

KOMPLEMENT SİSTEMİ

Jale ERDEĞER (*)

Organizmanın vücuda giren bir antijene karşı, bağışık yanıtı hem humoral, hem de cellular bağışıklık sistemini birlikte içermektedir. Vücuda giren bir antijen, kendine karşı oluşmuş antikorlar tarafından tanınmaktadır. Bu tanımadaki ilk adım, komplement sistemi tarafından yönetilen, biyolojik bir reaksiyonla başlar.

Komplement, omurgalıların serumunda doğuştan var olan bir protein kompleksi olup, zincirleme reaksiyon veren bir enzim sistemidir. Komplement önceleri serumda bulunan bir yardımcı faktör olarak, antikorla kaplanmış hücreler (alyuvar, bakteri, vs.) üzerine etkileyerek, bunların erimesine (sitolizis) neden olan bir faktör olarak düşünülmüştür. Antikorların etkisini tamamlaması ile tanınan komplement, bu asrın başında alyuvar erimesinde «tamamlayan madde» anlamında kullanılmıştır. Bugün komplement sisteminin bir çok reaksiyonda ve immunopatolojiyi oluşturan bir çok olayda yer aldığı belirlenmiştir.

Asra girmeden önce, yapılan gözlemlerden kaynaklanan bilgilere göre, normal serumun bakteriler üzerinde tahrip edici etki yaptığı görülmüş, komplement keşfedilmiştir. 1880 yıllarında, bakteriler için kültür besi yerlerinde taze kan serumunun zararlı olduğu farkedilmiştir. Serum uzun süre oda ısısında bırakıldığında veya 56°C'de 30 dk. ısıtıldığında bu etkisinin kaybolduğu görülmüştür. Bu yolla iki aktivitenin işlerliği ortaya konulmuştur. 1889 yılında Buchner bu özelliğin «aleksin» olarak isimlendirilen termolabil bir proteine bağlı olduğunu zannetti. 1894 yılında Pfeiffer, bağışık kobay serumu ile kolera vibrionunu karıştırdığı zaman vib-

(*) A.Ü. Vet. Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araş. Görevlisi

rionların eridiğini göstermiştir. (Pfeiffer fenomeni). Bu olayı inceleyen Pfeiffer, bakterilerin erimesinde ısıya dirençli ve dirençsiz iki faktörün rol oynadığını gösterdi. Isıya dirençli faktör, spesifik olup bakteriye özgül antikorlardır. Isıya dirençsiz olan faktöre önce aleksin, sonra komplement denilmiştir. 1895'de Bordet, vibrionların iki faktörden ileri geldiğini, bunlardan birinin termostabil ve spesifik olduğunu, diğerinin termolabil ve nonspesifik olduğunu tekrar gösterdi. Bordet 1898'de koyun eritrositleri, özgül antikor ve taze serum (komplement) ile olayı tekrarlamış ve koyun eritrositlerinin de eridiğini göstermiştir. 1907 yılında Ferrata komplementin tek bir maddeden oluşmadığını, en az iki proteinden şekillendiğini göstermiştir. C1 adı verilen bir euglobin ve bir pseudoglobin olan C2 elde edilmiştir. Diğer iki bileşim daha sonraki yıllarda bulunmuştur. (1912-1925). Gram-negatif bakterilerin, kobara zehirinin ve mayanın C1 ve C2'yi izlemeden hemolitik aktiviteye etkili oldukları gözlemlendiğinde C3 tanınmıştır. Serumun amonyakla muamelesi esnasında C4 tanımlanmış, C4'ün C1'den sonra C2'den önce reaksiyona girdiği gözlenmiştir. 1950'lerde yalnız bu dört komponent bilinirken, proteinlerin yeni tekniklerle ayrılması sonunda komplement proteinleri izole edilebilmiştir. 1960'dan itibaren fraksiyonlamanın gelişmesiyle C5, C6, C7, C8, C9 bileşimleri de bulunmuştur. Komplement sisteminde 11 ayrı serum proteini tanımlanmış bulunmaktadır. Bunlar miktar olarak serum globulinlerinin % 10'unu oluşturur. Bu arada komplement sisteminin inhibitörleri ve komplement sistemini aktive edebilen diğer serum globulinleri de bulunmuştur. (C3 aktivatörleri, properdin vs.)

Komplement sistemi için alternatif yol daha yenidir. 1950'lerde Phillemer ve arkadaşları mayalardan kökenini alan polisakkarit, zymosan gibi bazı mikrobiyal polisakkaritlerle, normal insan serumunu inkübe ettiklerinde, Mg iyonları varlığında, erken reaksiyona giren klasik komplement komponentleri (C1, C4, C2) olmadan, klasik geç işleyen komplement komponentlerinin (C3, C5, C6.) aktivasyonuna neden olduğunu gördüler. Zymosanın etkisini keşfedilenler, serumda partiküle bağlı bir nonkomplement protein olduğunu gösterdiler ve bunu properdin olarak isimlendirdiler. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda properdin purifiye edildi ve sonuçta onun Ig veya komplement komponenti olmadığı ortaya konuldu.

Nomenklatür :

Komplement sisteminde isimlendirme periyodik ilavelerle şekillendirilmiştir. Şu anda geçerli olan, her bileşimin bir harf ve bunu takip eden bir numarayla gösterilmesi veya inhibitör ve proaktivatörler için harflerle gösterilmesidir. (1968'de Uluslararası Terim Komisyonunda kabul edilmiştir.) Komplement C harfi ile sembolizedir. Komplement aktivasyonunda klasik yolda yer alan komponentler C1'den C9'a kadar numaralanmıştır. Örn.: C1, C2, C3, ... C9. Alternatif yolun faktörleri büyük harflerle gösterilir. Örn.: B, D, P gibi. Aktivasyon ürünleri üzerlerine birer düz çizgi konularak ayırt edilirler. Örn.: C1'in aktive olmuş hali C1, B'nin aktive olmuş hali B ile gösterilir. Biyolojik olarak aktif, fakat enzimatik devrede bulunmayan bir komponent de üzerine düz bir çizgi konularak ifade edilir. Örn.: C567 gibi. Enzimatik parçalanma sonucu ortaya çıkan komponent bölümleri, komponentin yanına küçük harf konularak simgelenirler. Örn.: C3a, C3b fragmentleri gibi. Sistemin düzenlenmesinde rol alan proteinler de işlevleri ile tanımlanırlar. Örn. C1 inaktivatör (C1 INH) : C1 inhibitörü, C3PA : C3 proaktivatörü gibi. C1q, C1s, C1r: C1'in alt ünitelerini gösterir.

Komponentteki belirli işlevliğin kaybı, proteinden sonra «i» harfinin konmasıyla ifade edilir. Örn.: C2_i ve B_i'de olduğu gibi. Bunlar büyük komponent parçalarıdır. Bağlanan tarafları bozulmuş ve bağlanma yetenekleri kaybolmuştur. Artık bir başka komplement proteini ile kompleks yapamazlar. Bu komponentlerin aktif tarafları peptidhidrolaz aktivitesi gösterir. Bir protein, parçalanmaya katılmayan peptidhidrolaz sonucu belirli aktivitesini kaybederse önde bulunan «i» ile gösterilir. Örn.: iC3b gibi.

KOMPLEMENTİN AKTİVASYONU

Bir çok fizyolojik proses, aktive edildiğinde, etkili kontrollere sahip değilse feci sonuçlara neden olabilir. Bunlara örnek olarak pıhtılaşma sistemi, fibrinolitik sistem, kinin sistemini verebiliriz. Bu sistemlerin kontrol edilemeyen aktiviteleri sırasıyla, kontrol edilemeyen kanamaya, yaygın intravasküler trombosise veya vasküler permeabilitede ciddi bozukluklara neden olur. Bu sistemlere ek olarak, bilinen bir sistem daha vardır ki, bu sistemin aktivasyonu, hücre membranlarının bozulması sonucu hücrelerin tahri-

batı veya organizmaların yıkımına neden olur. Bu, «Komplement Sistemi» olarak isimlendirilmiştir. Sistem kontrol edilemediğinde, büyük hücresel yıkıma neden olur. Bu sebeple bütün bu sistemler, kontrol edilemeyen aktivitelerini önlemek amacıyla, birbirine bağlanmış enzim reaksiyonları serisini içeren mekanizmlerle düzenlenirler. Birbirine bağlı reaksiyonların genel prensibi, bir reaksiyon ürününün diğer reaksiyonu katalize etmesi, ikinci reaksiyon ürününün üçüncü reaksiyonu katalize etmesi şeklinde devam eder. Bu tür zincir reaksiyonları, kademeli reaksiyonlar olarak bilinirler ve genellikle reaksiyon zincirini başlatmak için dürtü (başlatıcı) faktörü gerektirirler.

Komplement sisteminde tanımlanmış 11 komplement proteini serumda inaktif şekilde bulunurlar. Komplement aktivitesi başlatıldığında bu proteinler, belirli bir sırayla olayda yer alır ve aktive olurlar. Bu proteinlerin aktivasyonunda, birinin oluşması kendisinden bir evvelkine bağlıdır ve kaskat «çağlayan» tarzında bir aktivasyon gelişir. Birinci bileşen aktive edildiğinde, sıradaki diğer bileşen moleküllerini aktive etme yeteneğini kazanır. Her biri kendinden bir sonraki molekülü aktive ederek büyüyen bir çağlayan meydana gelir. Bir tek C1 molekülünün uyarılması, daha sonra gelen binlerce molekülün aktivasyonuna sebep olur. Her evredeki aktivasyon, yeni enzim aktivitelerini ortaya çıkarır. Komplemanın son bileşenleri tutundukları hücre zarı üzerinde bir fonksiyonel delik açarlar. Bunun hücrenin fosfolipit zar yapısını bozması ile ilgili olduğu sanılmaktadır. Bu hücrenin ölümü ile sonlanır. Artarda gelişen bu büyüme işlemi, bir tek C1 molekülünün aktivasyonu ile oluşur ve makroskopik bir olayla; bir hücrenin lizisi ile sonlanır. Kompleman aktivasyonunun ara evreleri sağlık ve hastalıkta önemli olan bir takım biyolojik aktivitelere neden olur.

Komplement sistemi aktivasyonunun 3 yoldan olduğu kabul edilir. Bu yollardan ikisi, dizinin üçüncü komponentinin (C3'ün) aktivasyonu için, birbirini izleme reaksiyonu (dizi reaksiyonu) gösterir. Bunlar klasik ve alternatif aktivasyon yollarıdır. Üçüncü veya sonuncu yol gerçek bir dizi reaksiyonu değildir. Membran zedeleyen kompleks ile bir kümelenmeler serisidir. Bu da aktive olmuş C3 ile gerçekleşir. Bu yol terminal yoldur. İlk iki yol için ortaklıktır.

Komplement sisteminin biyolojik fonksiyonlarının işleminde en kritik adım C3b'nin meydana gelmesidir. Bu C3'ün büyük olan bölünme parçasıdır. C3'ün bölünme reaksiyonunda klasik ve alternatif olarak iki yol vardır.

KLASİK KOMPLEMENT YOLU

Klasik komplement yolu, alternatif yola göre daha eski olup, tanınması uzun yıllar önce olmuştur. Klasik yolun aktivasyonu, bir çok madde tarafından başlatılabilir. Bunlar :

İmmunglobulinler : IgG3, IgG1, IgG2, IgM.

Anyonlar : DNA, RNA, dextran sülfat, TNP-Sığır serum albumini, poliinosinik, poliguanilik ve poliüridilik asitler.

Enzimler : Tripsin, plazmin, lizozimal enzimler.

Diğerleri : Endotoksinler, lenfosit membranları, zarlı viruslar, düşük iyonik kuvvet.

Bunların en iyi bilineni ve belki de en önemlisi, immunglobulin molekülleridir. Aktivasyon, hücre membran yüzeylerinde anti-jen-antikor ilişkisi ile başlatılır. İmmunglobulinlerin kümelenmesi de, komplement aktivasyonuna yol açan yapı değişikliklerine neden olur. Değişik Ig sınıfları, değişik Fc yapılarına sahiptir. Bu sebepten sadece IgG ve IgM C1'i bağlayabilir. IgG alt sınıfları arasında da fark vardır. IgG3 komplementi iyi bağlar, bunu IgG1 ve IgG2 izler. IgG4 ise zayıf bağlar veya hiç bağlamaz. IgG antikorları, komplementi sadece antijen üzerinde, birbirine çok yakın bölgede iki veya daha fazla antikör molekülünün bağlanmasından sonra tutabilirler. Çünkü, C1'i oluşturan subkomponentlerden C1q'nun alt birimlerinden en az ikisinin Ig'nin CH2 yerine çapraz bağlanması gerekir ki C1'in aktivasyonu gerçekleşsin. IgM'de bu sorun olmaz, çünkü tek molekülde birçok Fc bölgesi bulunmaktadır. Bir IgM'nin hücreye bağlanması, komplement aktivasyonu ve hücrenin ölümü için yeterlidir. Oysa birçok IgG antikörünün alyuvara bağlanması gerekir ki, iki IgG yanyana düşerek bağlansın ve komplement aktivasyonunu başlatabilsin. Enzimler söz konusu olduğunda örneğin fibrinolitik enzim plazminde ise C1 molekülüne bağlanma doğrudan doğruya proteolitik yoldan olmaktadır.

Antijen antikor kompleksleri seruma ilave edildiğinde birinci komponent (C1) komplekse bağlanır ve C2 ve C4 komponentlerinin aktivasyonunu katalize eden, aktif proteaza dönüşür. C4 ve C2'nin ayrılma reaksiyonları gerçekleşir. C4b ve C2a gibi aktive olmuş komponentler bir kompleks oluştururlar. (C4b, 2a). Bu kompleks proteolitik aktiviteye sahiptir ve C3'ün aktivasyonunu katalize eder. C3'ü C3a ve C3b parçalarına ayırır. C3b aktive olarak C4b, 2a, 3b aktif kompleksini oluşturur. Daha sonra bu kompleks C5'in ayrılma reaksiyonunda rol oynar. Sırasıyla C5b, C6, C7, C8, C9 devreye girerek sitoliz meydana gelir.

Alternatif yolda aktivasyon C1, C4 ve C2 olaya katılmaksızın gerçekleşir. Reaksiyon C3'ün aktivasyonundan başlayarak sitolizise kadar devam eder.

Klasik komplement yolunun aktivasyonunda rol alan komponentler: C1, C4 C2 dir.

C1: İlk Komponent :

C1; C1q, C1r ve C1s alt komponentlerinden oluşur. C1, Ca iyonlarının fizyolojik konsantrasyonlarında C1q, C1r ve C1s sub-komponentlerini 1:2:4 oranlarında ihtiva eden bir trimolekül komplekstir. C1q monomer IgG'yi zayıf olarak bağlar, fakat kümelenmiş IgG'yi bağlama kapasitesi yüksektir. Elektron mikroskopi C1q'nun bir hegzamer yapıya sahip olduğunu gösteriyor. C1q ve antikor arasındaki karşılıklı ilişki, antikorun ikinci sabit kısmı ve C1q hegzamer yapısının, globüler başları vasıtasıyla meydana geliyor. C1q altı alt üniteden ibarettir ve herbiri kollagen benzeri gövdeye bağlanmış bir globüler baş ihtiva eder. Globüler kısımlar IgG'nin CH2 ilmekleri için bağlanma bölgeleri taşırlar. IgG'ler de C1q bağlanma bölgeleri taşırlar. C1q'nun immun komplekse çapraz bağlanması C1r'de morfolojik bir değişikliği indükler ki, bu da C1r oluşumu için gerekli self-hydrolysis olayını katalize eder. C1r'nin disülfid bağı içeren zincirleri üzerindeki aktif bölge C1s oluşturmak için C1s'i hidrolize eder. C1'in C1s subüniti C4 ve C2'nin (Cleavage reaction) ayrılma reaksiyonunda rol oynar ki, bu da C3 konvertaz (C4b, 2a) oluşumuna yol açar.

parçaları ortaya çıkar. C2a'nın % 5'i Mg iyonları varlığında C4b ile füzyon gösterir. Bu bimolekül kompleks (C4b, 2a) C3 konvertazdır. C3 konvertaz C3'ü, C3a ve C3b olarak isimlendirilen iki parçaya böler. Açığa çıkan C3a, polimorf nükleer lökositler için kemotaktiktir. Aynı zamanda anaflatoksin aktivitesi gösterir, mast hücrelerinden histamin açığa çıkarır, düz kas kasılmasına neden olur. C3b membranlar ve Ig'lere bağlanarak bir opsonin aktivitesi gösterir. Çok sayıda C3b molekülü yüzey zarlarına transfer edilir. Makrofajlar üzerinde (incelenen bütün memelilerde), trombositler üzerinde (tavşanlarda), alyuvarlar üzerinde (yüksek hayvanlarda) bu zara bağlı C3b için özgül reseptörler bulunur. Bu reseptörler antijen-antikor-C3 kompleksinin bu hücrelere immun yapışmasını sağlayarak fagositozlarını kolaylaştırır. Bağlı C3 tabii haldaki molekülde bulunmayan yeni bir yapı gösterir ki bu yapı immunokonglutininin denen bir otoantikoru oluşmasına sebep olur. C3b'nin inaktivasyonu KAF (konglutinojen aktive edici faktör) enzimi ile olur. Eğer C3b fragmenti tesadüfen C4b, 2a ile birleşirse C4b, 2a, C3 konvertazdan C5 konvertaza dönüşür. (C4b, 2a, 3b). Şayet C3b fikze olmazsa inaktiftir (C3i) ve iki moleküle ayrılır. C3c (beta-1A globülini) ve C3d (alfa-2D) globülini) molekülü olarak ayrılır. Bağlanmış ve aktive olmuşsa hücre membran yapışma mekanizmasında rol oynar.

C5b, C6, C7, C8, C9 komponentlerinin rol oynadığı terminal yol alternatif ve klasik yol için ortaktır.

ALTERNATİF KOMPLEMENT YOLU

1950 ortalarında, Phillemer ve birlikte çalışanlar, properdinin C1, C4 veya C2 olmaksızın inaktif terminal komponentleri üzerinde selektif olarak etkili bir kompleks şeklinde, normal plazmada bulunan bir substans olduğunu gösterdi. Ayrıca diğer birkaç faktörün, komplement aktivasyonundan önce gerekli olduğu bulunmuştur. C1, C4 ve C2'ye etki etmeksizin inaktif C3'e etkideği bulunan kobra venom faktörü de komplement aktivasyonunun alterne yolu hakkında ipuçları vermiştir. Bu reaksiyon için gerekli olduğu bulunan, normal plazmadaki diğer birkaç faktör, Phillemer'in orjinal properdin faktörleri ile birbirine uymaktadır.

Alternatif yol; antikor yokluğunda, C3 konvertaz işlerliği meydana getirebilen bir mekanizme sahiptir. Daha önce, alternatif yol, C3'ün kullanımına yol açan bağımsız bir protein sıralaması esas alınarak, klasik yoldan ayrı tutulmuştu. Fakat şimdi, alternatif yoldaki proteinlerin hem antikora bağımlı, hem de antikora bağımlı olmayan C3 ayrışmasını aktive ettiği bilinmektedir. Alternatif komplement yolunun aktivatörleri :

İmmunglobulinler : (Kümelenmiş) : IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
IgA1 ve IgA2
IgE

Polisakkaritler : İnülin, agar, endotoksin, maya hücre duvarları

Diğerleri : Kobra venom faktör, tripsin

Alternatif yol belirli yabancı yüzeylerin; örneğin bakteri, mantar hücre duvarları veya helmint kutikuları varlığında C3 konvertaz işlerliği meydana getirebilir. Properdin sistemi ile komplement aktivasyonunda başlangıç faktörü olarak immunolojik olmayan değişik maddeler (bazı kompleks polisakkaritler) lipopolisakkaritler, endotoksin, tripsine benzer enzimler) veya immunolojik olarak kümelenmiş Ig'ler, C1q'ya tesbit olmamış Ig'ler gibi elemanlar rol oynar. Bu Mg iyonları varlığında olur.

Alternatif komplement yolunda rol oynayan komponentler C3, B, D, P dir.

C3: Üçüncü Komponent :

190.000 molekül ağırlığında bir beta-globulindir. Klasik C3 konvertazın substratıdır. Birbirlerine disülfid bağıyla tutunan 120.000 molekül ağırlıklı alfa ve 70.000 molekül ağırlıklı beta zincirlerinin oluşturduğu iki polipeptid zincirinden ibarettir. Alternatif yolun başlangıcında ya da klasik C3 konvertaz aracılığıyla C3'ün ayrılması sırasında alfa zincirinin N-terminalinden C3a olarak adlandırılan 6.000 - 8.000 MA'lı bir fragman salıverilir ve rezidü bir C3b fragmanı ortaya çıkar.

B: Tek bir polipeptid zincirinden oluşan 100.000 MA'da bir beta-globulin olduğu bilinmektedir. B C3b ile Mg iyonlarının da bulunduğu ortamda reversiblen bir interaksiyona girdiği zaman bir

C3 konvertaz aktivitesi gösterir. C3 konvertaz aktivitesi, D ile ayrılma reaksiyonuna girdiği zaman belirginleşir ve artar. D, C3b varlığında B'yi ayrıştırır. C3b, Bb oluşur, Ba, 20.000 MA'da alfa-elektroforetik mobiliteye sahiptir. Bb, 80.000 MA'da aktif kısmı taşıyan parçadır.

D: Yaklaşık olarak 25.000 MA'da serin esteraz aktivitesi olan tek polipeptid zincirli bir beta-globulindir. Daha önce de belirtildiği gibi D C3b, Bb biyomoleküler kompleksinin oluşumunda, C3 konvertaz aktivitesini tamamen ortaya çıkartmak için, C3b varlığında B'yi ayrıştırır.

P: Properdin :

220.000 MA'da Ig özelliği olmayan tetramerik gamma-globulindir. Alternatif yolun aktivasyonu sırasında partiküllere adsorbe olur. Bu nedenle bu yol «properdin yolu» olarak tanımlanmıştır. Doğal protein C3b'ye reversiblen olarak bağlanır ve Bi ayrışmasını gerileterek C3b, Bb'yi stabilize eder. C3b'ye bağlanma ve C3b, Bb'yi stabilize etme fonksiyonları, properdinin yapısında meydana gelen biçimsel, non-enzimatik değişikliğe bağlı olarak gerçekleşir. Properdin maya hücre duvarı ekstraktı ile serumdan adsorbe edilerek ayrılır. Mg iyonları ve komplementin üçüncü komponenti ile beraber bazı viruslar, Gram-negatif bakteriler üzerinde öldürücü etkisi vardır. Normal barsak florasına karşı meydana gelmiş doğal anti-korlar olarak da kabul edilir.

Alterne yolda rol oynayan C3, B, D, P hakkındaki bilgi verdikten sonra alterne yolu inceleyelim:

Alternatif yol aktivasyonu direkt değildir, yukarıda bahsedilen başlangıç faktörleri aracılığı ile gerçekleşmiştir. Doğal C3 internal bir thioester bağı içerir. Bu thioester bağının, fizyolojik koşullar altında direkt su hidrolizisine uğraması, dayanıklı modifiye bir C3 kaynağı sağlayabilir. C3(H₂O) oluşur. Bu C3 ile aynı moleküler ölçüye sahiptir. C3b'nin biyolojik özelliklerinin çoğunu korur. Zamanla modifiye C3 C3(H₂O)Bb oluşturmak üzere D aracılığı ile aktive olur. C3(H₂O) B faktörüyle Mg iyonları varlığında kompleks oluşturur ve B'nin D faktörüyle ayrılmasına izin verir. Alternatif komplement yolunun «başlangıç C3 konvertazını» doğurur. Bu enzim C3'ü C3a ve C3b parçalarına ayırabilir. C3b ana C3 konvertazın oluşumunu başlatır. Yani C3b, Bb oluşur (Feed-back olayı). C3b

parçası aktivasyon merkezini oluşturur. Çünkü, tekrar Mg iyonları varlığında B ile birleşmesi D'ye bağımlı aktivasyonu hızlandırır ve yeni amplifikasyon C3 konvertazları (C3b, Bb) meydana gelir. C3'ün alfa zincirinin 77. bağlanma bölgesinde, thioesterin elektroforetik karbonil gruplarından ayrılması ile C3b hemen açığa çıkar. Bununla beraber normal şartlar altında işlev, C3b ve C3(H₂O)'nun faktör H ve faktör I tarafından hızla tahribi yoluyla bastırılır. C3b'nin faktör H ve faktör I'nın etkisinden kısmen korunma özelliği şimdiye kadar izah edilememiştir. Şekillenen C3b yüzeylere bağlanır ve tekrar B ve D ile interaksiyona girerek, gittikçe artan miktarlarda C3b, Bb yapımına yol açar. C3b, Bb dayanıksızdır. Stabilizasyonu gerekir. Bu işlem faktör P eklenmesi ile olur. P C3b'nin bağlanan tarafı için H faktörüyle yarışır. H faktörü C3b, Bb, P kompleksini C3b ve Bb, P'ye ayırır. Faktör I sonradan C3b'yi inaktive edebilir. Böylece alterne yolun ürünleri şekillenir şekillenmez tahrib olurlar. Sialik asit içermeyen yüzeylerin varlığında faktör H kuvvetle inaktive olur. Bunlar bakteriyel ve mantarsal hücre duvarları, helmint kutikulları, bazı tümör hücre membranları ve kümelenmiş Ig'lerdir. Sonuçta bu yüzeylerden biri mevcutsa faktör H aktive olamayacaktır. Böylece C3b, Bb, P kompleksi tahrib olmayacak ve doğal C3'ten C3a ve C3b yapmada rol oynayabilecektir. Reaksiyonun siklik özelliğinden dolayı büyük miktarlarda C3b bu yolla meydana gelir ve alterne yol güçlü etkenler ile (bakteri, mantar, helmint) antikör yokluğuna rağmen, komplementi aktive edebilen bir yol sağlar.

Alternatif yolun önemli özelliği pozitif geri-beslemedir. (Feed-back) C3'ün parçalanma ürünü, C3 konvertazın daha çok aktivasyonuna sebep olan reaksiyonu katalize eder. Komplemant zincirindeki bu reaksiyon, C3 inaktivatörü KAF tarafından düzenlenir. KAF C3b'nin hemolitik ve immün yapışma reaktivitesini yıkar ve onu tripsine benzer enzimlerin hücumuna bırakır. Alterne yol halkasının kontrolü, serum beta globulin C3b inaktivatörü (C3b INA) tarafından da yapılır. Bu da C3b'yi C3c ve C3d halinde ayırır. CoF kobra serumu C3b'sinin bir analogu olabilir ve alterne yolu aktive eder.

Bu iki temel yoldan başka mekanizmalar da vardır. Bunlar ya bileşimlerin birini ya da terminal uçlarını aktive edebilmektedir. Flazminojen C3'ü değiştirir, elektroforetik alanda globulinlerden beta-1-C globulinini ayırır.

TERMINAL KOMPLEMENT YOLU

Klasik ve alternatif C3 konvertazlar komplement sisteminin biyolojik aktif proteinlerini toplarlar. Bunlar C3, C5, C6, C7, C8 ve C9'dur.

C3b bahsedilen işlevlerinden başka C4b, 2a ve C3b, Bb'nin «C5 konvertaz» haline çevirmeleri için de gereklidir. C3b ayrıca iki cellular bağlama fonksiyonuna da sahiptir

1 — İnternal bir thioesterden elde edilebilen, metastaz yapabilen bir karbonil yoluyla hücre zarına irreversible olarak kovalent bağla bağlanma,

2 — Bir çok hücre tipinde mevcut olan tripsin sensitif reseptöre yapışma.

Terminal Komplement Yolu Komponentleri : (C5-9):

C5: Disülfid bağlarıyla birleşen 115.000 MA'daki bir alfa zinciri ve 75.000 MA'daki beta zincirinden ibaret bir beta-globulindir. Klasik ya da amplifike C5 konvertazla parçalanınca alfa zincirinden yaklaşık 11.000 MA'da bir peptid olan C5a, C5b denilen büyük fragmanı terk eder ve salıverilir.

C6: Effektör reaksiyon dizilimine katıldığı süre içinde parçalanmaya uğramayan 128.000 MA'da tek zincirli bir beta-globulindir.

C7: İşlev verdiği süre içinde parçalanmadan kalan 120.000 MA'da tek zincirli bir beta-globulindir.

C8: 83.000 MA'da bir alfa zincir, 70.000 MA'da bir beta zincir ve yaklaşık olarak 10.000 MA'da bir gamma zincirinden oluşan 163.000 MA'da gamma-globulindir. Gamma zinciri, alfa zincirine kovalent bağlarla bağlı iken, alfa ve beta zincirleri nonkovalent olarak bağlanırlar.

C9: Alfa elektroforetik mobiliteli; ve 79.000 MA'da tek zincirli polipeptittir.

Terminal yol, komplement aktivasyon yolunun son safhasıdır. C3 konvertaz oluşumundaki reaksiyondan farklı olup bir dizi reaksiyonu değildir. C5'in enzimatik aktivasyonundan sonra, çözültide komplement komponentlerinin kendi kendilerine kümelenme-

leri «self-aggregation» ve hücre yüzeyine bağlanmış, makromoleküller komplekslere dönüşümünü ihtiva eder.

C3b, C5'in C5a ve C5b'ye ayrılmasında rol oynar. *Klasik yolda:* C4b, 2a enzimi (klasik C3 konvertaz) C3'ü, C3a ve C3b'ye böler demiştik. C3b seçici bir şekilde zardaki birleşme yerine yerleşir. Eğer C3b fragmenti tesadüfen C4b, 2a ile birleşirse C3 konvertazdan, C5 konvertaza dönüşür. Yani C4b, 2a, 3b oluşur. Bu enzim, C5'i güçlü bir kemotaktik faktör olan ve anaflatoksin etkisi gösteren C5a'ya ve C6 ve C7'ye yüksek bir afinitesi olan membran reaktif fragment C5b'ye böler. C5b daha sonra C6-9 ile reaksiyona girer. *Alternatif yolda,* C3b, Bb (amplifikasyon konvertazı) C3b molekülünü bağladığında, C3b, Bb, C3b'ye yani C5 konvertaza dönüşür. Bu C5'i C5'a ve C5b'ye böler. C5b klasik yolda olduğu gibi, C6-9 ile reaksiyona girer.

C5b parçası, C6 ve C7 1:1:1 moleküler oranda hedef hücre membranında birbirlerini etkilerler. Dayanıklı sabit bir kompleks yani C5b, 6, 7 oluşturmak için kümelenirler. Bu kompleks kısmen membranlara etkileyebilir. Bu trimoleküler kompleks tek bir C8 molekülü için bağlama yeteneğindedir. C8'de bu komplekse bağlanabilir. Sonuçta membran zedeleyen bir kompleks şekillenir. Bu kompleks (C5b, 6, 7, 8) muhtemelen hücre membran lipazlarını aktive eder. Buna da C9'un 6 molekülü adsorbsiyonla bağlanacaktır. C5b, 6, 7'ye C8'den bir molekül, C9'un 6 molekülünden birinin ilavesiyle litik kompleks ortaya çıkar. C5b, 6, 7, 8 C9'un birkaç molekülü ile kombine olduğunda etkili sitolitik kompleks şekillenir. Membran, komplekse bağlı C9'un miktarına oranla bozular. C9 yokluğunda ise C5b, C6, C7, C8 hücre içeriklerinin yavaş bir tempo ile sızmasına neden olan hafif bir şekilde zarar görmüş bir bölge meydana getirir. Son kompleks (C5b-9) gözleme «doughnut» biçiminde büyük bir yapıdır. Bu yapı hücre membranı içine girebilir. O, hücre içeriğini sızdıran bir delik oluşturur ya da çevresinde hücreyi tahrib edici etkiye sahiptir. Zar hasarı C5b-9 ünitesinin lipid tabakasına girmesiyle olur. C5b, 6, 7 hidrofobik dış halka, C8 ve C9 ise santral hidrofilik gövde yaparak transmembran tünelini yaparlar. Bu formda lipid tabakasını delerler. İlave bir protein olan, bant 5 de bu arada C5b, 6, 7'ye bağlanarak komplekste yer alır. Hücreye bağımlı C5b-9 kompleksleri çeşitli büyüklüklerde hidrofilik kanallar meydana getirirler. Bu da elektrolitlerin ve suyun

membranda karşılıklı değişimine izin verir. Hücre yeterli derecede su alırsa patlar.

Bazı sertleşmiş bakteriyel hücre duvarları komplemente direnç gösterirler. Diğer bir kısmı ise komplement ve lizozim ile birlikte çalışan sinergistik bir reaksiyona girerler. Erimeyen mikrobiyel hücrelerin komplement tarafından öldürülme ihtimali devam eder. Çünkü iç membranlar tahrib olur. Bazı nukleotid hücreler membran hasarını onarabilirler. Öldürülmede büyük miktarda antikora ve komplemente gereksinim gösterebilirler veya hasardan bütünüyle kurtulabilirler.

Sıvı fazdaki C5b-9 kompleksleri duyarlılaşmamış hücrelerin «reaktif lizisine» neden olabilir. Reaktif lizis (Lachmann and Thomson) olayı karıştırır. Aktive C5b, 6, 7'nin bir kısmı serbest kalır ve sadece nötrofiller için kemotaktik olmakla kalmaz, aynı zamanda yanındaki masum hücrelere de bağlanma yeteneği taşırlar. Hücre yüzeyine yapıştıktan sonra C8 ve C9'u da bağlayarak komplement sırasını tamamlar ve hücrenin ölümüne neden olurlar.

Membranda Komplement Lezyonu :

Lezyon elektron mikroskopta karakteristik bir görünüme sahiptir. Koyu boyanmış membranı delip geçen merkez ve bunu kuşatan, çoğu kez görünüşte tam olmayan bir yüzük vardır. Yüzükte boya almayan bölge 30 Å kalınlığındadır. Komplement fonksiyonu için kompleks bir membran istemez. Çünkü sadece lecithin'den yapılmış lipozomlarda tipik lezyonlar şekillenebilir. Böyle lipozomlar sadece karakteristik lezyon değil aynı zamanda, sızıntı da gösterirler. Bu lezyonlar şekillendikleri membrandan ayrılabilirler. Eriyen ezyonlarda huni-boru biçiminde, krater benzeri bir yapı görülmektedir. İki lipid katına giren bir boşluk «mağara» dikkati çeker.

İMMUNO - HEMOLİZ

Komplementin etki mekanizmasının incelenmesinde çoğu kez eritrosit erimesi olayı incelenmiştir. Bu immuno-hemoliz reaksiyonuyla ortaya konulmuştur. Bu olayda eritrosit E, antikor A ile sınıgelenmiştir. Antikora eritrositlerle birleşmesine «duyarlı kılmış» denir. Yani bir antijen-antikor kompleksi oluşmuştur. Antikor molekülünün antijen ile birleşmesi sonucu Fc kısmında olu-

şan biyolojik etkinlik komplemant komponentlerini aktive eder. Olayın safhalarını şöyle sıralayabiliriz:

1 — E+A EAc_a ++

Eritrositer antijen, immun kompleksi oluşturmak için antikor ile reaksiyona girer.

2 — EA+C1_{q,r,s} EAC1_{q,r,s,c_a} ++

3 — EAC1+C4 EAC1 C4

EAC14 bazı virusları nötralize edebilir.

4 — EAC1, C4+C2 EAC1,4,2_{M_g} ++

C4,2 enzim etkisi ile C3'ü aktive eder. Bu ilk aşamalar C1q yolu ile C3'ün aktivasyon mekanizmalarıyla ilgilidir.

5 — EAC1,4,2+C3 EAC1,4,2,3

C3 konvertaz (EAC1,4,2) C3'ün biri küçük C3a ve diğeri büyük C3b olmak üzere ikiye bölünmesine yol açar.

6 — EAC1,4,2,3+C5,C6,C7 EAC1,4,2,3,5,6,7

C5b parçası C6'yı aktive edip bağladığı gibi, anaflatoksin ve kemo-taksis etkileri de vardır.

7 — EAC1,4,2,3,5,6,7+C8,C9 EAC1-9 (EAC)

Komplekslere C8 bağlanması hücre membranında hasar meydana getiriyor. C9 burada etkiyi hızlandırıcı rol oynamaktadır. C8 ve C9 bileşenleri membranda iz bırakarak fikze olur. Elektron mikroskopide hücre zarında zımba delikleri manzarası vardır. Bu olayda eritrosit membranı bozulur ve hemoglobini serbest kalır. Geride globüler stroma halinde kalıntı bırakır. İmmunolojik sitolizin genel fenomeni ile yapılan immuno-hemoliz ile olay ortaya çıkarılır.

Komplemant aktivasyonunda bu denklemlerde de görüldüğü gibi, hemoliz ve bakteriyoliz ile sonuçlanan etki; klasik yolda, antijen-antikor kompleksinin C1q aktivasyonu ile başlayarak veya alternatif yolda, polisakkarid, lipopolisakkarid ve bazı Ig'lerin kümelenmeleri ile C3'ün aktive olması sonucu başlar. C3-C9 aktivasyonu lizise kadar devam etmektedir.

İmmun-hemoliz ile alyuvarlardan hemoglobin salıverilmesi, hücrelerin ozmotik şişkinliğini gerektirir. Bu proteinin geçmesine izin veren başlangıçtaki lezyonun çok küçük olduğunu gösteriyor. Eğer ortamın kolloid ozmotik basıncı hücrenin içindekine eşit bir

yükselme gösterirse (örneğin, % 30'luk albumin solusyonu kullanılarak) komplementin lize ettiği hücreler, intracellular potasyomlarını kaybederler, fakat yırtılmazlar veya hemoglobini salıvermezler.

KOMPLEMENT SİSTEMİNİN KONTROL MEKANİZMASI

Komplement Komponentleri Diziliminin Regülatörleri (=Düzenleyici Proteinleri) :

Komplement dizisinin regulasyonu, bazı temel bağlanma basamaklarının iç değişiklikleri ve ekstrinsik kontrol proteinlerinin yaptığı aracılık ile gerçekleşir. Doğal kontrol bazı kritik protein-protein ve protein-membran ilişkilerinin değişkenliğine bağlı olarak açıklanır.

C2a ve Bb'nin bağlanma bölgelerinin değişkenliğine bağlı olarak oluşan C3 ve C5 konvertazlarından çözünme-ayırılma reaksiyonu (decay-reaction), katalitik proteini kompleksten ayırır ve konvertazların fonksiyonunu elimine eder. Membran bağlama bölgelerine ait değişkenlik, C4b, C3b ve C5b parçalarının generasyonlarına bağlı olarak ortaya çıkar. Hızlı bir membran fikzasyonu gerçekleşmediği takdirde, bunun çeşitli etkinliklerin kaybı sonucu olduğu anlaşılır. Protein-protein ve protein-membran ilişkileri bu olayı açıklar.

Reaksiyonun ekstrinsik yani dış kontrol proteinleri; klasik aktivasyon yolunu regüle eden, aktive birinci komponentin inhibitörü (C1 INH) ve C4 bağlama proteini (C4bP), bir C3b bağlayıcı protein olan H ve C3b'nin inaktivatörü olan I'yı içerirler.

Ek bir kontrol tipi de biyolojik bakımdan aktif olan parçalanma ürünlerine karşı yönelmiştir. Anaflatoksin inaktivatörü (AI) reaksiyonun düşük MA'lı yan ürünlerini inaktive eder. S-proteini C5, 6, 7'nin geçici bağlanma kapasitesi için, bystander (seyirci) hücre membranlarında rekabete girer.

C1 INH (C1 esterez inhibitörü) : C1 INH % 35 oranına kadar yüksek karbonhidrat içeren 105.000 MA'da tek polipeptidüen oluşan gamma-globulindir. C1s'in hafif zincirine bağlanarak, C1s'in C4 ve C2'yi parçalayan serin proteaz bölgesinin kapasitesini irre-

versible olarak inhibe eder. Bu yolla klasik C3 konvertaz (C4b, 2a) oluşumunu kontrol eder. C1 INH ayrıca C1r'nin esterolitik aktivitesini de bloke eder. Böylece C1s subünitinin fonksiyonunun hem aktivasyonu hem de sürekliliğini regüle eder.

Normal olarak C1, C2 üzerine kinin aktivitesi gösterir. Ayrılma sonucu C2 kininler oluşur. Meydana gelen kinin miktarı C1 inaktivatörü ile kontrol altına alınır. Bu inaktivatörün doğuştan yetersizliği görülen bireylerde bu C2 kininin aşırı miktarları meydana gelir. C2 kinin vasküler permeabiliteyi artırır. Bu nedenlerle bu bireylerde yaygın yangısal olmayan ödemler görülür. İnsanlarda bu herediter angioödem olarak bilinir.

Bu inhibitör aynı zamanda, fibrinolitik enzim plazmini, kinin oluşturan sistem kallikrein ve koagülasyon sistem enzimlerini (Hegaman faktör, faktör 12 ve faktör 11'i) de inhibe eder.

C4bp : 550.000 MA'daki disülfid bağı içeren 70.000 MA'lı sekiz protomerden oluşmuştur. Bu makromolekül klasik yol C3 konvertazının (C4b, 2a) generasyonunu üç yolla regüle eder:

- 1 — C4b'ye bağlanan C2'nin kompetitif inhibisyonu,
- 2 — I tarafından C4b'nin parçalanma inaktivasyonunun artırılması,
- 3 — C2i oluşturmak için C2a'nın ayrılması yolu ile C4b, 2a'nın çözünme oranının hızlandırılması.

I (C 3b İnaktivatörü), Konglutinojen Aktive Eden Faktör (KAF) :

I, disülfid bağları ile birleşen 42.000 MA'daki bir beta zincirden ve 55.000 MA'daki bir alfa zincirinden oluşan iki polipeptid zincirinden ibaret bir beta-globulindir. I, C3b'nin alfa zincirini bölünme olmaksızın parçalar ve ortaya çıkan ürün (iC3b) C3b, Bb ve C4b, C2a'yı C5 konvertazlarına çevirmek için veya immün yapışmaya aracılık etmek için fonksiyon yapamaz. KAF C3b'nin hemolitik ve immün yapışma fonksiyonlarını inhibe eder ve onu tripik enzimlerin inaktivasyonuna maruz bırakır. İnaktivasyonu, C3c'yi ve daha küçük bir fragman olan 25.000 MA'lı C3d'yi meydana getirmek için, plazmin gibi bir non-komplementemik tripik proteaz aracılığıyla gerçekleşen daha ileri parçalanma izler. I bimoleküler C3

konvertazdaki C3b'yi inaktive edemez. Bu inaktivatör feed-back mekanizmasını da kontrol altına almış olur.

H : 150.000 MA'da tek bir polipeptid zincirinden oluşan beta-globulindir. C3 konvertazının (C3b, Bb) generasyonunu üç yolla regüle eder.

- 1 — C3b'ye bağlanan B'nin kompetitif inhibisyonu,
- 2 — I tarafından C3b'nin parçalanma inaktivasyonunun artırılması,
- 3 — B'i oluşturmak için Bb'nin dissosiyasyonu yolu ile C3b, Bb'nin çözünme oranının hızlandırılması.

Ne H, ne de I tek başına C3, B, D ve P'nin interaksiyonunu amplifikasyona kadar ilerletmekten koruyamaz. Amplifikasyon konvertazının kontrolündeki üç basamağın özellikle properdin stabilizasyonu varlığında bütünüleyici olduğu kesindir. C3'ün sürekli aktivasyonunun korunmasında C3b, Bb'den Bb'nin intrinsik olarak ve H faktörü ile çözülme ve salıverilmeleri az olarak etkilidir. I tarafından inaktive edilmediği sürece C3b, B ve D ile yeni konvertaz yapabilir. I sadece Bb ile birleşmeyen C3b üzerine etki yapar. Bu reaksiyon H tarafından artırılır.

AI (Anafatcksin İnaktivatörü) :

310.000 MA'da bir alfa-2-globulindir. Enzim 36.000 MA'da birbirinin aynı olan, sekiz subüniiti içerir. C3a, C5a, C4a ve bradikininin C-terminal arginini ayrıştıran bu inaktivatör metal bağımıdır. Aktif bölge epsilon-aminocaproicacid'in yüksek konsantrasyonlarında inhibe olur.

S—Protein :

80.000 MA'da tek polipeptid bir inter-alfa glikoprotein zinciridir. C5, 6, 7 kompleksine membran bağlanma bölgesinden bağlandığı ve böylece bystander hücrelere sitotoksite göstermeksizin C8 ve C9'un olaya katılımı gerçekleştiği saptanmıştır.

KOMPLEMENTİN SENTEZ VE KATABOLİZMASI

Komplement çok erken tanınmasına rağmen, sentez yerleri ve hücre orijinleri hakkındaki bilgiler yetersizdir.

rinin serum konsantrasyonları 3-130 mg/100 ml. arasında değişir. C2 3 mg/100 ml, C3 130 mg/100 ml'dir.

Her proteinin katabolizma oranı hızlı olup, saatte tüm plazmanın % 1-3'ü kadardır. Sağlıklı kişilerde C1q, C3, C4, C5 ve faktör B, P, C1 INA'nın sentezi ve katabolizmaları incelenmiştir. Pürifiye ve radyoaktif işaretli insan C4, C3, C5 ve B'sinin metabolik davranışları incelenmiş, bu proteinler için hemen hemen aynı seviyede yüksek bir katabolik oran saptanmıştır. % 2 plazma/saat veya % 50 plazma/gün değerindeki katabolik oran, bu proteinlerin insan plazma proteinlerinin en çabuk metabolize edilenleri arasında olduğunu göstermektedir.

Kalıtıl Kontrol :

Çeşitli komplement komponentlerinin insanlarda HLA sistemi-ne, farede H-2 genine bağlı olduğu düşünülüyor. Komplement sisteminin kontrol eden genlerin, doku uygunluk genleri ile ilişkisi, immun komplekslerin temizlenmesinde, kalıtsal yapının etkisini ortaya koymaktadır. Farede C3 sentezi H-2 bölgesiyle ilgili genlerin kontrolü altındadır. İnsanda C3, C6 ve faktör B sentezinin HLA ile ilgili olduğu gösterilmiştir. C4 ve C2'nin sentezi ayrı bölgelerden kontrol edilmektedir. B ve C4'teki yapısal değişimleri belirleyen genler B için tek, C4 için iki lokusta mevcuttur. Bunlar Bf, C4A ve C4B olarak bilinirler. Elde edilen veriler tek genetik bölgenin C2, C3, C6, C7, C8 ve B'nin sentezini kontrol ettiğini, iki yakın yerleşmiş lokusun yani C4A'nın ve C4B'nin ise C4'ün sentezini kontrol ettiğini göstermektedirler.

Komplementin Filojeni :

Solucan ve kabuklularda komplemen aktivasyonu gösterilememiştir. Primitif omurgalı hayvanlardan yılan balıklarında klasik komplement aktivasyonu mekanizmalarında eksiklikler vardır. Amphibi, sürüngen, kuşlar ve memelilerde komplement gelişimiyle, humoral bağışıklık arasında bir paralellik vardır. İmmun yetmezlik hastalıklarında da bu paralellik görülür.

rini salıvermekle cevap verecektir. Bu hücreler vazoaktif faktörlerden histamini granüller içinde ihtiva ederler. Bu faktörler birkaç dakika içerisinde lokal akut yangıya neden olurlar. Mast hücreleri aynı zamanda C3a ve C5a anaflatoksinlerine maruz kaldıklarında granül içeriklerini salıvereceklerdir.

Tip II veya Sitotoksik Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları :

Antikorlar hücrelerin yıkımına ya komplement vasıtasıyla veya sitotoksik hücrelerin işlerliğiyle katılırlar. Nötrofiller, eozinofiller, makrofajlar ve lenfositler gibi hücreler Ig'lerin Fc bölgeleri için reseptörlere sahiptirler. Bu hücreler immun kompleksler ile kaplı hedef hücreleri öldürebilirler. Bu yolla veya komplement merkezli lizis ile tahrip edilmiş hücreler akut yangısal olayı başlatırlar. Çünkü biyolojik olarak aktif, hücre yıkımına neden olan ürünlerin salıverilmesi meydana gelir.

Tip III veya İmmun Kompleks Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları :

İmmun kompleksler komplementi dokularda birikse bile fikle edebilirler. Komplementin bu yolla aktivasyonu Kemoterapötik faktörlerin meydana gelmesiyle nötrofilleri çekecektir ve nötrofiller immun kompleksleri sindirmeye çalışacaktır. Nötrofiller lizozomlarından proteolitik enzimleri dokulara salıverirler. Bu da dokulara hasarına sebep olur.

Tip IV veya Gecikmiş Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları :

Hücrel immun reaksiyonlar, akut yangısal reaksiyonlara katılırlar. Uygun sensitize T hücreleri taşıyan bir hayvana antijen enjekte edilirse, sonradan bir lokal yangısal reaksiyon meydana gelebilir. Reaksiyonun bu formu gecikmiş hipersensivite olarak bilinir. Yangısal cevap antijeni kuşatan sensitize T hücreleri vasıtasıyla kemotaktik ve vazoaktif lenfokinlerin salıverilmesiyle meydana gelir.

Komplement Komponentleri İçin Hücrel Reseptörler Aracılığı İle Oluşan Fonksiyonlar :

Anaflatoksin Aktivite : (C3a ve C5a) :

C4a, C3a, C5a; C4, C3, C5 alfa polipeptid zincirlerinin N-terminal uçlarında aktif C1 ve klasik, amplifikasyon konvertazları va-

sitasıyla parçalandıkları zaman oluşan aktivasyon ürünleridir. Bu peptidler, düz kas kontraksiyonlarını aktive etmeleri ve mediatör salıverilmesi için mast hücrelerini aktive edebilme kapasitelerinden dolayı anaflaktoksinler olarak isimlendirilirler. Spesifik membran reseptörlerine bağlandıkları düşünülmektedir. Histamin tarafından indüklenen artmış vasküler permeabilite immun komplekslerin lokal birikimini artırıcı rol oynayabilir. Artan vasküler permeabilitenin Ig ve komplement proteinleri gibi plazma proteinlerinin, komplement aktivasyonunu ekstravasküler bölgede artırdığı görülür. Bu olayın enflamatuar reaksiyonu şiddetlendirme olasılığı vardır. Anaflaktoksin inaktivatörü olarak adlandırılan bir serum karboksipeptidaz-B'si, bu peptidlerden C-terminal arginini serbestleştirerek anaflaktoksik peptidlerin histamini salıverme aktivitelerini 100-1000 kez azaltır. (des ARG deriveleri). Bir enflamatuar reaksiyonunda kritik fazlardan biri de lökositlerin birikimidir. Bu birikim lökositlerin kemotaktik, sekretuar ve yapışma reaksiyonlarını indükleyen 5Ca'nın aracılığı ile gerçekleştirilebilir. C5a nötrofillerdeki spesifik reseptörler tarafından tutulduğu zaman hücrelerin invitro göçüne yol açar. Ekstravasküler enflamasyon bölgesinde, göçe hazırlık safhasında olan granülositlerin kapillar endotel hücrelerine yapışmaları C5a/C5a des ARG deriveleri tarafından düzenleniyor olabilir. Bu peptidler invitro olarak nötrofillerin çeşitli yüzeylere yapışmalarını sağlarlar.

Kemotaksi (C3a, C5a, C567) :

Membran filtreleri kullanarak iki bölümden birine polinükleerlerin bir süspansiyonu, diğerine polinükleerleri çekebilecek şüpheli maddeler konularak 37°C'de inkübe edilir. Polinükleerlerin membran filtrelerden geçişi araştırılır. (+şimiotaksi). Bu durumlarda C3a, C5a, C567 bir şimiotaktiktir. Bu etkileriyle, yapıştıkları nötrofil lökositler aktivasyon alanına göç ederler. Plazmin, tripsin ve doku proteazları gibi maddeler C3 ve C5'i etkileyerek kemotaksis etkisi ortaya çıkarırlar. C5a eozinofil ve monositler üzerine de etkileyerek kemotaksis oluşturur. Kemotaktik faktörler lökositlerde lizis yapmadan lizozimal enzimlerin açığa çıkmasına yol açarlar. Bu enzimlerin etkisiyle yangısal reaksiyon oluşur.

İmmun Adherence (İmmun-Yapışma) :

Komplement ve serumla muamele edilmiş partiküllerin insan eritrositlerine yapışması, insan hücrelerinde komplement proteinleri için spesifik reseptörlerin var olduğunu ilk defa gösteren olaydır. Bu immün yapışma olarak adlandırılmıştır. Bu yapışma veya bağlanma olayı immün kompleks üzerindeki C3b reseptörlerinin aracılığı ile düzenlenir. C3b reseptörleri, enflamatuar reaksiyona katılan hücreler ve diğer insan hücrelerinde bulunur. C3b reseptörleri CR1 olarak adlandırılıyor. C3b, iC3b, C3d'ye ait reseptörler, partikül yapışması ile bazı hücre tipleri üzerinde gösterilmiştir. CR2, C3d'yi seçici olarak bağlayan reseptörün şu anda kullanılan ismidir. CR3, iC3b ile kuvvetle interaksiyona giren bir üçüncü C3 reseptörüdür. İmmuno-kompleksler üzerinde bulunan C4b, bu komplekslerin C3b reseptörleri taşıyan hücreler tarafından içeri alınmasına aracılık eder. Benzer bir yolla iC3b'de CR1'e bağlanabilir, fakat bunun bağlanma afinitesi düşüktür. Bu nedenle immün aderens terimi bazı komplement fragmentleri ile spesifik hücresele reseptörler arasındaki interaksiyonları yansıtır.

CR1 veya C3b Reseptörü :

İnsan eritrosit membranlarından izole edilmiştir. Yaklaşık olarak 205.000 MA'da bir glikoprotein olarak tanımlanmıştır. Bu glikoproteine karşı oluşan antikolar nötrofillerin, B lenfositlerinin ve monositlerin C3b reseptörlerinin fonksiyonlarını inhibe eder ve eritrositlerden izole edilen membran proteinlerinin immüno-presipitasyonuna yol açar.

CR2 veya C3d Reseptörü :

C3d ile interaksiyona girer ve başlıca B lenfositlerinde bulunur. Bu reseptör 148.000 MA'da bir membran proteindir. Şu anda bununla spesifik olarak reaksiyona giren monoklonal bir antikorun olduğu bilinmektedir. Bu reseptörlerin fonksiyonları tam olarak aydınlatılamamıştır.

CR3 veya iC3b Reseptörü :

iC3b'yi yüksek bir afiniteyle bağlar. Monositlerde, makrofajlarda, nötrofillerde ve bazı NK hücrelerinde bulunur. Disülfid bağlı

bir membran proteininden oluşan bu yapıyı monoklonal bir antikorun (anti-Mac-1) tanıdığı kabul edilir.

Partiküler bir antijen (bakteri, protozoon vs.) antikor ve komplement komponentlerinin ilkleri ile birleşip (AgAcC1, 4, 2, 3) plakelere, polinükleer, mononükleer hücre yüzeylerine yapışır. Hücreler C3 veya C4 için bir reseptör taşıyorsa immün yapışma kolaylıkla meydana gelir. AgAcC1, 4 kompleksi bu olayda yeterlidir.

Opsonizasyon :

Opsonin adı verilen antikorlar fagositozda ve bakterinin hücre içi tahribinde etkili bir faktördür. Komplement güçlü bir opsonin olarak rol oynayabilir ve fagositozisi artırıcı etkisi vardır. Antijenler, özgül antikorlar ve komplementin C1, 4, 2, 3 parçaları ile birleşip, bir antijen-antikor-komplement bileşiği oluşturduktan sonra bunlar trombosit, eritrosit, lökosit gibi hücrelere yapışma özelliği kazanırlar. (immün-adherence). Bu kompleks fagositlere yapışırsa fagositoz olayı kolayca gerçekleşir. Bu şekilde komplementin fagositozu hızlandırıcı etkisi olduğu anlaşılmaktadır. Opsonizasyon etkisi olarak isimlendirilen bu etki komplekse C5'in eklenmesiyle daha da artmaktadır.

Komplemente Bağımlı Fagositoz :

Yangı alanına toplanan lökosit ve monositlerin başlıca işlevi fagositozdur. Fagositoz olayında hücre içi enzimlerin yapımı artar. Bu lizozimal enzimler, hücre içine alınan mikroorganizmaları ve diğer maddeleri parçaladığı gibi fagositoz olayı esnasında bu enzimlerin dışarı dökülmesi sonucu, yangı etrafında normal dokuda zedelenme etkisi gösterir.

Özgül antikorlar olmadan da fagositer hücreler fagositoz yaparlar. Bu normal yüzey fagositozudur. Bu özgül olmayan fagositozda komplementin rolü vardır. Komplement aktivasyonu sonucu oluşan C3b mikroorganizmaların yüzeylerine bağlanır ve bağlanan C3b parçası C9'a kadar tüm komplementi aktive ederek bakteriyi eritir veya C3b'nin, reseptör taşıyan hücrelere bağlanması sonucu bakterinin fagositozu ile sonuçlanır. C3b ve C4b moleküllerine karşı reseptör taşıyan hücreler B-lenfosit, nötrofiller, monosit, makrofaq ve eritrosit gibi hücrelerdir. Ag-Ak birleşmesi ile aktive olan komplement C3b ve C4b safhasında yüzeylerinde reseptör taşıyan

bu hücre zarlarına yapışır. Bu yapışma yüzeylerde farklı olayları başlatır. Bu olaylar hücre çeşidine göre fagositoz, salgılanma veya farklılaşma ile sonuçlanır.

Membran Atakt (zedeleleyen) Kompleksi; C 5-9: Sitolitik Aktivite :

Sitolitik aktivite bir çok hücreyi etkiler. Gerek bakteri (Gram negatif bakterilerden bazıları) hücrelerinde gerekse diğer hücrelerde (eritrosit, lenfosit, tümör hücresi gibi) Ag-Ak kompleksinin aktive ettiği komplement etkisiyle hücre lizisi meydana gelir. Bu immuno-hemoliz olayı ile açıklanmıştır. Spesifik antikorlar ile duyarlılaştırılmış bakteri hücrelerinde lizis oluşur. Kanseri veya normal hücrelerin harabiyetine neden olur. Sitolitik etki membran lezyonlarına bağlı olarak şekillenir. Meydana gelen membran lezyonları elektron mikroskopta daha önce açıklandığı gibi tesbit edilebilmiştir.

Konglutinasyon

C3b'nin bir özelliği de bu molekülde bir antijenik yanın var olmasıdır. Bu antijenik özellik, vücut tarafından kendine ait olarak tanınmadığından kaynaklanır. C3b'nin meydana gelmesi, bu yeni şekillenmiş antijenik determinanta karşı otoantikorların yapımı ile sonuçlanır. Bu otoantikorlar immuno-konglutininler olarak bilinirler. İmmuno-konglutininler yüzeylerine C3 tesbit olmuş partiküllerle kümelenenlerdir. Bovidaelerde örneğin sığırlar, mandalar vs. bir serum proteini mevcuttur ki bu konglutinin olarak bilinir. Konglutinin de tesbit olmuş C3b'ye bağlanabilir ve immuno-konglutinin gibi C3b ile kaplı partiküllerin kümelenmesine sebep olabilir. Konglutininin biyolojik önemi bilinmiyor. AgAcC1423 kompleksleri antikor anti-C3 gibi hareket eden bu konglutinin adı verilen serum proteinleri ile aglutine edilebilirler.

Virus Nötralizasyon :

IgM sınıfı anti-viral antikorlar olduğunda, virusların nötralizasyonu için sadece C1, C4, C2 ve C3 bileşimleri yeterlidir. Biyolojik aktivitenin etkisizleştirilmesinde antijen-antikor invitro reaksiyonlarından biri de antijenin özgül antikorun ilavesiyle inhibe olmasıdır. Nötralizasyon testinin temeli, içinde özgül koruyucu, önleyici antikorlar bulunan serumların toksin, enzim veya virus süs-

pansiyonları ile karıştırıldığında toksinin, enzimin ve virusun infeksiyon yapma yeteneğini önlemesine dayanır.

Koagülasyon Fenomenine Komplementin Katılması :

Komplementin bazı yapıları, koagülasyon aşamaları sırasında işe karışır. Bu özellikle faktör C6'dır. Koagülasyona yardımcı immun kompleksler veya toksinler vasıtasıyla komplement aktivasyonu oluşur. Bu yolla koagülasyonun faktör XXII'sine ya da faktör plaketer III üzerine etkili olurlar.

SAĞLIK VE HASTALIKTA KLASİK VE ALTERNATİF KOMPLEMENT YOLLARI ÜZERİNDE AÇIKLAMALAR

Doğuştan hasta olanlar üzerinde, vücut sağlığını sağlamak için gerekli olan komplementin rolünü açığa çıkartmak için çalışmalar yapılmıştır. Komplement sisteminin hemen her komponentine ve sistemin iki doğal inhibitörüne ait genetik eksiklikler tanımlanmıştır.

C3 eksikliği konak savunma mekanizmalarının belirgin olarak bozulmasına yol açar. Bunlar, pyogenik ve Gram negatif infeksiyonlar, bozuk lökosit mobilizasyonu, serum bakterisidal, kemotaktik ve opsonik değişik aktiviteleri ile açıklanabilir. C3b ve B ile birlikte, alternatif yolun kontrolsüz aktivasyonuna neden olan I eksikliği de pyogenik infeksiyonlara neden olabilir. C5b-9 eksikliklerinde meningokoksik menenjit ve gonokokal artrit ile dissemine Neisseria infeksiyonlarının tekrarı görülür. Sitotoksik bir reaksiyon yoksa, bu vak'alarda bakteriyemi kontrol altına alınamayabilir. Özellikle C2 eksikliği olmak üzere bazı komplement eksikliklerinde sistemik lupus eritematosus, Henochchonlein purpura, polimiyelitis, glomerulonefrit gibi hastalıkların kromozomdaki MCH'a bağlandıkları için immun cevaptaki genetik değişiklikleri, bu hastalıkların artan görülme sıklığı açıklayabilir. C2, C4, C1r, C1s ve C1 INH eksikliğinde bakteriyel infeksiyonlara eğilimin artması görülür.

C1-9 için genetik defektlerin olduğu bilinmektedir. Klinik olarak en önemli komplement defektleri sistemin inhibitörlerine ait olanlardır. Bunlar C1 inhibitörü (C1 INH) ve C3b inaktivatörü (I)'ne aittir. Son zamanlarda faktör H ve properdin eksikliği olan

bir kaç vak'a tanımlanmıştır. C1 INH eksikliğinin herediter angionörotik ödem ile ilişkisi vardır. Hastalarda vücudun her yerinde görülebilecek olan subkutan veya intestinal ödem oluşur. I eksikliği çok nadir olarak görülür. Kliniğe yönelik laboratuvarlarda C3 seviyesi ölçülebilir ve 100 mg/dl altındaki değerler önemlidir. Bu düşüş bellibaşlı SLE (C3 yıkımına bağlı olarak) ve akut post-streptotoksik glomerulonefritte (C3 sentez azlığına bağlı olarak) meydana gelir.

Komplement Düzeyi Azalan Hastalıklar :

SLE (glomerulonefritli), akut glomerulonefritis, membrano-proliferatif nefrit, akut serum hastalığı, immün kompleks hastalığı, ilerlemiş karaciğer sirozu, yaygın damar içi pıhtılaşması, immün yetmezlik, infektif endokardit, infekte ventrikülo-arteriel, kalıtsal angionörotik ödem, kalıtsal C2 yetmezliği, paroxysmal soğuk, hemoglobulinemi, myastheria gravis, allograft atılım reaksiyonu, lenfosarkoma, karışık cryoglobulinemia.

Komplement Düzeyi Artan Hastalıklar :

Tıkanma sarılığı, tyroidit, polyartritis nodosa, dermatomyositis, akut myocart infarktüsü, ülseratif kolit, tifo, diabet, gout, reit her sendromu.

KOMPLEMENT TAYİNİ - AKTİVİTENİN ÖLÇÜLMESİ

Serum oda ısısında ayrıldıktan sonra, hemolitik aktivite incelenecekse hemen -70°C 'ye konmalıdır. (4 gün korunabilir) Komplement aktivitesi serum sulandırmaları yapıldıktan sonra, tavşan anti-koyun antikoru ile (hemolizin) duyarlılaşmış koyun eritrositleri ile muamele edildikten sonra ölçülür. Değerler cm^3 başına hemolitik komplement ünitesinin % 50'si olarak ifade edilir. (CH_{50}) bir CH_{50} ünitesi, test serumundaki hücrelerin % 50'sini lizise uğratabilen yeterli serum sulandırmaları veya miktarı olarak tanımlanır.

Komplement fraksiyonlarını (aktif-inaktif) Mancini'nin ışınal agarda yayılımı-tek radial diffüzyon, immün elektroforez ile göstermek mümkündür. Kontr elektroforez veya roket immuno elektroforez ile de fraksiyonlar incelenebilir. Komplementin belirlenmesi için immün adherens titresi ve non-immunglobulin Coombs

testi de kullanılabilir. Depolanmış komplement komponentlerinin fluoresan veya işaretlenmiş bağışık serumlarla ortaya konulması da dokularda komplementin aktive olduğunu gösterir.

Komplement aktivitesinin ölçülmesinde *klasik yol*: Yıllardır standart klasik yol denemesi tavşan antikörleri ile sensitize koyun eritrositlerinin, fizyolojik iyonik güçte ve 37°C'de hemolizisi ile yapılmıştır. Bu lizisin klasik yola bağlılığı, IgG veya IgM antikoru, Ca ve Mg iyonları, C1, C2, C4'ün kullanımı ile ortaya konulabilir. Türlerden birinin komplementi, belirli türlerin eritrositlerini lize edebilir. Bu neden olarak iyice anlaşılmış değildir. Deneyde eritrosit, antikor ve komplement kombinasyonlarında elverişli türler kullanılır. Deneyde % 50'lik bir hemolitik son nokta belirlenmektedir. Sensitize eritrositlerin yarısını lize etmek için gerekli komplement miktarı CH₅₀ ile ifade edilir.

Serumdaki her bir komplement komponenti için deneme girişimlerinde bulunulmuştur. Bu arada çok güç problemlerle karşılaşmıştır. Bu denemelerde klasik yolun 9 komplement komponentine sahip olmak gerekir. Bu komponentlerden birindeki noksanlık denenen homolog türlerde olumsuz sonuçlar yaratır. Araştırmacılar R ayıraçları olarak bilinen belirli ısı veya kimyasal muamelelerle bir komponenti elimine etmek için denemeler yaptılar. Fakat R ayıraçlarının kullanımı hatalı sonuçlar nedeniyle kaldırıldı.

Araştırmacılar komplement komponentleri ölçümü için üç seçeneğe sahiptir.

1 — Eğer spesifik anti-serum şekillenmişse radial immuno-diffüzyondur. Bu antijenin purifikasyonunu gerektirir. Bu yöntem fonksiyonel aktiviteyi ölçmez ve serumda düşük konsantrasyonlar da bulunan komponentler için daha duyarsızdır ve uygulanmaz.

2 — 9 komponentin her birini sağlayarak dokuzuncuyu bulmak için yapılır. İnsan ve kobay komplementi hariç bu test kullanılmamıştır.

3 — EAC1, EAC4, EAC1, 4, 2 vs. gibi intermedietleri üretmek için bir teknik kullanılabilir. Ayıraçlarla, EDTA ve serumla belirli türlerin bazı komponentlerini titre etmek mümkündür.

Alternatif Yol :

Alternatif yola maruz kalma onun Ig'lerden, Ca iyonlarından ve C1, C4 ve C2'den bağımsızlığını ortaya koyarak doğrulanabilir. Onun Mg⁺⁺ varlığında, Ca⁺⁺ yokluğunda sensitize olmamış tavşan eritrositlerinin lizisine neden olma gücü denenmiştir. Faktör B ısıya fazlasıyla dayanıksızdır. Faktör B'nin 50°C'de inaktivasyonu bazen alternatif yol blokajının bulgusu olarak bahsedilir.

KOMPLEMENT SİSTEMİNİN ORTAYA KONULMASI

İnsan patolojisinde ve deneysel olarak komplement sisteminin ortaya konulması, seçici araştırmalar ile total komplement doza-
jının (hemolitik komplement veya CH₅₀) incelenmesi sonucu ger-
çekleşmiştir.

Total Komplement Dozajı (Hemolitik Dozaj) :

Total komplement dilusyonları yapıldığında veya arzu edilen konsantrasyonları ile ilave edilen eritrosit+antikor süspansiyonu-
nun sabit bir volümünde doze edilebilir. 37°C'de inkubasyonundan
sonra tüpler santrifüj edilir ve üst sıvının optik dansitesi spektro-
fotometrede başlangıç hücre konsantrasyonu ile 541 veya 412 na-
no metrede okunur. Her tüpteki hemolizin yüzdesi (Y) % 100'lük
kontrol hemoliz ile ölçülür. Sonra normal biyolojik sıvının absö-
lüt

volümü kâğıt üzerine log. olarak geçirilir ve $\frac{Y}{1} - Y$ değerleri-

ne yerleştirilir. Böylece intermedier hemoliz zonu sağdadır;

$\frac{Y}{1} - Y = 1$ değerlerimizin sağda kesiştiği nokta, total komple-

mentin bir ünite hemolitik 50'yi içeren biyolojik sıvının absö-
lüt volümünün ve biyolojik sıvının her ml.'sinin UH₅₀ sayısını ölçme-
ye yarar.

Krogh, deneysel olarak gözlenen, komplement konsantrasyonları ile hemoliz derecesi arasındaki ilişkiyi bazı limitler içerisinde şu formülle göstermiştir :

$$y = \frac{x^n}{x + k}$$

y = Hemolizis derecesi (lize olan hücre oranı)
x = Hemolizin (veya komplement konsantrasyonu)
n, k = Değişmez sabiteler

Komplement titrasyonunda uygulamak istiyorsak, denklem :

$$x = k \left(\frac{y}{1-y} \right)^{1/n} \quad \text{şeklinde alınır.}$$

Hemolizin derecesi ve konsantrasyon arasındaki ilişkiyi göstermek için, denklemin logaritmik transforu yapılır;

$$\log. x = \log. k + \frac{1}{n} \log \frac{y}{1-y}$$

% 50 hemolizis oluşumunda ihtiyaç duyulan serum miktarı logaritması düz çizgilerle grafikte gösterilebilir.

Ortaya Koymada Diğer Teknikler :

1 — İmmuno adherens : Bu reaksiyon antijen-antikor kompleksine fikze olmuş C3b'nin (ve C4b'nin küçük bir bölümü için) araştırılması için ya bu kompleks bir partikül ile fikze edilerek (örn. eritrosit) ya da partiküler antijenin kendisi (örn. bakteri) olarak kullanılabilir.

2 — Antikomplementer özellik (PAC)

3 — Komplement bileşimlerinin ayrılma ürünleri : İyi koşullarda alınan bir biyolojik sıvıda, komplement bileşimlerinden birinin özellikle C3'ün ayrılma ürünlerinin varlığı, bu sıvıdaki bir antijen-antikor-komplement reaksiyonunun oluşması ile sonuçlanır. Ayrılma ürünleri kalitatif olarak immuno-elektroforezle ve kantitatif olarak faurell tekniğine göre bidimensionelle elektroforezle incelenebilir.

4 — Komplement bileşimlerinin hücresel ve dokusal kalıntıları : Bu artıkların (C3, C4, C1q, properdin vs.) aranması genellikle immun-fluoresans ile gerçekleştirilir.

5 — Komplement-Coombs testi : Bir hücre yüzeyindeki komplementin ortaya konulmasında hematolojide kullanılmaktadır.

Komplemente bağlı hemoliz hem klinik hem de deneysel çalışmalarda geniş ölçüde kullanılmıştır. Kullanılabileceği yerler :

1 — Serumdaki hemoitik komplementi titre etmek için : Serum dilue edilir ve standart miktarda duyarlılaştırılmış eritrosit eklenir. Komplement miktarına bağlı olarak değişik derecelerde oluşan hemoliz ölçülür.

2 — Komplement proteinlerinin tek tek titrasyonu : Yukarıdaki gibi yapılır. Fakat titre edilmek istenilen protein dışında tüm komplement proteinleri ortama aşırı miktarda konur.

3 — Antikorların ölçülmesi : Hemaglutinasyon testine benzer. Antikor ihtiva eden hücreler inkübe edilir. Daha sonra komplement eklenir ve oluşan hemoliz ölçülür.

KOMPLEMENT FIKZASYON TESTİ

Komplement fikzasyon testi, bugün bir çok hastalığın tanısında kullanılan, bilinmeyen antijen veya antikorun saptanması amacıyla yapılan bir serolojik testtir. Komplementin hücre yüzeylerine yapışma ve litik etkisi nedeniyle, eritrositleri lize etme yeteneği kullanılarak test gerçekleştirilir. İlk safhada antijen, antikor ve komplement birleştirilir. Antijen ve antikor özgül iseler birleşir ve komplementi bağlarlar. Eğer antijen ve antikor homolog değilse komplement serbest kalır. Reaksiyonun ikinci safhasında, birleşmemiş serbest komplementin ortamda bulunup bulunmadığı, duyarlılaştırılmış eritrositler kullanılarak anlaşılır. Eğer komplement antijen-antikor kompleksine bağlanmış ise eritrositlerde lizis görülmez, eğer antijen ve antikor özgül değil iseler, komplement serbest kalır ve sonradan eklenen duyarlılaştırılmış eritrositlerin lizisine neden olur.

CF testinin olumsuz yanı, anti-komplementer etkidir. Böyle durumlarda antijen ya da antikor yalnız başına komplementi bağ-

hyabilir. Bu deney için sakıncalıdır. Bu nedenle deney yapılmadan önce deneyde kullanılan reaktiflerin anti-komplementer olup olmadığı kontrol edilmelidir. Bu etki ısıtma ya da sulandırma ile kaldırılabilir. Eğer kullanılan maddeler uygun şekilde kontrol edilirse CF testi tanıda kullanılan duyarlı testlerden biridir. CF deneyi bir çok virus hastalığının tanısında gittikçe daha fazla kullanılmaktadır. Mantar hastalıklarından histoplazmoz, aspergilloz, protozoon hastalıklarından toxoplazmoz, helmint hastalıklarından kist hidatik ve shistomyasis'in serolojik tanısında CF testinden yararlanır. Bu serolojik test yıllardır bakteri ve virus infeksiyonlarının tanısında kullanılmaktadır.

Metod :

Makro ve mikro olarak uygulanır. Antijen, antikor ve komplement arasında yüksek spesifiteye sahip bir reaksiyondur. Kullanılmasındaki amaç;

- 1 — Bilinen antikor ile bilinmeyen antijenin tayini,
- 2 — Bilinen antijen ile hasta serumunda antikor miktarı tayinidir.

Komplementi fikze eden antikorlar bir infeksiyondan hemen sonra başlar, kanda kısa veya uzun süre kalır. Kandaki antikor miktarı farklı hastalıklarda farklı olduğu gibi aynı hastalıkta farklı bireylerde değişik olabilir. Etkileyen faktörler yaş, epidemiyolojik ve individual farklılıklar, infeksiyon yolu, erken aşılama, antijen.

Testte kullanılan reaktifler : 1 — Antikor (hasta serumu), 2 — Antijen, 3 — Komplement, 4 — Koyun eritrositleri, 5 — Anti-koyun eritrositi (amboseptör).

Her reaktif testten önce titre edilir ve belirli oranlarda kullanılır. Ayrıca her maddenin anti-komplementer özelliği araştırılır. Testte kullanılan hasta serumu 56°C'de 30 dakika inaktive edilir. (koyun serumu 60°C'de 30 dakika). Çünkü bu serum da komplement içermektedir. Komplementi tahrib edilmelidir.

- 1 — Serum : Berrak ve hemoliz olmamış olmalıdır. Genellikle santrifüj ile elde edilir. —20°C'de saklanmalıdır. Bir süre sonra titrede düşme görülebilir. Çünkü Ig'lerde harabiyet olur. Kullanılmadan önce ısı ile inaktive edilmelidir.

2 — Antijen : Bazı antijenler ticari olarak piyasada bulunur. Fakat pahalıdır. Daha evvel titre edilip ne şekilde sulandırılacağı bildirilmiştir. Antijenler büyük rutin laboratuvarlarında da hazırlanabilir. Titreleleri yapılır. Diğer laboratuvarlarla sonuçları karşılaştırılır. Uygun şekillerde saklanır.

3 — Komplement : Taze ergin kobay serumu kullanılır. Hayvanların kalplerine punksiyonla girerek birer haftalık aralarla iki kere kan alınır. (4-6 ml. kan/hayvan). Bir hafta sonra kalplerinden punksiyonla kan alınarak öldürülürler. (12-20 ml./hayvan). Serum santrifüjle elde edilir. Hemoliz görülen serum kullanılmaz. Serum 0.5-2 ml.'lik porsiyonlarda liyofilize edilir. —20°C'de saklanır.

4 — Koyun eritrositleri : Sıhhatli ergin koyun kanı toplanır ve küçük cam boncuklu şişede yaklaşık olarak 10 dakika çalkalanır. Defibrinize kan steril serum fizyolojikle üç defa santrifüje edilir. Son santrifüjden sonra yıkanmış koyun eritrositlerinin % 3-5 oranında FTS ile süspansiyonu hazırlanır ve 4-5 gün 4-7°C'de saklanabilir.

5 — Anti-koyun eritrosit antiserum : Bu serum amboseptör olarak isimlendirilir. Tavşanlarda oluşturulur ve elde edilir. Bu serum komplementin varlığında yalnızca eritrositlerin lizisine sebep olma yeteneğindedir. Ticari olarak piyasada bulunabilir. Amboseptör uygun şekilde yıkanmış koyun eritrositlerinin intravenöz enjeksiyonu ile farklı zamanlarda immunize edilmiş tavşanlardan elde edilir. Titreleleri ölçülür, yeterince yüksekse (1:4.000 den fazla) serum toplanır. 56°C'de 30 dk. inaktive edilir. 2 ml.'lik porsiyonlarda liyofilize edilir. Liyofilizasyondan sonra titre daha düşük olacaktır. Prezervatuar olarak % 0.1'lik NaNO₃ ilave edilebilir.

Koyun eritrositleri+amboseptör, hemolitik sistemdir. Antijen +antikör ile C'nin tüketildiği reaksiyonda indikatör olarak kullanılır. Reaksiyonu gözle görülebilir hale getirir.

Testte hasta serumun seri sulandırmaları antijen ve komplement ile inkübe edilir ve reaksiyona girer. İnkübasyon iki şekilde olabilir. Sıcak inkübasyon 30 dk. 37°C'de, soğuk inkübasyon 12-15 saat 4-7°C'de. Mikro sistemde soğuk inkübasyon tercih edilir, sıcak inkübasyon her zaman çalışmaz. Bu inkübasyondan sonra hemolitik sistem ilave edilir. İkinci inkübasyona 37°C'de 30 dk. bırakılır ve reaksiyon gözle görülebilir hale gelir.

Pozitif serum : Eritrosit sedimentasyonu,
Negatif serum : Eritrosit hemolizisi görülür.

Komplement Titrasyonu :

Mikro titrasyon :

1 — Liyofilize edilmiş komplement yeniden tertiplenir.

2 — Test tüplerinde NaCl ile komplementin dilüsyonları yapılır. 1/10, 1/20, 1/30...

Dilüsyon	ml. NaCl	ml. C	Dilüsyon	ml. NaCl	ml. C
1 : 10	0.8	0.1	1 : 70	1.38	0.02
1 : 20	0.95	0.05	1 : 80	1.58	0.02
1 : 30	1.45	0.05	1 : 90	1.78	0.02
1 : 40	0.78	0.02	1 : 100	1.98	0.02
1 : 50	0.98	0.02	1 : 110	2.18	0.02
1 : 60	1.18	0.02	1 : 120	2.38	0.02

Dilüsyonlar soğuk su banyosunda saklanır.

3 — Mikro plate'ler sınıflandırılır.

4 — Pipetle plate'lere NaCl konulur.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A
B	10	10	10	10	10
C	20	20	20	20	20
D	30	30	30	30	30
E	40	40	40	40	40
F	50	50	50	50	50
K

5 — Tüplerden C dilüsyonları plate çukurlarına doldurulur.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1:10	1:30	1:50	1:70							
A	50	50	50	50	50	50	50				
B	40	40	40	40	40	40					
C	30	30	30	30	30						
D	20	20	20	20							
E	10	10	10								
F											
K	50	50	50	50							

Toplam hacim her çukurda 50 ml. olmalıdır.

6 — Koyun eritrositleri ve amboseptör 37°C'de 30 dakika inkübe edilerek hemolitik sistem hazırlanır.

7 — K sırası kontroldür. Hemolitik sistem olarak eritrosit süspansiyonu hazırlanır. Amboseptör ilave edilmez.
24.75 ml.NaCl + 0.25 ml. eritrosit

8 — Bir dropper ile A'dan F'ye kadar her bir çukura 50 ml. hemolitik sistem konulur.

9 — K sırasına 50 ml. eritrosit süspansiyonu konur.

10 — Bir otomatik mixerde birkaç dakika karıştırılır ve plate kapatılır, 37°C'de 30 dakika ve sedimentasyonun oluşması için oda ısısında (20°C'de) 1-2 saat inkübe edilir.

11 — Herbir çukurdaki birleşme okunur. % 90 hemoliz veren dilüsyonla çalışılır. Örn. D sırası % 90 hemoliz veriyorsa bu dilüsyonla çalışılır. 20 ml.'de 1C ünitesi vardır denilir. Testte 2.5 C ünitesi yani 50 ml. bu dilüsyondan kullanılır.

Antijen Titrasyonu :

Mikro titrasyon :

NaCl	25 ml.	25	25	25	25	25
Ag Dilüsyonları	25 ml.	25	25	25	25	25
		1:2	1:4	1:8	1:16	
Pozitif serum	25 ml.	25	25	25	25	25
C'	50 ml.	50	50	50	50	50

12-15 saat 4°C'de veya 37°C'de 30 dakika

HS 50 ml. 50 50 50 50 50

30 dakika 37°C'de ve 12 saat 20°C'de

1 Ag ünitesi % 90 semimentasyon veren dilüzyondur. Örn. 1:32 testte 2 Ag ünitesi kullanılır. Bu 1:16 dilüzyondur.

Bazen 1:2, 1:4, 1:6, 1:8... dilüsyonları kullanılır. Bu çok miktarda antijen kullanımına neden olur.

1 — Mikro plate'ler isimlendirilir. Yanlız bir sıraya ihtiyaç vardır. 1:2, 1:4, 1:8, 1:16...

2 — Bu sıranın her bir gözüne 25 ml. NaCl damlatılır.

3 — Otomatik pipetlerle ilk çukura 25 ml. antijen konulur.

4 — İlk çukur otomatik pipetle karıştırılır. 25 ml. diğer çukurlara transfer edilir. Son çukurdan 25 ml. dışarı atılır.

5 — Titresi bilinen pozitif hasta serumdan tüm gözlere 25 ml. konur.

6 — NaCl ile dilüsyonu yapılan C'den tüm gözlere 50 ml. konur.

7 — Plate'in üzeri kapatılır. 12-15 saat 4-7°C'de inkübe edilir. (buzdolabında bir gece)

8 — Hemolitik sistem hazırlanır, her bir göze 50 ml. konur.

9 — Plate kapatılır, çalkalanır ve 37°C'de 30 dakika ve sedimentasyon oluşuncaya kadar oda ısısında 2 saat bekletilir.

Bir Ag ünitesi % 90 sedimentasyon veren dilüsyondur. % 10 hemolizis vardır.

Amboseptör Titrasyonu :

Tüplerdeki amboseptör dilüsyonu :

	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	...1 : 12.800
Amboseptör ml.	0.25	0.25	0.25	0.25
C' ml.	0.5	0.5	0.5	0.5

1. inkübasyon : 12-15 saat 4°C'de

NaCl ml.	0.5	0.5	0.5	0.5
% 2 eritrosit ml.	0.25	0.25	0.25	0.25

2. inkübasyon : 37°C'de 30 dakika ve 20°C'de 2 saat.

Testte kullanılan titre % 90 hemolizis veren dilüsyonun 4 katlı konsantrasyonudur.

Hemolitik Sistem :

Mikro testte % 1 eritrosit konsantrasyonları kullanılır.

1 — Defibrinize kan NaCl (FTS) ile üst sıvı berraklaşınca kadar 3-5 kez 10 dakika 3.000 rpm.'de santrifüj edilir. Son santrifüjden sonra üst sıvı atılır. Eritrositler uygun şekilde paketlenir.

2 — 30 ml. 1:6.000 dilüsyon amboseptör ile 4.45 ml. normal tuzlu su karıştırılır. Bu dilüsyondan 1.25 ml. + 23.5 ml. NaCl + 0.25 ml. eritrosit yavaşça karıştırılır.

3 — Hemolitik sistem kullanılmadan önce 30 dakika 37°C'de inkübe edilir. Hemolitik sistem buzdolabında saklanmalıdır. 24 saat içinde kullanılmalıdır.

Komplement Fiksasyon Testinde Esas Reaksiyon :

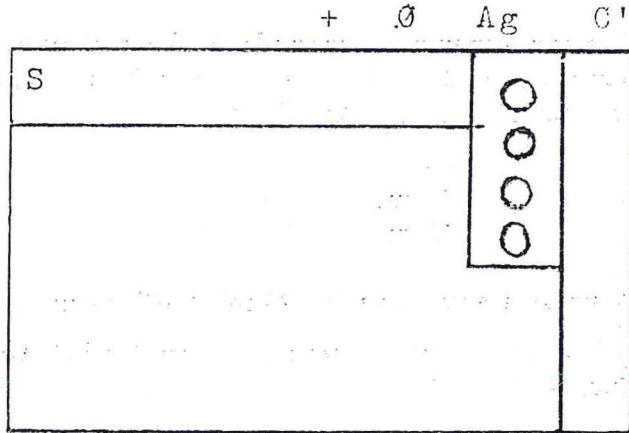
S = Serum kontrol

+ = + serum kontrol

O = — serum kontrol

Ag = Antijen kontrol

C' = Komplement kontrol



1 — Mikro plate'in isimlendirilmesi

2 — Hasta serum, + ve — kontrol serumları bir sıcak su banyosunda 30 dakika inaktive edilir. (koyun, keçi 60°C'de diğerleri 56°C'de)

3 — Kontroller hariç her bir çukura 25 ml. NaCl konulur.

Ag kontrol = 25 ml.

C' kontrol = —

25 »

—

—

—

13 »

10 ml.

20 »

30 »

40 »

50 »

4 — A sırasındaki hasta serum, + ve — kontrollerin her birine 25 ml. transfer edilir.

5 — B sırasındaki hasta serum; + ve — kontrollere 25 ml. transfer edilir. B sırasındaki serum dilüsyonlarının sonuna kadar otomatik pipet veya dilüterlerle çukurlar karıştırılır, sonraki sıranın sonuna kadar aktarılır ve 25 ml. dışarı atılır.

6 — Antijen titrasyonu ile titre saptanır.

İhtiyaç duyulan hacim (ml.) : $\frac{\text{örneklerin sayısı (+, — kontrol)}}{5}$

7 — A sırası kapanır. A sırasında Ag kontrol ve C' kontrole antijen konulmaz. Diğer çukurlara droperle 25 ml. Ag dilüsyonu konulur. Ag kontrol = 25 ml. Ag dilüsyonu

—
25 ml. »
13 ml. »

8 — A sırasına antijen yerine 25 ml. NaCl konur.

9 — Dilüsyonu bilinen + serum (titresi 1:8'dir) Ag kontrole 25 ml. konur. —

25 ml.
25 »
25 »

10 — Plate 1 saat 4°C'de inkübe edilir.

11 — NaCl ile C' titrasyonuna göre C' dilüsyonları yapılır. Soğuk su banyosunda bekletilir.

12 — C' kontrol hariç, her çukura C' dilüsyonlarından 50 ml. koyulur. C' kontrol = 50 ml.

50 »
50 »
40 »
30 »
20 »
10 »
—

13 — Plate 4-7°C'de 12-15 saat inkübe edilir.

14 — Hemolitik sistem hazırlanır.

15 — Her bir çukura 50 ml. hemolitik sistem konur.

16 — Plate kapatılır, otomatik mikserde uygun bir şekilde karıştırılır. 37°C'de 30 dakika inkübe edilir. Sonra 1-2 saat oda sıcaklığında bırakılır.

Değerlendirme :

- 0 = Total hemolizis : Üst sıvı kırmızı, şeffaf, eritrosit sedimentasyonu — ,
- 1 = Üst sıvı kırmızı, şeffaf, eritrositler çok küçük topaklar halinde dibe çökmüş,
- 2 = Üst sıvı kırmızı, şeffaf, eritrositler dibe çökmüş (% 50'den az),
- 3 = Üst sıvı sarı veya açık kırmızı, eritrositler % 50'den fazla çökmüş,
- 4 = Üst sıvı renksiz, % 100 eritrosit çökmesi. Total sedimentasyon. 3,4(+) olarak değerlendirilir.

Testin Kontrolü :

Örnekler okunmadan önce kontrollere bakılır.

Ag Kontrol :

Ag+ +C' + HS = Total hemolizis 0

..... + (+) serum + C' + HS = Total hemolizis 0

Ag+ (+) serum + C' + HS = Total sedimentasyon 4

1/2 Ag+ (+) serum + C' + HS = Total sedimentasyon 4

C' kontrol :	0
↓	0
Komplementin azalan miktarları	0
↓	1
↓	2
↓	3
↓	4
↓	4

Serum Kontrol :

..... + Serum + C' + HS = Total hemolizis 0

Eğer serum kontrollerinde eritrositlerin kümelenmesi olmuşsa bu serum değerlendirilmez.

Bilinen (+) kontrol : Son testte aynı titreyi vermelidir.

Bilinen (—) kontrol : (—) olmalıdır.

Hem zayıf hem de kuvvetli ayarlanan C' dilüsyonlarının kontrolü :

Zayıf : 1 1 1 3 4 4 4 4 : Çukurlarda total hemolizis yoktur.

Kuvvetli : 0 0 0 0 0 0 1 4 : Total hemolizis.

Ag dilüsyon kontrol = Zayıf Ag Ag kontrol = 0 0 2 1

Anti-komplementer serum : A sırasının serum kontrollerinde lizis yoksa, sıcakta uygun olarak inaktive edilmemiştir veya bir anti-komplementer serumdur.

Testin Yorumlanması :

Bir hayvanın 2 serum numunesi denenmelidir. Genellikle eşit ve 2 hafta aralıklarla alınmalıdır. Sürü kontrollerinin rutin olarak yapılmasında CFT çok faydalıdır. Düşük bir titre infeksiyonu ortaya koymaz. Çünkü düşük titrenin infeksiyon veya erken vaksınasyon sonucu olduğu üzerinde durulur. Negatif bir titre infeksiyonun olmadığını kanıtlar. Hayvanda immun yanıt çok düşüktür veya titreler çok erken olduğu gibi geç tayin edilmiş olabilir. Bir hayvanda titrelerdeki günlük değişmeler gözönünde tutulmalıdır. Yüksek titreler hastalığın memleket popülasyon indeksine bağlı olabilir.

KAYNAKLAR

- 1 — ADELSBERG, B.R. (1983) : The complement system in pregnancy. American J. of Reproductive Immunology. 4: 38-44.
- 2 — ALTON, G.G., JONES, L.M. et Pietz, D.E. (1977) : La Brucellose Techniques de Laboratoires. Dé uxieme édition, Organisation Mondiale de la santé, Series de Monogr. No. 55, Genève. p. 61-74.—

- 3 — ANON. (1976) : Immunologie, Tome I. System du complement, Chapitre 5. Editons. Crovan et Roques., Lille.
- 4 — ARDA, M. (1985) : İmmunoloji-I. A.Ü. Vet. Fak. Yayın. No. 404. Ders Kitabı. A.Ü. Basımevi, Ankara.
- 5 — AYDIN, N. (1984) : İmmunoloji ve seroloji. (Teksir). A.Ü. Vet. Fak. 84-85/3., s. 271-276.
- 6 — AYGÜN, S.T. (1957) : Bağışıklık Bilgisi. (İmmunoloji-Seroloji). A.Ü. Vet. Fak. Yayın. 93., Ders Kitabı-II, Yeni Desen Matbaası, Ankara., s. 97-100.
- 7 — BİLGEHAN, H. (1983). Genel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Bilgehan Basımevi, Bornova-İzmir., s. 407-420.
- 8 — CAMPBELL, D.H., GARVEY, J.S., CREMER, E.N., SUSDORF, D.H. (1970) : Methods in Immunology. 2nd. Ed. Reading, Massachusetts. London, p. 301-325.
- 9 — ÇETİN, E.T. (1981) : İmmunoloji. İ.Ü. Tıp. Fak. Vakfı - Bayda Yayını, s. 143-155.
- 10 — EYRE, P. (1980) : Pharamacological aspects of hypersensitivity in domestic animals: a review. Vet. Res. Commun. 4: 83-98.
- 11 — GARRATTY, G. (1975) : Complement, Its Chemical and Biological Characteristics. DADE Div. Amer. Hosp. Supply Corp. Miami, U.S.A.
- 12 — GÜLMEZOĞLU, E. (1983) : Bağışıklığın Temelleri. H.Ü. Yayın. A/16. Sevinç Matbaası, Ankara., s. 247-259.
- 13 — HIRSCH, R.L. (1982) : The complement system, Its importance in the host response to viral infection. Microbiological Reviews 46 (1): 71-85.
- 14 — HOBART, M.J., McCONNELL, I. (1975) : The Immune System. Blackwell Scientific Publications., Oxford., p. 56-75.
- 15 — LAMBRECHT, G. (1983). The complement fixation test in microtiter system. An International Course/Workshop in Veterinary Immunology, October, 5-12, Ankara.
- 16 — LINSKOTT, W.D. (1986) : Biochemistry and biology of the complement system in domestic animals. Progress in Veterinary Microbiology and Immunology., 2: 54-77.
- 17 — PODACK, E.R. (1986) : Molecular mechanisms of cytolysis by complement and by cytolytic lymphocytes. Journal of Cellular Biochemistry., 30: 133-170.
- 18 — ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. (1985) : Immunology Gower Medical Publishing Ltd. London., p. 7. 1-13.
- 19 — SERTER, F., BİLGEHAN, H. (1971) : Klinik Mikrobiyoloji. Ege Ü. Tıp Fak. Yayn. No. 84. Bornova Ege Ü. Matbaası., s. 253-262.
- 20 — TIZARD, I. (1983) : Veterinary Immunology. 2nd. Ed. WB. Saunders Company, Philadelphia, London., p. 106-117.
- 21 — UNANUE, E.R., BENACERRAF, B. (1983). TEXTBOOK of Immunology. Ed. Stamathis. G., Williams and Wilkins., Baltimore, London, p. 237-259.