

# ■ KOMPLEMAN

- Kompleman ile ilgili gözlemler 1800'lü yıllarda Nuthall, Pfeiffer ve Bordet tarafından gerçekleştirilmiştir;

Araştırmacılar kolera vibriolarını deney tüpünde bağışık taze serumla karşılaştırmışlar;

- Kolera vibrionu kültürü + koleraya bağışık taze kobay serumu → bakteriyoliz (+)
- Kolera vibrionu kültürü + ısıtılmış bağışık serum → bakteriyoliz (-)
- Kolera vibrionu kültürü + ısıtılmış bağışık serum + bağışık olmayan taze kobay serumu → bakteriyoliz (+)
- Tifo basili + Tifoya bağışık taze kobay serumu → bakteriyoliz(+)
- Kolera vibrionu kültürü + Tifoya bağışık taze kobay serumu → bakteriyoliz (-)
- Kolera vibrionu kültürü + ısıtılmış tifoya bağışık kobay serumu+taze kobay serumu → bakteriyoliz (-)

- Yapılan deneyde spesifik antikor içeren taze serum, 37 °C de bakteri süspansiyonuna ilave edildiğinde bu hücrelerin eridiği gözlenmiş; ancak işlem öncesi serum 56 °C de ısıtılır ise, litik özelliğin kaybolduğu saptanmıştır.
- Litik aktivite kaybı, ısıya dirençli antikorlar ile ilgili olamayacağından; sonuçta serumun içinde ısıya duyarlı ve antikorların işlevlerini tamamlayıcı (complement) özelliğe sahip bir maddenin bulunduğu kabul edilmiş ve bu madde kompleman olarak isimlendirilmiştir.



- Serumda bulunan, bayatlamakla veya 56 °C de 30 dakika ısıtmakla inaktive olan, bağışıklama ile miktarı artmayan, uygun antijen-antikor kompleksine bağlanabilen ve bu yolla sitolizlere yol açan madde komplekslerine **kompleman** denir.
- **KOMPLEMAN BİR ANTIKOR DEĞİLDİR,**  
Antijen-antikor kompleksi ile birleşir.

- Kompleman  $C_{1q,r,s}$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$ ,  $C_6$ ,  $C_7$ ,  $C_8$  ve  $C_9$ , olmak üzere 11 komponentten meydana gelmiştir. Bunların molekül ağırlığı, serumdaki miktarları, kimyasal yapıları farklıdır.

# Kompleman Sistemi

- Normal serumda düşük konsantrasyonda bulunan ve kompleks bir protein grubu olan Kompleman sistemi, mol ağırlıkları 25 ile 500 kDa arasında değişen, birbiri ile reaksiyona girebilen, kimyasal ve immunolojik farkları bulunan yaklaşık 30 farklı ve **inaktif** yapıtaşından meydana gelir.
- Normal şartlarda kan serumunda inaktif şekilde ve çözünür durumda bulunurlar ve sadece komplemanın çeşitli efektör fonksiyonlarına aracı olan ürünlerin salındığı özel durumlarda aktive olurlar.

- Sistemi oluşturan yapıtaşları belirli koşullarda aktive olurlar ve düzenli bir sıra ile birbirleri ile reaksiyona girerek protein-protein kompleksi ve aktif parçalanma ürünleri meydana getirirler.



# KOMPLEMANIN AKTİVASYONU

- Kompleman sisteminin 3 yoldan aktive olduğu bilinmektedir.
  - Klasik yol,
  - Alternatif yol ve
  - Lektin yolu.
- Bu sistemleri harekete geçiren uyarıcı maddelerin yanı sıra, ilk komponentleri de farklıdır. Kendilerini tetikleyen uyarıcılar farklı olsa da tüm aktivasyon yollarında amaç; **C5'in aktivasyonu ve sonunda membran atak kompleksinin aktivasyonudur.**

## ■ Klasik yol

- Klasik yoldan kompleman aktivasyonu genellikle özgül antijenle birleşen IgG veya IgM antikor kompleksi tarafından başlatılır. Klasik yol kompleman proteini C1 den başlar ve bir sonraki proteinin aktivasyonu şeklinde C9' da hücre erimesi ile sona erer.
- Antijen genellikle hücre şeklindedir (bakteri, eritrosit gibi) Antikorlar ise kompleman bağlayabilme özelliğinde olanlardır. (Ig G ve Ig M)

- Bu yolda C1q, C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, ve C9 komponentleri bu sıra ile görev alır. Bu proteinlerin hemen hemen hepsi **proenzim** şeklinde bulunurlar. Enzim aktivitesi kazanabilmek için bir önceki enzim tarafından parçalanmaları gerekir.

- Klasik aktivasyon yolunda C1 proteininin, antijene bağlanmış IgG ve IgM molekülüne birleşmesi söz konusudur.
- Klasik yolda C1q aktivasyonu başlatır. C1r, C1s'yi aktive eder. C1s, serumda serbest halde bulunan C4' ü parçalayarak C4a ve C4b' nin oluşmasına neden olur.



- C4b yüzeye bağlanarak C2' yi de kendine bağlar ve C1s için bir substrat oluşturur.
- C1s bu kez C2' yi parçalayarak C2a ve C2b moleküllerinin ayrışmasını sağlar.
- C2b serbest hale geçerken C2a, C4b' ye bağlı olarak yüzeyde kalır. Oluşan C4b2a kompleksi C3 konvertaz aktivitesi kazanır. C3' ü C3a ve C3b' ye parçalar.

- C3b, C4b2a molekülüne bağlanarak C4b2a3b kompleksini oluşturur. Oluşan yeni kompleks C5 konvertaz aktivitesi kazanır. C5' i C5a ve C5b olarak iki moleküle ayırır.
- C5b, C6, C7, C8, C9' u da kendisine bağlayarak MAK (Membran Atak Kompleksi) oluşturur hücre lizisi gerçekleşir.

## Alternatif yol

- Alternatif yol C3'den başlar ve C9' da sonlanır. Bu yolda ayrıca klasik yolda rol oynamayan faktör B ve faktör D ve properdin gibi komponentler yer alır.
- Alternatif yoldan kompleman aktivasyonunda antijen-antikor kompleksine gereksinim yoktur.

- Bu yol özellikle infeksiyonların başlangıcında, doğal dirençte etkilidir. Çünkü bu yolla aktivasyon için antikora gerek yoktur. Bazı mantar, parazit ve bakteri hücreleri, virusla infekte hücreler, tümör hücreleri, Ig yığıntıları ve çeşitli maddeler kompleman sistemini alternatif yoldan aktive ederler.



- Bu yolda, dolaşımda serbest bulunan C3 parçalanarak C3b ürünü oluşturur.
- Serbest C3b kısa sürede yıkıma uğrar, mikroorganizma yüzeyine yapışır ise faktör B ve D' yi kendine çeker; Faktör B, Ba ve Bb ye ayrılır.
- Bb, C3b' ye bağlanır ve C3bBb kompleksi oluşur ve bu kompleks C3 konvertaz aktivitesine sahiptir.

- C3bBb yeni C3a ve C3b oluşturarak alternatif yolu devam ettirir.
- C3b ler yeni faktör B leri bağlar ve sonuçta daha fazla C3b oluşur. Bu siklus bu şekilde devam eder. Yeni oluşan C3b, C3bBb kompleksine bağlanarak C3bBb3b kompleksini oluşturur ve bu kompleks alternatif yoldaki C5 konvertazdır. Bu da C5 i parçalar sonrası klasik yoldaki gibi devam eder.

- Kompleman sisteminin uyarılmasında rolü olan üçüncü yol **lektin** yoludur ve klasik yolla bir çok açıdan benzerlik gösterir.
- Lektin aktivasyon yolu mikroorganizma polisakkaritlerinin dolaşımdaki lektinlere bağlanması ile harekete geçmektedir. Yapısal olarak C1' e benzerlik göstermesi nedeniyle lektinlerin rol aldığı bu aktivasyon mekanizması sonraki aşamalarda klasik yoldakine benzer gelişme gösterir.

MBL karaciğerde sentezlenir.

Fonksiyonu : MBL, pek çok şekere etkin bir şekilde bağlanabilen ve oldukça iyi korunmuş bir antikor olarak görev yapar.

Mikrobiyal hücrelerin yüzeyleri ile iyi uyum gösterir. Bu hücrelerle bağlanması; fagositlerin MBL ile kaplanan bakterilere tutunması, bakterinin hücre içine alınması ve öldürülmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle MBL, direkt olarak bir opsonin olarak görev yapmaktadır.



- Hangi yoldan harekete geçerse geçsin, kompleman sisteminin uyarılması C5 aşamasından sonra benzer gelişme gösterir.
- Ortaya çıkan C5 konvertaz aktivasyonu sonucu önce C5, a ve b parçalarına ayrılır. Hücre duvarına yapışıp kalan C5b, sistemin geri kalan yapıtaşlarını ( C6,C7,C8 ve C9 ) kendine bağlar; sonuçta C5b-6789 kompleksi (Membran Atak Kompleksi) meydana gelir.

- MAK, membranı yarı geçirgen hale sokar; hücre dışı ortamdan hücre içine su ve kalsiyum gibi bazı maddelerin geçişi olur; sonuçta hücre şişer ve patlar. (sitoliz)

- Kompleman sisteminin harekete geçmesi sırasında, bölünmeye uğrayan her yapıtaşının bir kısmı (örnek C5b) hücre duvarına yapışıp, aktivasyonun bir sonraki aşamasını hazırlarken; diğer kısımlar (örnek C5a) biyolojik işlevini yerine getirmek üzere ortamdan uzaklaşır.

# KOMPLEMAN PROTEİNLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

- Kompleman bakteriyel infeksiyonlara karşı korunmada ve kandan immun komplekslerin temizlenmesinde seçici bir rol oynamaktadır. Ayrıca, kompleman sistemi inflamasyonda en etkin yollardan biridir.



# Komplemanın Başlıca Biyolojik Aktiviteleri

- 1) **Opsonizasyon** aracılığı ile fagositozu güçlendirme ve dolayısıyla bakterileri ve immun kompleksleri ortamdan temizleme.

Bir opsonin olan C3b hücre membranına doğrudan bağlanarak, C3b reseptörü taşıyan nötrofil ve makrofaj gibi fagositik hücrelerin bakteriye doğru çekilmesini sağlar ve böylece bakterilerin temizlenmesine yardımcı olur.

## 2)Anafolatoksinler

Bazı antikorların antijenlerle birleşme yetenekleri yanında bazı tip hücrelerle de birleşme yetenekleri vardır. IgG ve IgM cinsi bu antikora SİTOTROP veya SİTOFİL antikorlar denir.

Mast hücreleri ile birleşen bu tip antikorlar komplemanın özellikle C3a, C4a, C5a etkisiyle anafilaksiye neden olan histamin, bradikinin, asetilkolin, prostaglandin, serotonin gibi maddelerin salgılanmasına neden olurlar. Bu maddelerle bronş spazmı, kapiller geçirgenliğin artması, düz kaslarda kasılma ve karakteristik anafilaksi belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olur.

- İmmun komplekslerin fagositik temizlenmesi

İmmun kompleksler belirli bir antijenin sirkülasyonu sırasında oluşan humoral immün cevap sonucunda oluşabilirler. Bu kompleksler damar cidarında toplanarak komplemanı aktive ederler ve oluşturdukları inflamatuvar cevapla çevre dokulara zarar verebilirler. Kompleman immunoglobulinlere bağlanarak immün komplekslerin fagositozuna yardımcı olarak dolaşımdan temizlenmelerini sağlarlar.



### 3)Kemotaksis

- Kompleman proteinlerinin polimorfonükleer lökositlere ve makrofajlara bağlanması sonucunda fagositer hücrelerin inflamasyon yerine göçü (kemotaksis) sağlanır.
- Kemotaksis etkisi ile (özellikle C5a) kompleman fagositoza yardımcı olur.

# KOMPLEMAN BİRLEŞME DENEYLERİ

Kompleman birleşmesi gerçekleştiren antikorlar in-vitro deneylerde her zaman kolaylıkla farkedilmezler. Bakteri hücresi 1 mol IgM veya 3 mol IgG ile birleşir buna da komplemanın bağlanması gerekir. Lizis olayının fark edilebilmesi için çok miktarda bakteri hücresinin bulunması gerekir.

İşte bu nedenle komplemanın bağlanıp bağlanmadığını tespit için indikatör olarak koyun eritrositleri ve bunlara karşı hazırlanmış bağışık serumdan ibaret olan HEMOLİTİK SİSTEMDEN yararlanılır. Antijen ve antikorun özgülüğü ve komplemanı bağlaması bu hemolitik sistemle anlaşılır.

# KOMPLEMAN BİRLEŞME DENEYLERİ

- Hasta serumunda antikor varlığını ortaya koymak amacıyla uygulanan klasik metotlardan biri de kompleman birleşme deneyidir. Bu test iki sistem içermektedir.



- Bunlardan birincisi hastadaki infeksiyonun etkeni olduğundan şüphelenilen antijen ve hasta serumundan oluşur.
  
- İkinci sistem ( indikatör sistem) ise,
  - Koyun eritrositleri
  - Başka bir hayvanda koyun eritrositlerine karşı oluşturulan anti koyun eritrosit antikorunu (hemolizin)
  - Kompleman (kritik miktarda)

Bu deneyde kullanılan maddeler;

- Antijen: şüphelenilen hastalığa ait etken
- Antikor: hasta serumu
- Kompleman: taze kobay serumu
- Koyun eritrositleri
- Hemolitik serum: koyun eritrositlerine karşı antikor ihtiva eden serum
- Serum fizyolojik

- Bu üç komponent en uygun konsantrasyonda karıştırıldığında, anti-koyun eritrosit antikoru, eritrositlerin yüzeyine bağlanacak ve daha sonra da ortamdaki kompleman bu antijen antikor kompleksine tutunarak eritrositlerin lizisine neden olacaktır. Bu nedenle anti-koyun eritrosit antikoları aynı zamanda hemolizin olarak bilinir.

- Öncelikle şüpheli antijen üzerine hasta serumu konur, daha sonra solüsyona sınırlı miktardaki kompleman eklenir. Eğer hasta serumu bu antijene karşı antikor içeriyorsa oluşacak olan antijen-antikor kompleksi ilave edilen komplemanın tamamını bağlayacaktır.

(Antijen+hasta serumu+kompleman)

- Komplemanın kritik miktarı çok önemlidir ve sadece bir sisteme yetecek kadar kompleman olmalıdır.



- Daha sonraki basamakta koyun eritrositleri ve hemolizinden oluşan indikatör sistem reaksiyona dahil edilir.

(Antiijen+hasta serumu+kompleman+indikatör sistem)

- Eğer kompleman hasta serumundan gelen antikor tarafından oluşturulan komplekse bağlanamadı ise açıkta kalan kompleman koyun eritrosit -hemolizin kompleksi tarafından bağlanacak ve lizis oluşacaktır.

- Dolayısıyla indikatör hücrelerin lizisi , hasta serumunda antikor bulunmadığına ve negatif sonuca işarettir.
- Hasta serumunda komplemanı bağlayıcı antikorların bulunması yani indikatör sistemdeki eritrositlerin lizisinin gerçekleşmemesi pozitif sonuca işarettir.

- Hasta serumu+antijen+kompleman= 37 C de 1 saat + indikatör sistemden ilave= 37 C benmaride 30 dk. Beklet. Sonuçlar okunur. Hemoliz oluşup oluşmadığına bakılır.
- Diğer tarafta %25 lik koyun eritrosit süspansiyonu üzerine aynı miktarda hemolizin ilavesi ile indikatör sistem hazırlanır.
- Deney negatif ve pozitif serum ile kontrollü olarak yapılır.

-Tüplerde antijen-antikor kompleksi aracılığı ile tüketilmemiş kompleman kalmış ise kalan aktif kompleman miktarı ile ilişkili olarak indikatör hücrelerin tamamında veya bir kısmında lizis (hemoliz) olur.

-Hemoliz olan ilk tüpten bir önceki tüpteki serum titrasyonu antikor miktarını tanımlamak için kullanılır.



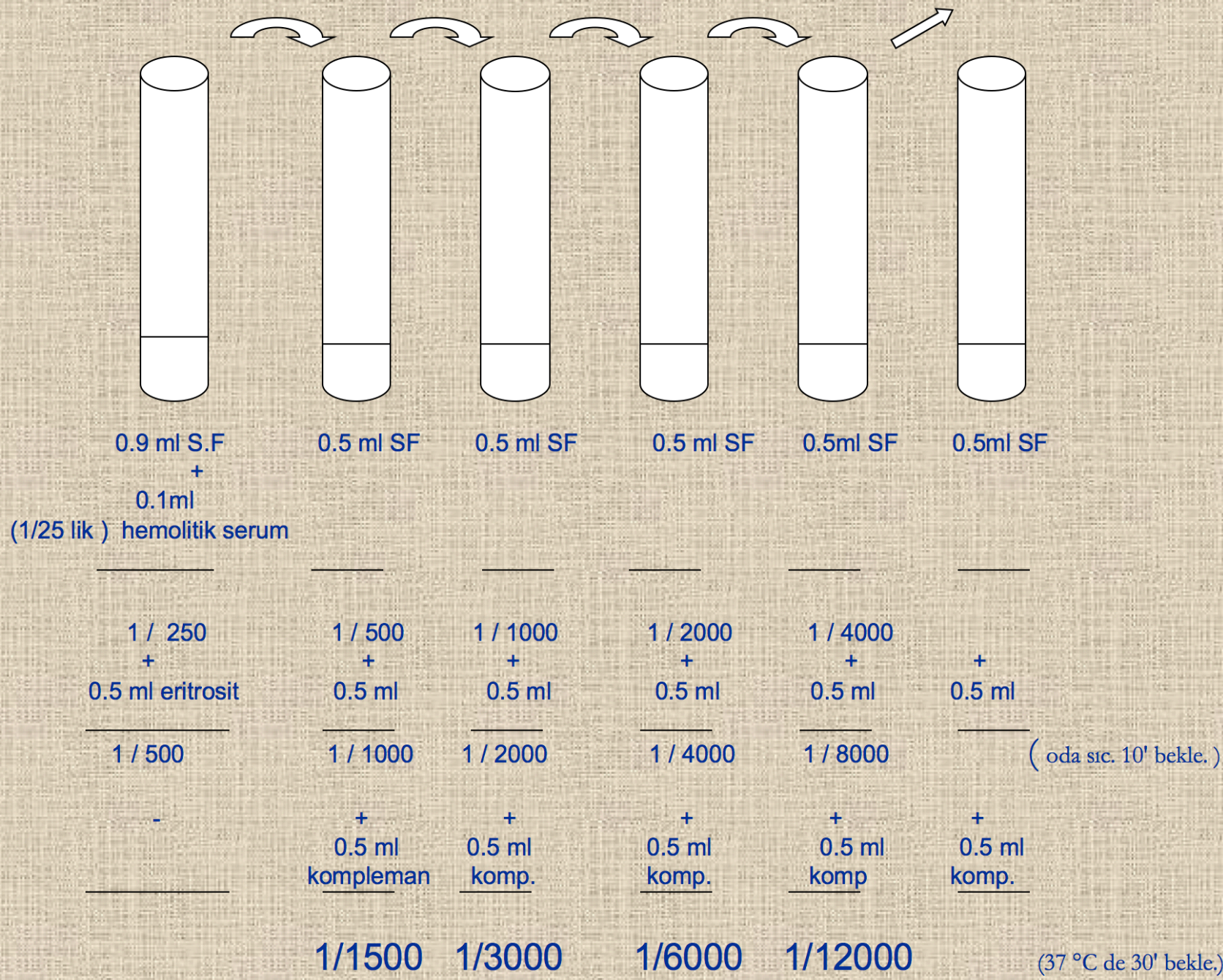
- CF testi IgM'yi IgG'den ayıramaz; zira her 2 antikor sınıfı da C'ı bağlayabilir.
- Dolayısıyla akut infeksiyonda tanı koydurucu olabilmesi için titrede 4 kat artışın gözlemlenmesi gerekir.
- Çok duyarlı bir yöntemdir, infeksiyon hastalıklarının serolojisinde geniş bir uygulama alanına sahiptir.
- Oldukça zor ve zahmetli olduğu için referans laboratuvarları dışında nadiren kullanılır.
- Coxackie virüs gibi prevalansı düşük virüslere karşı antikor saptamada uygun bir yöntemdir.

# •HEMOLİTİK SERUM TİTRAJİ

Serumun minimal hemoliz dozunun belirlenmesi için yapılır.

- Hayvanlara yabancı bir hayvanın hücreleri enjekte edilirse bu hücrelere karşı , o hayvanda antikor oluşur. Eritrositlere karşı antikor içeren böyle serumlara hemolitik serum veya hemolizin adı verilir.
- Hemolitik serum, kompleman birleşmesi deneyinde kullanılan koyun eritrositlerine karşı antikor içeren, tavşan serumudur.







- Hemolizin görüldüğü en yüksek sulandırım içeren tüp saptanır, bu tüpteki hemolitik serum sulandırımına "bir minimal hemolitik doz" (MHD) veya "bir hemolitik ünite" denir. Kompleman birleşmesi deneyinde bunun 3 kat yoğun sulandırımı yani 3 MHD kullanılacaktır.