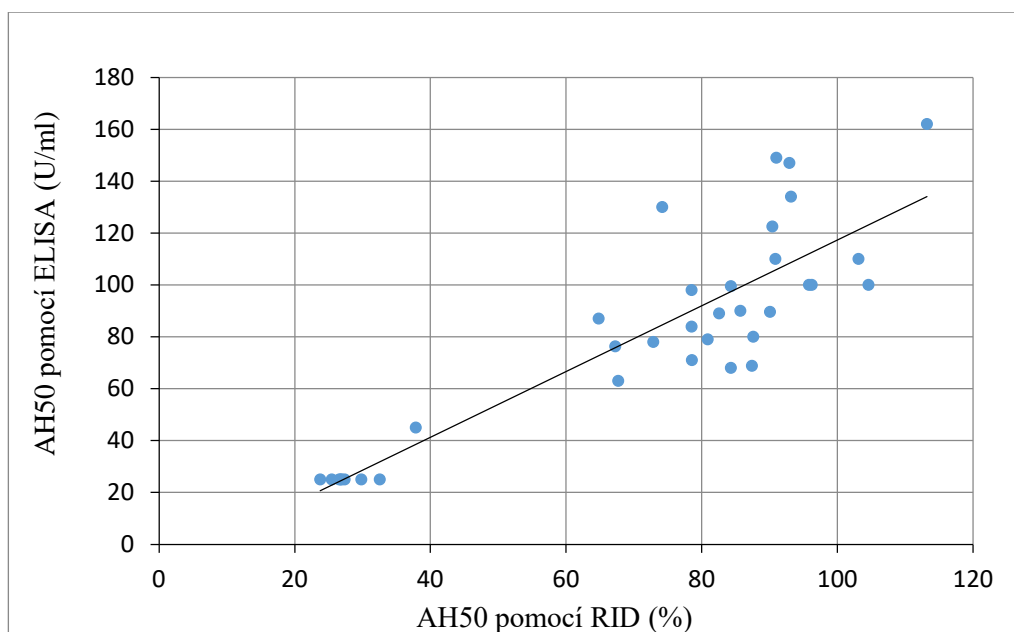
oddělení průměrů lytické zóny. Posledním krokem byla kontrola, se kterou bylo zacházeno stejně jako s ostatními testovanými vzorky. Získané hodnoty kontroly by měly být v rozmezí 20% od hodnoty udané na štítku lahvičky.

## 11 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

### 11.1 Korelace mezi stanovením testu AH50 metodou ELISA a RID

Pro stanovení celkové aktivity komplementu testem AH50 jsme testovali 35 pacientů. Pacientské vzorky jsme měřili nejprve metodou ELISA a poté i metodou RID. Pro stanovení korelace jsem využila hodnoty naměřené metodou ELISA a procentuální hodnoty, které jsem získala z jednotlivých průměrů zón u metody RID.

Graf 1 Korelace testu AH50 metodou ELISA a RID

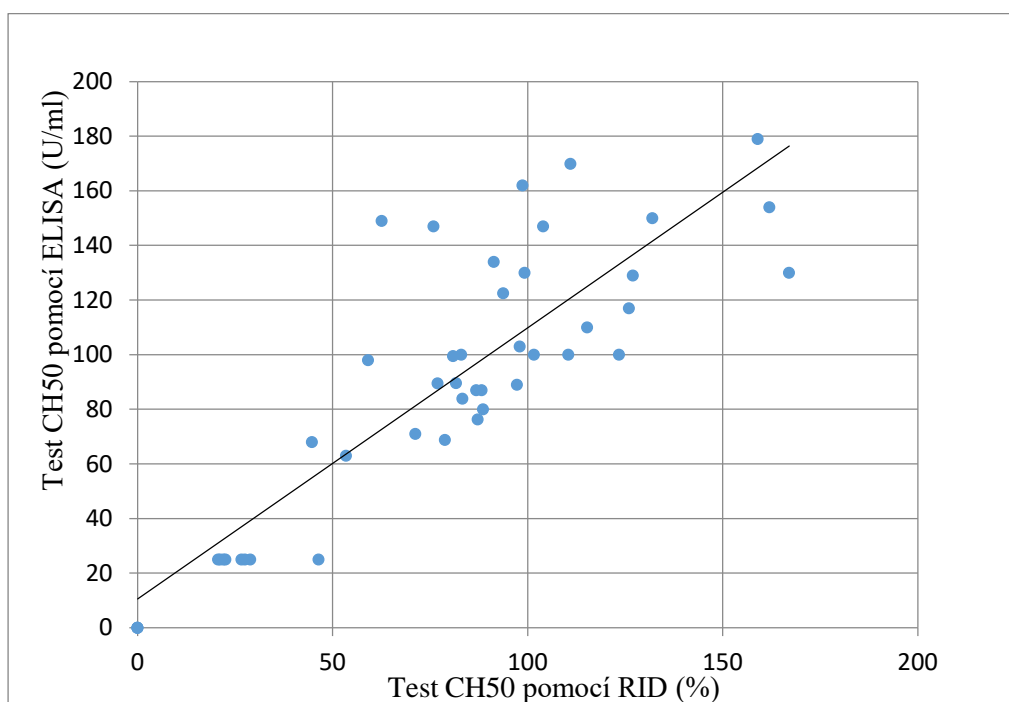


Na grafu 1 je znázorněna korelace mezi metodami ELISA a RID. Hodnoty naměřené metodou RID jsou nanesené na ose x a hodnoty získané metodou ELISA jsou vynesené na ose y. Korelační koeficient (R) vychází 0,879 a rovnice regrese je  $y = 1,268x - 9,4705$ .

### 11.2 Korelace mezi stanovením testu CH50 metodou ELISA a RID

Pro vyšetření testu CH50 bylo odebráno 45 pacientských vzorků. Všechny tyto vzorky jsem stanovila oběma metodami. Následně jsem jejich naměřené hodnoty zadala do grafu stejným způsobem jako u testu AH50.

Graf 2 Korelace testu CH50 metodou ELISA a RID



Graf č. 2 zobrazuje korelaci pro test CH50 stanovený metodami ELISA a RID. Korelační koeficient (R) je roven 0,86 a regresní rovnice je  $y = 0,9928x + 10,527$ .

### 11.3 Statistický popis jednotlivých metod

V následujících tabulkách (1,2,3,4) jsou uvedeny nejnižší a nejvyšší naměřené hodnoty pro daná vyšetření. Níže v tabulce jsou zaznamenány vypočítané hodnoty aritmetického průměru, směrodatné odchylky, variačního koeficientu a mediánu pro jednotlivé metody stanovující celkovou aktivitu komplementu. Hodnoty jsou vypočítané z předcházejícího měření.

*Tabulka 1 Výsledné hodnoty pro test AH50 metodou RID*

Počet měřených vzorků	35
Nejnižší naměřená hodnota	23,76 %
Nejvyšší naměřená hodnota	104,59 %
Aritmetický průměr	71,25 %
Směrodatná odchylka	27,46 %
Variační koeficient	38,5 % <sup>4</sup>
Medián	80.89 %

*Tabulka 2 Výsledné hodnoty pro test AH50 metodou ELISA*

Počet měřených vzorků	35
Nejnižší naměřená hodnota	25 U/ml
Nejvyšší naměřená hodnota	162 U/ml
Aritmetický průměr	80,87 U/ml
Směrodatná odchylka	39,59 U/ml
Variační koeficient	48,95 %
Medián	83,9 U/ml

*Tabulka 3 Výsledné hodnoty pro test CH50 metodou RID*

Počet měřených vzorků	45
Nejnižší naměřená hodnota	0 %
Nejvyšší naměřená hodnota	167,04 %
Aritmetický průměr	78,57 %
Směrodatná odchylka	42,75 %
Variační koeficient	54,41 %
Medián	83,3 %

*Tabulka 4 Výsledné hodnoty pro test CH50 metodou ELISA*

Počet měřených vzorků	45
Nejnižší naměřená hodnota	0 U/ml
Nejvyšší naměřená hodnota	169,9 U/ml
Aritmetický průměr	88,53 U/ml
Směrodatná odchylka	49,33 U/ml
Variační koeficient	55,72 %
Medián	89,6 U/ml

## **11.4 Ekonomické náklady**

V následující kapitole se zabývám finančními náklady pro jednotlivé testy stanovující celkovou aktivitu komplementového systému. Porovnávám ekonomickou náročnost laboratoře pro vyšetření testu AH50 a CH50 stanovené metodami ELISA a RID.

*Tabulka 5 Hodnota bodů pro vyšetření metodou RID*

Klasická cesta	399
Alternativní cesta	183

*Tabulka 6 Hodnota bodů pro vyšetření metodou ELISA*

Klasická cesta	399
Alternativní cesta	183
Lektinová cesta	390

Tabulky (5 a 6) znázorňují počet bodů, které náleží laboratoři za provedené vyšetření. Z těchto bodů je dále vypočtena celková nákladová hodnota bodu, která zjišťuje zisk nebo ztrátu laboratoře.

Nákladová hodnota bodu, která je vyšší než jedna, určuje výnos laboratoře. Naopak hodnota nižší než jedna značí ztrátu laboratoře při vyšetření danými testy.

Metoda RID je stanovena hemolytickým testem pro alternativní nebo klasickou cestu od firmy Binding site. Tato sada obsahuje 3 testovací destičky po 14 jamkách a stojí 8 288 Kč. Pomocí této sady lze testovat celkem 30 pacientů včetně kontroly a kalibrátorů. Za jedno vyšetření pacient zaplatí 276 korun a nákladová hodnota bodu pro toto vyšetření je 2,1. Vyšetření celkové aktivity komplementu pomocí metodou RID je finančně výhodnější pro pacienty i pro laboratoře.

Metodou ELISA je možné stanovit také lektinovou cestu komplementového systému. Testování celkové aktivity komplementu pomocí metody ELISA je nákladnější. Jedna sada vychází na 16 287 Kč a pomocí této sady můžeme vyšetřit celkem 45 pacientů i s kontrolou a kalibrátory. Jedno vyšetření vychází kolem 362 korun pro jednoho pacienta. Nákladová hodnota bodu 2,68 vypovídá o zisku laboratoře, ve které je toto vyšetření prováděno.

## DISKUZE

Cílem této bakalářské práce je porovnání metody ELISA a radioimunodifúze využívané ke stanovení celkové aktivity komplementu. Tyto metody se rutinně využívají v klinických laboratořích a slouží k vyšetření testu CH50 a AH50.

Metody ELISA a RID při vyšetření komplementu měří celkovou aktivitu, proto při jemné změně v komplementové kaskádě nejsou příliš citlivé. I přesto tyto metody stanovující aktivitu komplementu patří mezi nejvyužívanější v laboratoři. Obě metody pracují na stejném principu, při kterém erythrocyty živočišného původu citlivé na určité protilátky aktivují klasickou nebo alternativní cestu. Konečný produkt komplementového systému lyzuje erythrocyty. Výsledná hemolýza je poté naměřena spektrofotometricky, nebo v případě radioimunodifúze jsou změřeny průměry hemolytických zón na testovací destičce a následně pomocí počítačového programu IMAGINEJ 1.52a převedeny na procentuální hodnoty.

Metody ELISA a RID se od sebe liší přípravou a zpracováním vzorků. Příprava patientských vzorků pro metodu ELISA je náročnější, a v tomto případě by mohlo snáze dojít ke kontaminaci vzorků. Kontaminované vzorky pak nebude možno považovat za validní. Naopak výhodou pro vyšetření metodou ELISA je doba, která je potřeba pro celkové stanovení komplementu. Časový úsek od přípravy vzorků až po analýzu výsledků je při využití metody ELISA kratší. Další výhodou metody ELISA je vyšší citlivost, při stanovení komplementové aktivity lze vyšetřit kromě klasické a alternativní cesty i lektinovou.

Alternativní cesta je aktivována spontánně, zatímco klasická a lektinová dráha je aktivována danými rozpoznávacími mechanismy. Aktivace klasické cesty je spuštěna vazbou C1q s protilátkami a je značně závislá na zvýšené aktivitě alternativní dráhy. Za fyziologických podmínek bylo zjištěno, že amplifikace alternativní cesty je zodpovědná za 80% aktivity lytické cesty, která je vyvolaná klasickou dráhou. (Harboe, a další, 2006) MBL je klíčový protein v lektinové cestě. Nedostatek MBL je většinou vyvolán genetickou poruchou a vyvolává infekční onemocnění. V případě podezření na imunodeficienci je stanovena hodnota MBL. Při interpretaci imunochemických testů stanovující koncentraci MBL je zapotřebí opatrnosti. Kvůli genetickým variantám stanovená hodnota MBL nemusí přesně vyjádřit aktivitu lektinové cesty. (Kirschfink, a další, 2003) Imunochemické testy využívané pro stanovení aktivity komplementu mohou být nahrazeny funkčními testy a naopak.



Primárně se pro stanovení celkové aktivity komplementu využívá test CH50 pro klasickou cestu a AH50 pro alternativní cestu. V závislosti na klinických okolnostech lze zahrnout i vyšetření pro lektinovou dráhu pomocí testu, který stanovuje lektin vázající manózu. Nejčastější metodou pro testování lektinové dráhy je ELISA. Ve většině případů je testována celková aktivita komplementu nejprve testy CH50 a AH50 a následně dle interpretace výsledků se rozhodne, zda využít test pro lektinovou dráhu. V mé bakalářské práci jsem test stanovující koncentraci MBL nehodnotila, protože tento test nelze stanovit metodou RID.

V této bakalářské práci jsem porovnávala výsledky testu CH50 a AH50 naměřené metodou ELISA a RID. Pro test CH50 bylo využito 45 náhodných patientských vzorků, které byly stanoveny oběma metodami. Stejným způsobem bylo zpracováno dalších 35 patientských vzorků pro test AH50. V praktické části této bakalářské práce jsem stanovila závislost a sílu závislosti mezi hodnotami naměřenými metodou ELISA a hodnotami získanými pomocí radioimunodifúze. Závislost mezi těmito metodami jsem získala sestavením grafu pro test AH50 a CH50. V grafech jsou znázorněny na ose x hodnoty naměřené metodou RID a na ose y hodnoty stanovené metodou ELISA. Z vytvořených grafů lze stanovit korelační koeficient (R), který se pohybuje v rozmezí od -1 do 1. Čím víc se hodnota korelačního koeficientu blíží nule, tím je závislost mezi porovnávanými hodnotami menší. Korelační koeficient pro test AH50 je 0,879 a pro test CH50 je roven 0,86. Tyto hodnoty, které jsou téměř rovny 1, znázorňují kladnou lineární závislost.

Dále jsem u naměřených hodnot určila základní statistickou charakteristiku. Pomocí Excelu jsem pro jednotlivé metody vypočetla aritmetický průměr, směrodatnou odchylku, medián a variační koeficient. U testu CH50 byla u obou metod vypočtena vyšší směrodatná odchylka. U metody ELISA se jedná o hodnotu 49,33U/mm a u metody RID je rovna 42,75%. Tyto výsledky jsou způsobeny většími rozdíly mezi naměřenými hodnotami. Získané variační koeficienty, pro metodu ELISA 55,72% a pro metodu 54,41%, také vypovídají o různorodosti naměřených dat. Pro test AH50 byly stanoveny nižší hodnoty než pro test CH50. Výsledek směrodatné odchylky pro metodu ELISA vychází 27,46 U/mm a pro RID 39,59. Nižší hodnoty značí, že naměřené hodnoty pro AH5 nejsou ve statistickém souboru tolik rozptýleny. Výrazně nižší hodnoty variačního koeficientu jsou dalším znakem, který poukazuje na menší nesourodost stanovených dat. Výsledek variačního koeficientu 38,54% byl vypočten pro metodu RID a získaná hodnota pro metodu RID 39,59%. Pomocí těchto statistických výpočtů je možné získat přehled o naměřených hodnotách a jejich rozptýlu ve statistickém souboru.

U náhodně vybraných patientských vzorků byly jednotlivými metodami naměřeny rozdílné hodnoty. Vzorky byly stanoveny nejčastěji používanými metodami pro vyšetření celkové aktivity komplementu. Výpočtem korelačního koeficientu byla zjištěna závislost obou metod. Výsledky, které byly naměřené pro stanovení aktivity komplementového systému metodou ELISA nebo metodou RID nejsou tak odlišné, a proto je možné využívat obě tyto metody.

Z hlediska ekonomické náročnosti jsou obě metody, využívané pro stanovení celkové aktivity komplementu, pro laboratoře výhodné a jejich využití se podílí na zisku laboratoře. Výnos laboratoří provádějící toto vyšetření je dán nákladovou hodnotou bodu. Nákladová hodnota bodu je podíl všech hodnot bodů, které jsou dané pro použitá vyšetření, a částkou, kterou pacient za vyšetření zaplatí. Pro metodu radioimunodifúze a ELISA je nákladová hodnota bodu odlišná. Důvodem je, že metodu ELISA lze využít pro všechny tři cesty aktivující komplementovou kaskádu. Oproti tomu pomocí radioimunodifúze můžeme určit pouze klasickou a alternativní cestu. Nákladová hodnota bodu, kterou může laboratoř získat za vyšetření metodou ELISA je 2,68. Tato hodnota je nepatrně vyšší než nákladová hodnota bodu pro vyšetření pomocí radioimunodifúze, která je rovna 2,1.

Sada hemolytických testů metody RID využívaná pro stanovení komplementového systému je levnější pro klinické laboratoře i pro pacienty podstupující toto vyšetření. Ze všech daných a získaných hodnot lze říct, že využití radioimunodifúze je z ekonomického hlediska výhodnější.

## ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se věnovala porovnáním dvou nejčastějších metod využívaných ke stanovení celkové aktivity komplementu. Jedná se o metody ELISA a RID, které stanovují testy AH50 a CH50. Obě tyto metody jsou založené na stejném principu, proto je v této bakalářské práci porovnávám z hlediska přípravy a zpracování vzorků, ekonomické náročnosti a především správnosti metod.

V teoretické části jsem se zabývala imunitním systémem a především komplementem. Komplementový systém je důležitou součástí při obraně organismu a jeho nedostatečná funkce vyvolává řadu onemocnění. Dále v teoretické části zmiňuji konkrétní choroby a problémy způsobené poruchou komplementu, jeho vyšetření a následnou léčbu.

V praktické části jsem stanovila testy AH50 a CH50 pomocí jednotlivých metod, u kterých jsem poté vypočetla korelační koeficient a dále uvedla statistickou charakteristiku. Rozdíl mezi metodami je v preanalytické fázi, kdy je vzorek zpracováván a připravován na laboratorní analýzu. V závěru praktické části porovnávám finanční náklady, které jsou potřebné pro provedení jednotlivých metod. Po všech provedených vyšetřeních a výpočtech jsem došla k závěru, že z hlediska správnosti, jsou metody podobné a ke stanovení komplementové aktivity lze využívat metodu ELISA i metodu RID.

## 12 SEZNAM LITERATURY

**Bartůňková, Jiřina, Paulík, Milan a kolektiv, a. 2011.** *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. vydání. Praha : Grada publishing, 2011. ISBN 978-80-3533-7.

**Campos, Régis A., Rodrigues Valle, Solange O. a Toledo, Eliana Cristina. 2020.** Hereditary angioedema: a disease seldom diagnosed by pediatricians. *Jornal de Pediatria*. 2020, Sv. 5, 96.

**Castro, Christine a Gourley, Mark. 2010.** Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010, Sv. 2, 125.

**Costabile, Maurizio. 2010.** Measuring the 50% haemolytic complement (CH50) activity of serum. *Journal of visualized experiments*. 2010, 37.

**Dubois, Eline A. a Cohen, Adam F. 2009.** Eculizumab. *British journal of clinical pharmacology*. 2009, Sv. 3, 68.

**Ferenčík, Miroslav, a další. 2005.** *Imunitní systém - informace pro každého*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2005. ISBN 80-247-1196-6.

**Harboe, Marten, a další. 2006.** Design of a complement mannose-binding lectin pathway-specific activation system applicable at low serum dilutions. *Clinical and experimental immunology*. 2006, Sv. 144, 3.

**Hořejší, Václav a Bartůňková, Jiřina. 2005.** *Základy imunologie*. Praha : Triton, 2005. ISBN 80-7254-686-4.

**Immune Deficiency Foundation. 2015.** Complement Deficiencies. [autor knihy] R. Michael Blaese, a další. *IDF Patient & Family Handbook for Primary Immunodeficiency Diseases*. Towson : Immune Deficiency Foundation, 2015.

**Janeway, Charles A., a další. 2001.** The complement system and innate immunity. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York : Garland Science, 2001.

**Jeseňák, Miloš, Bánovič, Peter a kol., a. 2014.** *Vrozené poruchy imunity*. Bratislava : A-medi management, 2014. 978-80-970825-6-7.

**Kirschfink, Michael a Mollnes, Tom E. 2003.** Modern Complement Analysis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2003, Sv. 6, 10.

**Kline, J. N. a Kitagaki, K. 2006.** Interferons. [autor knihy] Geoffrey J. Laurent a Steven D. Shapiro. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. Iowa City : Academic Press, 2006.

**Lab tests online. 2020.** Complement. *Lab tests online*. [Online] 6. březen 2020. [Citace: 10. leden 2021.] <https://labtestsonline.org/tests/complement>.

**Liszewski, M. Kathryn, a další. 1996.** Control of the Complement System. [autor knihy] Frank J. Dixon. *Advances in Immunology*. 61. místo neznámé : Academic Press, 1996.

**Liu, H. H., Guo, J. B. a Geng, Y. et al. 2015.** Procalcitonin: present and future. *Irish Journal of Medical Science*. 2015, Sv. 7, 184.

**Maruna, Pavel. c2004.** *Proteiny akutní fáze: fyziologie, diagnostika, klinika*. Praha : Maxdorf, c2004. ISBN 80-85912-05-8.

**Mayer, Phd. Gene. 2017.** Microbiologybook: Immunology - chapter two Complement. *Microbiologybook*. [Online] 9. Prosinec 2017. [Citace: 24. 11 2020.] <http://www.microbiologybook.org/ghaffar/complement.htm>.

**Miranda, Amanda R., a další. 2013.** Hereditary angioedema type III (estrogen-dependent) report of three cases and literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2013, Sv. 4, 88.

**Mollah, Fatema a Tam, Schuman. 2020.** *Complement Deficiency*. Treasure Island, FL : StatPearls Publishing, 2020.

**Mollnes, Tom E., a další. 2007.** Complement analysis in the 21st century. *Molecular Immunology*. 2007, Sv. 16, 44.

**Morgan, B. Paul a Harris, Claire L. 2015.** Complement, a target for therapy in inflammatory and degenerative diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015, 14.

**Patel, Gayatri a Pongracic, Jacqueline A. 2019.** Hereditary and acquired angioedema. *Allergy Asthma Proc*. 2019, Sv. 6, 40.

**Racek, Jaroslav. c2006.** *Klinická biochemie*. 2. vydání. Praha : Galén, c2006. ISBN 80-7262-324-9.

**Zima, Tomáš. 2007.** *Laboratorní diagnostika*. 2. vydání. Praha : Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-372-3.

**Zipfel, Peter F., a další. 2019.** Complement Inhibitors in Clinical Trials for Glomerular Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2019, 10.