

Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,
ГКБ им. А.К. Ерамишанцева ДЗ г.Москвы

Комплемент-опосредованные и комплемент-активирующие состояния в нефрологической практике

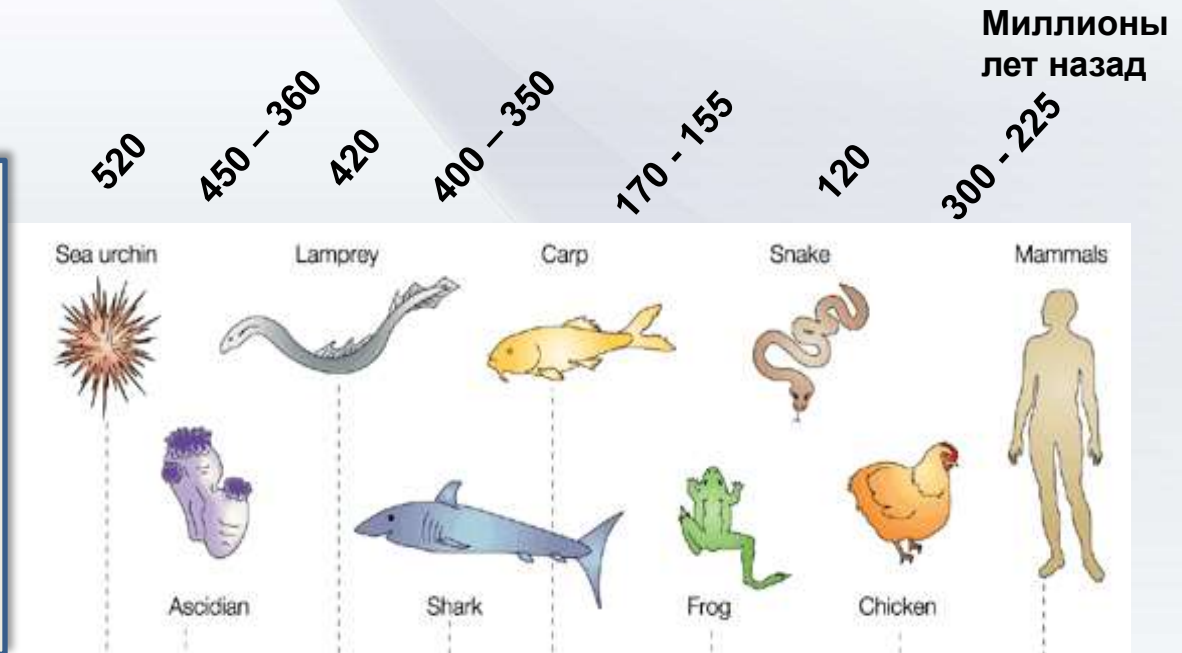
Н.Л. Козловская, К.А. Демьянова, Ю.В. Коротчаева,
В.А. Юрова, М.И. Акаева, Л.А. Боброва

XII Общероссийская конференция «РДО - 20 лет»
Москва, 18-20 октября 2018г.

Комплемент: Древняя защитная система

Функции комплемента

- Непосредственное уничтожение патологического агента (комплекс мембранной атаки – МАК=ТКК)
- Индукция фагоцитоза (C5a)
- Индукция воспаления (C3a, C5a, C5b-9)
- Прокоагулянтная активность (C5a, C5b-9)
- Удаление ИК и поврежденных клеток
- Усиление приобретенного иммунитета



Альтернативный путь

Лектиновый путь

Классический путь

Приобретенный иммунитет

Заболевания почек, в развитии которых играет роль патология системы комплемента

Атипичный гемолитико-уремический синдром

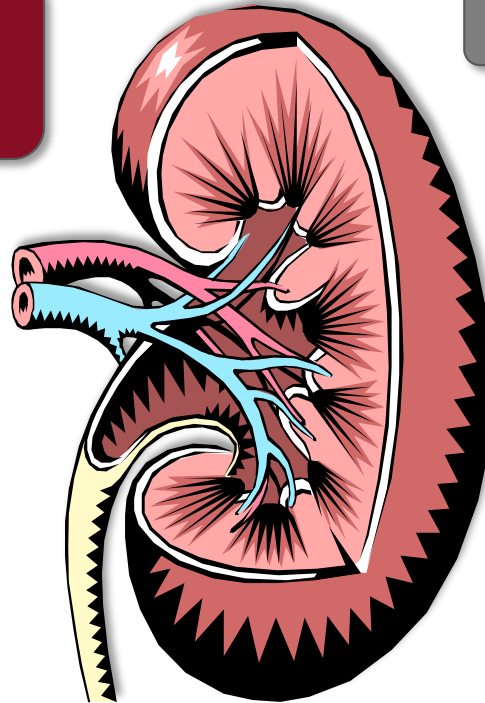
С3 гломерулопатия
(Болезнь плотных депозитов, С3
гломерулонефрит)

Катастрофический АФС (АФС-
ассоциированная нефропатия)

Волчаночный нефрит

Нефриты при ANCA-
ассоциированных васкулитах

Преэклампсия



Мембранопролиферативный ГН I типа

Мембранозная нефропатия

Анти-БМК-болезнь (синдром
Гудпасчера)

IgA нефропатия

Трансплантация почки (ишемия-
реперфузия)

Тубулоинтерстициальное повреждение
при массивной протеинурии

Дефект компонента и развитие болезни

Классический путь

C1q, C1r, C1s

Аутоиммунные болезни

C4 → C2 → C4b2a

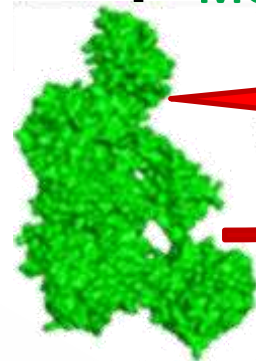
MBL, MASP

Лектиновый путь

Терминальный путь

iC3b

Фактор I
Фактор H
MCP



C3b

C5

C9

CD55

CD59

Альтернативный путь

Болезни почек
aHUS, C3G

Фактор H

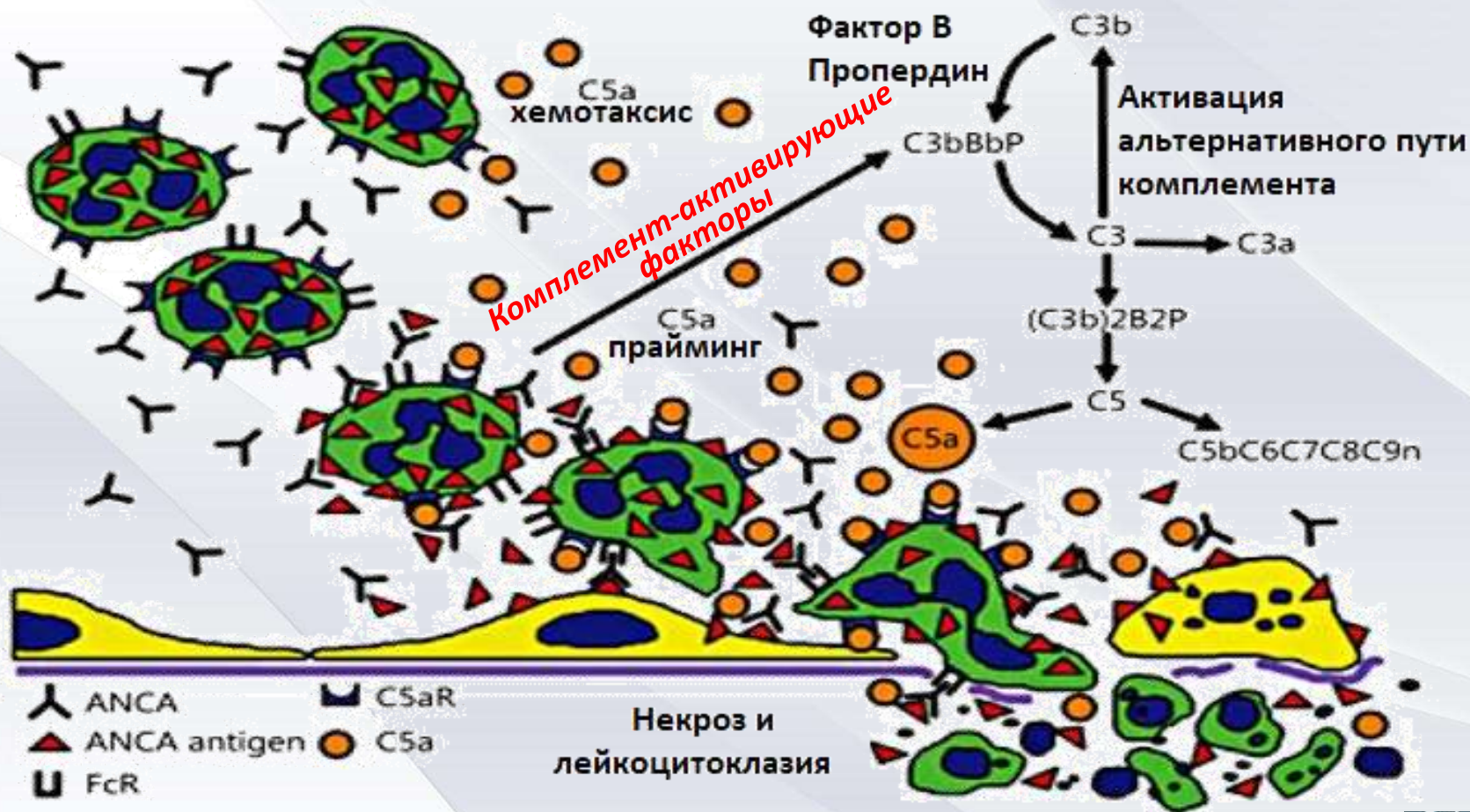
C3bBb

Фактор D
Фактор В
Пропердин

Менингококковая инфекция

ПНГ

Возможный патогенез острого сосудистого повреждения при ААВ



Аномалии системы комплемента, ассоциированные с заболеваниями почек

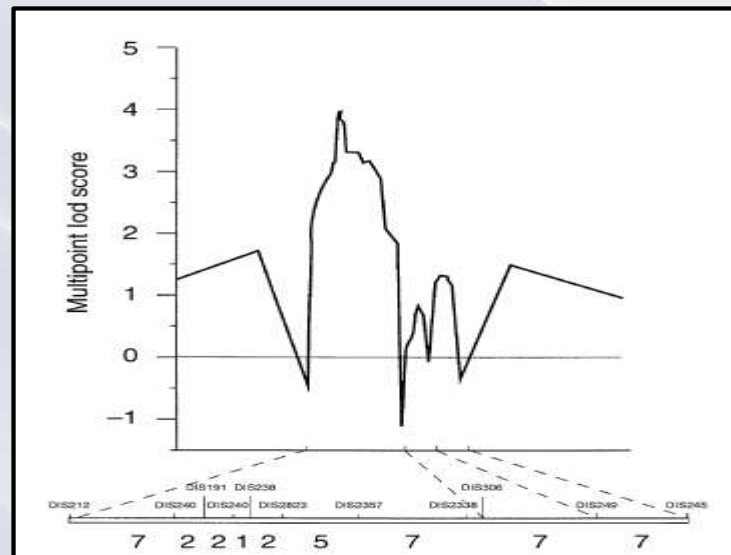
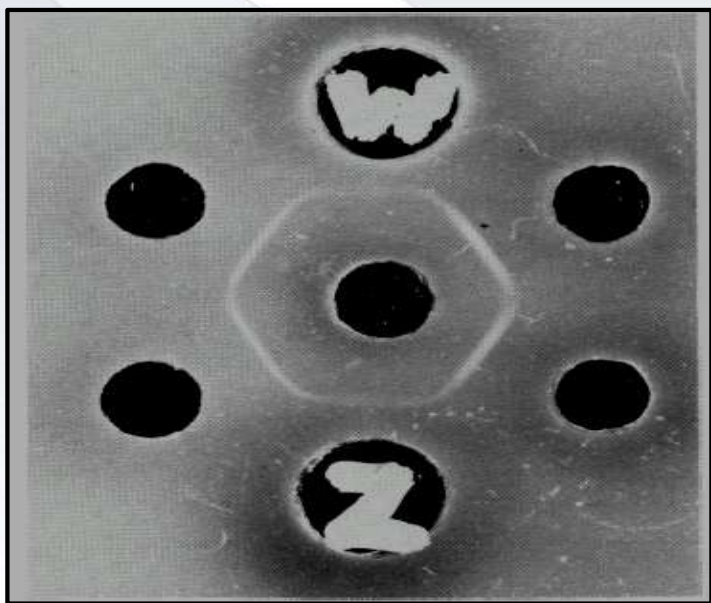
Компоненты комплемента	Заболевания
C3, CFH, CFI	C3гломерулопатия (DDD/C3GN), аГУС
MCP	аГУС
Фактор В	аГУС
CFHR5, CFHR3-1	Семейная C3гломерулопатия (CFHR5нефропатия)
CFHR1/3	IgA нефропатия, аГУС
C3Nef, аутоантитела к фф.В, Н	C3гломерулопатия (DDD/C3GN),
Bb (активированный ф-р В)	ГУС, ANCA-васкулит
C5b-9 (MAC=ТСС)	ГУС, ТТП, ANCA-васкулит
C3а, C5а	ANCA-васкулит, ТТП
C1q/C1qR	C1q нефропатия
Пропердин	ТИ повреждение при массивной протеинурии
C5, фактор В	ANCA-васкулит
C5aR, CFH, C5b-9, CD59	Ишемически-реперфузионное повреждение

Комплемент и атипичный ГУС

В начале 1970х годов впервые была установлена связь между активацией альтернативного пути комплемента (низкий C3) и аГУС

1981г.: описан первый случай аГУС у больного с дефицитом CFH

1998г.: Идентифицированы 3 семьи, в которых доказана связь аГУС с мутациями *CFH*



Установлена связь между локусом RCA на хромосоме 1q32 (кластер регуляторов комплемента, включая CFH) и ГУС

Схема активации комплемента

Proximal

Лектиновый путь

Классический путь

Альтернативный путь

Клиренс ИК
Опсонизация микробов

C3

C3 + H₂O – всегда активен
Амплификация (хронически)

CFB

C3b

Естественные ингибиторы CFH,
CFI, MCP, TBDH

C3bBb – конвертаза

iC3b

C5 - конвертаза

C5

C5a

C5b-9
МАК

- Мощный анафилотоксин
- Хемотаксис
- Провосполительный Эф-т
- Активация лейкоцитов / моноцитов
- Активация эндотелия
- Протромботический эф-т

- Лизис клеток
- Провосполительный эф-т
- Активация тромбоцитов
- Активация лейкоцитов/ моноцитов
- Активация эндотелия
- Протромботический эф-т

последствия

Последствия

Анафилаксия
Воспаление
Тромбоз

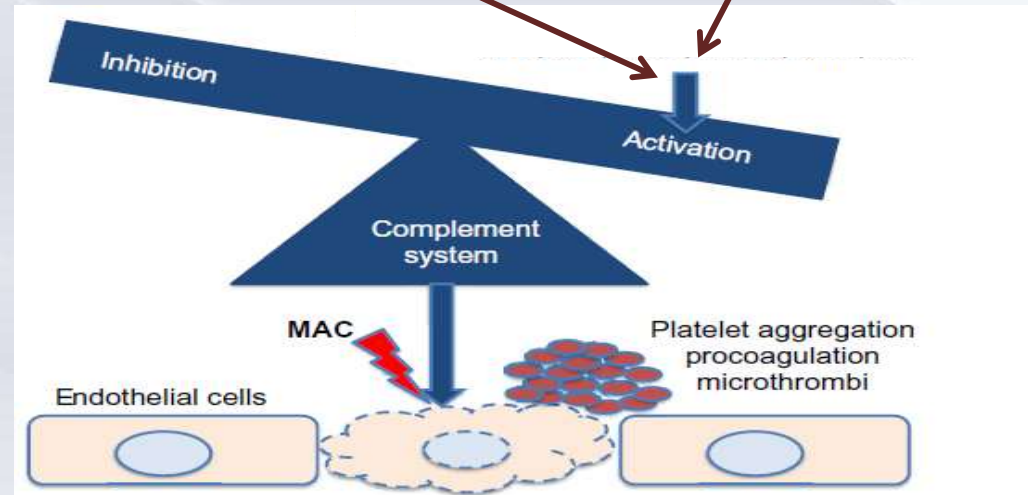
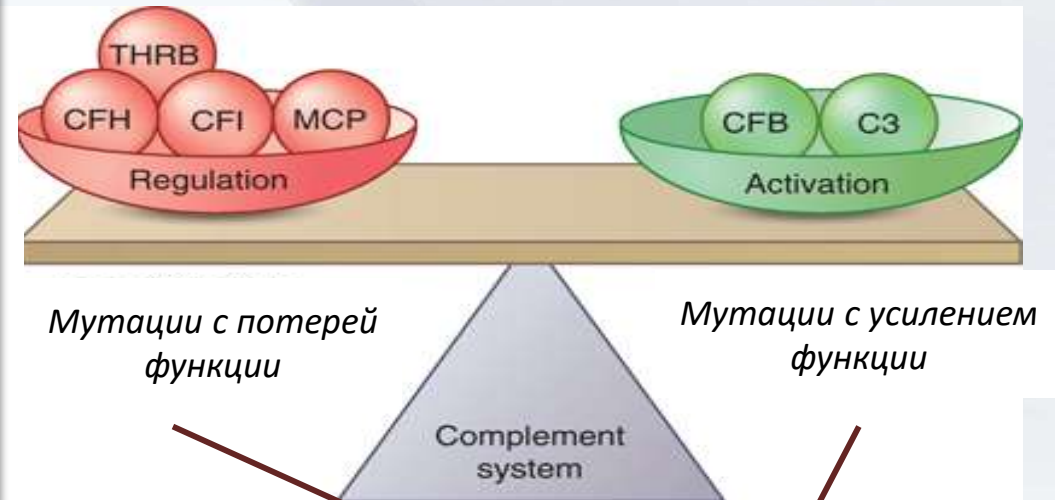
Деструкция
клеток
Воспаление
Тромбоз

Terminal

Генетические нарушения при атипичном гемолитико-уремическом синдроме

После инициации избыточная активация комплемента возможна только при нарушенной регуляции

- Мутации в генах регуляторных белков комплемента, приводя к количественному или, чаще, функциональному дефициту, нарушают их регулируемую роль в отношении альтернативного пути активации
- Мутации в генах C3 и фактора В усиливают активность комплемента

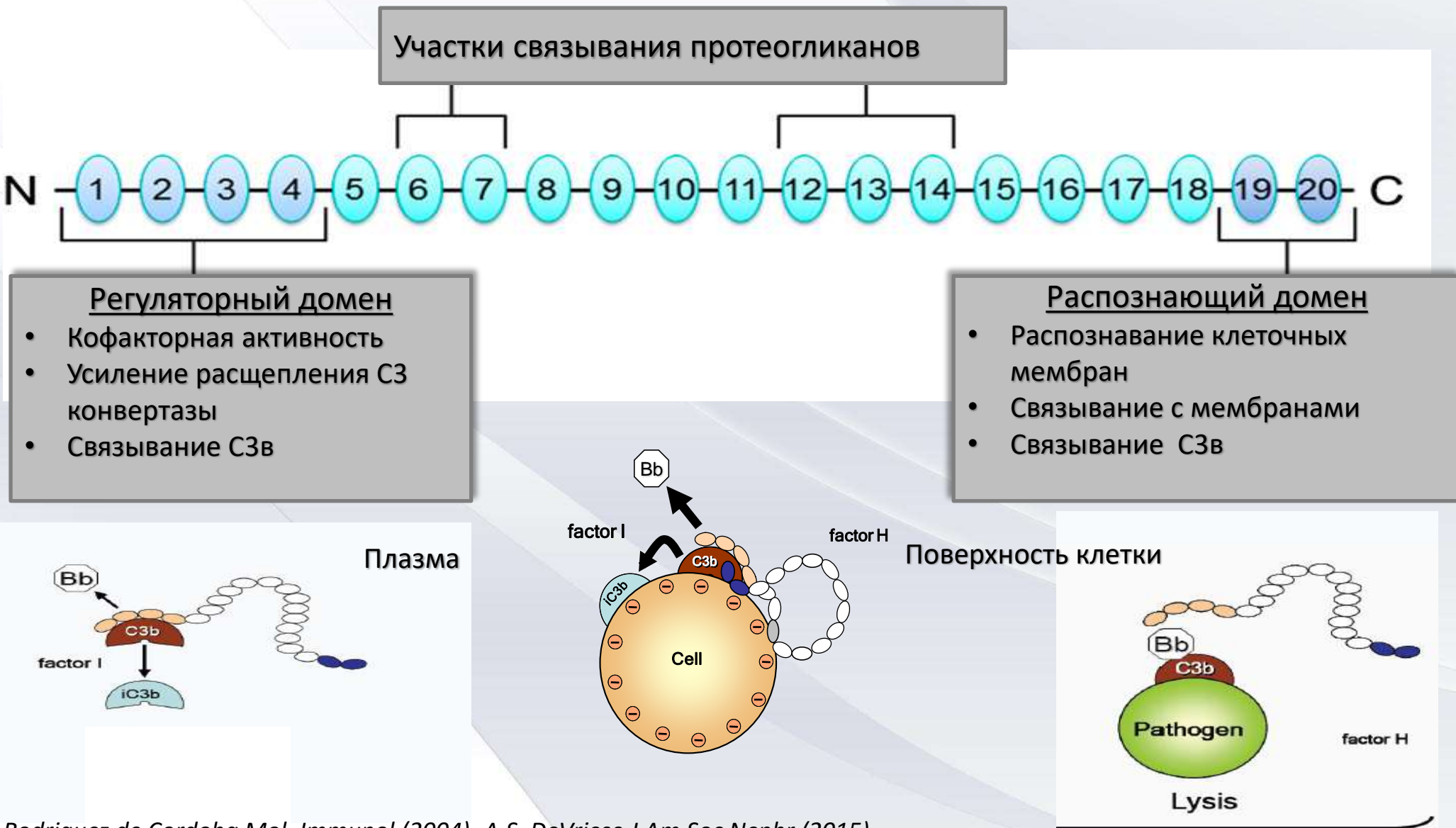


Мутации в генах компонента при а-ГУС

Идентифицированные генетические аномалии в регуляторных белках компонента при а-ГУСе

Ген	Измененный белок	Причина неконтролируемой Активации компонента	Частота (%)
Мутация не идентифицирована	Не идентифицирован	Не идентифицирована	30 - 50%
CFH	Фактор H	Нарушено связывание с эндотелием и, т.о., его защита, снижена инактивация C3b	20–30%
CFHR1/3	Фактор HR1, R3	Ассоциирована с появлением анти-CFH антител	6%
MCP (CD46)	Мембранный кофакторный протеин	Нарушена экспрессия на поверхности клеток, что снижает их защиту	6%
CFI	Фактор I	Не функционирует как основной кофактор для остальных ингибиторов компонента	4–10%
CFB	Фактор B	Приводит к стабилизации и активации C3 конвертазы	1–2%
C3	Комплемент C3	Резистентная к инактивации форма C3	5–10%
THBD	Тромбомодулин	Снижение инактивации C3b	5%

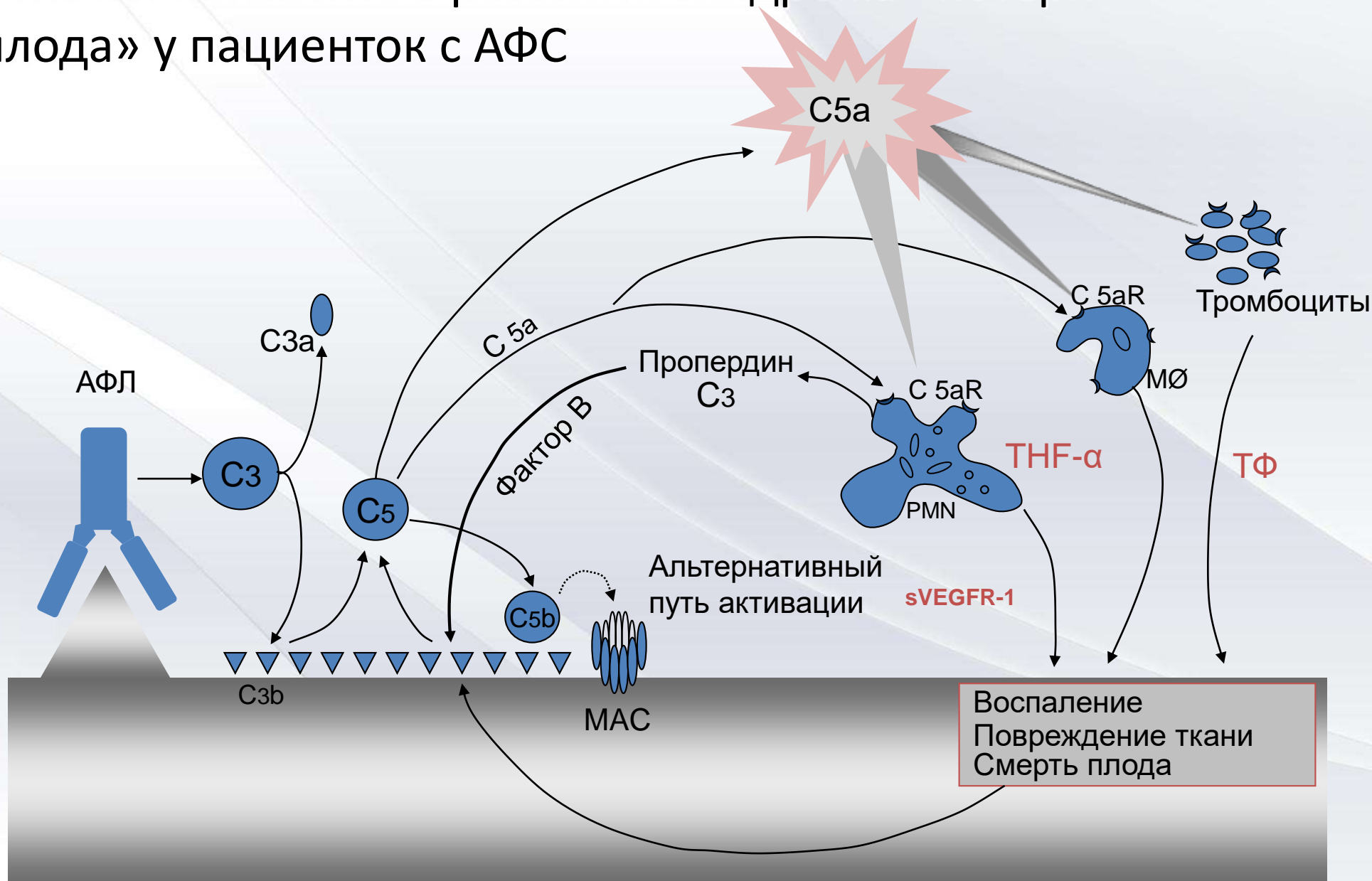
Роль фактора H в регуляции комплемента



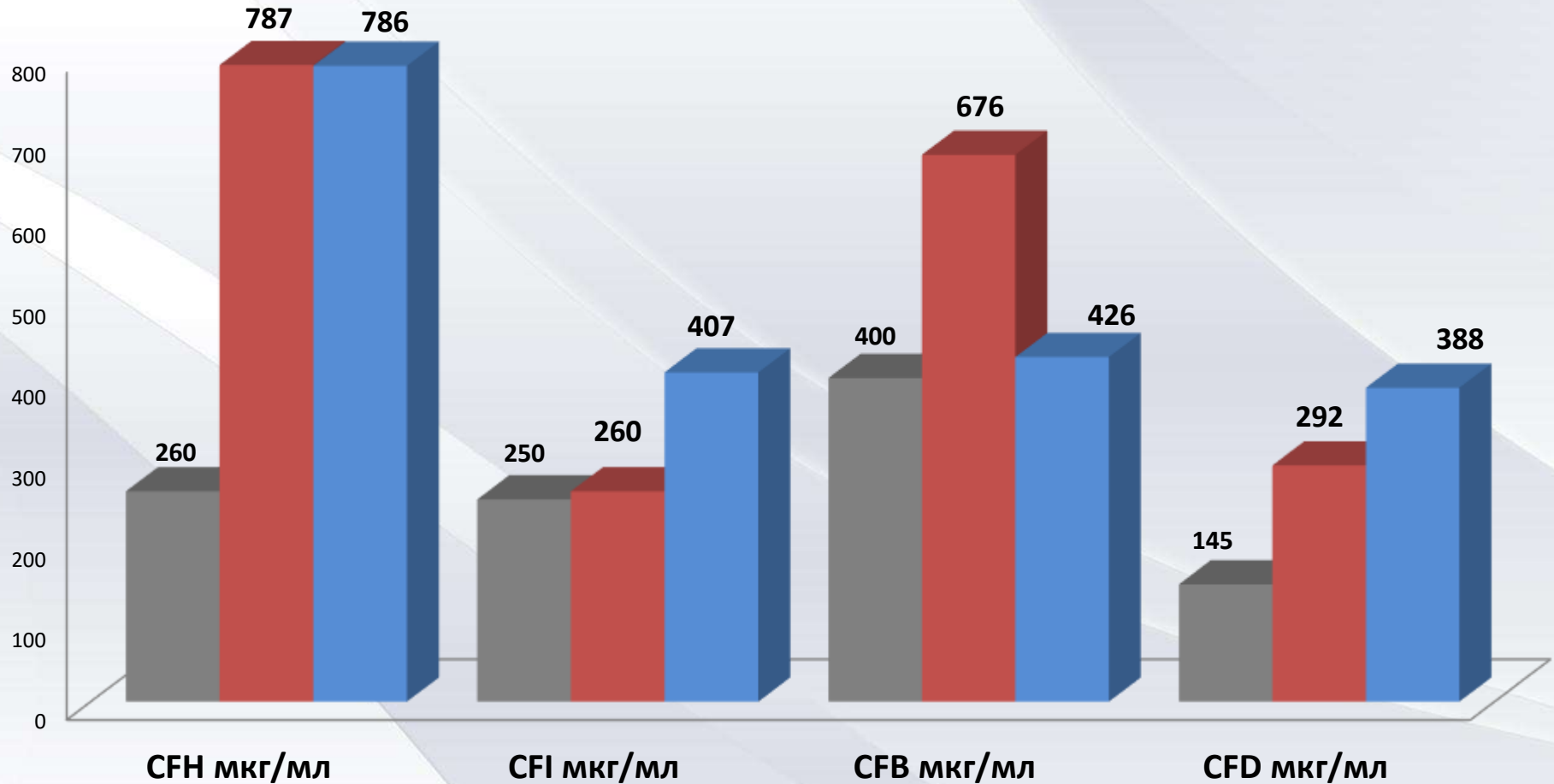
Виды исследования комплемента

- Определение содержания в крови компонентов комплемента (С3,С4, С3в, С5а, МАК) и белков-регуляторов комплемента (CFH, CFI, FB)
- Определение удельной активности факторов комплемента
- Определение антител: С3Nef, к компонентам С3 конвертазы, факторам H и B
- Определение экскреции с мочой компонентов комплемента и регуляторных протеинов
- Генетическое исследование системы комплемента: идентификация генетических вариантов регуляторных белков и компонентов комплемента (CFH, CFI, FB, С3, MCP, THBD, CFHR1-5, DGKE)
- Морфологические исследования : выявление депозитов комплемента в ткани почки

Роль комплемента в развитии синдрома «потери плода» у пациенток с АФС



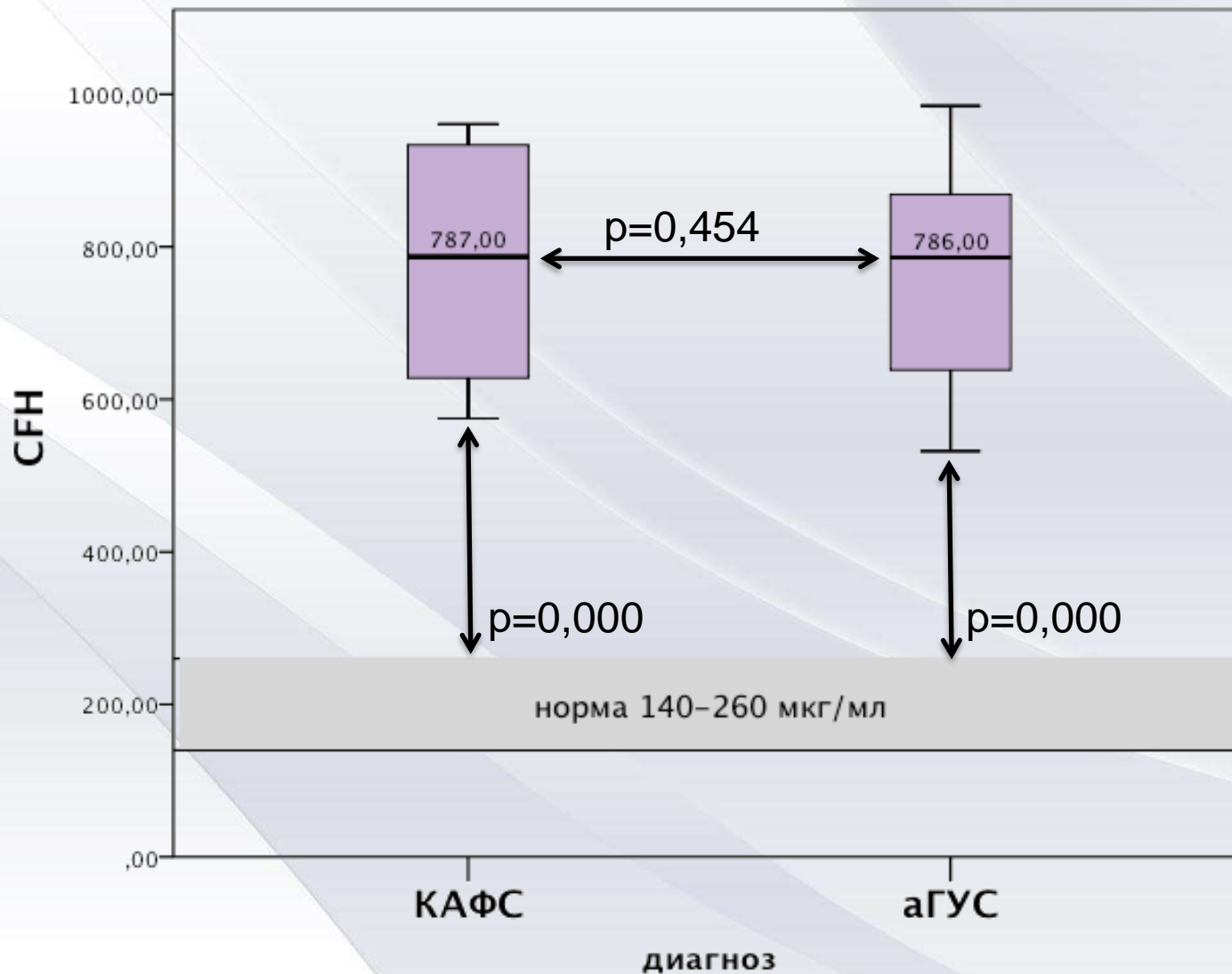
Концентрация факторов комплемента у больных с аГУС и КАФС в сравнении со здоровыми



■ здоровые ■ КАФС ■ аГУС

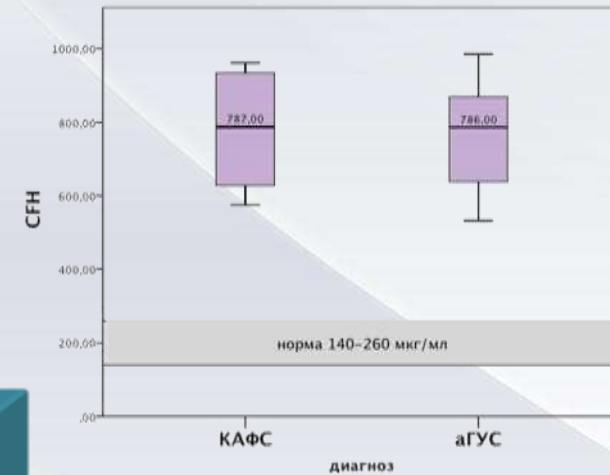
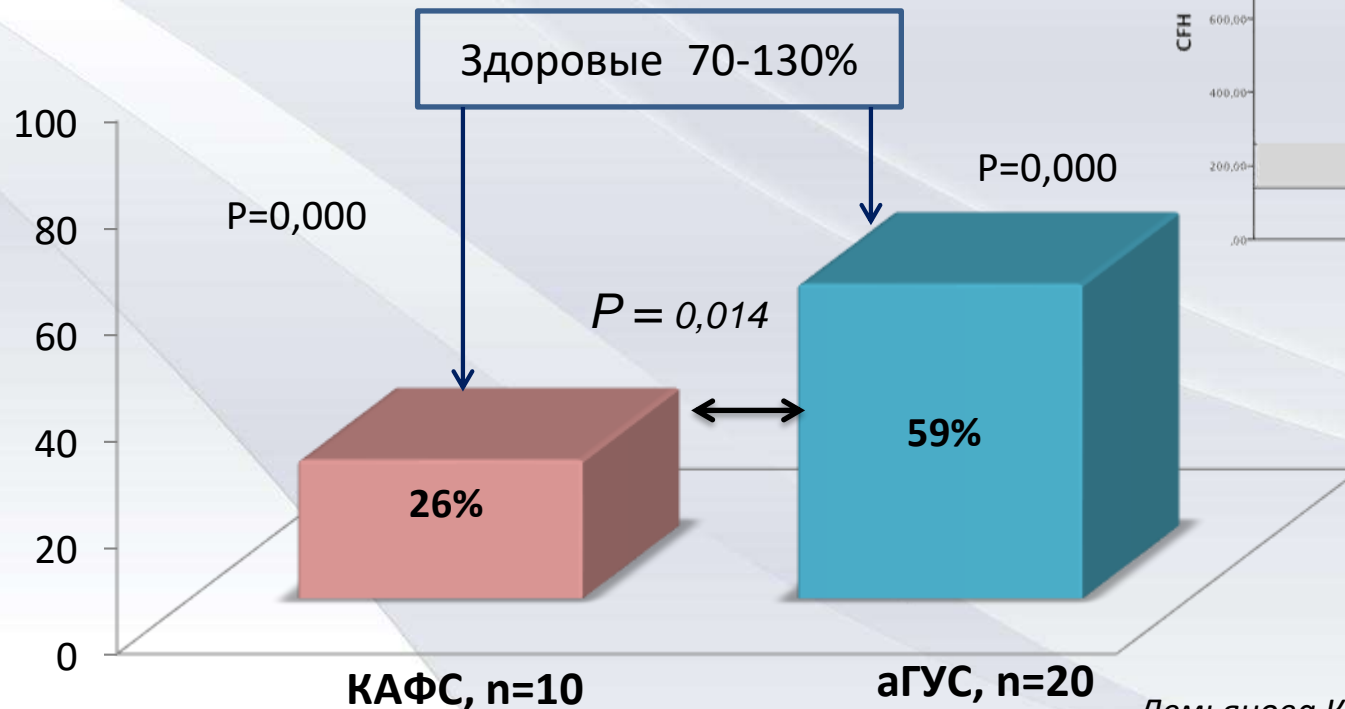
Демьянова К.А., Козловская Н.Л., 2016

Концентрация фактора Н(СФН), регулирующего активность АПК



Удельная активность фактора Н (%)

Оценивали количество фактора Н, связавшегося с С3b, считая, что только функционально активные молекулы фактора Н могут связываться с С3b. Количество связавшегося фактора определяли стандартной тест-системой (ELISA). Путем деления величины связавшегося фактора Н на количество свободного фактора Н получали значение удельной активности.



Результаты генетического анализа – в 5 случаях (25%) из 20 выявлены генетические варианты «нарушающие функцию», ассоциированные с аГУС

	пол	возраст	Органное поражение	Исход	Генетические варианты «affecting function»	Генетические варианты с неизвестным клиническим значением
№1	жен	43	почки, ЦНС, легкие, ЖКТ, глаза	ТПН	C3 с.3395 G>T гет	<i>CFHc.1419 G>A</i>
№2	жен	18	почки легкие	ТПН	CFHR5 с.1067 G>A гет	CFH с.184 G>A гет, CFH с.2016 A>G гет ADAMTS-13 с.2699 C>T гет
№3	жен	32	Почки, ПЭ печень, легкие, ЦНС	ХБП 3а АГ	CFHR5 с.1067 G>A гет CFH с.1548 T>A гет	CFH с.2016 A>G гомо CFHc.2808 G>T гомо THBDc.1418 C>T гет
№4	муж	19	Почки, ЦНС	ТПН, АТП	C3с.3856 G>A гет ADAMTS-13с.1016 C>G гет	CFHc.1204 C>T гомо CFHc.1419 G>A гомо ADAMTS-13 с.1342 C>G гомо ADAMTS-13 с.1852 C>G гет
№5	муж	34	Почки	ХБП 2 АГ	C3с.1210G>T гет MCPc.983 delA делеция MCPc.986 delC делеция	CFH с.2016 A>G гомо CFHc.2808 G>T гомо ADAMTS-13 с.1342 C>G гомо

ПЭ-преэклампсия, ЦНС-центральная нервная система, ТПН-терминальная почечная недостаточность, ХБП-хроническая болезнь почек, АТП- аллотрансплантация трупной почки, АГ –артериальная гипертензия, гет- гетерозигота, гомо-гомозигота

Демьянова К.А., 2018

У всех обследованных пациентов (n=20) выявлены генетические варианты генов системы комплемента с неопределенным клиническим значением- "variants of unknown significance" (VUS)

Наиболее часто встречающиеся VUS	количество пациентов, n (%)
ADAMTS-13 с.1342C>G	12 (60): 4-GG, 8-CG
CFHс.1419G>A	9 (45%): 3-AA,6-GA
CFHс.2016A>G	7 (35): 3-GG,4-AG
CFHс.2808G>T	7 (35): 3-ТТ,4-GT
CFH с.184G>A	5 (25):GA
C3с.304C>G	5 (25): CG
C3с.941C>T	4 (20): CT
ADAMTS-13 с.1852C>G	2(10): CG
CFHс.1204C>T	2 (10):CT

Количество VUS	Количество пациентов, n(%)
1	1 (5)
2	5 (25)
3	8 (40)
4	1 (5)
5	4 (20)
6	1 (5)

Генетические варианты VUS, обнаруженные в единичных случаях:

ADAMTS-13 с.19 C>T, ADAMTS-13с.2699C>T, DICERс.1091C>T, THBDс.1418C>T, THBDс.1502C>T, C5с1060C>A

Демьянова К.А., 2018

Взаимодействие мутаций в генах системы комплемента с факторами внешней среды при аГУС

мутации

- фактор Н (CFH)
- CFHR1
- фактор В (CFB)
- С3
- изолир. CFI
- комбинир. MCP
- положит. анти-CFH –антитела
- отр. анти-CFH –антитела
- изолир. MCP (CD46)



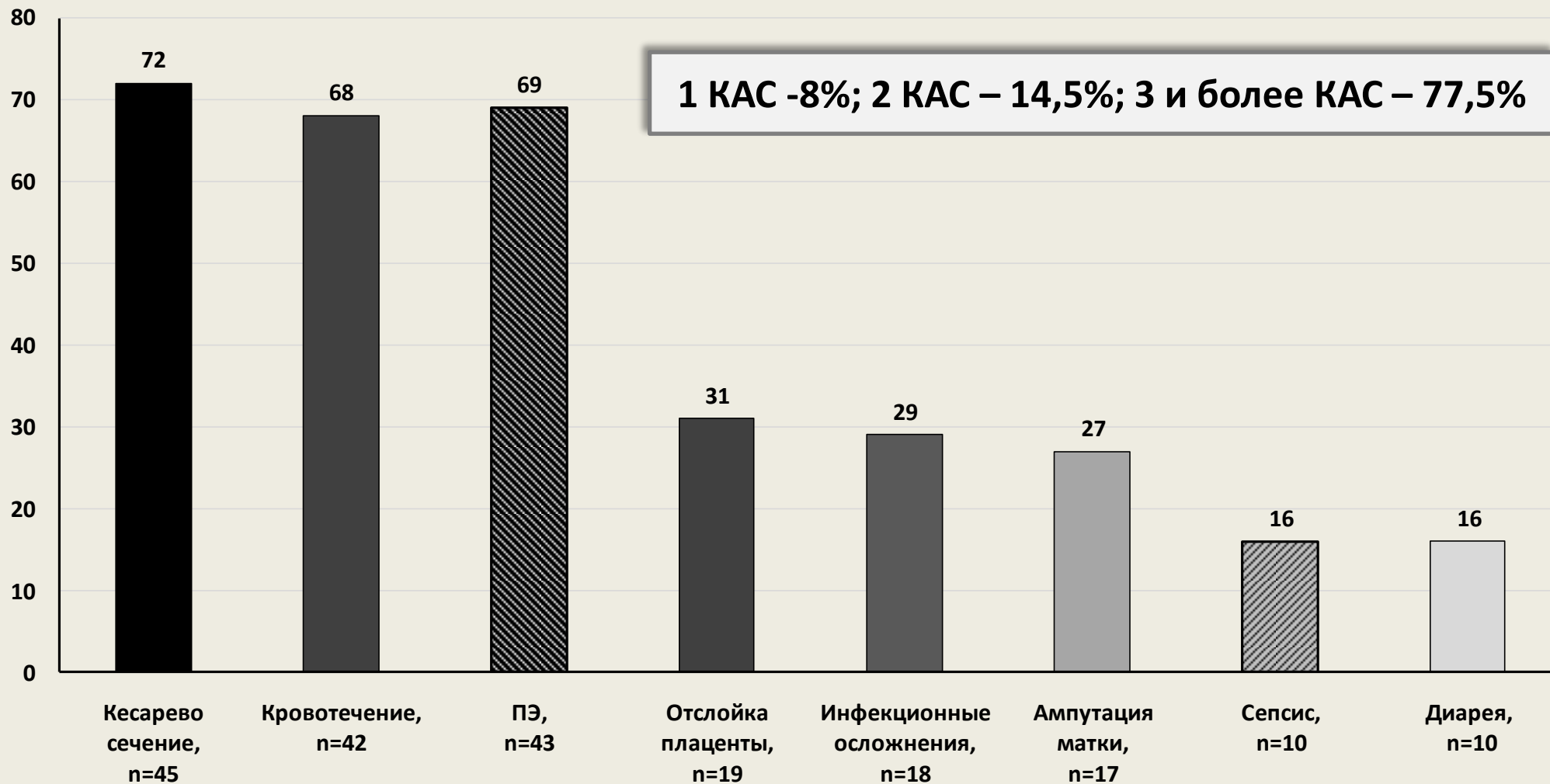
Комплемент-активирующие состояния

Дополнительные комплемент-активирующие состояния при акушерском аГУС



Дополнительные комплемент-активирующие состояния на заключительном этапе беременности (n=62)

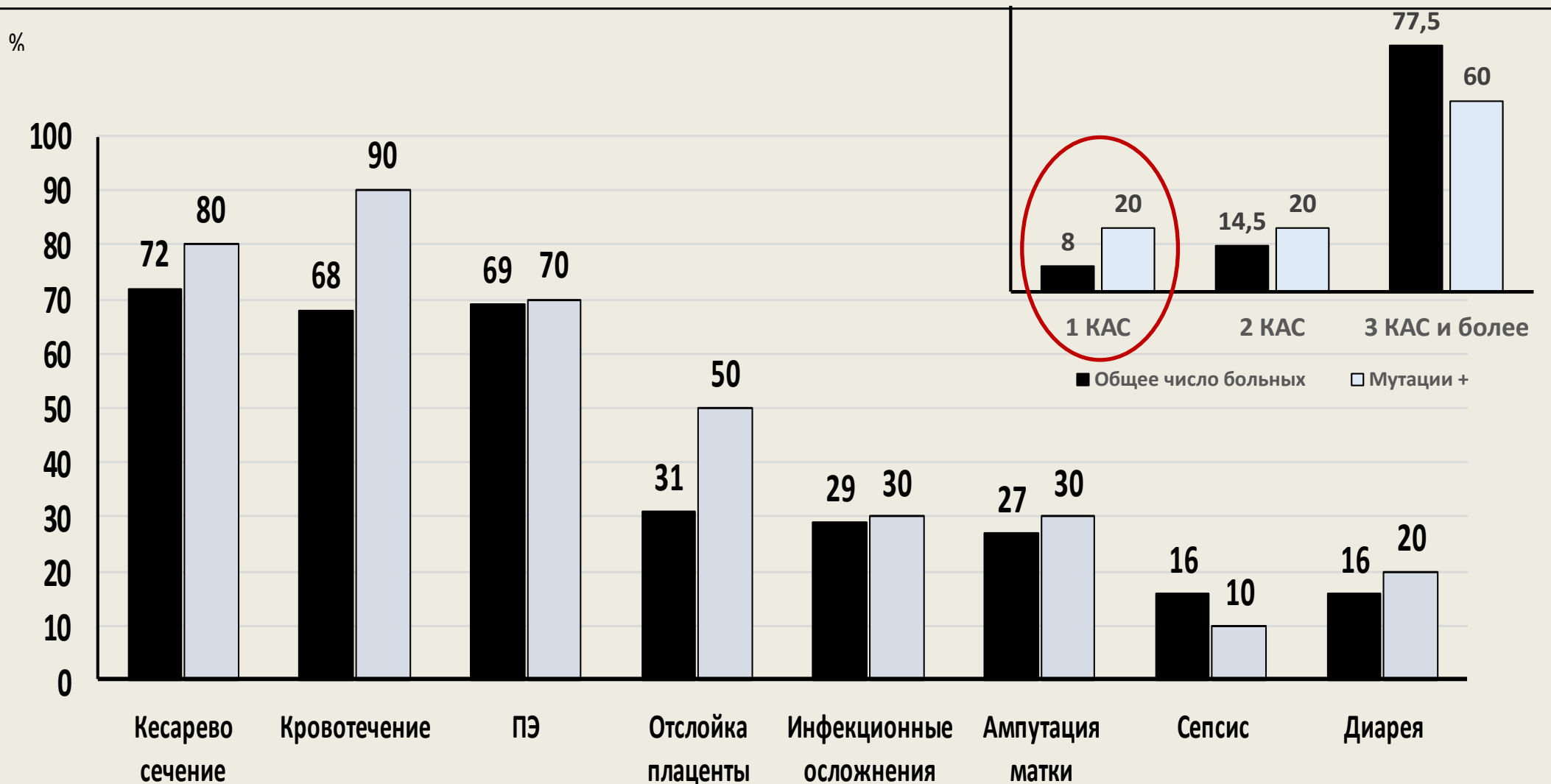
%



Генетический профиль у пациенток с акушерским аГУС (n=13)

	Мутации, нарушающие функцию (патогенные) 77%		Варианты генов системы гемостаза 100%	
	Вероятно патогенные	С неясным клиническим значением		
1	CFH c.1548T>A гет		CFH c.2016A>G гомо, CFH c.2808G>T гомо, THBD c.1418C>T гет, CFHR5 c.1067G>A гет,	
2			CFH c.2016A>G гомо, CFH c.2808G>T гомо, ADAMTS13 c.2699C>T гет	
3		C3 c.941C>T гет, C3 c.304C>G гет	CFH c.1419G>A гет	
4		C3 c.941C>T гет, C3 c.304C>G гет	CFH c.2016A>G гомо, ADAMTS13 c.1342C>G гет	
5	CFI c.719C>G гет		CFH c.1419G>A гет, CFH c.2016A>G гомо, CFH c.2808G>T гомо, CFH c.184G>A гет, ADAMTS13 c.1342C>G гет, THBD c.1418C>T гет,	
6			ADAMTS13 c.19C>T гет, ADAMTS13 c.1342C>G гомо, ADAMTS13 c.1852C>G гет	
7	THBD c.683C>T гет,		CFH c.1419G>A гет, , ADAMTS13 c.1342C>G гет	
8		C3 c.941C>T гет, C3 c.304C>G гет	CFH c.1419G>A гет, CFH c.2016A>G гет, ADAMTS13 c.19C>T гет	
9		C3 c.941C>T гет, C3 c.304C>G гет	CFH c.184G>A гет, CFH c.1419G>A гет, , ADAMTS13 c.1342C>G гет, THBD c.1418C>T гет	
10	CFH		CFH c.1204C>T, THBD c.1418C>T гет	
11			CFH c.184G>A гет, CFH c.1204C>T, CFH c.1419G>A гет, CFHR5 c485_486dupAA	
12	CFI c.1217G>A	C3 c.941C>T гет	ADAMTS13 c.2699C>T, ADAMTS13 c.1342C>G гет, ADAMTS13 c.19C>T гет, ADAMTS13 c.1852C>G гет	
13	C3g6718128G>A		CFH c.1204C>T, CFH c.2808G>T гет, THBD c.1418C>T гет, ADAMTS13 c.2699C>T гет	

Частота КАС у больных акушерским аГУС с неизвестным генетическим профилем и с патогенными мутациями системы комплемента



Патофизиология МПГН:

МПГН

Ig и C3 депозиты в капиллярной стенке и мезангии

Иммуноглобулин-позитивный, комплемент-позитивный МПГН

Циркулирующие иммуноглобулины или иммунные комплексы

Инфекции

Аутоиммунные заболевания

Моноклональные гаммапатии (диспротеинемии)

Отсутствие Ig депозитов, наличие C3 депозитов в капиллярной стенке и мезангии

Иммуноглобулин-негативный, комплемент-позитивный МПГН

Электронная микроскопия

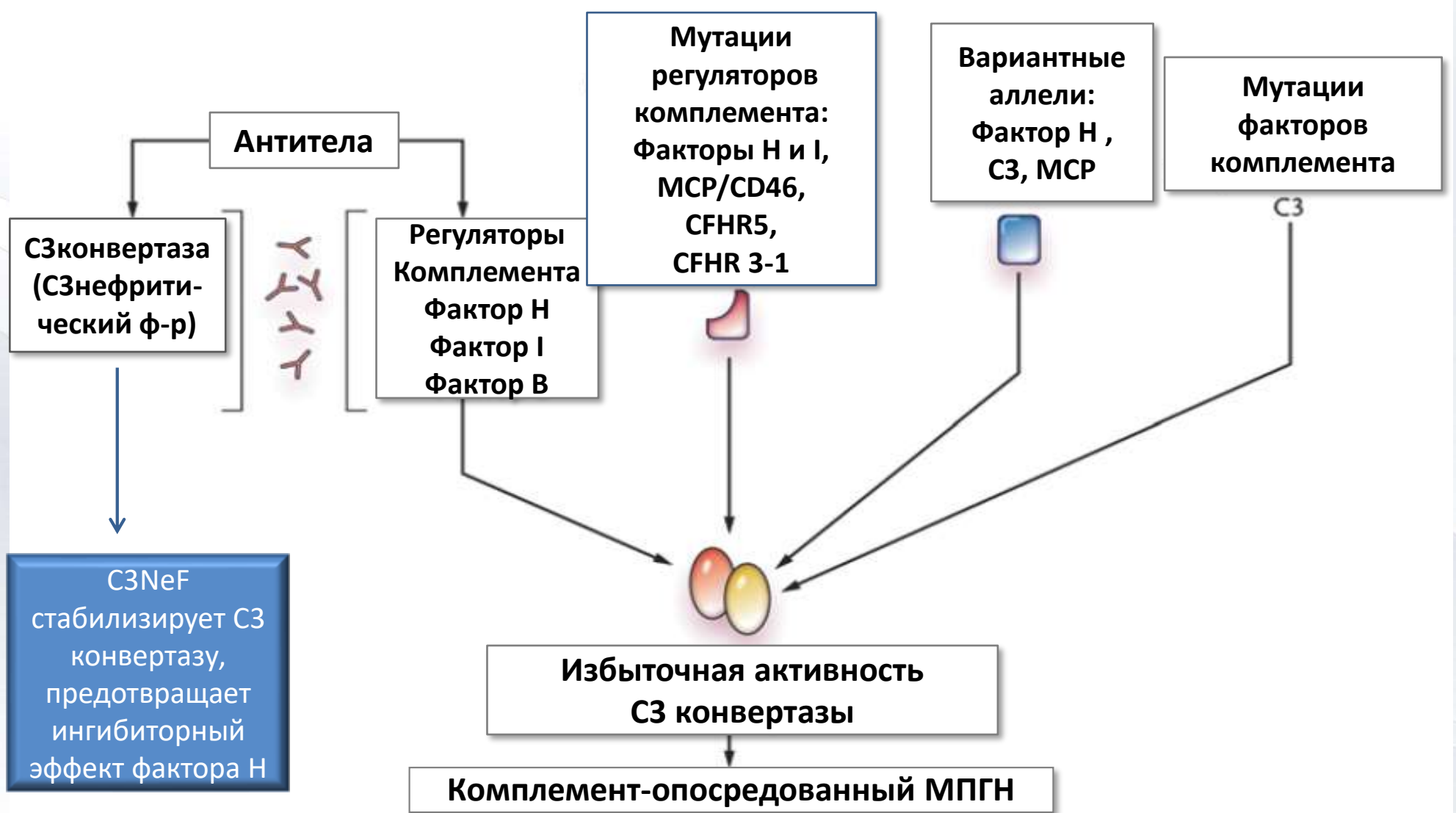
C3 ГН

DDD

Нарушение регуляции альтернативного пути комплемента

Наличие мутаций или антител к факторам или белкам-регуляторам системы комплемента

Приобретенные и наследственные аномалии комплемента, ассоциированные с развитием комплемент-опосредованного МПГН



Компоненты альтернативного и терминального путей комплемента в клубочках при болезни плотных депозитов (лазерная микродиссекция клубочков с последующей масс-спектрометрией)

Min Protein: 95.0% Min # Peptides: 2 Min Peptide: 90%

Display Options: Protein Identification Probability Req Mods: No Filter Search:

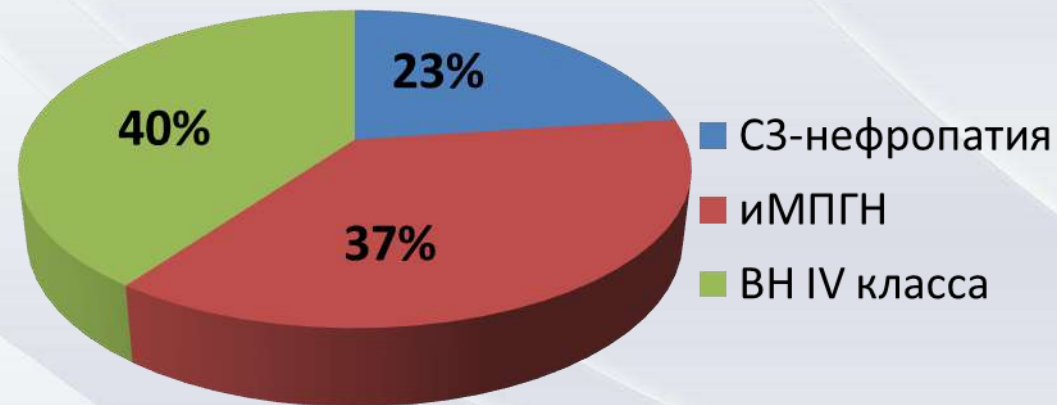
Probability Legend:

- over 95%
- 80% to 94%
- 50% to 79%
- 20% to 49%
- 0% to 19%

#	Visible?	Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (157)	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	Dense Deposit Disease								Normal Patient 1
							Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8	
1	✓	★	Complement C3 precursor [Contains: Complement C3 beta chain...	CO3_HUMAN	187 kDa		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%
2	✓	★	Vitronectin precursor - Homo sapiens (Human) (P04004)	VTNC_HUM...	54 kDa		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
3	✓	★	Complement component C9 precursor [Contains: Complement c...	CO9_HUMAN	63 kDa		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
4	✓	★	Apolipoprotein E precursor - Homo sapiens (Human) (P02649)	APOE_HUM...	36 kDa		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
5	✓	★	Complement C5 precursor [Contains: Complement C5 beta chain...	CO5_HUMAN	188 kDa		100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%		
6	✓	★	Complement factor H-related protein 1 precursor - Homo sapien...	FHR1_HUM...	38 kDa	★	99%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
7	✓	★	Clusterin precursor - Homo sapiens (Human) (P10909)	CLUS_HUM...	52 kDa		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
8	✓	★	Complement component C6 precursor - Homo sapiens (Human) ...	CO6_HUMAN	105 kDa	★	97%	98%		98%	57%	90%	99%	87%	
9	✓	★	Complement component C8 alpha chain precursor - Homo sapie...	CO8A_HUM...	65 kDa		90%	99%	79%	100%	33%		98%	90%	
10	✓	★	Complement C4-A precursor - Homo sapiens (Human) (P0COL4)	CO4A_HUM...	193 kDa		58%	28%		99%		40%	99%	99%	
11	✓	★	Complement component C8 beta chain precursor - Homo sapien...	CO8B_HUM...	67 kDa		99%	99%		90%	80%	90%	90%	90%	
12	✓	★	Complement component C8 gamma chain precursor - Homo sapi...	CO8G_HUM...	22 kDa		90%	99%				97%	94%	90%	

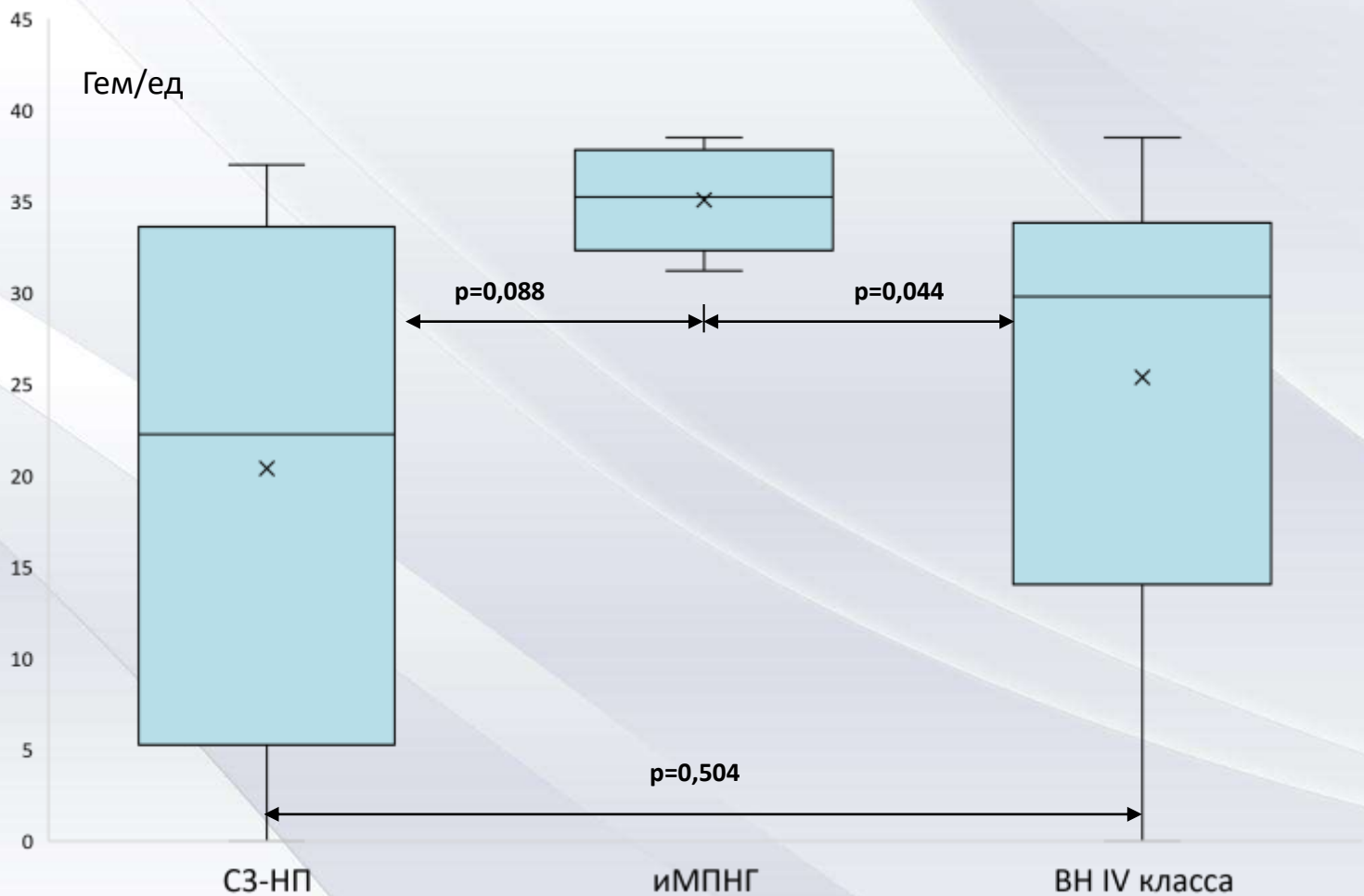
Исследование системы комплемента при различных вариантах МПГН

Цель: исследовать изменения в системе комплемента при С3-нефропатии, идиопатическом варианте МПГН и волчаночном нефрите



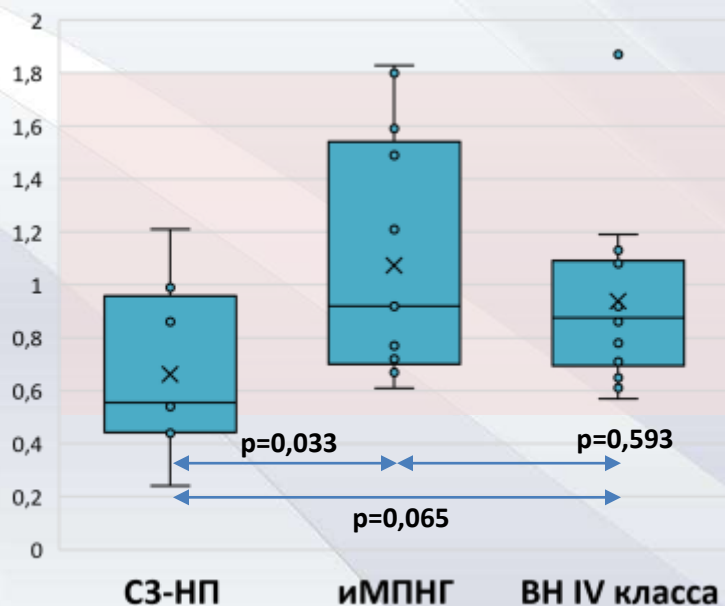
Нозология	М:Ж	Возраст
С3-нефропатия, n=8	2/6 (33/67%)	29,6±15,7
Идиопатический МПГН, n=13	8/5 (62/38%)	38,3±15,9
ВН IV класса, n=14	1/13 (7/93%)	32,5±9,2

Общая гемолитическая активность компонента (СН50) при различных вариантах МПГН

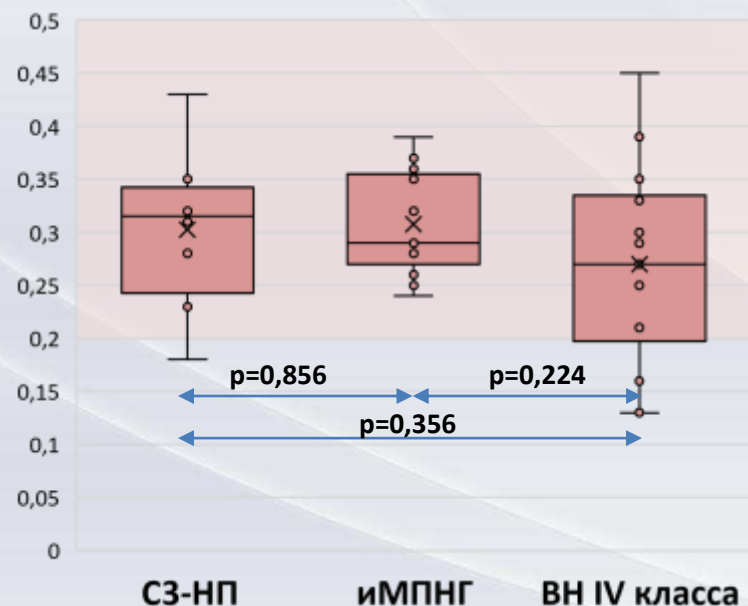


Средние значения С3 и С4 компонентов комплемента при различных вариантах МПГН

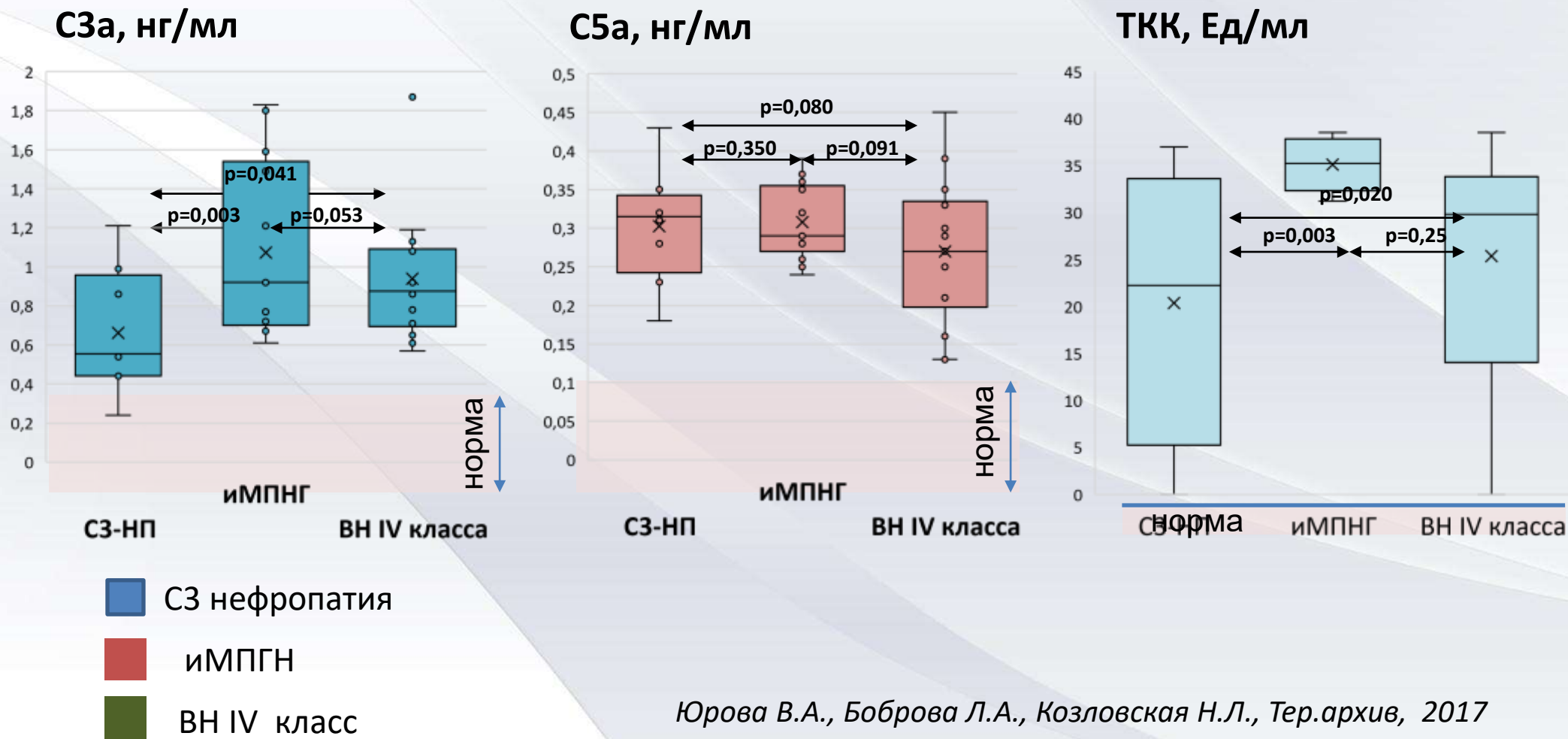
С3 компонент комплемента (норма 0,5-1,8 мг/мл)



С4 компонент комплемента (норма 0,2-0,5 мг/мл)



Средняя величина С3а, С5а компонентов и терминального комплекса комплемента (ТКК) в сыворотке крови больных различными вариантами МПГН



aГУС часто развивается у пациентов с коморбидными состояниями

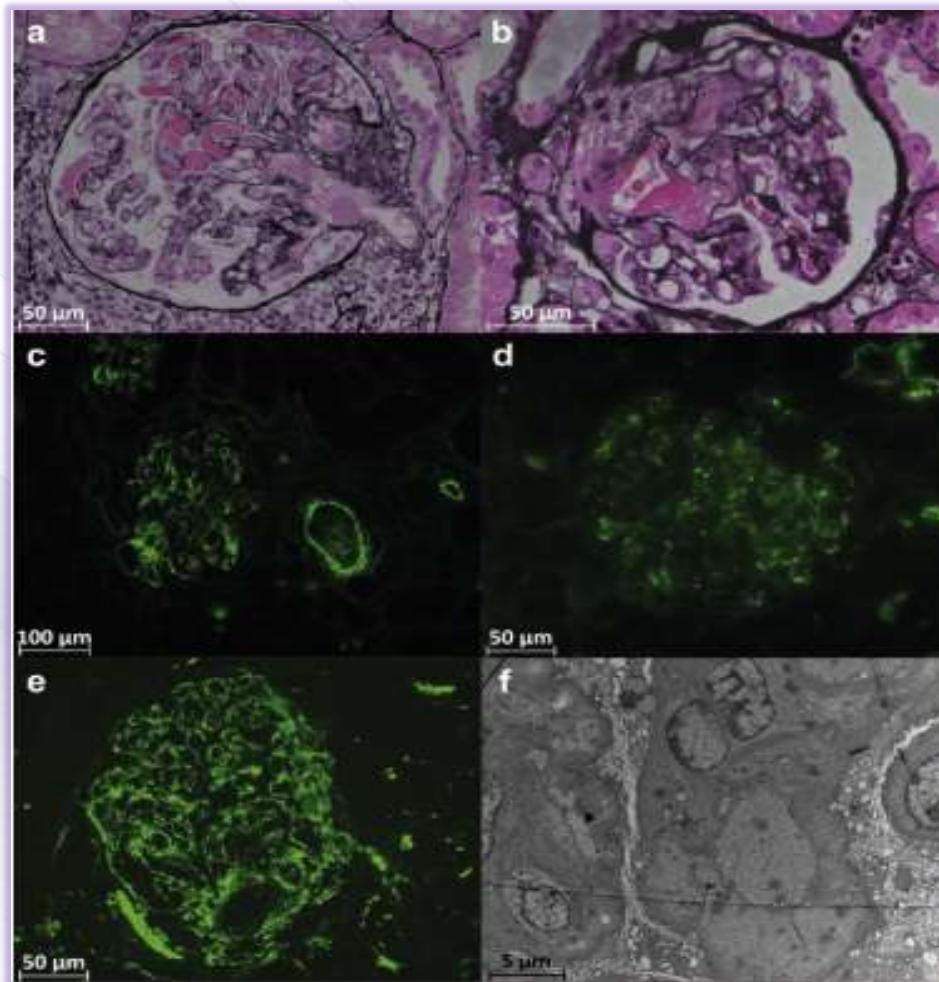
- 25% (47/191) of patients with aHUS and no known affected family member have coexisting diseases
- Complement mutations identifiable in only 27% of aHUS patients

Comorbid diseases	aHUS Patients With Comorbid Disease, n (%)	aHUS Patient With No Identified Mutation and Comorbid Disease, n	aHUS Patient With Identified Mutation and Comorbid Disease, n
Malignancy and chemotherapy	1 (2%)	1	0
Malignant hypertension	14 (30%)	12	2
Posttransplant HUS and calcineurin inhibitors	11 (23%)	8	3
Pregnancy-related HUS	10 (21%)	7	3
Systemic disease	3 (6%)		
- Scleroderma		2	1
- SLE			
Glomerulopathy	8 (17%)	4	4
Total	47 (100%)	34	13

SLE = systemic lupus erythematosus.

Noris M, et al. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5:1844-1859.^[18]

Тромбоз капилляров клубочков и депозиты C5b-9 и C3c в стенке гломерулярных капилляров у пациентов с ЗАГ и почечной ТМА



Фибриновые микротромбы (a) (b) C4d (c), (d) C3c, (e) депозиты C5b-9, вдоль стенки капилляров клубочка (f)

- В исследование включены 9 пациентов с злокачественной артериальной гипертонией (ЗАГ)
- Критерий включения – гистологическая картина ТМА в биоптате почки
- Выраженные гематологические признаки ТМА отсутствовали у 8 из 9 пациентов
- У всех больных выявлены депозиты C3c и C5b-9 в стенках капилляров клубочков и внегломерулярных сосудов
- Уровень C5b-9 в плазме крови оказался повышенным у всех пациентов
- Мутации в генах комплемента обнаружены у 6 больных
- Терминальной почечной недостаточности достигли 8 из 9 пациентов
- 4 была произведена трансплантация почки, во всех случаях отмечен рецидив ТМА

Несмотря на отсутствие выраженных гематологических проявлений ТМА, у 67% пациентов обнаружены генетические дефекты, связанные с нарушенной регуляцией комплемента

Исходные клинические характеристики пациентов с ЗАГ и ренальной ТМА

Пациент	Возраст, годы	Пол	АД, мм. рт. ст.	СКр, мкмоль/л	ТПН	Нв, ммоль/л	ЛДГ, ЕД/л	МАГА ^a	Тромбоциты, x 10 ⁹ /л ^b
1	38,4	Ж	184/140	1730	Да	5,1	1800	Да	224
2	40,3	М	205/114	1195	Да	5,7	1104	Да	158
3	37,7	М	200/120	586	Да	5,3	2125	Да	100
4	32,0	Ж	180/120	1138	Да	5,9	1486	Да	142
5	65,0	М	195/105	162	Нет	7,9	271	Нет	98
6	41,1	Ж	180/120	334	Да	7,5	291	Нет	285
7	28,5	Ж	224/122	1065	Да	5,1	298	Нет	228
8	27,9	М	240/150	673	Да	7,9	165	Нет	133
9	44,0	Ж	220/120	649	Да	8,2	339	Нет	340

- Нарушения в системе комплемента включали мутации в генах:

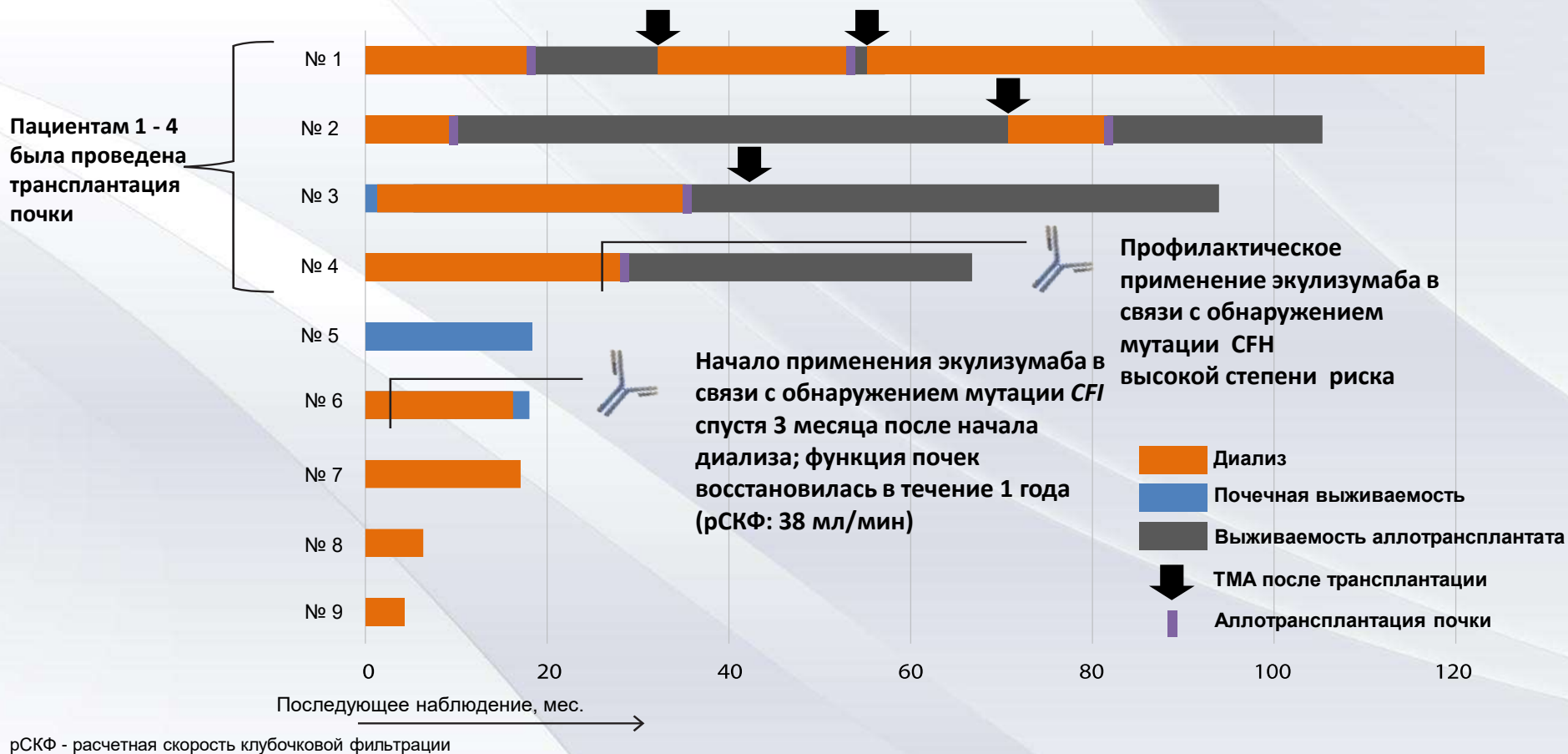
 C3
  CFH
  CD46
  CFI

- Выраженные гематологические проявления ТМА отсутствовали у всех пациентов, кроме пациента 3

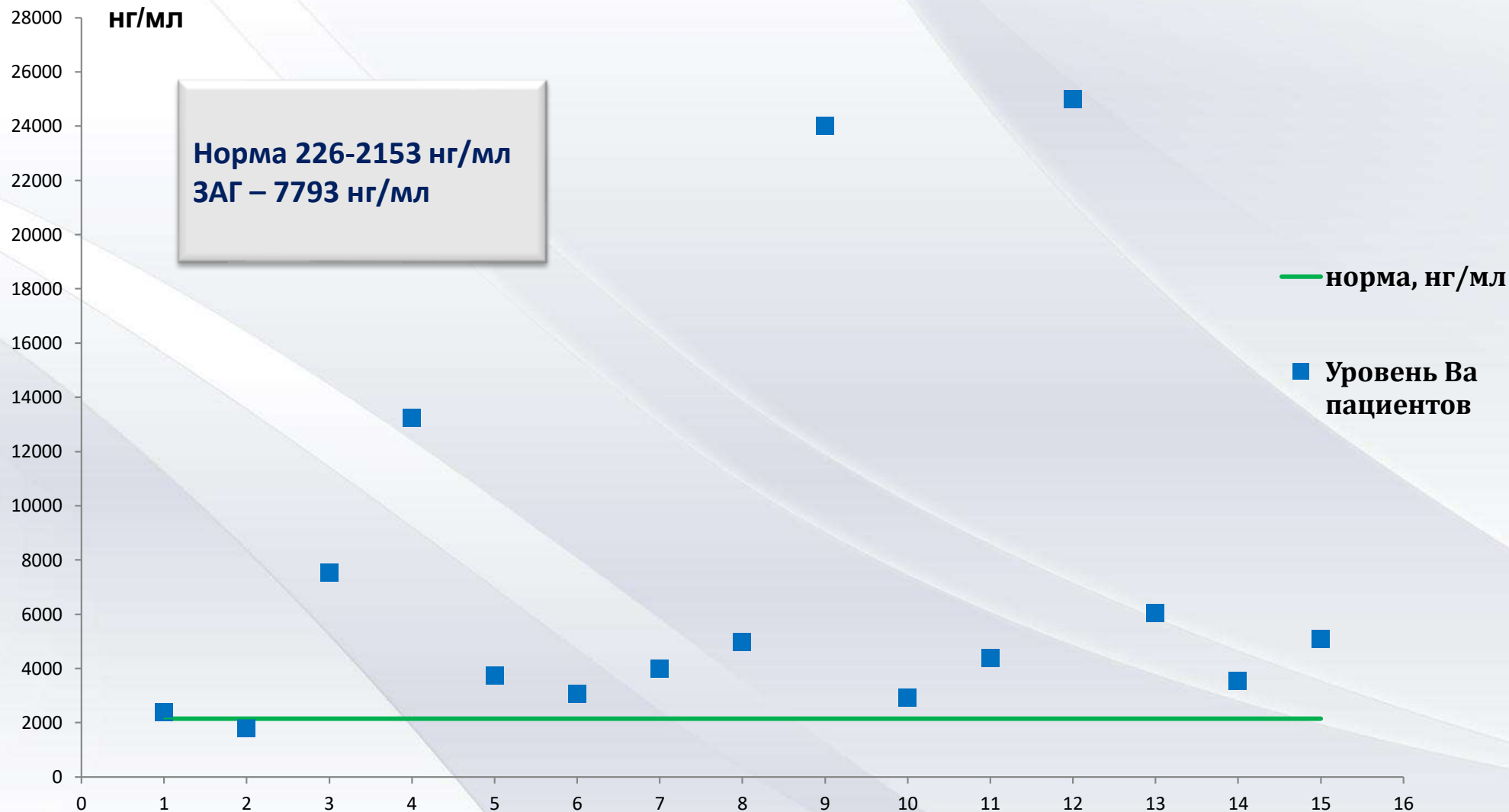
Timmermans SA, et al. [Published online February 7, 2017]. *Kidney Int.* doi:10.1016/j.kint.2016.12.009.

Почечный исход при ТМА, ассоциированной с ЗАГ

Несмотря на агрессивную терапию артериальной гипертензии и нормализацию уровня АД, у 8 из 9 пациентов развилась ТПН



Показатели Ва компонента комплемента плазмы у больных с ЗАГ и ТМА (n=15)

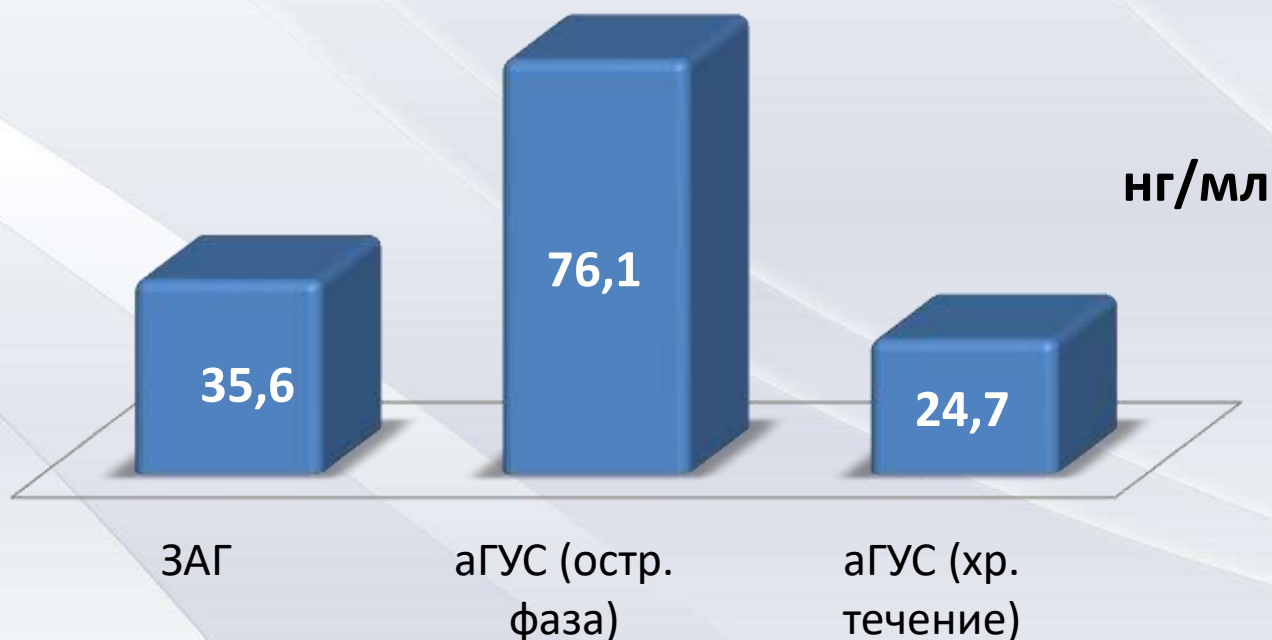


n-15

Акаева М.И., Козловская Н.Л. 2016

Содержание мембраноатакующего комплекса (C5b-9) при ЗАГ и аГУС

N=15



Частота генетических аномалий в системе комплемента , ассоциированных с аГУС, у пациентов с ЗАГ (n=16)

Ген	Вариант	Патогенность по ACMG	%/число больных	Частота в популяции, %
<i>C3</i>	c.2203C>T	Вероятно патогенная	20 (1)	0.21
<i>CFI</i>	c.1217G>A c.772G>A	Вероятно патогенная	40 (2)	0 - 1.59 0.01- 0.01
<i>CFHR4</i>	c.766G>A	Вероятно патогенная	20 (1)	0.32 - 0.32
<i>CFHR5</i>	c.136C>T	Вероятно патогенная	20 (1)	0.65 – 1,0

Мутации в генах комплемента обнаружены у 5 пациентов (31,3%)

Заключение

- Активация альтернативного пути комплемента – важный компонент патогенеза различных заболеваний
- Развитие ТМА у больных без идентифицированных мутаций в генах комплемента может быть обусловлено комплексом генетических вариантов с неизвестным клиническим значением
- Мощный триггер или сочетание триггеров способны вызвать неконтролируемую активацию комплемента при наличии у пациента множественных генетических вариантов с неизвестным клиническим значением, несмотря на отсутствие генетического дефекта, прочно ассоциированного с развитием аГУС
- Понятие «комплемент-опосредованная ТМА» шире понятия «атипичный ГУС» и включает, помимо последнего, ряд заболеваний и состояний, не ассоциированных напрямую с определенной генетической аномалией системы комплемента
- Внедрение этого понятия позволит расширить область применения комплемент-блокирующих препаратов



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!