

Fagositer ve Kompleman Sistemin Değerlendirilmesinde Pratik Yaklaşımlar

H. Barbaros Oral

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İmmünoloji Bilim Dalı, Doç.Dr.

Doğal immün sistem evrim sırasında edinsel immün sistemden önce ortaya çıkmıştır ve doğal immün sistem hemen hemen tüm çok hücreli organizmalarda mevcuttur (1).

Doğal immün sistem deri ve mukozal örtün epitel tabakası, dolaşım ve dokulardaki hücreler ve çeşitli serum proteinlerinden oluşur. Bu elemanlar mikropların girişini engellemek veya konağa girmiş olan mikropları ortadan kaldırmak için farklı fakat birbirlerini tamamlayıcı roller oynarlar.

Patojen bir mikroorganizma epitelyum tabakasını geçip subepitelyal dokuya girdiğinde o bölgedeki makrofajlar mikrobu tanıyıp TNF ve IL-1 gibi sitokinleri üreterek yanıt verirler. Bu sitokinler enfeksiyon bölgesindeki küçük damar endotelleri tarafından E-selektin ve P-selektin adı verilen adezyon moleküllerinin hızla eksprese edilmesine yol açar. Dolaşımdaki nötrofiller ve monositler yüzeylerindeki karbohidrat molekülleri ile bu adezyon moleküllerine gevşek olarak bağlanırlar. Zaman zaman kan akımına karşı koyamayan bu hücreler damar lümeninde endotel tabakası üzerinde yuvarlanmaya başlar. Bu arada, mikropla karşılaşan doku makrofajları ve makrofajdan sentezlenen IL-1 ve TNF'ye yanıt olarak endotel hücreleri kemokin adı verilen sitokin-benzeri molekülleri üretirler. Kemokinler endotel hücrelerinin yüzeyindeki heparan sülfat glikozaminoglikanlara bağlanır ve enfeksiyon bölgesine yakın alanda yüksek lokal konsantrasyonda bulunur (2). Bu kemokinler selektinler aracılığıyla komşu endotel hücrelerine gevşek olarak bağlı lökositlere etki eder ve lökosit integrinlerin ligandlarına olan afinitesini artırır. Ardından (yaklaşık 6-12 saat sonra) endotel hücre yüzeyinde lökosit integrinleri için ligandlar olan hücrelerarası adezyon molekülü-1 (Intercellular adhesion molecule-1; ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (Vascular cell adhesion molecule-1; VCAM-1) endotel yüzeyinde belirir. Bunlar sırasıyla lökosit yüzeyindeki integrinler olan lökosit fonksiyon antijen-1 (leucocyte function antigen-1; LFA-1) ve çok geç antijen-4 (Very late antigen-4; VLA-4) etkileşerek daha stabil bir bağlanmaya aracılık eder (1,2). Stabil adezyonu, lökositlerin endotelial boşluklardan ekstravasküler dokuya migrasyon izler. Kemokinler ayrıca lökositlerin motilitesini de uyarır. Sonuçta, lökositler damar duvarından geçerek enfeksiyon bölgesindeki yüksek konsantrasyonda kemokinleri içeren bölgeye doğru göç ederler. Vasküler dilatasyon ve artmış vasküler geçirgenlik ile ilişkili olarak lökositlerin enfeksiyon bölgesindeki birikimine enflamasyon adı verilir (3). İntegrinlerde ve selektin ligandlarında kalıtsal defektleri enfeksiyon bölgesinde lökositlerin birikiminde eksikliğe ve enfeksiyonlara duyarlılığın artmasına neden olur. Bu bozukluklara Lökosit adezyon eksiklikleri (Leucocyte Adhesion Deficiencies; LAD) denir.

Fagositoz mikroorganizmaların hücre içine alınmasından sorumlu sitoskeletona bağımlı bir olaydır. Nötrofil ve makrofajların yüzey reseptörleri fagositozda 3 önemli rol oynar: 1) Mikrobu fagosit membranına bağlarlar. 2) Rho ve Rab ailesi G proteinlerinin aracılık ettiği aktive edici sinyalleri iletirler. Fagosit membranı bu sinyallerle yeniden şekillenir. Fagosit plazma membranını partikül çevresine uzatır ve çevreler "zipping up". Daha sonra mikrop fagozom adı verilen membran-bağılı bir vezikül içerisinde hapis edilir. 3) Aynı reseptörler fagozom ile lizozomun füzyonu (fagolizozom oluşumu) ve fagolizozomdaki çeşitli enzimlerin aktivasyonunda rol oynayarak fagositlerin mikrobisidal aktivitesini başlatırlar.

Bu enzimlerden biri aktive fagositlerde plazma membranında ve fagolizozomal membranda yapılan fagosit oksidaz'dır. Fagosit oksidaz moleküler oksijeni NADPH'in indirgenmiş formu aracılığıyla süperoksit anyon, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi fagosite edilmiş mikroorganizmalara karşı toksik etki gösteren reaktif oksijen metabolitlerine (ROM) indirger (1). Çocukluk çağı kronik granümatöz hastalıkları fagosit oksidaz komponentlerinden birindeki kalıtsal yetmezliğe bağlı olarak gelişir. Bu yetmezlik nötrofillerin Gram (+) bakteri öldürme kapasitesini bozar. Bu proteinin kısmı ya da tam yetersizliği olan kişiler basit bakteriyel enfeksiyonları doğal immünite ile kontrol edemezler ve mikrobu elimine edebilmesinden önce adaptif immün yanıtı inşa etmesi gerekir. Sonuçta, T hücreleri ve aktive makrofajların birikimi (granülom) ile enfeksiyon kontrol edilmeye çalışılır (2). Makrofajlarda ikinci bir serbest radikal sistem daha mevcuttur. Bu indüklenebilir nitrik oksid sentazdır (iNOS). iNOS istirahat halindeki makrofajlarda yapısal olarak bulunmayan fakat LPS ve IFN- γ 'ya yanıt olarak oluşturulan sitozolik bir enzimdir. Arjinin'in sitrülün'e dönüşmesine ve böylece difüze NO gaz salınımına sebep olur. Makrofaj derive NO asidik fagozomda hidrojen peroksit veya süperoksit radikal ile etkileşerek oldukça toksik peroksinitrit radikallerin yapılmasına sebep olur. Böylece iNOS ve fagosit oksidaz sistemi ortak hareket ederek mikropların öldürülmesinde etkin roller oynarlar (1,2). Bir diğer enzim grubu ise mikrobiyel proteinlerin yıkımına sebep olan lizozomal proteazlardır. Nötrofil ve makrofajlar güçlü bir şekilde aktive edildiğinde ROM, NO ve lizozomal enzimler mikropların yanısıra normal konak dokusunu da hasarlayabilir. Bunlardan biri olan nötrofil elastaz doku hasarının önemli bir sebebidir. α 1-antitripsin gibi plazma proteinleri nötrofil elastaz aktivitesini inhibe eder. α 1-antitripsin genetik defektleri karaciğer ve akciğerde ilerleyici nötrofil-aracılı hasara ve sonuçta siroz ve amfizem'e yol açar (2).

Fagositik İşlevlerin Laboratuvar Değerlendirmesi

Fagositik işlevlerin değerlendirilmesinde genellikle nötrofillerin üzerinde odaklanılmıştır, çünkü bu hücreler monosit veya makrofajlara göre hem daha kolay hem de daha çok miktarda (özellikle işlevsel testlerin yapılabilmesi için) izole edilebilmektedirler.

Nötrofillerin fagositik işlevlerinin baskılanması, ya sayılarındaki azalmaya ya da işlevlerindeki bozukluklara bağlı olabilir. Nötrofillerin fagositik işlevlerini değerlendirilmede kullanılan laboratuvar testlerin başlıcaları şunlardır (4):

a) Nötrofil sayısı: En basit en temel fakat bir o kadar da önemli testlerden birisidir. Çünkü fagositik bozuklukların çoğu fagositik iş-

levlerin primer konjenital bozukluklarından ziyade nötropeniye bağlı olarak gelişmektedir. Kural olarak nötrofil sayısının 1000 mm³'ün altına düşmesi artmış enfeksiyon riskini gösterirken, bu sayı eğer 200 mm³'ün altına düştüğünde hastalar daima enfektedir.

b) Aderans: Aktive fagositik hücrelerin endotel yüzeyine olan artmış aderansı C5a'nın kemotaktik olmayan formu ile uyarılan nötrofillerin agregasyonu ve aderansını direkt olarak ölçen özel testler mevcut olmasına rağmen, adezyona aracılık eden CD11/CD18 kompleksinin farklı komponentlerinin ekspresyonuna akım sitometrisi ile bakılarak değerlendirilmesi indirekt fakat oldukça pratik bir yöntemdir.

c) Kemotaksis ve Migrasyon: Fagositlerin kemotaktik uyarılara doğru göçü sıklıkla Boyden kamarası adı verilen sistemlerde in vitro olarak değerlendirilir. Bunun yanı sıra Rebeck'un deri penceresi tekniği (Rebeck's skin window technique) gibi in vivo metodlar bulunmasına karşın rutin olarak kullanılmamaktadır.

- **Boyden kamarası kemotaksis testi:** Boyden kamarası nötrofillerin bir taraftan diğerine pasif geçişine izin vermeyecek kasar dar ancak bunların aktif geçişine izin verecek kadar geniş porlara sahip bir membran ile ayrılmış 2 bölmeden oluşur. Üst bölme hücreler, alt bölme ise bu hücrelerin hareketini uyararak kemotaktik faktörler (C5a veya terapeptit-f-met-leu-phe.. v.b.) konur. Membranın alt kısma bakan yüzeyinde bulunan veya membrandan alt bölmeye geçen nötrofillerin sayıları çeşitli yöntemlerle saptanarak bunların kemotaksis kapasiteleri ölçülmüş olur (Şekil 1).

d) Hücre içine alma: Fagositlerin mikroorganizmaları hücre içine alma yeteneklerini ölçen testler oldukça basittir.

Bu testlerde hücreler sıklıkla opsonize edilmiş partiküllerle (lateks, zimosan, ölü C. albicans, Ig ile kaplı boncuklar) yeterli süre enübe edildikten sonra ya hücre içine alınan partikül miktarı sayılarak ya da bir fagositik indeks (FI) ile bu işlev değerlendirilir.

$$FI (\%) = \frac{\text{Partikülleri içerisine alan hücrelerin sayısı}}{\text{Toplam hücrelerin sayısı}} \times 100$$

Fluoresan lateks boncuklar hücre içine alındıklarında kolaylıkla görüntülenebildikleri için testin uygulanmasını kolaylaştırabilmektedir, hatta ölçümlerde akım sitometrisi de kullanılabilir.

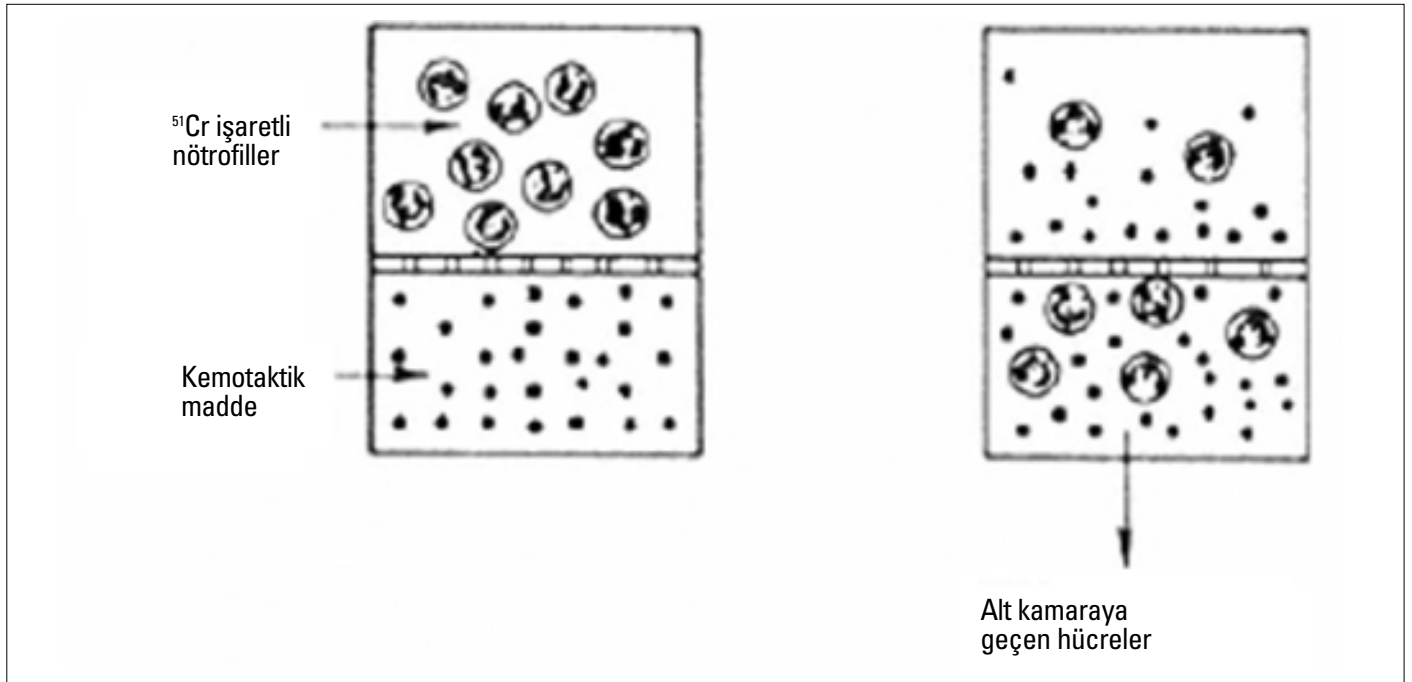
Bu test genelde rutin olarak kullanılmamaktadır, çünkü nitroblue terazolium indirgenme testi gibi diğer testlerde nötrofillerin hem hücre içine alma hem de oksidatif patlama yapabilme yetenekleri ölçülebilmektedir.

e) Degranülasyon: Sitoplazmik granül içerikleri fagozom içine salındıkları zaman mutlaka bir miktarı hücrenin dışına sızmaktadır. Hücre içine alma işlevinin ölçülmesi için uygulanan testler sırasında hücre üst kısmında kalan sıvıya nötrofillerin granüllerinden salınan miyeloperoksidaz, lizozim, β-glukuronidaz ve laktoferrin gibi maddeler ölçülebilir.

f) Oksidatif Patlama Ölçümü: Oksidatif patlamayı ölçmede kullanılan birçok farklı metod vardır. Ancak, en sıklıkla kullanılan test Nitroblue Tetrazolium (NBT) indirgenme testi'dir. Okside NBT solüsyonda renksiz veya soluk sarı renkte olup, indirgendiğinde mavi renge dönüşür. NBT testinde oksidatif patlamaya yol açan 2 farklı tip uyarandan biri ile inkübe edilir. Uyararak opsonize partiküller kullanılırsa nötrofillerin hem hücre içine alma hem de oksidatif patlama yapabilme kapasitesi ölçülebilir. Forbol esterler gibi difüze olabilir aktivatör kullanıldığında protein kinaz C NADPH-sitokrom B sistemini aktive eder ve solunumsal patlamaya direkt olarak sebep olur. Ölçüm iki şekilde yapılabilmektedir.

- **Mikroskopik teknik:** Maviye boyanmış sitoplazmaya sahip nötrofiller sayılır. Ancak bu testin standartize edilmesi zordur ve değerlendirmesi subjektiftir.

- **Kantitatif teknik:** Klasik kantitatif yöntemde pirimidin ile hücre içi NBT'nin salınımı sağlanır ve absorbans bir spektrofotometre ile 515 nm dalga boyunda ölçülür. Çok duyarlı ve doğru sonuç veren bir test olmasına karşın uygulanması zordur; çünkü hücrelerden boyanın salınımını sağlamak için kullanılan maddeler oldukça toksiktirler.



Şekil 1. Boyden kamarası kemotaksis testi

Hangi teknik kullanılırsa kullanılsın nötrofilleri forbol esterlerle uyarılmaya yanıt veren ancak opsonize patiküllere yanıt vermeyen bir hastanın nötrofillerinin mikroorganizmaları hücre içine alma ile ilgili mekanizmalardan birinde bozukluğun olduğu söylenebilir. Solunumsal patlama oluşturma yeteneğinde primer bozukluk olan bir hastadan alınan nötrofiller ise hiçbir tip uyarana yanıt vermez.

g) Mikrobiyel Öldürme Testleri: Nötrofillerin başlıca koruyucu işlevi mikroorganizmaların hücre içine alınıp öldürülmesidir. Bunun ölçülebilmesi için bakteriler veya mantarlar insan plazmasının (opsonin kaynağı olarak) varlığında nötrofiller ile bir arada tutulur. Yeterli süre inkübasyondan sonra hücreler ayrılıp eritilir ve hücre içi canlı bakterilerin sayısı saptanır. Canlı ve ölü bakterilerin tespit edilebilmesi için akrinin oranj gibi boyalar kullanılabilir. Ancak uygulanması zor ve sıkıcıdır. Bu nedenle öldürme işlevinin ölçümünde genellikle indirekt bir yöntem olan NBT testi kullanılır.

Fagositik işlevlerle ilgili hastalıklar (4,5):

1. Nötropeni: Nötropeni fagositöz bozukluğuna bağlı enfeksiyonun en sık nedenidir. Nötropenin başlıca sebepleri:

- Konjenital
- Sekonder (Kazanılmış)
 - A. Kemik iliğinde nötrofil yapımının baskılanması
 - 1. İlaçlara bağlı
 - 2. Tümör invazyonu
 - 3. Beslenme bozuklukları
 - 4. İdiyopatik
 - B. Nötrofillerin periferde yıkımı
 - 1. Otoimmün (Felty Sendromu)
 - 2. İlaçlara bağlı

2. Aderans Bozuklukları: CD11/CD18 kompleksinin ekspresyonunun yokluğu ile seyreden nadir konjenital bir hastalıktır.

3. Hiper IgE Sendromu: Hastalığın patogeneğinde monosit kemotaksisinde bozukluğun ya da mononükleer hücreler tarafından kemotaksis inhibitörü maddelerin yapımının söz konusu olabileceği düşünülmektedir.

4. Fagositik Öldürme İşlevinin Bozuklukları:

- **Kronik Granüloematöz Hastalık:** Hastalığın patogenezi heterojendir. Hastaların büyük bir çoğunluğundaki temel bozukluk sitokrom B'nin ağır zincirindedir. Bunların dışındaki olgularda ise protein kinaz C'nin bir substratı olan sitozolik protein p47'nin olmaması, daha nadiren de ya p67'nin ya da sitokrom B'nin ağır zincirinin bulunmamasıdır.

Bu moleküllerdeki eksiklikler işlevsel oksidaz'ın hücre membran düzeyinde toplanmasını önler, süperoksid ve hidrojen peroksit'in yapımı bozulur, ve bunun sonucunda hücre içi öldürme yetersiz olur. Hem nötrofiller hem de monositler/makrofajlar bu bozukluktan etkilenirler.

Bu durumlarda özellikle stafilokok, serratia, klebsiella, salmonella, nokardiya ve aspergillus türleri gibi katalaz pozitif mikroorganizmalar tarafından oluşturulan enfeksiyonlarla mücadelede sorun vardır. Katalaz negatif mikropların sebep olduğu enfeksiyonlarla ilgili bir problem yaşanmaz.

- **Chediak-Higashi Sendromu:** Bu hastalarda sitoplazmik granüllerde anormallikler vardır ve buna bağlı olarak bazı mikroorganizmaların hücre içinde öldürülmesi gerçekleştirilememektedir. Nötrofiller mikroorganizmaları içine alabilir ancak sitoplazmik granüller düşük enzimatik içerikli dev sekonder lizozomlara katılır. Sonuçta hücre içi öldürme yavaşlar ve etkisiz hale gelir. Bu hastalarda NK aktivitesinde de düşüklük söz konusudur.

Bu hastalarda klinik bulguların (mukokutanöz albinizm, tekrarlayan nötropeni, sebebi açıklanamayan ateş yüksekliği, periferik nöropati, tekrarlayan bakteriyel ve viral enfeksiyonlara bağlı gelişen ateş yüksekliği ile birlikte hepatosplenomegali ve/veya lenfadenopati) yanı sıra nötrofillerde dev lizozomların görülmesi ve mikrobiyel öldürme testlerinde anormallik saptanması tanı koydurucudur.

Kompleman Sistemi ve Bozuklukları

Kompleman Sistemi mikroplara karşı defansta önemli rollere sahip olup dolaşan ve membran ile ilişkili 25'den fazla proteinden oluşan bir sistemdir. Kompleman sisteminin ilk komponenti (proenzim) aktive olduğu zaman bu bir enzim aktivitesi kazanır. Bu enzim kendisini izleyen komponenti aktive ederek enzim haline çevirir. Bu reaksiyonları birbirini aktive eden enzimlerin izlediği reaksiyonlar dizisi takip eder. Kompleman yolundaki komponentlerden birinin eksikliğinde bu aktivasyon yolağı durur ve reaksiyon sonlanır.

Kompleman aktivasyonu 3 ana yolağı izleyerek gerçekleşir. Klasik yol, lektin yolu ve alternatif yol. Tüm bu yollar C5'in aktivasyonu ve sonunda membran atak yolunun aktivasyonuna yol açar. Bunlardan biri olan alternatif yolağı bazı kompleman proteinleri mikrobiyel yüzeylerde aktive edildiği zaman tetiklenirken, klasik yolağı adı verilen diğeri mikroplara ve diğeri antijenlere antikolar bağlandığı zaman harekete geçirilir. Üçüncü bir yolağı olan lektin yolağı ise mikropların yüzey glikoproteinlerindeki terminal mannoz kalıntılarına bir plazma proteini olan mannoz-bağlayan lektin'in (MBL) bağlanması ile aktive edilir (Şekil 2) (6,7).

Kompleman sistemi konak defansında başlıca üç ana işlevde rol alır (2). Bunlar;

1) Opsonizasyon: C3b mikropların yüzeyini kaplar ve bu mikropların yüzeylerinde C3b için reseptör taşıyan fagositlere bağlanmasını kolaylaştırır.

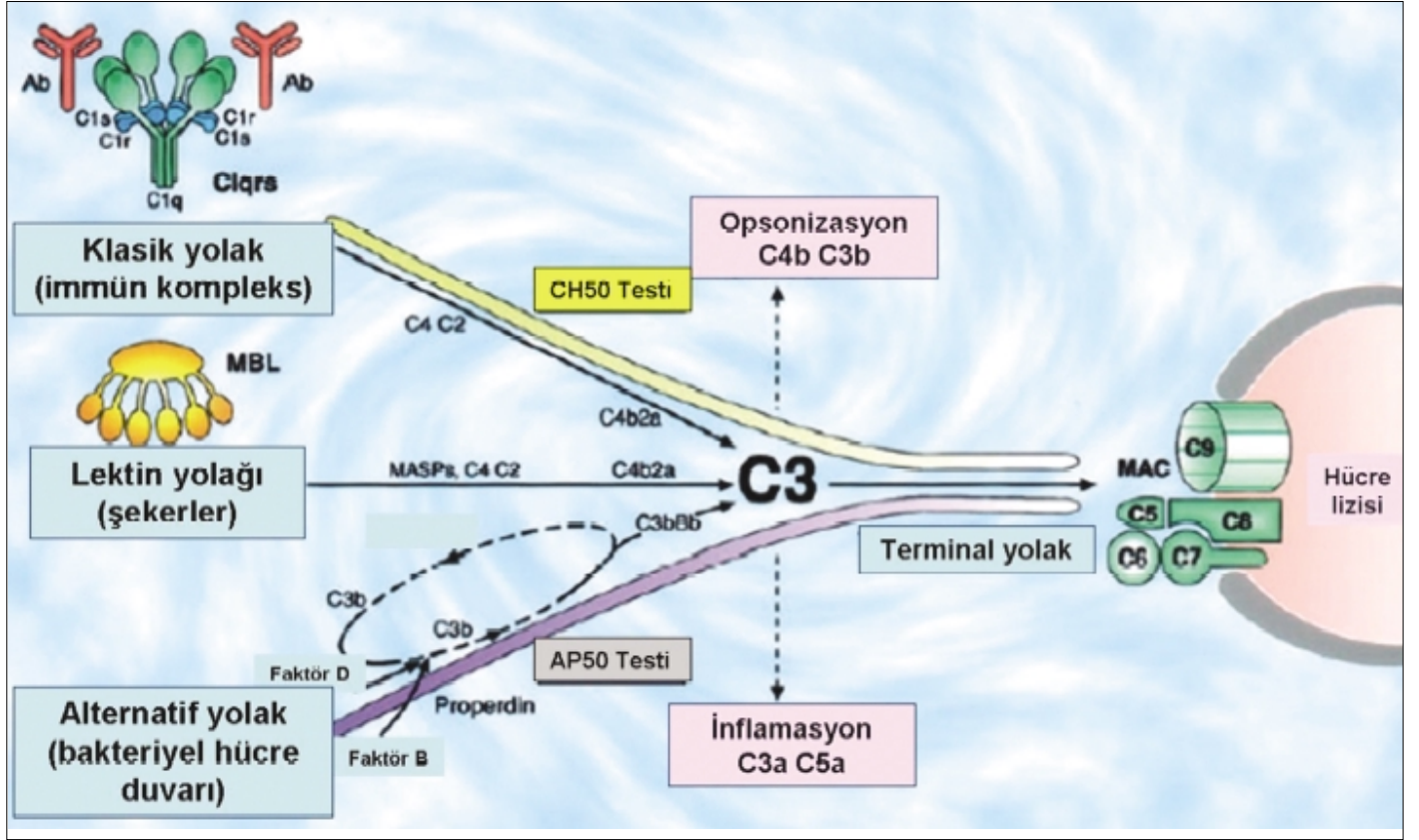
2) Kemotaksis: Kompleman proteinlerinin bazı yıkım ürünleri nötrofiller ve monositler için kemoatraktandırılar ve kompleman aktivasyonunun olduğu bölgede enflamasyonu ilerletirler.

3) Mikrobiyel öldürme: Kompleman aktivasyonu sonucunda yapılan membran atak kompleksi (MAC) adı verilen polimerik protein kompleksi mikrobiyel hücre duvarına yerleşerek su ve iyon girişine neden olan kanallar açar ve mikrobu ölümüne sebep olur.

Kompleman Sisteminin Laboratuvar Değerlendirmesi

Kompleman testleri kompleman komponentlerinin tek tek ölçümünü veya klasik yolak (CH50) ve alternatif yolak (AP50) işlevlerinin değerlendirilmesinden oluşur (8).

Kompleman komponentlerinin ölçümünde nefelometre veya turbidimetre ve radial immüno-diffüzyon (RID) gibi metodlar kullanılır. En sıklıkla ölçülen komponentler C3 ve C4'dür. Bunun yanında C3d ve C1-inhibitör ölçümünde de RID kullanılır.



Şekil 2. Kompleman Sisteminin Aktivasyonu. Alternatif yolak 50 testi (AP50), Klasik yolak hemolitik 50 testi (CH50), Mannoza bağlayan laktin ile ilişkili serin proteaz (MASP), Membran atak kompleksi (MAC)

Tablo 1. Kompleman bozuklukları ile ilişkili klinik durumlar							
Klinik Tablo	CH50	AP50	C3	C4	C1-inh antijenik	C1-inh işlevsel	Süreç
Eksiklikler							
C1q, C1r/C1s, C4 veya C2 eksikliği*	0	Normal	Normal	Normal*	Normal	Normal	Klasik yolak
Faktör D veya Properdin eksikliği	Normal	0 veya ↓↓	Normal	Normal	Normal	Normal	Alternatif yolak
C3, C5, C6, C7, C8 eksiklikleri	0 veya ↓↓	0 veya ↓↓	I veya Normal	Normal	Normal	Normal	C3 veya C9
Tüketilme durumları							
SLE, kriyoglobulinemi, HÜVS, Serum hast.	↓	Normal veya ↓	Normal veya ↓	I	Değişken	Değişken	Klasik yolak
Sepsis, PSGN	Normal veya ↓	↓	↓	Normal	Normal	Normal	Alternatif yok
Ciddi SLE, MPGN tip1 Major proteinüri	↓	↓	↓	↓	Değişken	Değişken	Her iki yolak
Regülasyonun yetersizliği							
HAE, AAE	↓	Normal	Normal veya ↓	↓↓	↓↓-Normal	↓	Klasik yolak
Faktör H ve I eks., C3 nefritik faktör	Normal-↓	↓↓-0	↓	Normal	Normal	Normal	Alternatif yolak
* C4 eksikliğinde C4 düzeyleri düşük olacaktır. Kazanılmış Anjiyoödem (AAE), herediter anjiyoödem (HAE), hipokomplemanemik ürtikeryal vaskülit sendromu (HÜVS), membranoproliferatif glomerülonefrit (MPGN), post-streptokokkal glomerülonefrit (PSGN).							

CH50 hemolitik testlerinde hasta serumunun antikorla kaplı koyun eritrositlerini lize etme kapasitesi ölçülür. AP50 testinde ise C3b'yi aktive ederek alternatif yolağı aktive etme özelliğine sahip olan tavuk eritrositleri kullanılır. CH50 testinde tavşan anti-koyun antikorları ile kaplı eritrositleri içeren agaroz jel insan serumu ile +40C'de inkübe edilir. Hasta serumunda bulunan C1 kompleman yolağını çalıştırması plakta berrak bir zon görünümüne yol açan eritrosit lizisi ile sonuçlanır. Hastalara ait örneklerin çapı standard eğriden okunarak yüzde normal kompleman aktivitesi hesaplanır. CH50 değeri antikorlarla kaplı eritrositlerin %50'sini lize etmek için gerekli serum miktarını gösterir.

Lektin yolağının işlevini ölçmek için ise mannan ile kaplı ELISA plaklarına hasta serumu eklenir. Hasta serumunda bulunan MBL'nin mannana bağlanmasını takiben MASP enzimleri C4'ü parçalar. Plakta biriken C4b ve C4d molekülleri enzim ile konjüge monoklonal antikorlar kullanılarak ölçülebilir.

Kompleman ile ilgili klinik durumlar

Kompleman sisteminin değerlendirilmesi birçok hastalığın tanısında ve monitörize edilmesinde önem taşır (9). Bazı hastalıklarda kompleman testlerinde görülen değişiklikler Tablo 1'de özetlenmiştir.

Kaynaklar

1. Kılıçturgay K. İmmünoloji 2003, Yenileştirilmiş 3. Baskı, Bursa, Nobel & Güneş Yayınevi, 2003, 203.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology,. 4th edition, Philadelphia, WB Saunders, 2000, 363-380.
3. Medzhitov R, Janeway Jr C. Innate Immunity. N Engl J Med, 2000, 343: 338-44.
4. Virella G. Introduction to Medical Immunology, 4th edition, New York, Marcel Dekker, 1998, 317-334.
5. Malech HL, Galin JI. Neutrophils in human diseases. N Engl J Med, 1987, 317: 687.
6. Walport MJ. Complement. First of two parts. N Engl J Med, 2001, 344: 1058-66.
7. Walport MJ. Complement. Second of two parts. N Engl J Med, 2001, 344: 1140-4.
8. Wen L, Atkinson JP, Giclas PC. Clinical and Laboratory evaluation of complement deficiency. J Allergy Clin Immunol 2004, 113: 585-593.
9. Jamal S, Jolles S. The role of complement testing in dermatology. Clin Dermatol, 2005, 30: 321-326.