

XXXI.OTDK Biológia szekció

Komplement diszfunkciók Neuromyelitis opticában

Készítette:

Veszeli Nóra

Témavezető:

Dr. Varga Lilian, Ph.D.

tudományos főmunkatárs



**Eötvös Loránd Tudományegyetem, Immunológia Tanszék
Semmelweis Egyetem, III. számú Belgyógyászati Klinika**

**Budapest,
2013**

Tartalomjegyzék

Bevezető.....	4
A koplementrendszer.....	4
Az aktiválódás útjai.....	4
Klasszikus úton történő aktiváció.....	6
Lektin útvonalon történő aktiváció.....	7
Alternatív úton történő aktiváció.....	8
Anafilatoxinok.....	9
A komplement aktiváció szabályozása.....	9
Neuromyelitis optica.....	10
Aquaporin4-autoantitest.....	10
Diagnózis.....	10
Kezelés.....	11
Célkitűzések.....	11
Vizsgált egyének és módszerek.....	10
Betegek.....	10
Kontrollok.....	12
Minták kezelése.....	13
EDTA-plazma.....	13
Szérum.....	13
Komplement aktivációs útvonalak vizsgálata.....	13
Hemolitikus titrálás.....	13
Komplement fehérjék vizsgálata.....	14
C4-szint mérése radiális immundiffúzióval.....	15
Komplement aktivációs termékek vizsgálata.....	16
Kiértékelés.....	17
Eredmények és értékelésük.....	17
Komplement aktivációs útvonalak	17
Komplement fehérjék.....	18
Komplement aktivációs termékek.....	19
Korreláció vizsgálat.....	20
Definitív NMO, RION, LETM.....	21

Összefoglalás.....	24
Summary.....	25
Irodalom.....	26
Köszönetnyilvánítás.....	29
Szerzői hozzájárulás.....	30

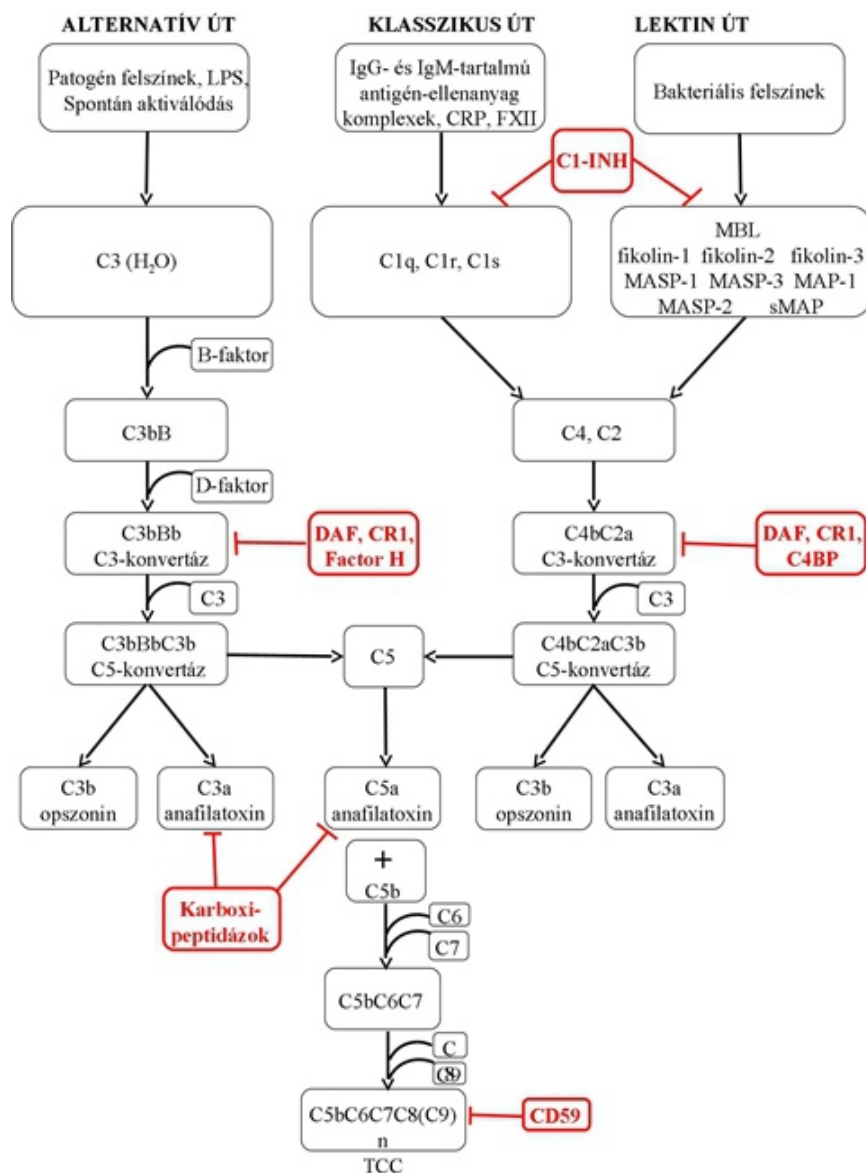
Bevezetés

Komplementrendszer

A komplementrendszer a veleszületett immunitás elengedhetetlen része, ugyanakkor segíti az adaptív immunrendszert is. Egymást láncreakcióban, kaszkádszerűen aktiváló faktorokból, szabályozó molekulákból és az egyes komponensek aktivációs fragmentumait megkötő receptorokból épül fel. A több, mint 30 fehérjéből álló rendszer az egyik leghatékonyabb effektor rendszer, amelynek aktiválódása elősegíti a szervezetbe került kórokozók és testidegen anyagok elpusztítását és eliminálását. A végrehajtó szerepe mellett a kaszkád egyes komponensei döntő szerepet játszanak a veleszületett és adaptív immunrendszer kölcsönhatásának kialakításában, illetve részt vesz az immunfolyamatok megindításában és szabályozásában (1).

Aktiválódás útjai

A rendszer aktiválódása három úton mehet végbe: a klasszikus, az alternatív és a lektin útvonalon (*1.Ábra*).



1.Ábra: A komplementrendszer aktiválódási útjai (Csuka Dorottya)

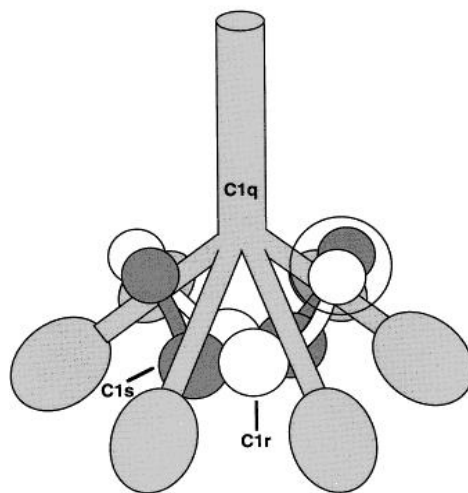
MASP: mannózkötő lektinhez kapcsolt szerin-proteáz, MBL: mannózkötő lektin, TCC: terminális komplement komplex

Mindhárom útvonal végül a membrán károsító komplex (MAC) -más néven terminális komplement komplex (TCC)- kialakulásához vezet. A kaszkád utolsó enzimátikus hasítása a C5 komponensen eredményezi a C5b fragmentumot. A C5b mellé bekötődik a C6 majd a C7 komponens, ezáltal a komplex hibrofóbbá válik így a C8 komponens a membránba képes

mélyedni. A C8 a komplexhez kötődik, ezáltal már végbe mehet kismértékű lízis. A célsejt elpusztítását végül a C8-hoz kötődő számos C9-molekula váltja ki pórusképzéssel (1).

Klasszikus útvonalon történő aktiváció

Elsősorban IgG-t, vagy IgM-et tartalmazó immunkomplexek indítják el a folyamatot, de e mellett a C1-hez kötődő polianionok, egyes vírusok és baktériumok is eredményezhetik az aktivációt. A C1 molekulakomplex C1q alegysége tölti be a felismerő funkciót, a négy szerin-proteáz (C1s-C1r-C1r-C1s) pedig az aktiválódásért, a komplex proteolitikus aktivitásáért felelős. A C1q az immunglobulin molekula Fc-részéhez kötődik globuláris feji részével. A kötődés a C1r alegységben konformáció-változást idéz elő, és autokatalízis révén aktiválódik. Az aktivált C1r ezután hasítja a C1s alegységet, mely szintén enzimatis aktivitást nyer (1, 2). A komplex felépítését az alábbi ábra szemlélteti (2.Ábra).



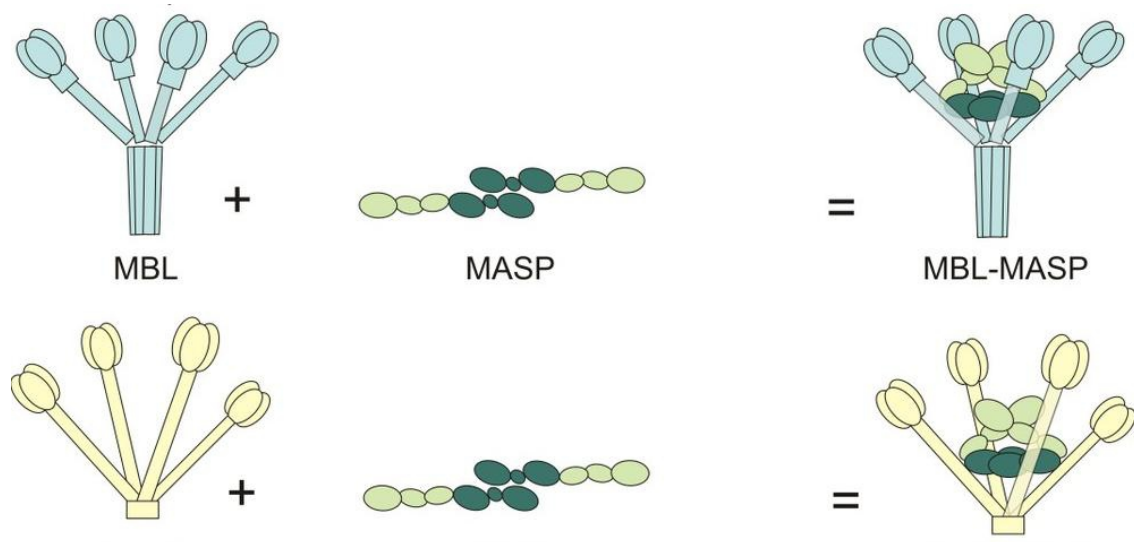
2. Ábra: C1-molekula-komplex (Nicole M Thielens et al.1999, Immunopharmacology)

A C1s két szubsztrátja a C4 és a C2. A C4 molekula hasításával keletkező nagyobbik fragmentum, a C4b a C1 molekulához kötődik, majd a C2 hasítása során keletkező C2b is kapcsolódik a C4b-hez. Ennek eredményeként létrejön a klasszikus útvonal C3-konvertáz enzime (C4bC2b), mely a komplementrendszer működése során központi szerepet játszó C3 molekula aktiválására képes.

A C3 molekula hasításából keletkező C3b fragmens hozzákötődik a C4bC2b-hez, az így létrejövő trimolekuláris komplex a klasszikus út C5-konvertáza. Ha a C5 molekula hasítódik, a létrejövő C5b az antigén felületére kötődik. A C5 aktivációs lépést követően a klasszikus és az alternatív aktivációs folyamatok megegyeznek (3).

A lektin útvonalon történő aktiváció

A mannóz-kötő lektin (MBL), fikolinok szolubilis mintázat felismerő molekulák, melyek a komplementrendszer lektin útvonalát a mannóz-kötő lektinhez asszociált szerin-proteáz-2 (MASP-2) közreműködésével aktiválják (fikolin-1, fikolin-2 és fikolin-3 emberben). A mikroorganizmusoknak, illetve elhalt gazdasejteknek a szénhidrát, vagy N-acetyl mintázatához kötődik az MBL/fikolin, mely ez által aktiválja a MASP-2-t, mely szerin-észterázként képes a C4 majd a C2 molekula hasítására (4,5). A MASP-2 aktivációja erősen függ a MASP-1-től, a MASP-1 autoaktivációja következtében hasítja a zimogén MASP-2-t, ezáltal aktiválja. A MASP-1 gátlásával a MASP-2 autoaktiváció is gátlódik. A MASP-1 a C2 hasítására is képes, ezáltal felerősíti a MASP-2 C3-konvertáz-t (C4bC2b) kialakító képességét. A két enzim közötti kooperáció a magyarázata annak a megfigyelésnek, hogy minden MBL/MASP-komplex által létrehozott C4b a C2b-vel való kapcsolódás eredményeként C3-konvertázzá alakul, míg a klasszikus útvonal esetén csupán minden negyedik C4b formálódik C3-konvertázzá. Az MBL/fikolin-MASP komplex szerkezetében hasonlít a C1-molekulakomplexre (3.Ábra) (6).



3.Ábra: MBL- és ficolin-MASP komplex. (Russel Wallis)

A C5 konvertáz kialakulása a klasszikus út aktivációjánál leírtakhoz hasonlóan történik.

Az alternatív úton történő aktiváció

A szervezetben kis mértékben, de állandóan hidrolizálódó C3b-szerű C3(H₂O) molekulák teszik lehetővé az alternatív út aktivációját. A C3(H₂O) kedvező környezetben - mint például a kórokozók, gombák és vírusok felszíne, amik csak kis mennyiségben tartalmaznak szíálsavat- a felszínhez kötődve aktív marad. A szervezet saját sejtjei nagy mennyiségben tartalmazzák a szíálsavat a membránban, ami nem kedvez az alternatív út aktiválódásának. A C3(H₂O) B faktor-t képes kötni, amely így aktiválódik a D faktor által, és C3(H₂O)Bb keletkezik. Ez a komplex a Bb hatására a natív C3-at hasítja. A keletkező C3b az aktivátor felszínhez tud kötődni, B faktorról kapcsolódik, majd a D faktor általi hasítás következtében kialakul a C3bBb, az alternatív út C3 konvertáza. A komplexet a properdin stabilizálja, egyébként pár perc után inaktiválódna. A C3-konvertáz további C3 molekulákat képes hasítani, ezzel nagyfokú amplifikációt tesz lehetővé. A keletkező C3b komponens a C3bBb mellé kötődve a C5 molekula hasítására képes alternatív C5 konvertáz komplexet hozza létre (7).

Anafilatoxinok

A rendszer aktiválódása során keletkező kisebb fragmentumok (C2a, C4a, C3a, C5a, Ba.) a környezetbe diffundálnak. A C5a és a C3a anafilatoxinok, aktivitásuk révén hatással vannak számos folyamatra. Az erek átteresztőképességét, valamint a gyulladást közvetítő citokinek felszabadulását fokozzák, illetve kemotaktikus aktivitásuk révén befolyásolják a leukociták migrációját (3).

A komplement aktiváció szabályozása

A szervezet saját sejtjeinek védelmét, és a túlzott mértékű komplement aktiválódás kivédését szabályozó molekulák, a properdin kivételével, inhibitorok biztosítják. A szabályozásban szolubilis molekulák és membránfehérjék is részt vesznek.

Működésüket tekintve lehetnek enzimgátlók, mint például a szolubilis C1-inhibitor, amely gátolja a C4- és C2- komponensek aktiválását a C1r, C1s, MASP-1 és MASP-2 gátlásával, és ez által gátolja a klasszikus és lektin úton történő aktivációt.

Vannak olyan szabályozó molekulák, melyek maguk is enzimaktivitással rendelkeznek, így fejtik ki szabályozó hatásukat. Ilyen szolubilis enzim az I faktor, amely a C4b-t és a C3b-t hasítja. A folyamatban a membrán kofaktor fehérjét (MCP-t), a CR1-et, a H faktort, vagy a C4b-kötő fehérjét használja kofaktorként. Az anafilatoxin-inaktivátor (karboxipeptidáz N) a C3a-, és C5a peptidekről lehasítja a terminális arginint, melynek következtében inaktiválódnak, bár a C5a_{desarg} még ebben a formában is ellát bizonyos funkciókat, pl. kemotaktikus aktivitása van.

A keletkezett aktivációs komplexek dezintegrálásában szolubilis szabályozó molekulák és membránfehérjék is részt vesznek, így védi meg a szervezet saját sejtjeit a lízistől. A CR1 (1-es típusú komplementreceptor) és a lebomlást gyorsító faktor (DAF) a klasszikus és alternatív útvonal C3/C5 konvertázainak szétesését gyorsítja. A CD59 membránfehérje megakadályozza a MAC kialakulását azáltal, hogy gátolja a C9 molekula C8-hoz kötődését.

A komplementrendszer aktiválódásának megfelelő szabályozása elengedhetetlen a szervezet fiziológiás állapotának fenntartásához (3,8).

Neuromyelitis optica

A Neuromyelitis optica (NMO) a központi idegrendszert érintő autoimmun betegség, melyet a látóideg és a gerincvelő gyulladása jellemez. Ez a ritkának mondható (1/100.000 gyakoriságú) betegség nőknél sokkal gyakrabban fordul elő, a nemek aránya (nő:férfi) 9:1. Elsősorban 30-40 éves korosztályt érinti, de ritkán előfordulhat idősebb korban, illetve gyermekkorban is (9). A betegség lefolyását tekintve az esetek 80-90%-ában relapszusokban zajlik, míg az esetek kisebb része monofázisos (10).

Aquaporin4-autoantitest

A többi demyelinisációval járó betegségtől egy specifikusnak bizonyult auto-antitest különbözteti meg, amely a központi idegrendszer víztereinek szabályozásában fontos szerepet játszó aquaporin-4 (AQP4) vízcsatornák ellen termelődik. Az AQP4 vízcsatorna a többi vízcsatornához képest túlsúlyban található meg az agyban, különösen gyakori a látóidegben, és a gerincvelőben (11,12). Az AQP4-autoantitest, főként IgG₁, átmegy a vér-agy-gáton és az astrocytákon levő AQP4 molekulákhoz kötődik, ami két egymással párhuzamosan végbe menő folyamatot von maga után. Egyrészt bekövetkezik az AQP4 endocitózisa/degradációja, másrészt kiváltja a II-es típusú túlérzékenységi reakciót, vagyis az NK sejtek degranulációját, előidézve az astrocyták elpusztítását az ADCC reakció révén, illetve aktiválja a komplementrendszert. Az aktivált komplement és az általa mobilizált neutrofil és eosinofil granulociták elősegítik az astrocyták nekrozisát (13,14). Az idegsejtek károsodása, és a demyelinizáció másodlagosan következik be, a Na-függő glutamát transzport zavarának következtében ugyanis a glutamát háztartás felborul (15).

Diagnózis

Sokáig a Sclerosis multiplex (SM) variánsai közé sorolták a patológiai kép és a relapszusokban való megnyilvánulása miatt. Később számos típusos eltérés miatt felvetették, hogy két külön betegségről van szó. Az aquaporin4-autoantitestek felfedezése óta az NMO-t már önálló betegségként tartják számon. Definitív diagnózisának felállításához számos kritériumot határoztak meg. A két klinikai kritérium a látóideggyulladás (opticus neuritis), és a transzverz myelitis. Radiológiai kritérium, hogy a koponya MRI negatív legyen, vagy SM-re nem jellemző, illetve a gerinc MRI vizsgálat eredménye 3 csigolya szegmentumnál

kiterjedtebb myelitist mutasson. Szerológiai kritérium a szérumban anti- AQP4 ellenanyagok jelenléte. A két klinikai kritériumnak mindenképp teljesülnie kell, illetve a radiológiai és szerológiai kritériumok közül legalább kettőnek a definitív diagnózishoz (10,16).

A specifikus ellenanyag felismerésével olyan NMO-s eseteket is el tudunk különíteni a Sclerosis multiplexstől melyek csak a látóideget, illetve a gerincvelőt érintő kórképet mutatnak. Összességében ezt NMO-spektrumnak nevezzük. Ide tartozik a RION (recurrent inflammatory optic neuritis) melyet bilaterális vagy ismétlődő látóideg gyulladás jellemez, illetve idetartozik a LETM (longitudinally extensive transverse myelitis) melyre a legalább három csigolyaszegmentumra kiterjedő myelitis jellemző (17).

Kezelés

A betegség lefolyása egyénenként változó lehet, ezért, és a kis számú esetek miatt, egységes, általánosan elfogadott kezelési mód még nincs megállapítva. Az akut tünetek kezelésében elsődleges szerepe van a nagy dózisban adagolt szteroidoknak, súlyos tünetek esetén azonban egyre szélesebb körben alkalmaznak plazmaferézist (18). A későbbi akut stádiumok megelőzésére az immunszuppresszív kezelés hatékonyságát mutatták ki (19). Ez legtöbbször tablettában adagolt szteroidok és egyes daganatok kezelésére alkalmazott azathioprine (immunszuppresszív ágens, ami elsősorban a leukociták proliferációját gátolja) kombinációját jelenti, majd a szteroidot fokozatosan leépítve az azathioprine hosszú távú szedését javasolják (20,21).

Célkitűzések

A látóidegben és a gerincvelőben zajló patológiai folyamatokban az aquaporin 4 fehérjékhez kapcsolódó főként IgM típusú antitestek hatására lokálisan végbemenő komplementaktiválódás szerepét szövettani vizsgálatok igazolják (11). A szisztémásan kimutatható anti-AQP4 (többnyire IgG1) ellenanyag és az NMO patogenezise között klinikai tanulmányok és patológiai adatok is alátámasztották a kapcsolatot, míg a komplementrendszerrel illetően csupán egyetlen tanulmány tesz említést arról, hogy a C4d és

SC5b-9 szintek emelkedettek szérumban, aminek alapján a klasszikus útvonal aktivációjára következtettek (11,22).

Munkánkban a komplementrendszer részletes vizsgálatát tűztük ki NMO betegségben, annak érdekében, hogy tisztázzuk, van-e a keringésben mérhető komplement paraméterekben olyan eltérés, melynek diagnosztikus jelentősége lehet a betegség lefolyását illetően.

Vizsgált egyének és módszerek

Betegek

A multicentrikus vizsgálatba 25 NMO-s beteget vontunk be, akiknek a vérében aquaporin-4 autoantitestek kimutathatóak voltak (szeropozitívak). Öt egészségügyi intézetből (Pécsi Orvostudományi Egyetem, Neurológiai Klinika, Pécs; Jahn Ferenc Dél-Pesti Kórház, Neurológiai Osztály, Budapest; Markusovszky Kórház, Neurológiai Osztály, Szombathely; Megyei Kórház, Neurológiai Osztály, Kecskemét; Szent György Megyei Kórház, Neurológiai Osztály, Székesfehérvár) kaptuk meg a betegek szérum és EDTA-plazma mintáit.

A betegek átlag életkora 40 év (min.-max. kor 30-69 év), és a nemek aránya (nő:férfi) 22:3. Valamennyien azathioprine kezelésben részesülnek, és a mintavételkor tünetmentes állapotban voltak. 12 beteg megfelel a definitív NMO kritériumainak, 4 betegnek csak látóideg gyulladásal kapcsolatos tünetei vannak (RION), míg 9 beteg csak gerincvelő gyulladásal kapcsolatos tüneteket mutat (LETM).

Kontrollok

Egészségügyi szűrővizsgálatra érkező véletlenszerűen kiválasztott 113 egészséges egyén vérmintáinak vizsgálatával kapott adatokkal történt a betegek eredményeinek összehasonlítása. A kontrollok átlag életkora 35 év (min.-max. kor 30-43 év), és a nemek aránya (nő:férfi) 49:64.

Minták kezelése

EDTA-plazma

A vérvétel és a vérmintákat lecentrifugálását követően a plazmát a lehető legrövidebb időn belül lefagyasztottuk, és -72°C -on tároltuk. Amennyiben szállításra volt szükség, akkor a mintákat a szállítás során szárazjég közé tettük.

A mintákat csak egyszer, a komplement mérések idején olvasztottuk fel.

Szérum

A vérvétel során levett vért a megalvadása után lecentrifugálták, majd a kapott szérumot -72°C -on tároltuk. Szállításuk, ha szükséges volt, a plazma mintáknál leírtakkal megegyezően történt.

A komplementaktivációs útvonalak vizsgálata

A klasszikus, az alternatív és MBL-függő lektin útvonal esetében szérum mintákban vizsgáltuk meg az összkomplement aktivitást. A klasszikus útvonal esetében a Semmelweis Egyetem III. Számú Belgyógyászati Klinika Komplement Laboratóriuma által a klinikai diagnosztikában bevezetett hemolitikus titrálással határoztuk meg az aktivitást (Mayer módszere alapján), míg az alternatív és lektin út esetében ELISA módszert alkalmaztunk a Wieslab által gyártott kereskedelmi kittel a gyári ajánlásoknak megfelelően.

Hemolitikus titrálás

A minták hígításához szükséges VBS^{++} -puffer elkészítéséhez VBS puffert és Ca-Mg^{2+} törzsoldatot használtuk. A VBS-t az A-oldatból (85 g NaCl, 1 l desztillált víz, 3,75 g Na-barbiturát) és B oldatból (5,75 g barbitálsav, 600 ml forró desztillált víz) állítottuk össze, majd desztillált vízzel 1,8 literre egészítettük ki. Miután lehűlt, a pH-t 7.4 ± 0.5 -re állítottuk be 1 M HCl-val. Az oldatot desztillált vízzel 2 literre egészítettük ki, így 5x koncentrált törzsoldatot készítettünk, amely $4-10^{\circ}\text{C}$ között 6 hónapig tárolható. A Ca-Mg törzsoldatot 20,33 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ és 4,41 g CaCl_2 siccum összekeverésével, majd desztillált vízzel 100 ml-re való feltöltésével készítettük, amely 4°C -on 3 hónapig tárolható. A VBS^{++} puffert úgy készítettük el, hogy a VBS 900 ml-éhez 2,5 ml Ca-Mg^{2+} törzsoldatot adtunk, majd kiegészítettük 1 literre desztillált vízzel. A koncentrált VBS^{++} puffer is 6 hónapig tartható el $4-10^{\circ}\text{C}$ -on.

A hemolitikus rendszert úgy készítettük el, hogy a VBS-Ca-Mg²⁺ pufferral háromszor mosott birka vörösvértestből (vvt) az utolsó centrifugálást (800 g, 4 perc) követően az üledékből 2%-os szuszpenziót készítettünk a VBS-Ca-Mg²⁺ pufferral. A 96 lyukú ELISA lemezhez 10 ml VBS-Ca-Mg²⁺ pufferben 0,2 ml birka vvt üledéket szuszpendáltunk el. Ezt az oldatot összekevertük 1:2000 hígítású hemolizin oldattal (*ORLC 25 Amboceptor 5ml, DADE BEHRING GmbH, Marburg, Germany*), amit úgy készítettünk el, hogy 10 ml VBS-Ca-Mg²⁺ pufferhez 0,5ml hemolizin oldatot adtunk. Az oldatok összekeverése után 20 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk.

A hemolitikus tesztet 96 lyukú ELISA lemezen állítottuk össze. Minden 4. oszlopba (kivéve a lízis és reagens kontrollokat) 294 µl VBS-Ca-Mg²⁺ puffert, a 3., 2. és 1. oszlopokba pedig 150 µl mértünk a pufferből pipettával. A mintákat úgy hígítottuk, hogy minden negyedik lyukba 6 µl-t mértünk belőlük, majd a 4. lyukból 150 µl-t átvittünk a 3. lyukba, majd abból 150 µl-t a 2.-ba és abból szintén 150 µl-t az 1. lyukba. A normál humán szérumból, a magas- és az alacsony kontrollokból is 6 µl-t mértünk a megfelelő lyukakba és a mintákhoz hasonló módon hígítottuk. A líziskontroll (100%-os lízis) lyukba 150 µl desztillált vizet, a pufferkontroll lyukba (0%-os lízis) 150 µl VBS-Ca-Mg²⁺ puffert mértünk.

Ezután a reakciót minden lyukba 75 µl hemolitikus rendszer hozzáadásával indítottuk el, és 37°C-on inkubáltuk 60 percig.

Ezt követően a reakciót centrifugálással (3500 fordulat, 5 perc) állítottuk le, és minden lyukból 150 µl felülúszót vittünk át laposaljú ELISA lemezre. Az optikai denzitást fotométeren 550 nm-en mértük le. A kiértékelést összkomplement program segítségével végeztük.

A komplement fehérjék vizsgálata

Számos komplement komponens szintjét mértük szérumban. Turbidimetriával (*Cobas Integra 800 analizátor, Roche, Németország*) mértük meg a C3 mennyiségét, míg a B faktor és I faktor koncentrációit a Laboratórium által a diagnosztikában használt radiális immundiffúzió módszerével állapítottuk meg. A C4 és a C1-inhibitor antigén koncentrációk meghatározását hasonlóan, radiális immundiffúzióval végeztük. A C5 esetében az általunk bevezetett radiális immundiffúziós metodikát alkalmaztuk.

C4-szint mérése radiális immundiffúzióval

A minták hígításához szükséges VBS-puffert az A-oldatból (85 g NaCl, 1l desztillált víz, 3,75 g Na-barbiturát) és B oldatból (5,75 g barbitálsav, 600 ml forró desztillált víz) állítottuk össze, majd desztillált vízzel 1,8 literre egészítettük ki. Miután lehűlt, a pH-t 7.4 ± 0.5 -re állítottuk be 1 M HCl-val. Az oldatot desztillált vízzel 2 literre egészítettük ki, így 5x koncentrált törzsoldatot készítettünk, amely 4-10 °C között 6 hónapig tárolható.

Agaróz oldatból (1,5 %-os, 1,5 g agaróz, 100 ml agaróz puffer, 0,01 g Na-azid) 15 ml-t felmelegítettünk, majd miután lehűlt 56 °C-ra hozzáadtunk 55 µl kecskében termelt anti-humán C4 ellenanyagot (DAKO). A megfelelően zsírtalanított, vízszintező asztalon elhelyezett, 10x10 cm² területű üveglemezre öntöttük az ellenanyagot tartalmazó gél, és hagytuk megdermedni. Dermedés után 2,5 mm átmérőjű lyukakat vágunk a gélbe. Minden vizsgálandó minta, a magas és alacsony kontrollok 1:2 hígításából (VBS-sel hígítva), valamint a standardokból (Dako Human Calibrator) 5-5 µl-t mértünk a lyukakba. Standardként agaróz pufferrel (90 % VBS, 10 % 0,1M EDTA) 1:1-1:8 felezve hígított normál kevert szérumot használtunk. A vízszintesen elhelyezett lemezeket 48 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten, ez alatt megtörtént a precipitáció.

Ezután a lemezeket fiziológiás sóoldatban mostuk két óránként, összesen három alkalommal cserélve a mosófolyadékot, hogy a nem precipitálódott fehérjéket eltávolítsuk. Mosás után a gél nedves szűrőpapírral lefedve rászárítottuk a lemezre. A gél Amidoblack festékkel (1g amidoblack, 250 ml metanol, 200 ml desztillált víz, 50 ml jégecet) festettük, majd a felesleges festéket festékmentesítő oldattal (500 ml metanol, 400 ml desztillált víz, 100 ml jégecet) távolítottuk el. A precipitációs gyűrűk átmérőjét, amely arányos a minták C4 koncentrációjával, automata mikrométerrel mértük meg. A minták C4 szintjét a standardként bemért, ismert koncentrációjú szérum hígításaiból saját készítésű programmal határoztuk meg.

Az I faktor, B faktor, C5, C1-inh esetében a radiális immundiffúziós metodika megegyezik a C4 esetben leírtakkal. A felhasznált ellenanyagokat és a vizsgálati körülmények részleteit az 1.táblázat tartalmazza.

Antitest			Minta hígítása	Kalibrátor	Normál tartomány***	
Név	Gyártó	Térfogat*			Érték	Mértékegys.
Poliklonális nyúlban termelt anti- humán C4	Dako,	70	1:2	Dako	0,15-0,55	g/l
Kecsében termelt anti- humán C5	Diasorin	150	1:2	NHS**	70-130	%
Kecsében termelt anti- humán C1- inhibitor	Quidel	120	1:2	Saját, tisztított fehérje	0,15-0,3	g/l
Birkában termelt anti- humán B faktor	Binding Site	150	1:2	NHS	70-130	%
Birkában termelt anti- humán I faktor	Binding Site	90	1:1	NHS	70-130	%

*10x10 cm-es lemezre, 15 ml gélre vonatkoztatott mennyiség

**Egészséges egyének szérumból kevert saját kalibrátor

***SE, III.sz Belgyógyászati Klinika Komplement labor diagnosztikában használt normál értékek

C5 radiális immundiffúziós módszer beállítása

Több ellenanyag esetében meghatároztuk a radiális immundiffúzióhoz szükséges optimális bemérési mennyiséget egy lemezhez. *Dako* által gyártott ellenanyag esetében 250 µl-t mértünk a 15ml-es gélhez. *Diasorin* esetében 150 µl-t mértünk be, a *Quidel* által gyártott ellenanyag esetében pedig 35 µl-t szükséges a 15 ml-es gélbe, ahhoz, hogy a pericipációs gyűrűk mérete, és élessége ideális legyen a kiértékeléshez. NMO-s méréseinkhez a *Diasorin* által gyártott, kecsében termelt anti-humán C5 ellenanyagot használtuk.

A komplement aktivációs termékek vizsgálata

A klasszikus (C1rC1sC1-inh), az alternatív (C3bBbP) és a terminális út (SC5b-9) aktivációs termékeit a korábban beállított házi ELISA módszerekkel határoztuk meg, EDTA-plazmában (23).

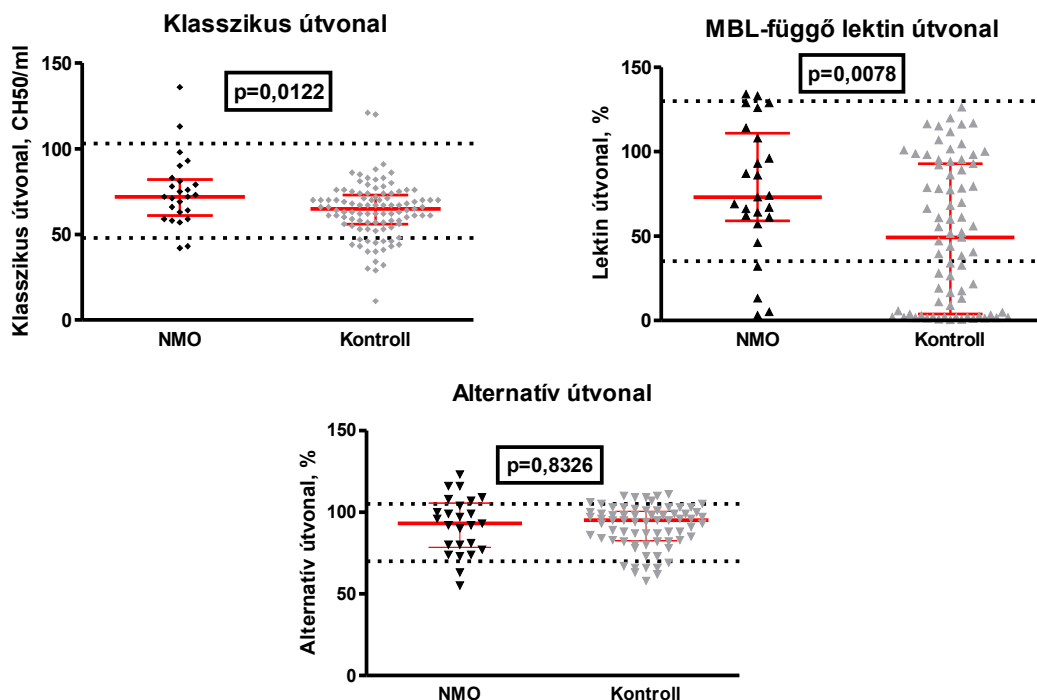
Kiértékelés

Statisztikai elemzéseket a Prism 5 programmal (GraphPad Software, San Diego California, U.S.A.) végeztük el. A független csoportok összehasonlítására Mann-Whitney tesztet, míg a korrelációk kiszámítására a Spearmann-féle Rho tesztet alkalmaztuk. Minden statisztikai elemzésnél a $p < 0,05$ értéket tartottuk statisztikailag szignifikánsnak.

Eredmények

Komplementaktivációs útvonalak

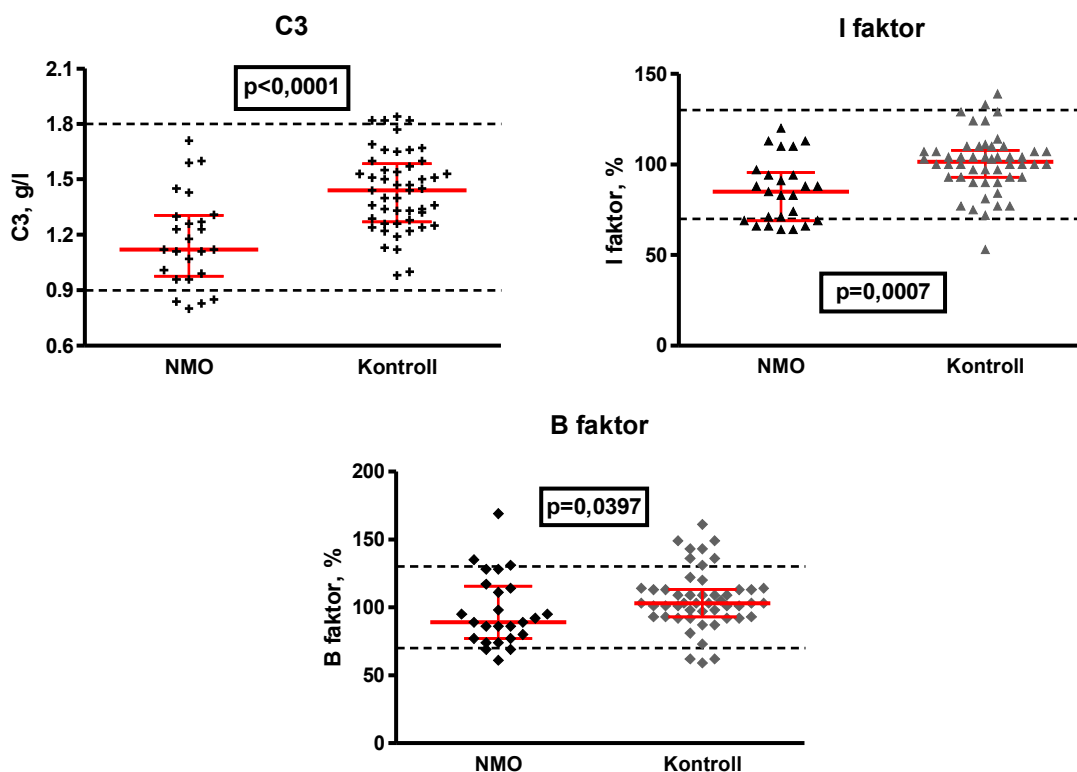
A klasszikus és az MBL-függő lektin út összkomplement aktivitásai szignifikánsan emelkedtek ($p=0,0122$ és $p=0,0078$) a betegekben az egészséges kontrollokhoz viszonyítva, míg az alternatív útvonalé nem mutatott különbséget a két csoport között (1.ábra).



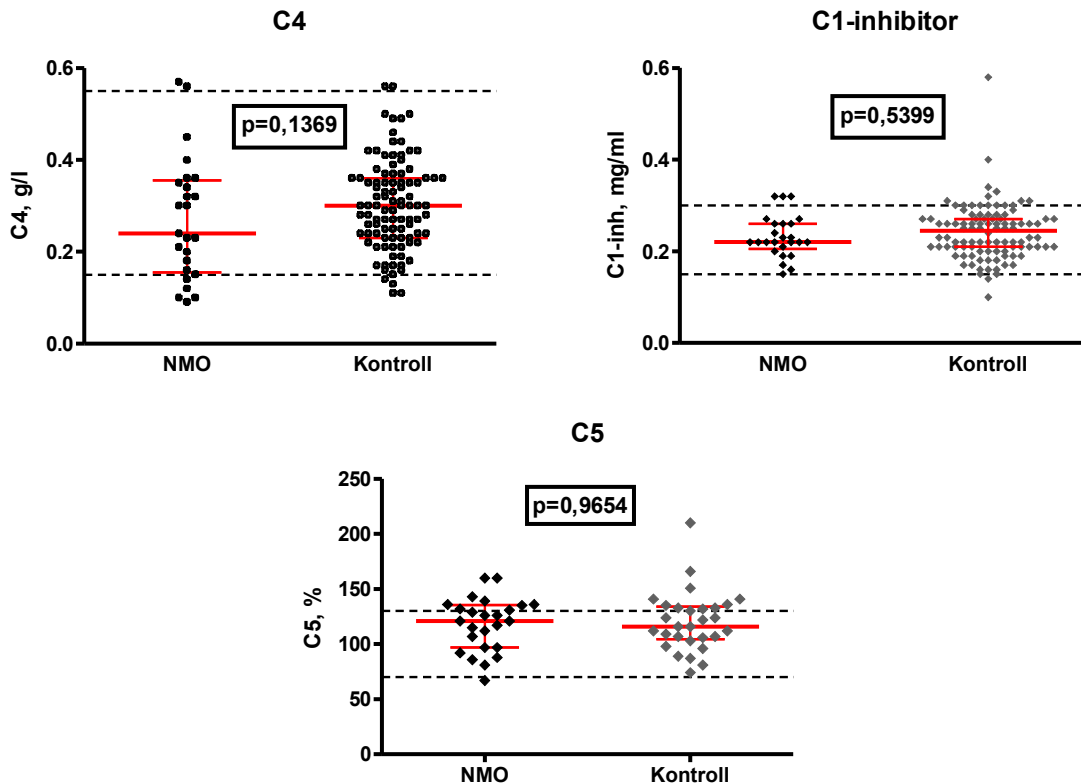
1.Ábra. A komplementrendszer aktivációs útvonalainak összkomplement aktivitásai az egészséges kontrollokhoz képest. A szaggatott vonalakkal határolt rész a rutin diagnosztikában meghatározott normál tartományokat jelöli, a piros vonalak a mediánt és az interkvartiliseket jelölik.

Komplement fehérjék

Az alternatív útvonal komponenseinek- a C3, I faktor, és B faktor- szérumban mért szintjében szignifikáns csökkenés látszik ($p<0,001$, $p=0,007$ és $p=0,0397$) az NMO-s betegekben egészségesekhez viszonyítva, míg a többi komponens- C4, C5, C1-inh- szintjében nem kaptunk szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest (2. és 3. ábra).



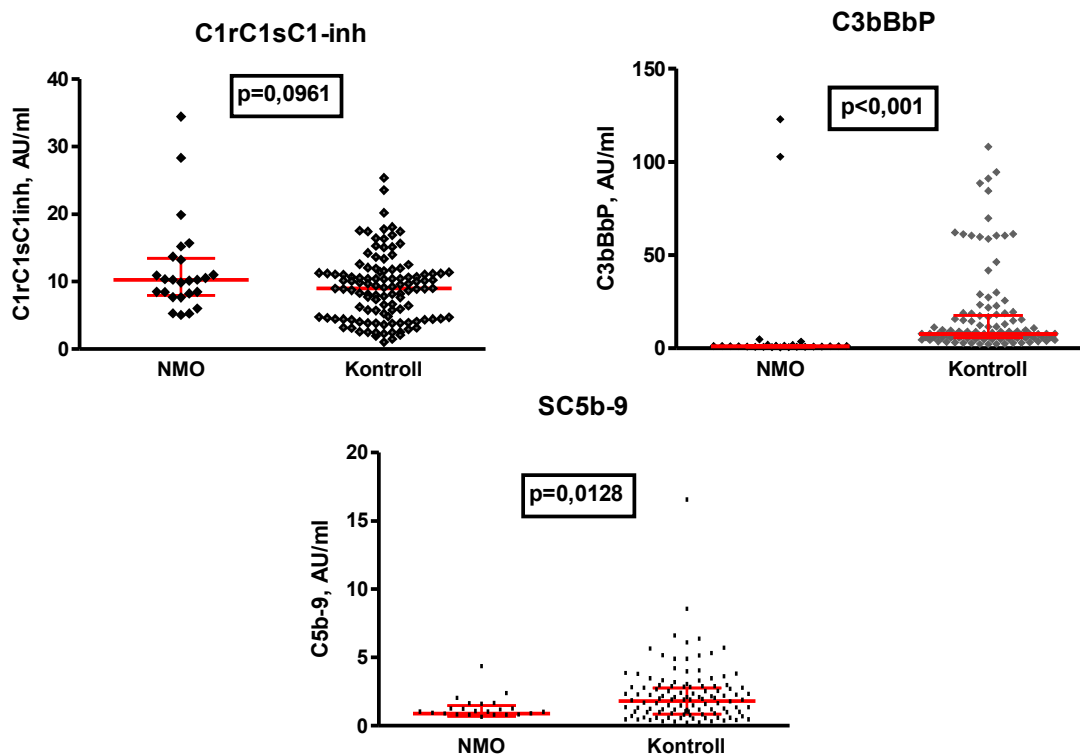
2.Ábra. Az alternatív útvonal komponenseinek szintjében tapasztalt változások
A szaggatott vonal a normál tartományokat jelöli, a piros vonalak a mediánt és az interkvartilis tartományt jelölik.



3.Ábra. Egyéb komplement komponensek szintjének összehasonlítása az egészséges kontroll egyénekben mért értékekkel. A szaggatott vonal a normál tartományokat jelöli. A piros vonalak a mediánt és az interkvartiliseket jelölik.

Komplement aktivációs termékek

Az egészséges kontrollok eredményeihez viszonyítva szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk a C1rC1sC1-inhibitor szintjében. Ugyanakkor a C3bBbP és az SC5b-9 komplement aktivációs termékek szintjében szignifikáns csökkenést mutattunk ki NMO-s betegek plazmájában az egészséges kontrollokhoz képest (4. ábra). A komplement aktivációs termékek relatív mennyiségét vizsgálva a C1rC1sC1-inh komplex a C1-inhibitor arányában minimális emelkedést mutat a betegekben az egészségesekhez képest ($p=0,0108$). Az relatív C5b-9 a C5-höz viszonyítva nem különbözött a két csoportban. A C3bBbP komplexet akár a C3 akár a B faktor arányában vizsgáltuk, szignifikáns csökkenést kaptunk a betegekben ($p<0,0001$, $p<0,0001$).



4.Ábra. A komplement aktivációs termékek szintjei egészségesekhez viszonyítva
A piros vonalak a mediánt és az interkvartiliseket jelölik.

Korreláció vizsgálat

Megvizsgáltuk, hogy a komplement paraméterek milyen összefüggést mutatnak egymással a betegek és az egészségesek mintáiban. A korrelációkat a 2. és 3. táblázat szemlélteti, az egyszerűség kedvéért ahol volt korreláció, azt piros színnel jelöltük, amely esetben pozitív korrelációt találtunk azt az összefüggést '+' jelöli, ahol negatív korrelációt találtunk azt '-' jelöli. NMO-s betegek mintáiban számos komplement paraméter szintje korrelál egymással. Megfigyelhető, hogy a komplement komponensek közül több korrelál egymással, mint az egészséges kontrollok mintáiban.

NMO-s betegeknél a legszorosabb összefüggéseket a C3 mutatta a klasszikus összkomplementtel ($r=0,8001$; $p<0,0001$), az I faktoral ($r=0,7958$; $p<0,0001$) a B faktoral ($r=0,7701$; $p<0,0001$) és a C4-gyel ($r=0,7195$; $p<0,0001$).

NMO Korreláció										
	CH50	C3	C4	I faktor	B faktor	C1 inh	C5	C1rsC1-inh	C3bBbP	SC5b-9
CH50		+	+	+	+	-	-	+	+	-
C3			+	+	+	-	+	-	+	-
C4				+	+	+	+	-	-	-
I faktor					+	-	-	-	+	-
B faktor						+	+	-	-	-
C1 inh cc.							-	-	-	-
C5								-	-	-
C1rC1sC1-INH									-	-
C3bBbP										+
SC5b-9										

2.Táblázat. NMO-s betegek komplement komponenseinek korrelációja

Az egészséges egyének szérumában a legszorosabb korreláció az I faktor és a B faktor között volt ($r=0,5874$, $p<0,0001$), ugyanakkor az I faktor a C5-tel is szoros korrelációt mutatott ($r=0,5265$, $p=0,0048$).

Egészséges (MK) korreláció										
	CH50	C3	C4	I faktor	B faktor	C1 inh	C5	C1rsC1-inh	C3bBbP	SC5b-9
CH50		+	+	-	-	-	-	-	-	-
C3			-	+	+	+	-	-	-	-
C4				-	-	+	-	-	-	-
I faktor					+	-	+	-	-	-
B faktor						-	-	-	-	-
C1 inh cc.							-	-	-	-
C5								-	-	-
C1rC1sC1-INH									-	-
C3bBbP										+
SC5b-9										

3.Táblázat. Egészséges egyének komplement komponenseinek korrelációja

Az egészségesek és betegek korrelációs mintázatának összehasonlításából kiderül, hogy a betegekben nem csak több paraméter között lehetett kimutatni összefüggést, hanem ezek az összefüggések sokkal szorosabbak is voltak. Különösen jellemző volt az alternatív út komponensei közötti erős pozitív korreláció.

Definitív NMO, RION, LETM

Az összkomplement és a komplementfehérjék, valamint a komplement aktivációs termékek szintjeinek összehasonlítását elvégeztünk az NMO betegség klinikai szempontból megkülönböztetett alcsoportjaiban (definitív NMO, RION, LETM) is. A komplement analízis szempontjából a klinikai alcsoportok között szignifikáns különbséget nem volt, ezért ezeket az eredményeket nem részletezem.

A NMO-t nem rég óta tekintik önálló betegségnek, az első diagnosztikus kritérium rendszer 1999-ben született meg, amit 2004-ben tovább fejlesztettek. A betegség patomechanizmusát tekintve 2-es típusú (ellenanyag-mediálta) túlérzékenységi reakció okozta gyulladásos folyamat áll a háttérben. A patológiai szövetminták vizsgálatakor a komplement aktiváció szerepe egyértelműen bebizonyosodott, és arra is van adat, hogy a komplement aktivációs termékek megjelenését szisztémásan is ki tudták mutatni egyes relapszusban levő betegeknél (22). Az erről szóló tanulmány értékét csökkenti az a körülmény, hogy a komplement aktivációs termékek szintjét szérumban vizsgálták, ami az in vitro komplementaktiváció miatt meghamisíthatja az eredményeket. A natív komplement fehérjék szérumban koncentrációit sem mérték pedig a komplement aktiváció mértéke csak az alap komplement fehérjék szintjéhez viszonyítva értelmezhető (24).

Munkánkban először került sor a komplementrendszer részletes és korszerű vizsgálatára, melyek magukban foglalták a teljes komplement kapacitás felmérésére szolgáló funkcionális összkomplement méréseket, az intakt komplement fehérje koncentrációk meghatározását, és a komplementaktiválódás során keletkező aktivációs termékek szintjének kimutatását is.

Megmértük a klasszikus és az alternatív aktivációs út összaktivitását és komponenseinek szintjét, és emellett először került sor az MBL-lektin útvonal vizsgálatára. Arra is gondot fordítottunk, hogy a komplement aktivációs termékek kimutatására olyan mintákat (EDTA-plazmát) alkalmazzunk, amelyekben az eredményeket meghamisító in vitro komplementaktiváció megfelelően gátolva volt.

Tanulmányunkba gyógyszeres kezelés alatt álló, tünetmentes betegeket vontunk be. Az eredmények alapján mi nem tudtunk kimutatni komplement aktivációs termékeket a remisszióban lévő betegek mintáiban, annak ellenére, hogy a betegek szeropozitívak voltak.

Az eredmények ugyanakkor azt sem zárják ki, hogy a negatív eredményt ellentétes hatású folyamatok eredményezik. A betegségre jellemző gyulladásos állapot során fokozott komplement termelést kellene tapasztalnunk, de ha ezzel egy időben szignifikáns komplement felhasználás is zajlik- ami főként az alternatív útvonalat érinthetné- akkor az összkomplement aktivitás nem feltétlenül mutat csökkenést. A gyulladás mellett szól a klasszikus és lektin útvonal összaktivitásának mérsékelt emelkedése, a komplement felhasználásra pedig a C3, B faktor, I faktor szintek szignifikáns csökkenése utal.

Amennyiben folyamatosan zajló komplementaktivációt feltételezünk, ami a natív fehérje szintet is lecsökkenti, akkor ilyen krónikus állapotban- mint amilyen ez a betegség is- a komplement aktivációs termékek szintjében bekövetkező emelkedés nem mindig tetten érhető. Hasonló következtetésekre jutottak Szisztémás lupus erythematosus-os betegek vizsgálatával (25). Ebből a szempontból hasonló a helyzet Hereditær angioneurotikus ödémában, ahol a C1-inhibitor hiányában folyamatosan felhasználódó C4 szintje csökkent, még sem lehet C4d-szint emelkedést detektálni, ellenkezőleg, a C4d-szint is csökkent az egészségesekhez képest (26).

Az általunk vizsgált NMO-s betegekben azonban a relatív komplement aktivációs termék koncentrációk -arányosítva a natív fehérjékhez- nem mutattak emelkedést. Kivétel a klasszikus útvonal, ahol a relatív aktivációs termék mennyiségében minimális emelkedés figyelhető meg, ugyanakkor semmi nem utal a klasszikus útvonal in vivo aktiválódására, mivel, a C1-inhibitor és C4-szintek nem csökkentek ráadásul a klasszikus összkomplement szint magasabb volt a betegekben. Ezen eredmények alapján megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált NMO-s betegekben komplementaktiváció nem zajlik.

A komplement vizsgálatok diagnosztikus jelentőségének megállapítására tervezzük, hogy a továbbiakban remisszióban levő kezelt betegekkel kapott eredményeinket összehasonlítsuk akut fázisban levő, kezeletlen betegek eredményeivel is.

Összefoglaló

A Neuromyelitis optica (NMO) a központi idegrendszer autoimmun betegsége, amelyet a látóideg és a gerincvelő gyulladása jellemez. A betegséget a központi idegrendszer fő vízcsatornája, az aquaporin-4 ellen termelődő ellenanyagok közvetítik. Szövettani jelei a lokális IgG lerakódás és komplement aktiváció. A betegség lefolyását tekintve relapszusokban zajlik, ritkán monofázisos. Teljes mértékben hatékony kezelési módot még nem találtak, az akut kezelésben szteroidokat, a relapszusok megelőzésére pedig leggyakrabban azathioprint alkalmaznak. Az autoantitestek a keringésben is kimutathatók, azonban a komplement rendszerre vonatkozó adatok NMO-ban igen szegényesek, a komplementrendszer részletes tanulmányozására eddig még nem került sor.

Célunk volt a klasszikus, az alternatív és a lektin útvonal vizsgálata, ami magában foglalta az egyes komplement fehérjék és a komplementaktivációs termékek kimutatását és a három aktivációs út összkomplement mérését.

25 kezelt, tünetmentes állapotban lévő, aquaporin4-autoantitest szeropozitív NMO-s beteget [40 (30-69) évesek, 22 nő], és 113 egészséges egyént [35 (30-43) évesek, 64 nő] vontunk be a vizsgálatba.

A klasszikus összkomplementet hemolitikus, az alternatív és MBL-lektin útvonalakat ELISA módszerrel vizsgáltuk. A C3 szinteket turbidimetriával, míg a C4, C5, B faktor, I faktor és a C1-inhibitor koncentrációit radiális immundiffúzióval mértük. A C1rC1sC1-inh, C3bBbP és SC5b-9 komplement aktivációs termékek szintjeit ELISA módszerrel határoztuk meg.

A klasszikus, és az MBL-lektin út aktivitása szignifikánsan magasabb volt a betegekben, mint a kontrollokban ($p=0,0122$ és $p=0,0078$), míg az alternatív összkomplement aktivitás nem különbözött a kontrolloktól. A C3, I faktor és B faktor szintek szignifikánsan alacsonyabbak a betegekben, mint a kontrollokban ($p<0,0001$, $p=0,0007$ és $p=0,0397$). A C4, C5 és a C1-inhibitor szintekben nem volt különbség a két csoport között. A C1rC1sC1-inh szintjében nem kaptunk eltérést a kontrollokhoz képest, míg a C3bBbP és SC5b-9 szintek szignifikánsan alacsonyabbnak adódtak ($p<0,0001$ és $p=0,0128$).

Bár az általunk vizsgált betegek vérében az AQP4-autoantitestek kimutathatóak voltak, eredményeink szerint remisszióban levő, kezelt NMO-s betegekben szisztémásan komplementaktiváció nem zajlik.

Summary

Neuromyelitis optica (NMO) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS) characterized by inflammation of the optic nerve and spinal cord. The disease is mediated by autoantibodies against aquaporin-4 (AQP4), the main water channel of the central nervous system. Local IgG deposition and complement activation within the CNS are histological hallmark of the disease. Most patients have a relapsing form of the disease with repeated attacks, but rarely it appears in a monophasic form. Acute syndromes are treated by steroids and more often azathioprine is used to avoid relapses.

Autoantibodies are present in the circulation, however data on the complement system are scarce, detailed analysis of the complement system hasn't been done.

We performed to investigate all of the complement activation pathways including the determination of complement proteins, activation products and the activities of each pathway.

In the study 25 AQP4-seropositive patients in remission phase [40 (30-69) age, 22 female] and 113 [35 (30-43) age, 64 female] healthy volunteers were involved. All patients were treated by azathioprine.

Activities of the complement pathways were measured in sera by the hemolytic titration (classical pathway) and Wi-ELISA (alternative and lectin pathways). Serum C3 levels were measured by turbidimetry, C4, C5, Bf, If, and C1-inh concentration were determined by radial immunodiffusion. The plasma levels of complement activation products C1rC1sC1-inh, C3bBbP and SC5b-9 were determined by ELISA system.

Activities of both the classical and lectin pathway were significantly higher in patients ($p=0,0122$ and $p=0,0078$) than in the controls, however the activities of the alternative pathway didn't show significant elevation compared to controls. Serum levels of C3, I factor and B factor were significantly lower ($p<0,0001$, $p=0,0007$ and $p=0,0397$) in NMO patients than in the controls. By contrast neither C4, C5, or C1-inh levels differed between the two groups. We didn't find significant elevation of complement activation product C1rC1sC1-inh levels in EDTA-plasma, however levels of C3bBbP and SC5b-9 were significantly lower ($p<0,0001$ and $p=0,0128$) in the samples of patients compared to controls.

Although the specific autoantibody is present in the circulation of the patients treated by azathioprine, our findings indicate that it does not trigger systematic complement activation.

Irodalom

1. Erdei Anna. A komplementrendszer szerepe az elsődleges felismerési mechanizmusokban és az immunválasz szabályozásában. *Magy Immunol* 2003; 2(4):33–38
2. Nicole M Thielens, Beate Bersch, Jean-François Hernandez, Gérard J. Arlaud. Structure and functions of the interaction domains of C1r and C1s: keystones of the architecture of the C1 complex. *Immunopharmacology*, 1999
3. Erdei Anna, Sármay Gabriella, Prechl József. Immunológia. *Medicina* 2012
4. Thiel S. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. *Mol Immunol*. 2007 Sep;44(16):3875-88
5. M. Matsushita, et al. Cutting edge: complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol* 164 (2000) 2281-4
6. Héja Dávid, Kocsis Andrea, Dobó József, Szilágyi Katalin, Szász Róbert, Závodszy Péter, Pál Gábor, Gál Péter. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *PNAS*, 2012
7. Volanakis JE. Participation of C3 and its ligands in complement activation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990;153:1-21
8. Peter F. Zipfel and Christine Skerka. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nature Reviews Immunology* 2009 9, 729-740 (2009)
9. Woojun Kim, Su-hyun Kim, Ho Jin Kim. New insights into Neuromyelitis optica. *J Clin Neurol* 2011;7:115-127
10. Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 1999;53:1107-14
11. Iljicsov Anna, Barsi Péter, Várallyai György, Tátrai Erika, Somfai Gábor Márk, Berecki Dániel, Rudas Gábor, Simó Magdolna. Devic-szindróma- esetismertetés, valamint a diagnosztika és kezelés aktuális elvei. *Ideggyogy Sz* 2010;63(9-10):320-326

12. Pittock SJ, Weinshenker BG, Lucchinetti CF, Wingerchuk DM, Corboy JR, Lennon VA. Neuromyelitis optica brain lesions localized at sites of high aquaporin 4 expression. *Arch Neurol* 2006;63:964-968
13. Hinson SR, Pittock SJ, Lucchinetti GF, Roemer SF, Fryer JP, Kryzer TJ, et al. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. *Neurology* 2007;69:2221-2231
14. Vincent T, Saikali P, Cayrol R, Roth AD, Bar-Or A, Prat A, et al. Functional consequence of neuromyelitis optica-IgG astrocyte interactions on blood-brain barrier permeability and granulocyte recruitment. *J Immunol* 2008;181:5730-5737
15. Marignier R, Giraudon P, Vukusic S, Confavreux C, Honnorat J. Anti-aquaporin-4 antibodies in Devic's neuromyelitis optica: therapeutic implications. *Ther Adv Neurol Disord* 2010;3:311-321
16. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006;66:1485-9
17. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol* 2007;6:805-15
18. Weinshenker BG, O'Brien PC, Petterson TM, Noseworthy JH, Lucchinetti CF, Dodick DW, et al. A randomised trial of plasma exchange in acute central nervous system demyelinating disease. *Ann Neurol* 1999;46:878-6
19. Papeix C, Vidal SJ, de Seze J, Pierrot-Deseilligny C, Tourbah A, Stankoff B, et al. Immunosuppressive therapy is more effective than interferon in neuromyelitis optica. *Mult Scler* 2007;13:256-9
20. Mandler RN, Ahmed W, Dencoff JE. Devic's neuromyelitis optica: a prospective study of seven patients treated with prednisone and azathioprine. *Neurology* 1998;51:1219-20
21. Invernizzi P, benedetti MD, Poli S, Monaco S. Azathioprine in multiple sclerosis. *Mini Rev Med Chem* 2008;8:919-926
22. Erdem Tüzün, Murat Kürtüncü, Recai Türkoğlu, Sema İçöz, Münevver Pehlivan, Ömer Birişik, Mefküre Eraksoy, Gulsen Akman-Demir. Enhanced complement

consumption in neuromyelitis optica and Behcet's disease patients. *Journal of neuroimmunology* 233 2011; 211-215

23. Csuka Dorottya, Füst György, Farkas Henriette, Varga Lilian. Parameters of the classical complement pathway predict disease severity in hereditary angioedema. *Clinical Immunology* 2011; 139,85-93
24. Mollnes TE, Jokiranta TS, Truedsson L, Nilsson B, Rodriguez de Cordoba S, Kirschfink M. Complement analysis in the 21st century. *Mol Immunol* 2007;44(16):3838-49
25. Nürnberger W, Bahkdi S. Plasma C3d/C3 quotient as a parameter for in vivo complement activation. *J Immunol Methods* 1984; 16;74(1):87-91
26. Varga Lilian és munkatársai, nem publikált eredmény

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni †Füst György Professzornak, aki a kutatást kezdeményezte és megindította ebben a témában, illetve lehetővé tette, hogy én is ebben a témában dolgozzak

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Varga Liliannak aki a kutatás vezetését átvette és irányította, Illés Zsolt Professzornak, aki a minták begyűjtésében, illetve a klinikai adatok megszerzésében nagy segítséget nyújtott.

Köszönöm Prohászka Zoltánnak, hogy a Kutatólaboratóriumban dolgozhatok.

Ugyancsak köszönöm Csuka Dorottyának, aki a C1rC1sC1-inh, C3bBbP és SC5b-9 aktivációs termékek szintjének mérését végezte, illetve Dóczy Andrásnének, és Szendrei Zsuzsannának, akik az egyes módszerek elsajátításában és gyakorlásában nagy segítséget nyújtottak.

Szerzői hozzájárulás

1. A C5 radiális immundiffúziós módszer beállítottam.
2. C4, C5, C1-inhibitor radiális immundiffúziós méréseket végeztem a mintákban, melynek eredményeképpen megkaptam az egyes egyének mintáinak C4, C5, és C1-inhibitor antigén koncentrációit.
3. Hemolitikus összkomplement mérést végeztem a mintákban, melynek eredményeként megkaptam a klasszikus útvonal összaktivitását.
4. Az 1,-3. pontban felsorolt és a dolgozatban részletezett összes további laboratóriumi eredményt statisztikai kiértékelését és értelmezését végeztem.