



UIT

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Det helsevitenskapelige fakultet

Rapport : MED 3950 Masteroppgave/Kull 2012

C1-inhibitor. Betydning i sykdom og terapi

-Et narrativt litteraturstudium belyst med publikasjoner av T.E Mollnes, E.W. Nielsen og medarbeidere, ved immunologisk forskningslaboratorium Nordlandssykehuset Bodø

Marie Hansen Evjenth

Tromsø: profesjonsstudiet i medisin juni 2017

UIT Norges Arktiske universitet 2017



Forord

Hensikten med denne rapporten er å få en god forståelse for hvordan C1-inhibitorproteinet virker, i hvilke systemer proteinet utøver sin funksjon, hvilken betydning proteinet har i patogenesen til hereditært angioødem, samt å se på utvalgte publikasjoner ved en lokal forskningsgruppe ledet av Tom Erik Mollnes, i forhold til proteinets betydning i sykdom og terapi.

Da jeg skulle finne en problemstilling og skrive en prosjektbeskrivelse for masteroppgaven i medisin, visste jeg at jeg hadde lyst å skrive oppgave som omhandlet intensiv- eller akuttmedisin, da dette var noe som interesserte meg mye på dette tidspunktet. I tillegg ønsket jeg å ha veileder som var stasjonert i Bodø, da det var dit jeg selv skulle i forbindelse med den såkalte Bodøpakken. Jeg fant til slutt Erik Waage Nielsen og sendte en mail og spurte om hjelp til å finne oppgave. Erik var svært behjelpelig og skulle se nærmere på dette. Opprinnelig var forslaget å skrive en litteraturoppgave om bradykinin, og hvilken rolle det spilte i sykdom og terapi. Problemstillingen ble raskt endret til å handle om C1-inhibitorproteinet, samt å dreie litteraturoppgaven mot lokal forskning på dette området. Underveis har problemstillingen og formålet med oppgaven fått noen justeringer, og har endt opp som et mer tradisjonelt litteraturstudium, men med et særskilt fokus på lokale publikasjoner som også har fått mye plass i teksten.

Jeg vil med dette rette en meget stor takk til min hovedveileder, Erik Waage Nielsen. Han har hele tiden vært svært behjelpelig, kommet med forslag til litteratur, svart fort på mail, og gitt matnyttige tilbakemeldinger. Han har hentet ut målinger av C1-INH, haptoglobin og CRP ved hjelp av rapportverktøyet Qlikview. Ved hjelp av dataprogrammet GraphPad har han også laget grafer og beregnet lineær regresjon i oppgavens del to.

Å skrive masteroppgave har vært en lærerik prosess.

Marie H. Evjenth, Bodø 6. juni 2017

Innhold

Sammendrag	V
Forkortelser	VI
Innledning	1
1.1 Bakgrunn	1
1.2 Formål/problemstilling	2
1.2.1 Formål 1	2
1.2.2 Formål 2	2
1.3 Avgrensning av oppgaven	2
2 Materiale og metode	3
2.1 Litteraturstudium	3
2.2 Analyse av C1-INH og haptoglobin	4
3 Resultater	5
3.1 C1-inhibitor. Struktur og funksjon	5
3.2 Komplementsystemet. Tre aktiveringskaskader	7
3.3 C1-inhibitor. Regulering av komplementkaskaden	10
3.4 Aktivering av komplement i forsøk ved Mollnes, Nielsen og medarbeidere	10
3.4.1 Studie I – «High Dose Intravenous Immunoglobulin Treatment Activates Complement In vivo»	11
3.4.2 Studie II – «Mechanism of Complement Activation and Its Role in the Inflammatory Response After Thoracoabdominal Aortic Aneurysm Repair»	12
3.4.3 Studie III – «Mechanisms of Complement Activation and Effects of C1- inhibitor on the Meconium-induced Inflammatory Reaction in Human Cord Blood»	13
3.5 I hvilken grad er C1-inhibitor en god hemmer av komplementsystemet?	14
3.5.1 Studie IV – «C1-inhibitor Attenuates Hyperacute Rejection and Inhibits Complement, Leukocyte and Platelet Activation in an ex vivo Pig-to-human Perfusion Model»	14
3.5.2 Studie V – «Candidate Inhibitors of Porcine Complement»	15
3.5.3 Studie VI – «Effect of Supraphysiologic Levels of C1-inhibitor on the Classical, Lectin and Alternative Pathways of Complement»	16

3.5.4	<i>Studie VII – «Anti-inflammatory Effects of C1-inhibitor in Porcine and Human Whole Blood are Independent of its Protease Inhibition Activity»</i>	16
3.6	C1-inhibitor. Funksjon i kallikrein-kinin-systemet	19
3.6.1	Bradykinin	20
3.7	C1-inhibitor. Funksjon i koagulasjonskaskaden og fibrinolysen	21
3.8	C1- inhibitor. Effekt på koagulasjonskaskaden i forsøk med humant fullblod ...	22
3.8.1	<i>Studie VIII – «C1-inhibitor Efficiently Inhibits Escherichia coli-induced Tissue Factor mRNA up-regulation, Monocyte Tissue Factor expression and Coagulation Activation in Human Whole Blood»</i>	22
3.8.2	<i>Studie IX – «C1-inhibitor Efficiently Delays Clot Development in Normal Human Whole Blood and Inhibits Escherichia coli-induced Coagulation Measured by Thromboelastometry»</i>	23
3.9	Hereditært angioødem.....	25
3.9.1	Patogenese	25
3.9.2	Type 1 og type 2.....	26
3.9.3	Biokjemisk diagnostikk.....	26
3.9.4	Genetikk.....	28
3.9.5	Behandling.....	28
3.10	Studier ved Mollnes, Nielsen og medarbeidere om hereditært angioødem	31
3.10.1	<i>Studie X – «Effect of Time, Temperature and Additives on a Functional Assay of C1 inhibitor»</i>	31
3.10.2	<i>Studie XI – «A Neoepitope-Based Enzyme Immunoassay for Quantification of C1-inhibitor in Complex with C1r and C1s»</i>	33
3.10.3	<i>Studie XII – «C1-inhibitor and Diagnosis of Hereditary Angioedema in Newborns»</i>	33
3.10.4	<i>Studie XIII – «Identification of a C → T Mutation in the Reactive-Site Coding Region of the C1-Inhibitor Gene and its Detection by an Improved Mutation- Specific Polymerase Chain Reaction Method»</i>	34
3.10.5	<i>Studie XIV – «C3 is Activated in Hereditary Angioedema, and C1/C1-Inhibitor Complexes Rise During Physical Stress in Untreated Patients»</i>	35

3.10.6	<i>Studie XV – «Expression of Active Human C1 Inhibitor Serpin Domain in Escherichia coli»</i>	35
3.10.7	<i>Studie XVI – «C1-Inhibitor Reduces the Ischemia- Reperfusion Injury of Skeletal Muscles in Mice after Aortic Cross-Clamping»</i>	36
3.11	C1-Inhibitor som akutfaseprotein	36
3.11.1	C1-inhibitor og CRP	37
3.11.2	Haptoglobin og CRP	39
4	Diskusjon	41
4.1	Er C1-inhibitor en god hemmer av komplementsystemet?	41
4.2	C1-inhibitor og sepsis	42
4.3	C1-inhibitor som akutfaseprotein	43
5	Konklusjon	44
	Referanser	45
	Vedlegg: Kunnskapsevaluering/GRADE	51

Sammendrag

Formålet med denne oppgaven er todelt. Hoveddelen av oppgaven er et narrativt litteraturstudium med mål å få en bred og god forståelse for hvilken struktur og funksjon C1-inhibitor har, hvilken effekt proteinet har i de ulike kaskadesystemene i kroppen hvor proteinet inngår som en regulator, samt hvilken rolle proteinet spiller i patogenesen ved arvet angioødem, alt dette belyst med publikasjoner av T.E Mollnes, E.W Nielsen og medarbeidere ved immunologisk forskningslaboratorium, Nordlandssykehuset Bodø. Formålet med del to er å besvare i hvilken grad C1-INH er et akutfaseprotein, slik det er angitt i litteraturen.

Ved å gjennomføre søk i databaser som PubMed, Google Scholar og UpToDate, i tillegg til ulike verktøy som f.eks. felleskatalogen, har de artiklene som er brukt i denne oppgaven blitt valgt ut med bakgrunn i hvorvidt de svarte på de tingene jeg ønsket å vite om C1-inhibitor, for deretter å bli framstilt i teksten. De lokale publikasjonene ble funnet ved å gjøre følgende søk i PubMed: «C1 inhibitor Mollnes Nielsen», noe som gav 18 treff, hvorpå 16 artikler ble inkludert». Del to er analyse av målinger av C1-INH og CRP (n=125), sammenlignet med målinger av haptoglobin og CRP (n=10350). Statistikk og grafer er laget ved hjelp av GraphPad Prism, og tallene er hentet ut ved hjelp av rapporteringsverktøyet Qlikview direkte fra DIPS- labdatabase.

C1-INH har viktige funksjoner i komplementsystemet, kallikrein-kinin-systemet, koagulasjonskaskaden og fibrinolysen. Forskergruppen ved Mollnes og Nielsen har sett på dette proteinet i mange ulike settinger, og de blir presentert i denne oppgaven. Blant viktige funn er at C1-INH viser seg å ikke være en god hemmer av komplementsystemet sammenlignet med andre hemmere. C1-INH har også vist seg å kunne ha fordelaktige funksjoner ved sepsis, da mange av kaskadesystemene som proteinet regulerer er involvert i patogenesen ved sepsis. Videre viser vi i slutten av oppgaven at C1-INH i liten grad oppfører seg som et akutfaseprotein i våre målinger, hvor vi sammenligner målinger av C1-INH og haptoglobin opp mot CRP-økning i samme prøve. Økningen av C1-INH er sparsom og uten diagnostisk betydning.

Forkortelser

C1 – INH: C1- inhibitor

iC1 – INH: inaktivert C1- inhibitor

fC1-INH: funksjonelt C1-INH

RCL: reactive center loop

FXII: faktor XII

FXIIa: aktivert faktor XII

FXI: faktor XI

FXIa: aktivert faktor XI

PK: prekallikrein

HK: høymolekylærvekt kininogen

BK: bradykinin

tPA: tissue plasminogenaktivator

uPA: urokinase type plasminogenaktivator

HAE: Hereditært angioødem

Innledning

1.1 Bakgrunn

C1-inhibitor (C1-INH) er et serpin (serinprotease inhibitor) som er med på å regulere mange av kroppens kaskadesystemer. Antitrombin III, plasminogen inaktivator 1 (PAI-1) og α -1-antitrypsin er andre proteiner som også regnes som serpiner, og de har noen strukturelle og funksjonelle likheter med C1-INH. Av de viktigste oppgavene til C1-INH er hemming av C1r og C1s i den klassiske komplementkaskaden, i tillegg til inaktivering av plasma kallikrein, faktor XIa og FXIIa i kallikrein-kinin-systemet og koagulasjonskaskaden. Den har også inhiberende funksjoner i fibrinolysen, men i mindre grad sammenlignet med de ovennevnte systemene. C1-INH finnes normalt i plasmakonsentrasjoner rundt 0,25 g/l, tilsvarende 2,38 μ M (1).

I tillegg har proteinet en sentral rolle i patofysiologien til sykdommen arvet angioødem (HAE). HAE skyldes mutasjon i et av allelene som koder for C1-INH. Sykdommen deles inn i type 1 og 2. Ved begge formene produseres det C1-INH fra det friske allelet, men ved type 1 gir det syke allelet ingen produksjon av C1-INH, og ved type 2 lages det et protein som ikke virker.

C1-INH har vært gjenstand for studier gjort ved en lokal gruppe ledet av T. E. Mollnes ved Nordlandssykehuset i Bodø. De har sett på proteinet i mange ulike sammenhenger, og som blir presentert i denne oppgaven.

Ved tilstander som sepsis og septisk sjokk involveres blant annet kaskadesystemene nevnt ovenfor, spesielt komplementsystemet og koagulasjonskaskaden, hhv. ved inflammatorisk respons og forbrukskoagulopati som kan være en del av bildet ved septisk sjokk. På grunn av C1-INH sin rolle i disse systemene, vil f.eks. målrettet behandling med suprafysiologiske doser av proteinet kunne gi mer effektiv behandling. Slike forsøk med suprafysiologisk tilførsel er studert både in vitro og in vivo i forskergruppen ledet av T. E. Mollnes.

1.2 Formål/problemstilling

1.2.1 Formål 1

Først og fremst vil jeg se på hvilken struktur og funksjon C1-inhibitor har, hvordan proteinet normalt virker i komplementsystemet, kallikrein-kinin-systemet, koagulasjonen og fibrinolysen, i tillegg til hvilken rolle proteinet spiller ved arvet angioødem. Belyst med 16 publikasjoner ved Mollnes, Nielsen og medarbeidere vil jeg også se på hvilken rolle C1-inhibitor har i sykdom og terapi sett i relasjon til proteinets fysiologiske egenskaper.

1.2.2 Formål 2

Til slutt ønsker jeg å se i hvilken grad C1-inhibitor oppfører seg som et akutfaseprotein i alle målinger som er gjort av C1-INH ved laboratoriet ved Nordlandssykehuset i Bodø, sammenlignet med et annet akutfaseprotein fra samme laboratorium, nemlig haptoglobin.

1.3 Avgrensning av oppgaven

Oppgaven begrenser seg til å se på struktur, proteinfunksjon, samt funksjon i de kaskader C1-inhibitor inngår. I forhold til andre kliniske problemstillinger hvor C1-inhibitor inngår, begrenser det seg i denne oppgaven til de forskningsspørsmål T.E Mollnes, E.W Nielsen og medarbeidere har besvart angående dette.

2 Materiale og metode

2.1 Litteraturstudium

Oppgaven er et narrativt litteraturstudium med en vid problemstilling og som derfor søker å få en bred forståelse og oversikt over det valgte temaet. Dette til forskjell fra et systematisk litteraturstudium som har et mer avgrenset tema og godt definert forskningsspørsmål man ønsker å få svar på. Da formålet med oppgaven er å se på C1-INH sin fysiologiske virkning belyst med studier som viser C1-INH i mer kliniske situasjoner, har jeg valgt å presentere de viktigste funnene fra studiene som egne avsnitt under de respektive kapitlene som handler om proteinets normalfunksjon.

Mye av arbeidet med oppgaven har bestått i å sette seg inn i temaet, som for meg er relativt nytt sett bort fra mer generell undervisning i immunologi vi har hatt tidligere på studiet. Det har blitt gjort søk i medisinske databaser for å finne gode kilder, i tillegg til at veileder Erik Waage Nielsen har kommet med tips til kilder underveis i arbeidet. Under vises en oversikt over hvilke søkeord og databaser som har blitt brukt. Da det er et narrativt studium har jeg valgt ut litteratur ut fra hvilke kilder som ga meg den informasjonen jeg trengte, men per tema har flere artikler blitt lest i fulltekst, før til slutt de som er referert til har blitt valgt ut. Originalartikler, samt nyere publikasjoner har blitt foretrukket fremfor eldre publikasjoner. Kilder har også blitt funnet i referansekildene til artikler som har vist seg interessante underveis.

I PubMed og Google Scholar har følgende søkeord blitt brukt:

- «C1-inhibitor AND serine protease inhibitor AND structure AND function», «C1-inhibitor AND complement system AND regulation»,
- «C1-inhibitor AND contact phase system»,
- «C1-inhibitor AND hereditary angioedema AND pathophysiology AND bradykinin»,
- «Angioedema AND bradykinin»,
- «Cetor»,

- «Ecallantide».

Andre databaser som UpToDate og felleskatalogen er også blitt brukt, med følgende søkeord, hhv:

- «Hereditary angioedema»
- «Berinert», «Cinryze», «Icatibant»

For å finne de lokale publikasjonene som har fått særskilt fokus i denne oppgaven ble følgende søk gjort i PubMed: «C1 inhibitor Mollnes Nielsen», dette gav 18 treff. 16 artikler ble inkludert i oppgaven, og 2 ble ikke inkludert da jeg ikke hadde tilgang til disse da de kun fantes i papirformat.

2.2 Analyse av C1-INH og haptoglobin

For å svare på spørsmålet om C1-inhibitor er et akutfaseprotein har vi sammenlignet målinger av C1-INH og CRP i samme prøve, med målinger av haptoglobin og CRP i samme prøve, alle målt ved Nordlandssykehuset Bodø.

Målingene har min veileder Erik Waage Nielsen hentet ut ved hjelp rapportverktøyet Qlikview (Qliktech, Radnor, PA, USA) som de bruker ved Nordlandssykehuset. Verdiene er hentet fra Klinisk Kjemisk Laboratorium ved NLSH, og de er komplett anonyme. Vi har bare brukt rekvisisjoner med enten «C1-INH **og** CRP» (n=215) eller «Haptoglobin **og** CRP» (n=10350), tatt samme dag.

Erik Waage Nielsen har også gjort de statistiske målingene og laget grafene, begge ved hjelp av dataprogrammet GraphPad Prism, produsert av GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA.

3 Resultater

3.1 C1-inhibitor. Struktur og funksjon

C1-INH har en molekylvekt på rundt 104 000 Da. Proteinet er bygd opp av en enkel polypeptidkjede på 478 aminosyrer, som igjen utgjør 51 % av den totale massen til proteinet. Videre har den bundet til seg mange karbohydratgrupper, noe som utgjør de resterende 49 % av molekylvekten. Mesteparten av karbohydratene er lokalisert til N-terminalen av proteinet (2). C1-INH sin sekundære proteinstruktur består av 9 α -helixer og tre β -flak. Aminosyrene 113 – 478 ved C-terminalen svarer til serpindomenet, som er bevart mellom de ulike serpinene. En spesifikk sekvens i denne delen av proteinet kalles for «reactive center loop» (RCL) og er en sentral del når det kommer til gjenkjenning, binding og inaktivering av proteaser. Sekvensen består av rundt 17 aminosyrer, 15 av disse er lokalisert litt ut fra kjernen til proteinet, mens resten er med å feste denne sekvensen til et av β -flakene. Peptidbåndet P1-P1' i denne sekvensen er avgjørende for hvilke proteaser serpinet binder og inaktiverer; hos C1-INH svarer dette til aminosyrene Arg⁴⁴⁴ – Thr⁴⁴⁵ (3). Samtidig er det mange av serpinene som hemmer flere proteaser, slik at det er nærliggende å tro at også flere av sekvensene innad i RCL er med å avgjøre spesifisiteten (4). C- og N-terminalen av polypeptidkjeden er knyttet sammen ved hjelp av to disulfidbroer, Cys¹⁰¹-Cys⁴⁰⁶ og Cys¹⁰⁸-Cys¹⁸³, som er med på å stabilisere proteinstrukturen. Reduksjon av disse bindingene er med på flytte RCL nærmere kjernen av proteinet, og denne strukturendringen fører til at C1-INH sin evne til å binde og inaktivere proteaser forstyrres. Mutasjoner som påvirker disse bindingene er vist å gi et ikke-funksjonelt protein (5).

C1-INH har flere biologiske effekter, og man kan dele disse i to kategorier; kompleksdannelse, slik som ved hemming av proteaser, og ikke-kompleksdannelse. Den kompleksdannende mekanismen er lik for alle serpinene. Ved gjenkjenning av en aktuell protease dannes det først en reversibel ikke-kovalent binding mellom proteasen og serpinet. Deretter vil proteasen kløyve P1-P1' som den har bundet seg til. Dette initierer en strukturell endring av proteinet og det dannes en kovalent esterbinding mellom proteasen og serpinet. RCL vil bli inkorporert som en del av de tre β -flakene, og bindingsstedet til proteasen blir invertert. Så vil proteasen flyttes til motsatt pol av

proteinet (6). Når peptidbindingen i RCL er kløyyvet, vil ikke C1-INH lenger kunne binde til seg flere proteaser, og proteinet inaktiveres for denne funksjonen. Inaktivt C1-INH, iC1-INH, sirkulerer i plasma med en noe lavere molekylvekt, ca. 95 000 Da (7).

C1-INH har også en rekke effekter som virker uavhengig av kompleksdannelse. Blant annet kan C1-INH, via karbohydratgruppene ved N-terminalen, binde seg til E- og P-selektiner på endoteloverflaten, og på den måten hindre leukocyters evne til å binde seg her. Okkupering av bindingsstedene til E- og P-selektiner forhindrer også makrofager fra å binde seg her. Denne egenskapen er noe både aktivt og inaktivert C1-INH har, noe som styrker sannsynligheten for at det er karbohydratgruppene i proteinet som kan binde seg til selektinene, dette underbygges også av at deglykosylert C1-INH mister sin evne til å hindre rekruttering av leukocyter. Samtidig har C1-INH også vist seg å kunne binde til substanser i ekstracellulær matriks, blant annet type IV kollagen, entacin og lamilin. Denne bindingen påvirker ikke C1-INH sin evne til å inaktivere proteaser, og derfor er også dette mest sannsynlig via en annen mekanisme enn kompleksdannelsen sett ved proteaseinaktivering (8). Flere eksempler på funksjoner utenom proteasehemming er også evnen til å interagere med mikroorganismer. Eksempelvis kan C1-INH binde til lipopolysakkarider fra gram negative bakterier, via den karbohydratrike N-terminalen. Denne bindingen hindrer at lipopolysakkaridene binder seg til reseptorer på overflaten til makrofager, og dermed reduseres utskillelsen av eks. TNF- α fra makrofager (9).

C1-INH syntetiseres for det meste i leveren, men også i monocytter, mikroglia, fibroblaster og endotelceller. I litteraturen er også C1-INH angitt å være et akutfaseprotein, altså øker både mengden mRNA og mengden C1-INH ved inflammasjon. Eksempelvis har syntesen av proteinet vist seg å øke ved stimulering med IL-6 og TNF- α . Derimot har IL-1 sparsom effekt mtp. økt produksjon av C1-INH, og kan også være med på å hemme produksjonen (10). Ved infeksjon og inflammasjon vil inflammatoriske celler som monocytter og makrofager skille ut en rekke cytokiner, som TNF- α , IL-1 og IL-6, lokalt hvor infeksjonen eller vevsskaden har oppstått. Disse cytokinene setter i gang en akutfasereaksjon i kroppen, som blant annet innebærer at

leveren vil oppjustere syntesen av en rekke proteiner som har ulike roller i immunresponsen, og disse kalles da akutfaseproteiner. Man kan videre skille mellom «negative akutfaseproteiner» og «positive akutfaseproteiner», hvor syntesen av disse hhv. reduseres og oppjusteres. Eksempler på negative akutfaseproteiner er albumin og ferritin. Eksempler på positive akutfaseproteiner er CRP, serum-amyloid A, koagulasjonsproteiner (fibrinogen, protrombin), komplementproteiner (C2, C3, C4, C5), transportproteiner (haptoglobin), samt proteaseinhibitorer (α -1-antitrypsin, α -1-antichymotrypsin, C1-INH) (11). I en studie blant pasienter med cirrhose ble ulike akutfaseproteiner målt, da det kan være vanskelig å biokjemisk diagnostisere bakterielle infeksjoner hos disse pasientene, likevel viser CRP seg å være signifikant høyere ved infeksjon, og den markøren som også øker mest. De andre akutfaseproteinene viser en ikke- signifikant økning, selv om noen øker mer enn andre, hhv. β 2- mikroglobulin, ferritin, fibrinogen, C1-INH, C4, haptoglobin og C3 (12). C1-INH og C3 i øvre del av referanseområde, målt sammen med CRP, har hos pasienter med inflammatorisk tarmsykdom vist å gi en høyre odds ratio for morbus Crohn sammenlignet med ulcerøs colitt, og det er implisert at målinger av disse kan være nyttig diagnostisk for å skille mellom Mb. Crohn og ulcerøs colitt (13).

3.2 Komplementsystemet. Tre aktiveringskaskader

I det følgende avsnittene vil komplementsystemets funksjon og C1-inhibitors rolle som regulator av dette systemet bli presentert. Forskergruppen ved Mollnes, Nielsen og medarbeidere har gjort flere forsøk som både omhandler aktivering av komplementsystemet og bruk av C1-inhibitor som terapi i situasjoner hvor dette systemet er involvert i patogenesen. Det er derfor viktig å forstå den basale kunnskapen bak dette. Studiene presenteres etter systemets normalfunksjon og C1-INH sin regulering av dette har blitt gjennomgått.

Komplementsystemet er en del av det medfødte immunsystemet. Hvis invaderende patogener bryter kroppens mekaniske barrierer (hud, slimhinner etc), er det denne delen av immunsystemet som bekjemper infeksjonen først. Hvilken av de ulike reaksjonsveiene i komplementsystemet som aktiveres avhenger av hvilken mikrobe som

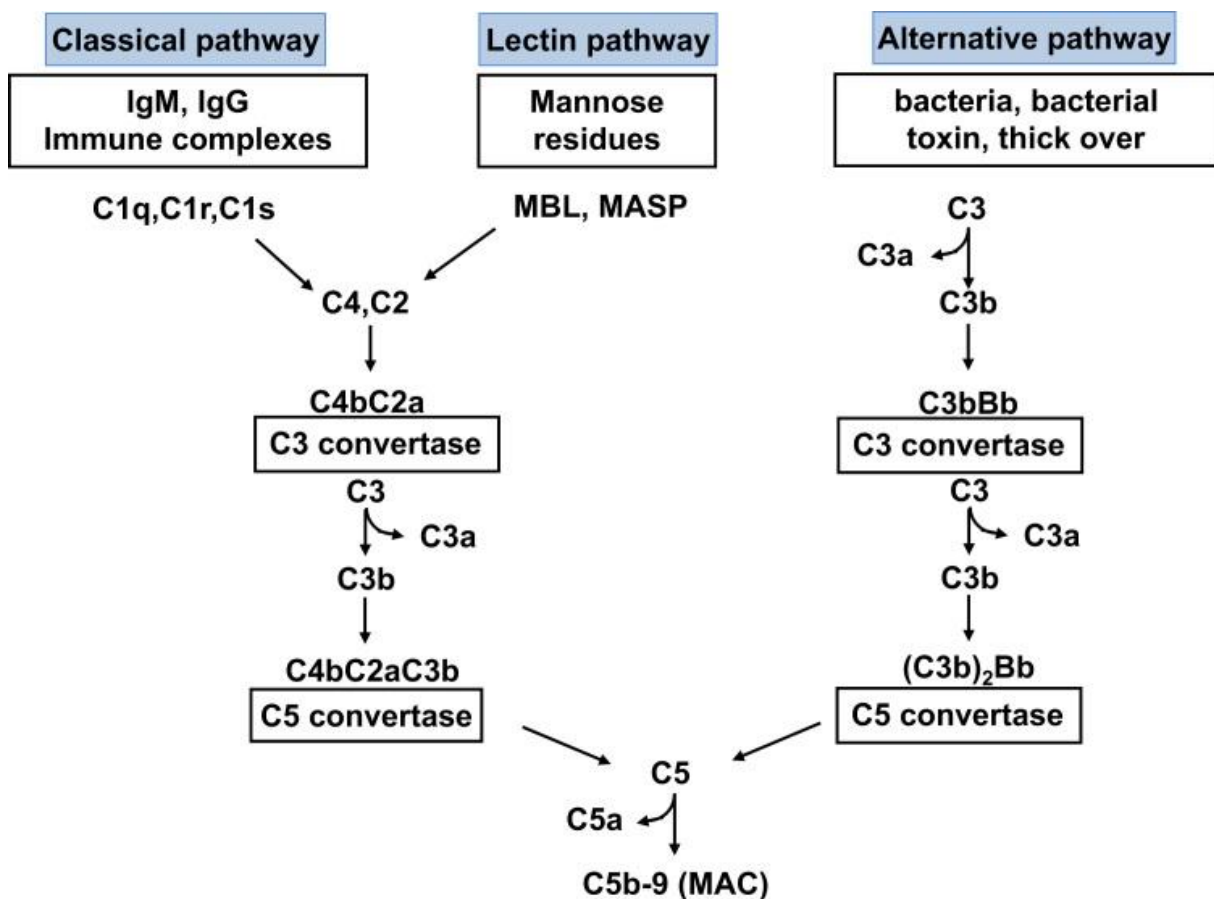
invaderer kroppen, og hvordan mikroben slår seg ned i kroppen. Komplementsystemet består av 30 forskjellige plasmaproteiner, og mange av disse er proteolytiske enzymer, proteaser, som sirkulerer som inaktive zymogener. Når en infeksjon trigger en immunrespons og komplementsystemet blir satt i gang, vil hver protease kløyves og aktiveres, og deretter aktivere flere enzymer i kaskaden (14,15).

Den alternative komplementkaskaden aktiveres av lavgradig spontan hydrolyse av en thioesterbinding i C3. C3 blir syntetisert i lever, og når det blir skilt ut i plasma skjer en strukturell endring av proteinet, slik at denne thioesterbindingen blir tilgjengelig for hydrolyse. Det dannes C3(H₂O) som kan binde faktor B, noe som fører til at faktor B endrer struktur og kan bli kløyd av faktor D til Bb og Ba. Bb forblir bundet til C3(H₂O) og har proteolytiske egenskaper, og komplekset binder til seg C3 som det igjen kløyver til C3a og C3b. En liten mengde av C3b bindes kovalent til patogener, og vil binde til seg faktor B som deretter vil kløyves av faktor D og generere faktor Ba og Bb. C3b danner kompleks sammen med Bb, C3bBb/ C3 konvertase. C3 konvertase virker så via en slags positiv feedback mekanisme hvor den kløyver mer og mer C3 til C3b og Bb. C3b-fragmentene fikseres til patogenet, og til slutt vil hele patogenet være dekket av dette (Fig. 1). Denne prosessen reguleres av hhv. Properidin (P), som forsterker denne mekanismen, og faktor H som har motsatt effekt. Det faktum at patogenet er dekket med C3b-fragmenter gjør at makrofager lettere gjenkjenner det ved at den binder C3b via komplementreseptor 1 (CR1) på sin overflate. Videre vil også C3b binde til C3 konvertase for å danne komplekset C3b₂Bb (C5 konvertase), som kan kløyve komponent C5 til C5a og C5b, og til slutt danne det terminale komplementkomplekset (TCC) også kalt membrane attack complex (MAC), C5-C9. (16) (Fig.1).

En annen kaskaden som kan aktiveres ved en immunrespons er lektinkaskaden. I plasma sirkulerer mannose-bindende lektiner sammen med to serin protease zymogener, MBL- assosiert serine protease 1 og 2 (MASP-1 og MASP 2). Når et slikt kompleks binder til mannose ved overflaten til makromolekyler på patogener, vil et MASP-2 molekyl bli enzymatisk aktivt og kløyve komponent C4 til C4a og C4b. C4a fungerer som et anafylatoksin som kan rekruttere leukocytter. C4b bindes til patogenets

overflate. Deretter vil MASP-2 også kløyve komponent C2, og danne C2a og C2b (inaktivt). C4b og C2a danner sammen C3 konvertase (Fig.1) (17).

Den klassiske komplementkaskaden aktiveres ved at antistoff-antigenkomplekser (eks. IgG, IgM) som sirkulerer i plasma binder seg til kaskadens første protein, C1, som er strukturelt likt MASP-1 og MASP2. Dette proteinet er bygd opp av tre subkomponenter; en enhet C1q (som består av 6 subenheter), en enhet C1r (som består av to subenheter) og en enhet C1s (som også består av to subenheter). C1r og C1s regnes som serinproteaser. Binding mellom antistoff-antigenkomplekset og C1q-C1r-C1s medfører en strukturell endring av C1, som igjen fører til at C1r-C1s utøver sin proteolytiske aktivitet og kløyver og aktiverer de to neste proteinene i kaskaden, C4 og C2 (Fig.1) (17).



Figur 1: skjematiske oversikt over de tre aktiveringsveiene i komplementsystemet (17).

3.3 C1-inhibitor. Regulering av komplementkaskaden

C1-INH er den eneste kjente hemmeren av C1r og C1s i den klassiske komplementkaskaden. Den hindrer videre aktivering ved å binde til C1r-C1s-komplekset via samme mekanisme som er utdypet tidligere mtp. serpin-inaktivering av proteaser, slik at C1r-C1s ikke kan utøve sin proteolytiske aktivitet på de neste proteinene i kaskaden (18).

C1-INH hemmer både MASP-1 og MASP-2 i lektinkaskaden. Inaktivering av disse proteinene hindrer videre aktivering av lektinkaskaden på en effektiv måte. Antitrombin har også en viss hemmende effekt på disse proteinene, men ikke like effektivt som C1-INH. Sammen med heparin vil effekten til antitrombin bli atskillig mer effektiv. Heparin potenserer også C1-INH, men har ikke like dramatisk. Evnen til å hemme MASP-1/MASP-2 blir moderat økt. (19).

C1-INH har vist seg å ha regulerende effekt i den alternative kaskaden, men det finnes ikke evidens for at dette skyldes kompleksdannelse med kovalent binding og påfølgende inaktivering; sannsynlig er det andre mekanismer som fører til dette. Blant annet har det vist seg at C1-INH kan binde seg til C3b og påvirke dets binding til faktor B, samt å gjøre dette komplekset mer ustabil (20).

3.4 Aktivering av komplement i forsøk ved Mollnes, Nielsen og medarbeidere

I det følgende avsnitt vil forskning på aktivering av komplementkaskadene ved Mollnes, Nielsen og medarbeidere bli presentert. Forfatterne har målt aktivering ved tre ulike situasjoner, nemlig aktivering av komplementsystemet ved intravenøs tilførsel av immunglobulin, aktivering av komplementsystemet som patofysiologisk mekanisme ved iskemisk reperfusjonsskade, samt aktivering av komplement induisert av mekonium:

- *Studie I: «High Dose Intravenous Immunoglobulin Treatment Activates Complement in vivo» (21)*
- *Studie II: «Mechanism of Complement Activation and Its Role in the inflammatory response After Thoracoabdominal Aortic Aneurysm Repair» (22)*

- Studie III: «Mechanism of Complement Activation and Effects of C1-inhibitor on the Meconium-induced Inflammatory Reaction in Human Cord Blood» (23)

3.4.1 Studie I – «High Dose Intravenous Immunoglobulin Treatment Activates Complement In vivo»

IgG tilført i høye doser blir brukt i behandling av noen få inflammatoriske sykdommer, samtidig som det har blitt rapportert om gunstige effekter ved tilførsel av IVIG («intravenous immunoglobulins») ved både auto- og alloimmune gjentatte spontanaborter. En gruppe på syv kvinner som ble tilbydd slik behandling for gjentatte aborter ble studert for å se hvilken effekt intravenøs tilførsel av IVIG hadde på komplementaktivering. Det ble tatt blodprøver til analyse av de ulike aktiveringsproduktene i komplementsystemet, rett før infusjon, samt rett etter. Produktene ved komplementaktivering økte signifikant etter infusjon med IVIG.

	Før tilførsel av intravenøst immunoglobulin	30 min etter tilførsel av intravenøst immunoglobulin	Forskjell før-etter
C1s/C1-INH-kompleks	98 AU/ml (24 - 269)	86 AU/ml (27 - 244)	P= 0,687
C4bc	118 AU/ml (13 - 270)	74 AU/ml (16 - 256)	P = 0,156
C4d	8,1 µg/ml (2,3 - 10,4)	8,6 µg/ml (2,8 - 10,7)	P = 0,296
Bb	0,66 µg/ml (0,45 - 1,26)	1,66 µg/ml (0,91 - 2,00) P 0,015	P= 0,015
C3bc	9,8 AU/ml (6,9 - 44,6)	31,2 AU/ml (11,3 - 75,6)	P = 0,015
C5a	10,5 ng/ml (7,0 - 15,1)	12,7 ng/ml (10,1 - 16,9)	P = 0,015
TCC	0,81 AU/ml (0,65 - 1,88)	2,19 AU/ml (0,85 - 3,28)	P = 0,015
C1q	78 % (45 - 98)	78 % (59 - 109)	P = 0,312
C1-INH	0,28 g/l (0,24 - 0,34)	0,32 g/l (0,28 - 0,37)	P= 0,062
fC1-INH	94 % (76 - 108)	101 % (84 - 230)	P = 0,031
C3	1,21 g/l (1,08 - 1,45)	1,25 g/l (1,03 - 1,43)	P = 0,687
C4	0,26 g/l (0,22 - 0,40)	0,28 g/l (0,20 - 0,35)	P = 0,078
C4bp	92 % (69 - 107)	95 % (66 - 225)	P = 0,078

Tabell 1: tabellen viser konsentrasjonen av de målte aktiveringsproduktene i komplementsystemet før og etter infusjon med IgG. Tallene er medianverdier, og i parentes er

høyeste og laveste målte verdi innad i gruppen. I kolonnen lengt til høyre er også p- verdiene for sammenligningen mellom konsentrasjonene før og etter angitt. Markert i blått er de komponentene som viste signifikant økning etter tilførsel med IVIG.

Forfatterne så altså at intravenøs tilførsel av IVIG ga en signifikant aktivering av komplementsystemet, vist med økning i mange av aktiveringsproduktene. Det legges imidlertid til at i senere tid har flere funnet at IVIG har en komplementinhiberende effekt, og IVIG brukes i dag til behandling av mange autoimmune sykdommer (24).

3.4.2 Studie II – «Mechanism of Complement Activation and Its Role in the Inflammatory Response After Thoracoabdominal Aortic Aneurysm Repair»

I 2003 utførte gruppen en prospektiv observasjonsstudie som undersøkte hvilken rolle aktivering av komplementsystemet spiller i patofysiologien til iskemisk reperfusjonsskade ved transabdominale inngrep hos pasienter med abdominale aortaaneurismer (thoracoabdominal aortic aneurysm repair, TAAA).

Komplementaktiveringen fant sted like etter reperfusjonen. Blodprøver ble tatt før kirurgi, før klemmer ble satt på aorta, før klemmene ble tatt bort, samt på flere tidspunkt etter at klemmene ble tatt bort. Både cytokiner, chemokiner og komplementprodukter ble analysert. I tillegg observerte de følgende:

- Det var en moderat økning i C1r-C1s/C1-INH komplekser fra 17 AU/ml til 27 AU/ml ($p < 0,01$) i TAAA-gruppen seks timer etter reperfusjon. Blant de ulike gruppene innad TAAA opererte, var det ulike verdier av komplekset ved den første målingen, og derfor ble også den prosentvise økningen sammenlignet, og denne var signifikant høyere sammenlignet med kontroll ($p < 0,01$ etter seks timer).
- C4bc (indikerer aktivering av både den klassiske kaskaden og lektinkaskaden) økte signifikant fra 8 AU/ml til 89 AU/ml seks timer etter reperfusjon ($p < 0,01$). Den relative økningen av C4bc var også mye større enn økningen av C1r-C1s/C1-INH.
- C3bBbP (alternative kaskaden) økte fra 11 AU/ml til 47 AU/ml etter seks timer ($p < 0,01$)

- C3bc (alle kaskadene) økte fra 12 AU/ml til 69 AU/ml ($p < 0,01$). I tillegg økte også TCC fra 0,6 AU/ml til 2,1 AU/ml ($p < 0,05$).
- Ingen signifikant økning ble sett i kontrollgruppene, og forskjellen mellom gruppene var også signifikante.

Basert på dette kan man anta at den klassiske kaskaden spiller en mindre rolle i patofysiologien ved reperfusjonsskade, samtidig som komponenter i lektinkaskaden ga større økning og dermed er mer sannsynlig som aktiveringsvei. Det var også en økning i den alternative kaskaden, noe som selvfølgelig kan skyldes at den kan aktiveres som en forsterkning til lektinkaskaden.

3.4.3 Studie III – «Mechanisms of Complement Activation and Effects of C1-inhibitor on the Meconium-induced Inflammatory Reaction in Human Cord Blood»

I 2009 ble det gjort et forsøk som målte komplementaktivering ved mekoniumindusert inflammasjon, samt effekt av C1-inhibitor i en slik situasjon. Serum fra friske givere ble tilsatt mekonium fra friske nyfødte. Komplementaktivering ble undersøkt ved å analysere forskjellige aktiveringsprodukter i komplementsystemene; C1r-C1s/C1-INH-komplekser (klassisk kaskade), C4d (aktivering av klassisk kaskade og lektin), C3bBbP (alternativ kaskade), samt det terminale komplementkomplekset TCC.

- Etter 30 minutters inkubasjon ble det observert en spontan økning i C1r-C1s/C1-INH komplekser, men tilsetning av mekonium gav ingen signifikant økning utover dette, noe som tyder på at den klassiske kaskaden ikke er sentral i denne reaksjonen.
- Tilsetning av mekonium til prøvene ga imidlertid en signifikant økning av C4d (klassisk og lektin komplementkaskadene), samt C3bBbP (den alternative kaskaden). I tillegg var det også en signifikant økning av TCC.
- For å se spesielt på om lektinkaskaden spiller en sentral rolle i komplementaktivering i denne situasjonen, ble det gjort forøk hvor mekonium ble tilsatt serum som inneholdt MBL i konsentrasjoner over 500 ng/ml. Etterpå ble både TCC og C4d analysert. Effekten av tilsatt inhibitorisk anti-MBL mAb 3F8 og ikke-inhibitorisk anti-MBL mAb 1C10 ble vurdert, og førstnevnte ga en signifikant reduksjon i produksjonen av C4d (63 % reduksjon, $p = 0,0159$), mens

sistnevnte ikke ga noen signifikant effekt. Da dette antistoffet har slik effekt, kan det tyde på at mekonium direkte aktiverer lektinkaskaden.

Mekonium aktiverer altså både lektin- og den alternative komplementkaskaden, og C1-inhibitor i suprafysiologiske mengder hemmer denne aktiveringen.

3.5 I hvilken grad er C1-inhibitor en god hemmer av komplementsystemet?

I de følgende avsnitt vil publikasjoner ved Mollnes, Nielsen og medarbeidere som ser på C1-INH sin effektivitet som hemmer av komplementsystemet bli presentert. De samlede og viktigste resultatene fra disse studiene er skjematisk fremstilt i tabell 2. De følgende stueiene presenteres:

- *Studie IV: «C1-inhibitor Attenuates Hyperacute Rejection and Inhibits Complement, Leukocyte and Platelet Activation in an ex vivo Pig-to-human Perfusion Model» (25).*
- *Studie V: «Candidate Inhibitors of Porcine Complement» (26).*
- *Studie VI: «Effect of Supraphysiologic Levels of C1-inhibitor on the Classical, Lectin and Alternative Pathways of Complement» (27).*
- *Studie VII: «Anti-inflammatory Effects of C1-inhibitor in Porcine and Human Whole Blood Are Independent of its Protease Inhibition Activity» (28).*

3.5.1 Studie IV – «C1-inhibitor Attenuates Hyperacute Rejection and Inhibits Complement, Leukocyte and Platelet Activation in an ex vivo Pig-to-human Perfusion Model»

En nyretransplantasjon ble imitert ved å ta ut nyrer fra 12 ulike griser, og deretter ble nyrene reperfundert med blod tilsatt C1-INH eller HSA (humant serum albumin, kontroll). Så ble det undersøkt i hvilken grad C1-INH kunne forsinke hyperakutt frastøtning. Seks nyrer ble perfundert med C1-INH og seks med HSA. Nyrene ble stabilisert mtp. oksygentilførsel, karbondioksidkonsentrasjon, elektrolytter, pH og temperatur før forsøkene ble satt i gang. Effekten av C1-INH vs. HSA ble målt i tid fra infusjon til frastøtning av organet. Frastøtning ble definert som 100% økning i vaskulær mostand, samt makroskopiske forandringer som synlig hevelse og blødninger. Underveis ble det målt ulike komplementaktiveringsprodukter for å undersøke effektiviteten av C1-INH. Etter 15, 60 og 180 minutter ble det målt C1r-C1-INH-

komplekser, C4bc (aktiveringsprodukt av C4), C3bc (aktiveringsprodukt av C3), samt TCC (tabell 2). Reperfusjon med blod tilsatt C1-INH økte overlevelsen av grisenyrene til en median tid på 327 minutter, sammenlignet med en median tid på 79 minutter i kontrollgruppen. Forskjellen var signifikant ($P < 0,00001$). I tillegg til at proteinet også hemmet den klassiske komplementkaskaden og genereringen av det terminale komplementkomplekset. C1-INH ga også en signifikant reduksjon i plateaktivering og aktivering av leukocytter.

3.5.2 Studie V – «Candidate Inhibitors of Porcine Complement»

I 2006 publiserte Mollnes, Nielsen og medarbeidere en studie hvor de ønsket å undersøke utvalgte komplementhemmere med tanke på effekt på komplementaktivering, samt at de ønsket å sammenligne de ulike hemmerne. Serum fra gris ble tilsatt enten zymosan (polysakkarid som aktiverer lektin- og den alternative kaskaden), HAIGG (heat aggregated immunoglobulin G, aktiverer den klassiske komplementkaskaden), eller E.coli. Til disse prøvene ble det tilsatt enten serinproteasehemmere (FUT-175 [syntetisk komplementhemmer, bl.a. brukt i behandling av pankreatitt i Japan], og C1-INH), monoklonale antistoffer fra mus (mAb; anti-faktor B og anti-faktor D), eller VCP (vaccinia complement control protein). Humant serumalbumin (HSA) ble brukt som kontroll. Ved å måle TCC anslo man effektiviteten av de ulike hemmerne (tabell 2). FUT-175 hemmet dannelsen av det terminale komplementkomplekset for alle aktivatorene av de ulike komplementkaskadene. C1-INH hemmet både lektinkaskaden og den alternative kaskaden, men til sammenligning var hemmingen av den klassiske komplementkaskaden mindre uttalt. For å inhibere dannelsen av TCC trengtes store mengder av proteinet. Anti faktor B ga en komplett hemming av lektinkaskaden, den hemmet også aktiveringen av den klassiske kaskaden, men ikke like effektivt. Faktor D ga en effektiv hemming av den alternative kaskaden, og sammenlignet med anti-faktor B trengtes en mindre konsentrasjon. VCP hemmet alle kaskadene ved relativt lave doser.

3.5.3 Studie VI – «Effect of Supraphysiologic Levels of C1-inhibitor on the Classical, Lectin and Alternative Pathways of Complement»

I 2007 ble det i et forsøk tilsatt C1-INH i suprafysiologiske mengder for å deretter undersøke effekten av dette i den klassiske komplementkaskaden, lektinkaskaden og den alternative kaskaden. Normalt humant serum ble tilsatt enten C1-INH, PBS (fosfat bufret saltvann), albumin eller EDTA (ethyemediaminetetraacetic acid).

Konsentrasjonene av C1-INH var 2,8 -, 14-, og 28 ganger normal konsentrasjon av C1-INH, hhv. 0,5 mg/ml, 2,5 mg/ml og 5,0 mg/gl. Albumin ble tilsatt i konsentrasjonene 0,5 mg/ml, 2,5 mg/ml og 5,0 mg/ml. For å registrere effekten av dette ble det målt C4 og TCC (27) (Tabell 2). C1-INH i suprafysiologiske mengder ga en signifikant hemming av både lektinkaskaden og den klassiske kaskaden. Effekten var størst i lektinkaskaden, hvor det også trengtes lavere doser for å oppnå signifikant effekt.

3.5.4 Studie VII – «Anti-inflammatory Effects of C1-inhibitor in Porcine and Human Whole Blood are Independent of its Protease Inhibition Activity»

I 2009 ble både serum og fullblod fra menneske og gris tilsatt C1-INH, iC1-INH, SPICE, eller compstatin, samt HSA (humant serumalbumin) som kontroll. SPICE er en komplementinhibitor og ble tilsatt blod fra gris, og compstatin er en tilsvarende hemmer av komplement og ble tilsatt prøvene fra menneske. Prøvene ble alle tilsatt E.coli for å indusere aktivering av komplement og gi en inflammatorisk respons. En rekke inflammasjonsmediatorer ble målt. C1-INH og iC1-INH gav signifikant reduksjon av en rekke cytokiner og andre proinflammatoriske mediatorer induert av E.coli. Denne effekten skyldes sannsynligvis ikke proteasehemming. Komplementaktiveringen ble vurdert ut fra målinger av TCC (Tabell 2). C1-INH viste kun moderat hemming av komplementkaskaden.

	Grad av komplementinhibering, målt ved TCC	
<i>C1-Inhibitor attenuates hyperacute rejection and inhibits complement [...] (25)</i>	C1-INH	Før: 0,7 AU/ml (KI 0,3 – 1,0) 0 min: 1,7 AU/ml (KI 0,2 – 3,1) 15 min: 3,0 AU/ml (KI 1,3 – 4,7) 60 min: 4,5 AU/ml (KI 2,4 – 4,7) 180 min: 7,7 AU/ml (KI 3,7 – 11,6)

		Ved frastøtning: 11,1 AU/ml (KI 5,7 – 16,4) (p-verdi <0,004 sammenlignet med før) C1-INH sammenlignet med albumin, p <0,001	
	Albumin, kontroll	Før: 0,6 AU/ml (KI 0,3 – 0,8) 0 min: 6,7 AU/ml (KI 0 – 13,9) 15 min: 16,9 AU/ml (KI 2,3 – 31,6) 60 min: 29,4 AU/ml (KI 0 – 75,0) Ved frastøtning: 27,8 (KI 14,4 – 41,1) (p- verdi <0,003 sammenlignet med før.	
<i>Candidate inhibitors of procine complement (26).</i>	C1-INH	Komplett inhibering, uttrykt som hemming av TCC, ved 16 mg (64 IE)/ml serum. Molaritet: $9,2 \times 10^{-4}$ (zymosan, HAIGG, E.coli)	
	FUT-175	Komplett inhibering, uttrykt som hemming av TCC, ved 0,2 mg/ml serum. Molaritet: $2,2 \times 10^{-3}$ (zyomsan, HAIGG, E.coli)	
	Anti faktor B	Komplett inhibering, uttrykt som hemming av TCC, ved 1 mg/ml serum. Molaritet: $4,0 \times 10^{-5}$ (zyomsan, HAIGG).	
	Anti faktor D	Komplett inhibering, uttrykt som hemming av TCC, ved 0,05 mg/ml. Molaritet: $2,0 \times 10^{-6}$ (zymosan), $5,1 \times 10^{-7}$ (HAIGG), $2,0 \times 10^{-6}$ (E.coli)	
	VCP	Komplett inhibering, uttrykt som hemming av TCC, ved 0,05 mg/ml serum. Molaritet: $1,1 \times 10^{-5}$ (zymosan. HAIGG, E.coli)	
<i>Effect of supraphysiological levels of C1 [...] (27). *</i>	[C1-INH] x2,8	K	a) 2 % reduksjon, ikke signifikant b) 23 % reduksjon, p >0,05 c) 12 % reduksjon, p >0,05
		L	a) 33 % reduksjon, p <0,001 b) 82 % reduksjon, p <0,001
		A	a) Ingen signifikant effekt b) 7 % reduksjon, p > 0,05
	[C1-INH] x14	K	a) 27 % reduksjon, p <0,05 b) 70 % reduksjon, p <0,001 c) 41 % reduksjon, p <0,001
		L	a) 77 % reduksjon, p <0,001 b) 82 % reduksjon, p <0,001
		A	a) Ingen signifikant effekt b) 59 % reduksjon, p <0,001
	[C1-INH] x28	K	a) 40 % reduksjon, p <0,001 b) 85 % reduksjon, p <0,001 c) 77 % reduksjon, p <0,001
		L	a) 86 % reduksjon, p <0,001 b) 81 % reduksjon, p <0,001
		A	a) Ingen signifikant effekt

			b) 87 % reduksjon, p <0,001
	C1-INH, funksjonell analyse av MBL/MASP	[C1-INH] x 1: 77 % reduksjon, p < 0,001 [C1-INH] x 3: 83 % reduksjon, p <0,001 [C1-INH] x 11: 86 % reduksjon, p <0,001 [C1-INH] x 21: 86 % reduksjon, p <0,001	
	Albumin, kontroll	Ingen signifikant effekt når tilsatt i ekvivalente konsentrasjoner som C1-INH i noen av forsøkene.	
	EDTA, kontroll	- 89 % reduksjon (klassisk kaskade, solid fase) - 81 % reduksjon (lektin, solid fase) - 93 % reduksjon (alternativ kaskade, solid fase) - 99 % reduksjon (alternativ kaskade, væskefase)	
	IgG	- 12 % reduksjon (alternativ kaskade, solid fase) - Ingen signifikant reduksjon (alternativ kaskade, væskefase)	
	Compstatin, kontroll	- 96 % reduksjon (klassisk kaskade, væskefase)	
<i>Anti-inflammator y effects of C1-inhibitor [...] (28)</i>	Serum	C1-INH	Gris: Inhiberte, men ikke signifikant. Humant: ingen signifikant effekt
		iC1-INH	Gris: ikke-signifikant økning av E.coli induert komplementaktivering. Humant: signifikant økning av E.coli induert komplementaktivering (p <0,001)
		SPICE	Inhiberte TCC til baseline
		Compstatin	Inhiberte TCC til baseline
	Fullblod	C1-INH	Gris: ingen signifikant effekt. Humant: Ingen signifikant effekt
		iC1-INH	Gris: signifikant økning av komplementaktivering,
		SPICE	Inhiberte TCC til baseline
		Compstatin	Inhiberte TCC til baseline

Tabell2: Skjematisk fremstilling av de viktigste resultatene fra de fire ovennevnte artikler, hvor effektiviteten av C1-INH er målt ved konsentrasjon av TCC (= terminalt komplementkompleks, C5b-9). Artiklene har brukt ulike fremstillinger, slik at tallene har ikke blitt videre sammenlignet annet enn skjematisk fremstilt. Resultatene av C1-INH er markert i blått. * I tabellen er pkt. a) for de ulike kaskadene tilsvarende forsøk i solid fase, men hvor serum er tynnet ut 1:101, pkt. b) er solid fase med mindre uttynning av serum, men konsentrasjoner tilnærmet like fysiologiske forhold. Pkt. c) er i væskefase.

Også i *studie III* (23) hvor man så på mekoniumindusert inflammasjon og aktivering av komplement fra 2009, som allerede er nevnt i avsnitt ovenfor, ble det også undersøkt hvilken effekt C1-INH hadde på denne aktiveringen. C1-INH ga doseavhengig reduksjon av en rekke proinflammatoriske cytokiner: TNF- α (64 % reduksjon ved 50 E C1-INH, $p < 0,0099$), IL-1 β (66% reduksjon ved 50 E C1-INH, $p = 0,0046$), IL-6 (74 % reduksjon ved 50 E C1-INH, $p = 0,0005$) og IFN- γ (53 % reduksjon ved 50 E C1-INH, $p = 0,0099$) sammenlignet med albumin. 10 E/ml C1-INH ga en signifikant reduksjon i dannelsen av C1r-C1s/C1-INH-komplekser ($p = 0,0002$), i tillegg ga C1-INH doseavhengig reduksjon av C4d sammenlignet med albumin ($p = 0,0017$). C1-INH tilsatt i konsentrasjonen 50 E/ml reduserte dannelsen av C3bBbP med 90 %, og C1-INH bremsset mekoniumindusert dannelse av TCC sammenlignet med albumin ($p = 0,001$), samt reduserte TCC med 70 % når tilsatt i konsentrasjonen 50 E/ml.

3.6 C1-inhibitor. Funksjon i kallikrein-kinin-systemet

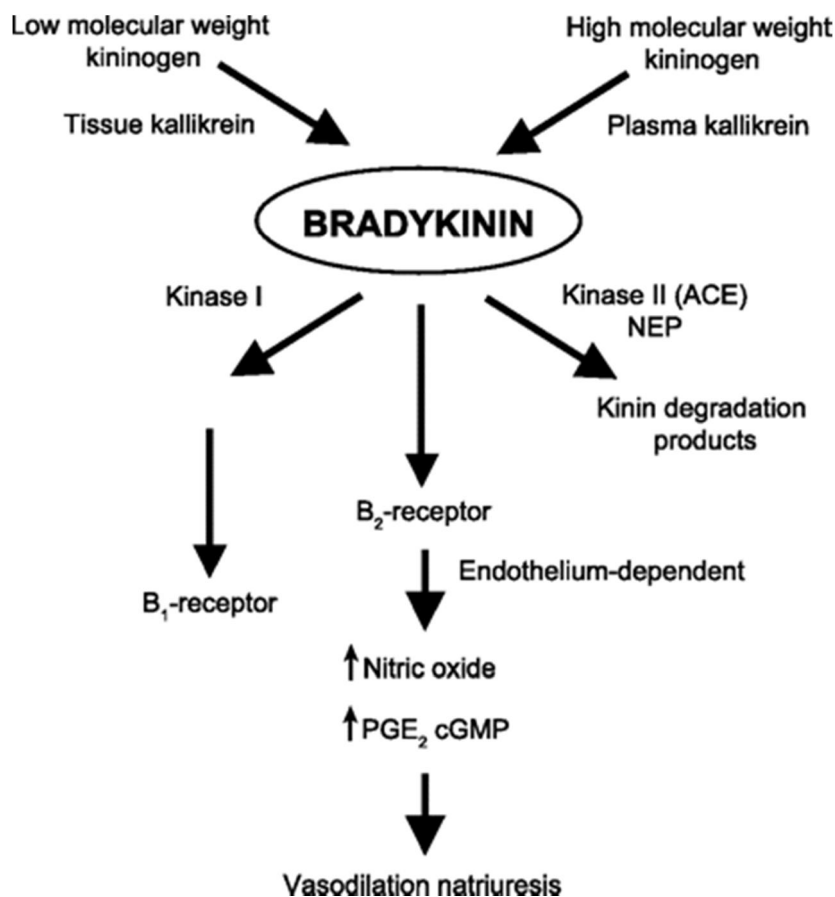
Kallikrein-kinin-systemet er en enzymatisk kaskade i plasma som består av fire forskjellige proteiner; de tre zymogenene faktor XII (FXII), faktor XI (FXI) og prekallikrein, samt høymolekylærvekt kininogen (HK) som er en ikke-enzymatisk kofaktor. Dette systemet aktiveres når FXII kommer i kontakt med en negativt ladd overflate, og blir til FXIIa. Aktiveringen av FXII til FXIIa kan ha to ulike konsekvenser; aktivering av koagulasjonskaskaden via den interne koagulasjonskaskaden og/eller aktivering av kallikrein-kinin-systemet via prekallikrein, som til slutt fører til dannelse av bradykinin (29). HK er et substrat for denne prosessen: kallikrein spalter HK og frigjør bradykinin (Fig. 2). I tillegg til å generere bradykinin fra HK, virker aktivert kallikrein via en positiv feedback mekanisme og aktiverer mer FXIIa fra FXII, samt at det bidrar i dannelsen av urokinase (30).

C1-INH er, i tillegg til α 2-makroglobulin, en inhibitor for kallikrein, og er dermed med på å regulere aktiviteten til kallikrein. Rundt 50 % av aktivt kallikrein danner komplekser med C1-INH (31). Inaktiveringsraten er høyere når C1-INH danner komplekser med kallikrein enn med α 2-makroglobulin. I tillegg er det også vist at det ikke er noen forskjell i inaktiveringen av kallikrein i plasma som ikke har kininogen (HK) i seg og

plasma hvor kininogen har vært tatt bort og deretter tilsatt igjen, slik at det antas at dette molekylet ikke har noen beskyttende effekt hva angår inhibering av kallikrein (32).

3.6.1 Bradykinin

Bradykinin er en vasodilaterende substans som er med på å regulere blodtrykk, samt at bradykinin kan gi plasmalekkasje, være involvert i inflammasjon og gi bronkokonstriksjon. Effekten medieres via binding til bradykininreseptorene B1 og B2. Sistnevnte er til stede i mange vev, og er til vanlig den reseptoren som brukes, mens B1 oppreguleres ved inflammasjon. Når bradykinin binder til B2, vil den G-proteinkoblede reseptoren bringe signaler videre. Det fører til at endotelet hvor reseptorene finnes frigir nitrogenmonoksid (NO) og prostacyclin. Disse virker vasodilaterende og gir økt plasmalekkasje i kapillærer og venoler. Bradykinin har en ekstremt kort halveringstid grunnet nedbrytning via enzymer som for eksempel angiotensinkonverterende enzym (ACE), og derfor er det vanskelig å måle mengden bradykinin i plasma. Ved å tilsette bradykinin i plasma har man derimot kunne påvise økt utskillelse av NO i utåndet luft hos griser, samt reduksjon i perifer karmotstand (33,34). Bradykinin er sentral i patofysiologien bak hereditært angioødem, som vi kommer tilbake til senere.



Figur 2 viser en skjematisk fremstilling av dannelsen av bradykinin (35).

3.7 C1-inhibitor. Funksjon i koagulasjonskaskaden og fibrinolysen

Den interne koagulasjonskaskaden aktiveres ved at FXIIa omdanner FXI til FXIa, og som deretter aktiverer koagulasjonskaskadens faktor IX. Faktor IX vil sammen med fosfolipid, Ca^{2+} -ioner og FVIII som er kofaktorer, danne et kompleks som er i stand til å aktivere faktor X i koagulasjonen. Den aktive formen av faktor X kan omdanne protrombin til trombin (36), hvorpå trombin igjen aktiverer fibrinogen til fibrin.

C1-INH er en viktig hemmer for aktiveringen av FXIa, og indirekte påvirker dette koagulasjonskaskaden. Andre serpiner som har denne effekten inkluderer α 2-antiplasmin og α -1-antitrypsin. Også antitrombin har en hemmende effekt, men man antar altså at C1-INH er mest effektiv når det gjelder hemming av FXIa (37).

En viktig del av normal hemostase er evnen til å bryte ned en trombe for å forhindre en varig propp. Tissue type plasminaktivator (tPA) og urokinase type plasminaktivator (uPA) fører begge til aktivering av plasminogen til plasmin, som igjen har som oppgave å bryte ned dannet fibrin. Når bradykinin dannes ved aktivering av kontaktsystemet, vil denne mediere frisetting av både tPA og uPA fra endotelceller, i tillegg kan også kallikrein direkte aktivere uPA (38).

Den viktigste hemmeren av plasmin er α -2-antiplasmin. Kompleksdannelse med andre inhiberende molekyler, slik som α -2-makroglubulin, α -1-antitrypsin og C1-INH har noe hemmende effekt, men denne er liten (39).

3.8 C1- inhibitor. Effekt på koagulasjonskaskaden i forsøk med humant fullblod

I de følgende avsnittet vil to studier ved Mollnes, Nielsen og medarbeidere som involverer koagulasjon og fibrinolyse presenteres:

- *Studie VIII: «C1-inhibitor Efficiently Inhibits Escherichia coli-induced Tissue Factor mRNA up-regulation, Monocyte Tissue Factor Expression and Coagulation Activation in Human Whole Blood» (40)*
- *Studie IX: «C1-inhibitor Efficiently Delays Clot Development in Normal Human Whole Blood and Inhibits Escherichia coli-induced Coagulation Measured by Thromboelastometry» (41).*

3.8.1 Studie VIII – «C1-inhibitor Efficiently Inhibits Escherichia coli-induced Tissue Factor mRNA up-regulation, Monocyte Tissue Factor expression and Coagulation Activation in Human Whole Blood»

I 2013 gjorde Mollnes, Nielsen og medarbeidere et forsøk hvor de så på effektene av C1-INH på E.coli- induert inflammasjon og hemostase (40). Tissue faktor (TF) er en av de viktigste aktivatorene av koagulasjonen, det uttrykkes blant annet på monocytter, og bakterier, og cytokiner kan øke uttrykket av TF på disse cellene. TF er en viktig kofaktor for faktor VIIa; sammen kan de katalysere dannelsen av store mengder FXa og FIXa. Samtidig kan trombin som genereres av celler som har TF også aktivere blodplater og

faktor V. Prøver med humant fullblod ble tilsatt enten E.coli eller lipopolysakkardier (LPS) fra E.coli, og til disse prøvene ble det igjen tilsatt C1-INH eller inaktivert C1-INH.

- De fant at protrombin F1-2 (PTF1-2) økte kun i liten grad etter tilsetning av negativ kontroll (PBS), fra 0,19 nmol/l til 0,65 nmol/l. Ved inkubasjon med LPS i konsentrasjonen 100 nmol/l, økte PTF1-2 8,5 ganger fra 0,65 nmol/l til 5,6 nmol/l. Ved tilsetning av C1-INH ble dette reversert til 0,65 nmol/l ($p < 0,05$). Compstatin hadde samme effekt.
- Ved inkubasjon med E.coli økte PTF1-2 fra 1,5 nmol/l til 12,1 nmol/l. Tilsetning med C1-INH reverserte dette, og gav de samme nivåene som før inkubasjon med E.coli ($p < 0,05$). HSA som negativ kontroll hadde ingen effekt.
- Nivået av TF mRNA ble også undersøkt. Målingene ble gjort ved PCR, og angitt til relative kvantiteter beregnet ut fra nivået hos negativ PBS kontroll. Nivået av TF mRNA i PBS kontroll var da lik 1 RQ («relative quantity»). Etter inkubasjon med LPS økte mRNA fra 1 RQ til 5,9 RQ, og inkubasjon med E.coli ga en økning fra 1 RQ til 6,5 RQ. C1-INH reduserte TF mRNA til utgangsnivået ($p < 0,05$).

Inaktivert C1-INH reduserte LPS-indusert PTF1-2 fra 20,5 nmol/l til 3,4 nmol/l, men funnet var ikke statistisk signifikant. IC1-INH reduserte PTF1-2 konsentrasjonen induert av E.coli signifikant (sagt å være signifikant, men p-verdi ikke oppgitt). IC1-INH ga økt uttrykk av TF mRNA som allerede var økt ved inkubasjon med både LPS og E.coli. LPS og E.coli ga økte nivåer av IL-8 (hhv. 309 pg/ml til 1933 pg/ml og 309 pg/ml til 3784 pg/ml). Ved tilsettelse av iC1-INH økte utskillelsen av IL-8 induert av LPS signifikant ($p < 0,05$), samtidig som det ikke var noen signifikant effekt på IL-8 induert av E.coli.

3.8.2 Studie IX – «C1-inhibitor Efficiently Delays Clot Development in Normal Human Whole Blood and Inhibits Escherichia coli-induced Coagulation Measured by Thromboelastometry»

I 2016 publiserte Mollnes, Nielsen og medarbeidere en artikkel som handlet om C1-INH sin effekt på koagulasjonstid, samt hvilken effekt C1-INH har på dannelsen av tromber i blod som er inkubert med E.coli, og som sådan etterligner en situasjon med sepsis (41). ApTT (aktivert partiell tromboplastintid) analyserer funksjonen til den interne koagulasjonskaskaden og er følsom for fibrinogen, protrombin, samt faktorene V, VIII,

IX, X, XI og XII, prekallikrein og høymolekylærvekt kininogen (42). I denne studien ble apTT brukt som mål, i tillegg til INR og tromboelastometri. Platefunksjonen ble også målt. Blod fra donorer ble tilsatt enten C1-INH i økende konsentrasjoner, eller HSA (humant serum albumin, negativ kontroll) i tilsvarende mengder. En høy dose C1-INH, 47,6 μM , ga økt aPTT fra 44 s til 79 s ($p < 0,05$), og sammenlignet med HSA i lik konsentrasjon var funnet signifikant ($p = 0,0002$). Det var ingen effekt på INR. C1-INH ga en doseavhengig økning fra 789 s til 2015 s ved NATEM-testen ($p < 0,05$) når man tilsatte den høyeste konsentrasjonen.

Alfavinkelen ved NATEM-testen (tromboelastometri) som reflekterer viskositeten/kvaliteten til den dannede blodproppen, ble redusert fra 47° til 28° når C1-INH ble tilsatt i en konsentrasjon av 47,6 μM ($p < 0,05$), sammenlignet med HSA var også forskjellen signifikant ($p = 0,0313$). En doseavhengig økning av koagulasjonstiden, også målt ved NATEM, fra 261 s til 595 s ble også målt ($p < 0,05$). INTEM analysene som gjenspeiler koagulasjonen i den interne kaskaden viste økt koagulasjonstid fra 191 s til 309 s ($p < 0,05$). Alfavinkelen ble redusert fra 73° til 62° , og tiden til proppdannelse økte fra 98 s til 152 s ($p < 0,05$). Alle resultatene var ved C1-INH tilsatt i høyeste konsentrasjon. C1-INH hadde ikke signifikant på EXTEM som gjenspeiler ekstern koagulasjonsaktivering, men alfavinkelen ble redusert fra 69° til 55° ($p < 0,05$), samt tiden til proppdannelse økte fra 114 s til 222 s ($p < 0,05$). C1-INH ga også en signifikant reduksjon av fibrinolyse.

I samme forsøk ble det gjort målinger av koagulasjonstid i prøver som var preinkuberte med E.coli, for å kunne etterligne en situasjon med sepsis, og hvilken effekt C1-INH har i forhold til koagulasjonstid. I en konsentrasjon på $10^8/\text{ml}$ ga E.coli en reduksjon i koagulasjonstid målt med NATEM, fra 622 s til 120 s, og sammenlignet med en aktivator av koagulasjon som ga en reduksjon fra 873 s til 500 s, var E.coli en mer potent aktivator av trombedannelse. Samtidig økte også alfa vinkelen fra 44° til 66° , som indikerer en mer stabil propp. Ved tilsettelse av C1-INH ble disse effektene fullstendig reversert.

3.9 Hereditært angioødem

3.9.1 Patogenese

Angioødem er en lokalisert hevelse i hud eller slimhinner som oppstår på grunn av forflytning av væske ut i det interstitielle rom. Angioødem kan opptre isolert, assosiert med urticaria og pruritus, eller som en del av symtombildet ved anafylaktisk sjokk. Det medieres enten av mastceller som rekrutteres ved eks. inflammatoriske og allergiske reaksjoner, eller ved frigjøring av bradykinin (43):

- Ved mastcellemediert angioødem frigjør cellene blant annet histamin, heparin, leukotrien C4 og prostaglandin D2 som gir økt permeabilitet i lokale kapillærer og vener, som igjen gir økt plasmalekkasje og hevelse på det aktuelle stedet. Mastcellemediert angioødem er gjerne assosiert med urticaria og pruritus, og det kan effektivt behandles med antihistaminer og/eller glukokortikoider (43).
- Bradykininmediert angioødem oppstår ved overproduksjon av bradykinin eller ved fravær av hemming av bradykinin, som igjen fører til plasmalekkasje og lokal hevelse fordi permeabiliteten i kapillærer og vener øker. Denne formen for angioødem er ofte ikke assosiert med urticaria og kløe, og det kan heller ikke behandles på samme måte med antihistaminer eller glukokortikoider (43).

Hereditært angioødem er en sykdom som skyldes mutasjoner i ett av de to allelene som koder for C1-INH. Bare ett friskt allel gir for lave konsentrasjoner av normalt fungerende C1-INH, og det gjelder både HAE type 1 og 2. Ved type 2 HAE lages et ikke-funksjonelt C1-INH-protein fra det syke allelet i tillegg. Sykdommen er karakterisert av gjentatte episoder med angioødem som kan ramme ulike deler av kroppen.

Ved HAE er det bradykininmediert ødem som antas å være sentral i patogenesen. C1-INH er en viktig regulator av kaskaden som generer bradykinin; fravær av hemming ved C1-INH tidlig i kinin- kallikreinkaskaden gir økt produksjon av bradykinin, noe som medfører typiske anfall av hevelser. Anfallene er selvbegrensende og varer typisk 2 – 5 dager, de kan variere i alvorlighetsgrad og affisere ulike deler av kroppen. De vanligst affiserte områdene er hud, gastrointestinaltraktus og larynx. Prevalensen av HAE angis å

være ca. 1 pr. 50 000. Kvinner og menn er like ofte affisert, og det er ikke noen signifikant forskjell i prevalens mellom ulike etniske grupper. HAE debuterer ofte i barne- og ungdomsårene, men ofte har pasientene hyppigere anfall etter tenårene.

3.9.2 Type 1 og type 2

HAE deles inn i to undergrupper basert på konsentrasjon av C1-INH, funksjonelt C1-INH og komplementfaktor 4. For mest mulig nøyaktig diagnostikk anbefales det å måle konsentrasjon av C1-INH, nivå av funksjonelt C1-INH og C4, og deretter sammenfatte disse prøvesvarene for å sette korrekt diagnose:

HAE type 1 karakteriseres ved lave konsentrasjoner av C1-INH som kommer fra det friske allelet. Det syke allelet produserer ikke C1-INH som fanges opp i antigene målinger. Det er derfor også lave konsentrasjoner av funksjonelt C1-INH, samt lave konsentrasjoner av C4. Dette er samtidig den vanligste formen for HAE da den sees hos ca. 85 % av pasientene (10).

HAE type 2 karakteriseres av normale eller forhøyede verdier av antigen-C1-INH. Det normale allelet lager C1-INH, og det syke allelet lager et dysfunksjonelt protein som gir lave konsentrasjoner av funksjonelt C1-INH og lave konsentrasjoner av C4, men høye verdier av C1-INH målt antigen. Årsaken til at det noen ganger kan være forhøyede plasmakonsentrasjoner av C1-INH ved HAE 2, er at det dysfunksjonelle proteinet ikke binder seg til proteaser, og at det derfor har en noe lengre halveringstid i plasma (10).

3.9.3 Biokjemisk diagnostikk

[C1-INH]	For å bestemme mengde av C1-INH i serum brukes gjerne immunokjemiske analysemetoder, eks. nefelometri (brukes ved Oslo Universitetssykehus), turbidimetri eller radial immunodiffusion, med spesifikke antistoffer mot C1-INH (44). Referanseområde: 0,16 – 0,38 g/L (45).
----------	---

<p>Funksjonelt C1-INH</p>	<p>Kan bestemmes ved kromogene analyser for å bestemme konsentrasjonen av funksjonelt C1-INH; C1s i kjent mengde tilsettes en plasmaprøve med C1-INH. Etter inkubasjon i 5-15 minutter tilsetter man fargestoffer som binder seg til den mengden C1s som ikke har dannet kompleks med C1-INH. Ved å beregne forskjellen mellom tilsatt mengde C1s og gjenværende mengde C1s, kan man anslå hvor mye funksjonelt C1-INH som finnes i den aktuelle prøven. Ved HAE er mengden fC1-INH ofte mellom 3 – 50 %. (46). Denne metoden gir flere falsk positive resultater sammenlignet med ELISA (44)</p> <p>Mengden funksjonelt C1-INH kan også bestemmes ved ELISA, basert på bindingen mellom C1-INH og C1s. C1s blir merket med biotin og tilsatt en prøve med C1-INH, og man kan deretter bestemme andelen kompleksdannelse med ELISA. Denne prøvemethoden har flere falske negative resultater sammenlignet med den den kromogene målemetoden (44).</p> <p>Referanseområde: ≥ 68 % (45) (metodeavhengig, ved OUS brukes ELISA).</p>
<p>C4</p>	<p>Ved mangel/dysfunksjonelt C1-INH vil det være begrenset inhibering av C1 i komplementkaskaden, og den vil derfor kunne kløyve store mengder C4 uten at denne aktiviteten blir regulert, noe som medfører lavere konsentrasjon av C4 i plasma. Konsentrasjonen av C4 måles i likhet med C1-INH med nefelometri (47).</p> <p>Referanseområde 0,10 – 0,50 g/L (47).</p>

Tabell 3: viser en skjematisk oversikt over de tre viktigste biokjemiske analysene for diagnostikk av HAE, de vanligste målemetodene for disse, samt referanseområder.

3.9.4 Genetikk

Begge formene for HAE viser autosomal dominant arvegang, men rundt 25 % av pasientene har vist seg å ha en ny mutasjon, slik at det trenger ikke alltid å være en positiv familieanamnese hos disse pasientene. Nesten alle pasientene er heterozygote, altså er det kun ett affisert allel (48). Ut fra dette vil man teoretisk sett forvente at produksjonen av proteinet er redusert til 50 %, men flere målinger viser at nivået av funksjonelt C1-INH kan være så lavt som 3 – 30 % hos HAE-pasientene. En av grunnene til dette er at evnen til å regulere alle kaskadene der C1-INH inngår blir redusert, noe som gir påfølgende økt forbruk av enzymer i reguleringsystemene, og resterende mengde C1-INH vil bli bundet til disse, og deretter eliminert fra plasma (10).

3.9.5 Behandling

Behandlingen av HAE er todelt; forebygging av anfall (profylaktisk behandling, både kortsiktig og langsiktig), og behandling av akutte anfall.

Akutte anfall behandles med enten plasmaderivert C1-INH (pdC1-INH) (førstevalg), rekombinant C1-INH (kort halveringstid) eller andre medikamenter, Icatibant (bradykininreseptorantagonist) og Ecallantide (kallikrein-antagonist). Hvis angioødemet er lokalisert til hud utenom ansikt og hals kan man vente og se om det går over av seg selv, men om hevelsene er i ansiktet eller ved halsen bør det behandles. Abdominale anfall og anfall som er lokalisert til larynx skal behandles for å unngå en ofte svært vanskelig intubasjon (49–51).

Langtidsprofylaktisk behandling bør startes hvis pasienten har mer enn ett alvorlig HAE-anfall per måned, eller hvis tidligere anfall har vært vanskelige å behandle. Til dette kan man bruke plasmaderivert C1-INH, androgener eller antifibrinolytiske midler som traneksamsyre. PdC1-INH er et dyrere alternativ enn de andre, men er blant annet førstevalg hos pasienter som er gravide. Androgener har en god forebyggende effekt, eks. Danazol (registreringsfritak i Norge) eller Stanzolol, og disse tolereres av de fleste pasienter om dosen er lav. Androgener og har samtidig en bedre effekt enn antifibrinolytiske midler. Tranexamsyre er også et alternativ, men er minst effektiv av

de nevnte alternativene når det kommer til å forebygge anfall. Behandlingen tolereres godt hos barn, men man bør være forsiktig med denne typen behandling om pasienten i tillegg har forhøyet risiko for tromboemboliske hendelser, eller tidligere har hatt en blodpropp (49,50). Det finnes tre plasmaderiverte C1-INH- konsentrater tilgjengelig; Berinert, Cinryze og Ceter. Sistnevnte er kun godkjent for bruk i Nederland.

Berinert® er plasmaderivert humant C1-INH. Det finnes tilgjengelig med 500 IE C1-INH eller 1500 IE C1-INH. Konsentratet brukes for å behandle akutte anfall av HAE eller som korttidsforebygging av anfall før planlagte medisinske inngrep eller prosedyrer, samt ved dentale inngrep. Hvis en pasient får et akutt anfall av HAE, gis 20 IE pr. kg kroppsvekt, dette gjelder både voksne og barn. Som forebygging av anfall gis 1000 IE mindre enn seks timer før inngrep/ prosedyre, tilsvarende gis det 15-30 IE pr. kg til barn. Maks konsentrasjon i plasma oppnås etter 0,8 timer, gjennomsnittlig halveringstid for 1500 IE er 87, timer, og 91,4 timer for 500 IE. Hos barn og ved mer alvorligere anfall er halveringstiden noe kortere (52).

Cinryze® er et annet plasmaderivert humant C1-INH- konsentrat som brukes i behandling av akutte anfall, ved kortsiktig forebygging av anfall, samt langtidsforebygging av anfall hos pasienter som har tilbakevendende alvorlige anfall, og hvor annen langtidforebyggende behandling har dårlig effekt. I motsetning til Berinert er det ikke fastslått sikre doseringsanbefalinger for Cinryze, slik at det er indisert til bruk hos barn eldre enn 12 år. Ved begynnende tegn til HAE-anfall eller ved manifest anfall gis 1000 IE som injeksjon, og ved uteblitt bedring av symptomer kan ny dose gis innen 60 minutter. Ved anfall som omfatter larynx, eller hvis behandlingsoppstart er forsinket, kan dose nummer to gis før det har gått 60 minutter. Ved rutinemessig forebygging av angioødemfall anbefales oppstart med 1000 IE hver 3.-4. dag, men intervallene mellom dosering kan justeres til den enkelte pasient basert på alvorlighet og hyppighet av anfall. Ved forebygging før medisinske prosedyrer anbefales 1000 IE. Ved administrasjon av 500 IE øker konsentrasjonen av funksjonelt C1-INH til det dobbelte i løpet av 1-2 timer. Halveringstiden er 56 timer etter injeksjon av 500 IE, og

62 timer etter injeksjon av 1000 IE. Maks konsentrasjon i plasma nås etter ca. 1,2 timer (53).

Cetor® er et tredje alternativ av plasmaderivert C1-INH, som er godkjent for bruk i Nederland. Det er et nanofiltrert produkt, med en halveringstid på ca. 40 timer. Den brukes ved akutte anfall av HAE, og gis i doser på 1000 IE intravenøst, som kan gjentas etter 60 minutter ved uteblitt effekt (54).

Conestat alfa (Ruconest®) er rekombinant C1-INH som utvinnes fra melken til genmodifiserte kaniner, og det brukes kun ved akutte HAE-anfall. Dosen justeres i forhold til vekt, og med en kroppsmasse under 84 kg anbefales 50 IE pr. kilo, mens ved en vekt på over 84 kg gis 4200 IE. Da den rekombinante varianten av C1-INH ikke inneholder like mange karbohydratgrupper, har den en mye kortere halveringstid på kun to timer. Den kan derfor ikke brukes til langtidsprofylakse (55).

Icatibant (Firazyr®) er en bradykinin 2- reseptorantagonist som brukes ved akutte HAE-anfall. Den settes subkutant i en dose på 30 mg, som hvis nødvendig kan gjentas inntil to ganger pr. døgn, men med minst 6 timer mellom hver injeksjon. Icatibant er et decapeptid som har 5 færre aminosyrer enn BK, og som dermed ikke danner et aktivt protein, men det fungerer som en kompetitiv reseptorantagonist og hindrer binding av bradykinin til B2- reseptoren, samtidig gjør den modifiserte BK- strukturen den resistent mot nedbrytning av proteaser. Halveringstiden er 1 – 2 timer (56).

Ecallantide (Kalbitor®) er en kallikreinantagonist som fører til nedsatt dannelse av bradykinin. Medikamentet gis subkutant i en dose på 30 mg, og kan gjentas innen 24 timer. Indikasjon for bruk er akutte anfall av HAE, men medikamentet markedsføres ikke i Norge. Ecallantide utvinnes fra gjærsopp, og er assosiert med hypersensitivitet og anafylaktiske reaksjoner hos opptil 4 % av pasientene (57).

3.10 Studier ved Mollnes, Nielsen og medarbeidere om areditært angioødem

I det følgende avsnittet vil det bli presentert ulike studier av Mollnes, Nielsen og medarbeidere om areditært angioødem. Enten i forhold til biokjemiske diagnostiske analyser, diagnostikk av nyfødte og genetikk, eller fremstilling av C1-inhibitor rekombinant:

- *Studie X: «Effect of Time, Temperature and Additives on a Functional Assay of C1-inhibitor» (58)*
- *Studie XI: «A Neoepitope-based Enzyme Immunoassay for Quantification of C1-inhibitor in Complex With C1r and C1s» (59)*
- *Studie XII: «C1-inhibitor and Diagnosis of Hereditary Angioedema in Newborns» (60)*
- *Studie XIII: «Identification of a C → T Mutation in the Reactive-site Coding Region of the C1-inhibitor Gene and its Detection by an Improved mutation-specific Polymerase Chain Reaction Method» (61)*
- *Studie XIV: «C3 is Activated in Hereditary Angioedema, and C1/C1-inhibitor Complexes Rise During Physical Stress in Untreated Patients» (62)*
- *Studie XV: «Expression of Active Human C1-inhibitor Serpin Domain in Escherichia coli» (63)*

Helt til slutt presenteres en studie om iskemisk reperfusjonsskade og C1-INH:

- *Studie XVI: «C1-inhibitor Reduces the Ischemia –Reperfusion Injury of Skeletal Muscles in Mice After Aortic Cross-clamping» (64)*

3.10.1 Studie X – «Effect of Time, Temperature and Additives on a Functional Assay of C1 inhibitor»

I 1994 så forskergruppen ved Mollnes og Nielsen på hvordan ulike parametre spiller inn på analysene av C1-INH og funksjonelt C1-INH for å kunne gi anbefaling om hvordan prøver til slik analyse bør håndteres. Det er særlig aktuelt i Nord-Norge hvor slike prøver ofte må sendes over lange avstander for analyse. Det ble tatt prøver fra pasienter med HAE type 1 og friske. Plasma ble deretter tilsatt enten EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid), heparin, natriumcitrat eller polybrene-EDTA og deretter analysert. Det ble også gjort analyser av serum uten tilsetning. For å bedømme tidsaspekt og

temperatur for analysene ble disse gjort umiddelbart etter tining fra -70° , etter 6 timer ved 4° , etter 6 timer ved 37° , etter 24 timer ved 4° og etter 24 timer ved 37° .

	EDTA		Heparin		Natriumcitrat		Polybrene-EDTA		Serum	
	Frisk	HAE	Frisk	HAE	Frisk	HAE	Frisk	HAE	Frisk	HAE
24 t, 4°	14 %	39 %	8 %	35 %	5 %	68 %		57 %	9 %	80 %
24 t, 37°	12 %	83 %	19 %	48 %	13 %	50 %		76 %	13 %	78 %

Tabell 4: viser den prosentvise reduksjonen i C1-INH funksjon ved ulike temperaturer etter 24 timer.

Det var en signifikant reduksjon i nivået av funksjonelt C1-INH både i kontrollgruppa ($p = 0,039$) og gruppa med HAE type 1 pasienter ($p = 0,0002$) når lagringstida økte, men det var ingen signifikant forskjell mellom temperaturene prøvene ble lagret i, selv om det ble rapportert en tendens til noe mindre reduksjon av funksjon i prøvene som ble lagret i 4° .

Funksjonen til C1-INH varierte med ulike tilsetninger i prøvene. Funksjonen var signifikant høyere i serum og prøver tilsatt EDTA eller heparin sammenlignet med natriumcitrat ($p = 0,0003 - 0,0025$) hos friske. I prøvene fra pasienter med HAE var forskjellene mindre. Serumprøver, plasma tilsatt EDTA og plasma tilsatt heparin hadde kun noe høyere C1-INH-funksjon sammenlignet med citrert plasma. Funnene var enten ikke signifikante eller kun marginalt signifikante ($p = 0,055 - 0,809$). Forskjellen mellom plasmaprøvene med citrat og de andre prøvene kan mest sannsynlig tilskrives en uttynnende effekt når man tilsetter citrat grunnet økt volum ekstracellulært, noe som ikke er tilfellet når man tilsetter de andre stoffene. Studien viste imidlertid at det var forskjell mellom prøver tatt av friske og pasienter med HAE, slik at de skiller godt mellom disse. Ut fra dette anbefalte de også at prøver burde være mottatt til analyse innen 48 timer.

3.10.2 Studie XI – «A Neoepitope-Based Enzyme Immunoassay for Quantification of C1-inhibitor in Complex with C1r and C1s»

I 1997 gjorde forskningsgruppen i Bodø en studie for å finne en metode for å spesifikt og sensitivt bestemme mengden C1-INH i kompleks med C1r og C1s, for å detektere tidlig komplementaktivering. Når C1-INH binder seg til C1r-C1s blir en ny epitop (del av et biomolekyl som er angrepspunkt for en immunrespons) eksponert, og denne epitopen eksponeres ikke på ubundet C1-INH. Ved å bruke spesifikke monoklonale antistoffer fra mus som binder seg til denne epitopen, kan man bestemme mengden C1-INH-C1r-C1s. Komplekset vil fanges av det monoklonale antistoffet, og etter skylling av prøven kan et andre antistoff tilsettes for å avgjøre hvor stor mengde komplekser som er dannet. I forsøket ble prøver med normalt humant serum tilsatt varmeaggregert IgG (HAIGG) for å aktivere den klassiske komplementkaskaden. Det monoklonale antistoffet MoAb Kok 12 er spesifikt for en neoepitop som eksponeres på C1-INH bundet til C1r-C1s, og andre proteaser. Målemetoden ble testet ut ved å aktivere komplementkaskaden med HAIGG (heat aggregated IgG). Standardprøven var anslått å ha aktiveringsprodukter tilsvarende 1000 AU/ml. Den nedre deteksjonsraten for kompleksene var satt til 0,05 AU/ml, noe som tilsvarer 0,05 %. Prøvene viste en variasjon på 12 % (variasjonskoeffisient).

3.10.3 Studie XII – «C1-inhibitor and Diagnosis of Hereditary Angioedema in Newborns»

Tidlig diagnostikk av HAE er viktig, da anfallene kan være svært alvorlige, samt at rett behandling må gis ved anfall. I 1994 gjorde forskningsgruppen i Bodø en studie for å se på muligheten for å diagnostisere HAE hos nyfødte. Mengden C1-INH antigen er lavere hos nyfødte enn hos voksne, men mange av komplementfaktorene øker i mengde i løpet av barnets første leveuker. På tidspunktet studien ble gjennomført fantes det ikke referanseområder for C1-INH for nyfødte. Studien ble gjort ved å gjøre diverse målinger fra umbilikalt blod fra 80 nyfødte som ble inkludert, hvorav to av spedbarna hadde mødre med HAE, hhv. baby 1 og baby 2. Deretter ble C1-INH antigenkonsentrasjoner bestemt, i tillegg til at funksjonelt C1-INH også ble analysert. C4 ble også bestemt. Mødrene som hadde HAE fikk infusjon med 1000 IE C1-INH som profylakse før fødsel, men sannsynligvis påvirket dette ikke navlestrengsanalysene da proteinet ikke går over i føtal sirkulasjon. De fant at nivået av C1-INH hos nyfødte er 60 – 100 % av nivået hos voksne (tabell 5). Babyen som hadde lave nivåer av både C1-INH, funksjonelt C1-INH og

C4 (baby 2), hadde en episode med magesmerter og vandig diaré ved 19 måneders alder. Ingen årsak ble funnet da babyen ble lagt inn på lokalsykehus. Symptomene vedvarte i 4 uker, men gav seg 6 timer etter en infusjon med 500 IE C1-INH etter overflytting til sentralsykehus.

	Median verdi	2,5 – 97,5 persentil
C1-INH antigen	0,17 g/L	0,11 – 0,22g/L
Funksjonelt C1-INH	64,5 %	47,2 – 85,9 %

Tabell 5: viser verdiene av C1-antigen og fC1-INH hos de friske nyfødte i studien.

		Baby 1	Baby 2
C1-INH	Fødsel	0,12 g/L	< 0,05 g/L
	6 mnd.	0,24 g/L	0,13 g/L
fC1-INH	Fødsel	61,8 %	34,3 %

Tabell 6: viser verdiene av C1-INH og fC1-INH til barna født av mødre med HAE

3.10.4 Studie XIII – «Identification of a C → T Mutation in the Reactive-Site Coding Region of the C1-Inhibitor Gene and its Detection by an Improved Mutation- Specific Polymerase Chain Reaction Method»

Tidlig diagnostikk av arvet angioødem er viktig, og hos f.eks. spedbarn og barn kan dette være vanskelig. Det å kunne identifisere mutasjoner ved PCR («polymerase chain reaction») kan være av stor diagnostisk betydning. I 1998 identifiserte forskergruppen ved Mollnes, Nielsen og medarbeidere en mutasjon i C1-INH hos to slekter med opphopning av HAE type 2 lokalisert i Nord-Norge, samt en slekt på Vestlandet. De lagde en skreddersydd PCR for nettopp denne mutasjonen. I studien ble det inkludert fire pasienter fra Nord-Norge med HAE type 2, samt en pasient fra vestlandet. Blod fra friske givere ble brukt som kontroll. Videre ble exon 8 i C1-INH genet amplifisert ved å bruke en primer sekvens (5'-ATGCTGGCTTCTGACTCTGT-3' [HAE primer 1] og 5'ACTGAGAGCTGAGGCTGGAG-3' [HAE primer 2]) og genet ble amplifisert med PCR-teknikk. Det ble funnet en punktmutasjon som alle fire pasientene fra samme slekt i Nord-Norge var heterozygote for, mutasjonen CGC til TGC. Dette gjaldt også pasienten

med type 2 HAE fra vestlandet. Denne informasjonen ble da brukt til å skreddersy en PCR for denne mutasjonen. Dette kan være nyttig for diagnostikk av nyfødte hvor en av foreldrene har denne mutasjonen.

3.10.5 Studie XIV – «C3 is Activated in Hereditary Angioedema, and C1/C1-Inhibitor Complexes Rise During Physical Stress in Untreated Patients»

Anfall med angioødem kan utløses av ulike årsaker, eksempelvis mindre kirurgiske inngrep som tannprosedyrer og andre fysiske traumer. I tillegg kan også fysisk stress trigge anfall. I 1995 gjennomførte Mollnes, Nielsen og medarbeidere en studie hvor de ønsket å se hvilken effekt fysisk aktivitet hadde på utløsning av anfall (62). En gruppe bestående av seks kvinner med HAE type 1 og en mann med HAE type 1 gjennomførte forsøk hvor de syklet i 10 – 15 minutter til de oppnådde utmattelse. Mannen syklet litt lengre. En kontrollgruppe gjennomførte de samme forsøkene, og disse friske personene hadde samme kjønn og alder som pasientene. For å se på aktivering av komplementsystemet, kallikrein-kinin-systemet, koagulasjon og fibrinolyse, ble det tatt aktuelle prøver rett før syklingen startet, rett etter at den var avsluttet, samt to og fire timer etter forsøket var ferdig. Blant annet så de at kompleksdannelsen mellom C1 og C1-INH var signifikant høyere hos HAE-pasientene sammenlignet med kontrollgruppen, økningen var 36 % ($p = 0,0089$). Hos begge gruppene var det en økning i fibrinolysen da tiden for nedbryting av tromber var 51 % redusert ($p = 0,0021$), samt at t-PA økte med 37 % ($p = 0,001$) og at aktiveringen av plasminogen økte med 100 % ($p = 0,0024$). På samme tid ble det av etiske årsaker ikke utført mer en moderate forsøk hva fysisk utmattelse angår, og resultatene må også ses ut fra dette.

3.10.6 Studie XV – «Expression of Active Human C1 Inhibitor Serpin Domain in Escherichia coli»

I 1998 gjorde forskergruppen et forsøk for å se om de kunne uttrykke rekombinant C1-INH i E.coli. Ved PCR teknikk fremstilte de en C1-INH som manglet N-terminalen (trunkert form), og denne ble deretter forsøkt produsert i E.coli, noe den ble i E.coli BL21 (DE3), samt i E.coli AD494 (DE39, hvor sistnevnte klarte å danne disulfidbroer i cytoplasma. Da de senere gjorde forsøk for å se om denne rekombinante C1-INH fungerte, klarte den å danne kompleks med C1s in vitro. Allikevel var mye av rC1-INH

som ble dannet uløselig, slik at det vanskelig kunne brukes. Artikkelen konkluderte med at evnen til å danne disulfidbroer var essensielt for å kunne danne funksjonelt rekombinant C1-INH i cellystemet. RC1-INH i E.coli BL21 (DE3) hadde verken funksjon eller disulfidbroer. Produksjonen av rekombinant C1-INH var altså avhengig av et system med evne til å danne disulfidbroer.

3.10.7 Studie XVI – «C1-Inhibitor Reduces the Ischemia- Reperfusion Injury of Skeletal Muscles in Mice after Aortic Cross-Clamping»

I 2002 gjorde gruppen et forsøk hvor de ønsket å se på hvilken effekt C1-INH hadde på iskemisk reperfusjonsskade i en musemodell. Mus fikk stanset sirkulasjonen ved å sette på klemme på aorta, nedenfor nyrearteriene, i 60, 75 eller 105 minutter, og deretter ble de reperfunderet i 3 timer. 1000 IE C1-INH ble gitt, hvor 2/3 av dosen ble gitt før reperfusjon, og 1/3 av dosen ble gitt etter. Kreatin-kinase (CK) ble brukt som mål på muskalskade etter iskemisk reperfusjon. CK økte for det første proporsjonalt med lengden på iskemien. C1-INH reduserte CK signifikant ved 75 minutter og 105 minutter med iskemi ($p= 0,012$).

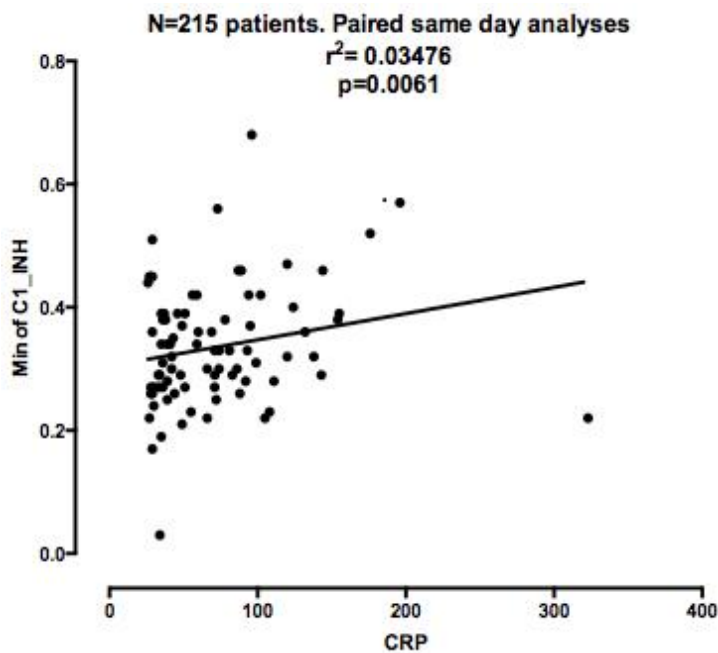
3.11 C1-Inhibitor som akutfaseprotein

Akutfaseproteiner endrer konsentrasjon i plasma ved inflammasjon (65). En eventuell endring bør være minst 25 %. Akutfaseproteinet C-reaktivt protein (CRP) kan øke flere hundre prosent. Komplementproteiner anføres å ha mer moderate endringer. Hvis C1-INH øker med 100 %, dvs. dobler sin verdi under inflammasjon, som noen artikler hevder, burde imidlertid tolkingen av C1-INH-verdier, og egentlig referanseområdet, justeres i forhold til inflammasjonsstatus. En doblet C1-INH- verdi på grunn av inflammasjon kunne feilaktig frikjenne en HAE- pasient som normal. For å belyse nærmere hvor mye C1-inhibitorkonsentrasjonen øker under inflammasjon har vi ved hjelp av rapportverktøyet Qlikview hentet ut komplett anonyme verdier fra analyser ved Klinisk Kjemisk Laboratorium ved NLSH.

Vi har bare brukt rekvisisjoner som enten hadde C1-INH **og** CRP, eller haptoglobin **og** CRP, tatt samme dag.

3.11.1 C1-inhibitor og CRP

I figur 3 er resultatene av lineær regresjon for C1-INH/CRP vist. Av ligningen for den rette regresjonslinjen for C1-INH/CRP; « $Y = 0,0004350 * X + 0,3066$ », ser vi at om CRP stiger fra 0 til 100 vil C1-INH bare øke fra 0,3066, avrundet til 0,31 g/L til $0,31 + 0,04 = 0,35$ g/L. Klinisk er dette en helt ubetydelig stigning og vil ikke forstyrre en eventuell HAE-diagnostikk.



Figur 3: grafen viser sammenhengen mellom CRP og C1-INH målt hos de samme pasientene for en dag (n=215).

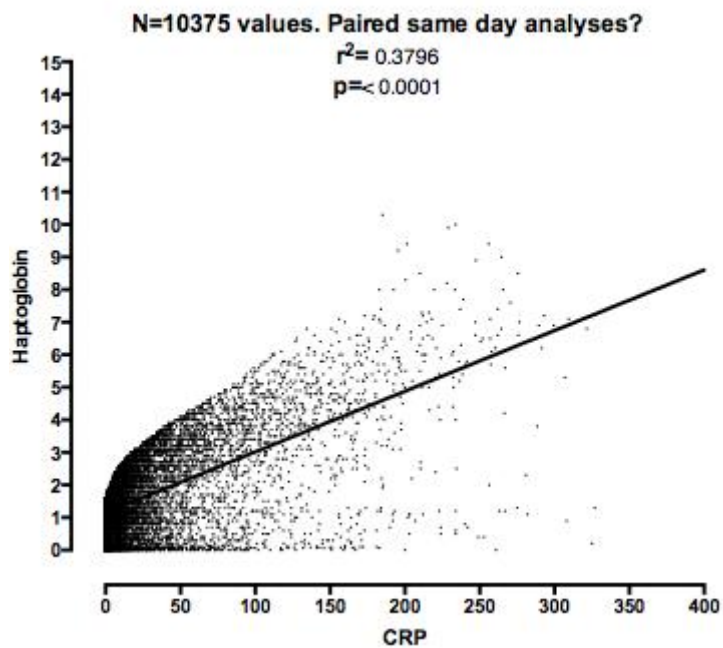
Linear reg.	C1-INH
	Y
Best-fit values	
Slope	0.0004350 ± 0.0001571
Y-intercept when X=0.0	0.3066 ± 0.008513
X-intercept when Y=0.0	-704.8
1/slope	2299
95% Confidence Intervals	
Slope	0.0001272 to 0.0007429
Y-intercept when X=0.0	0.2899 to 0.3233
X-intercept when Y=0.0	-2493 to -397.9
Goodness of Fit	
R square	0.03476
Sy.x	0.09773
Is slope significantly non-zero?	
F	7.671
DFn, DFd	1.000, 213.0
P value	0.0061
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	215
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	215
Number of missing values	0
Equation	$Y = 0.0004350 \cdot X + 0.3066$

Tabell 7: viser dataene som ligger til grunn for utregningen av lineær regresjon for C1-INH.

Stigningskoeffisient for kurven er beregnet $0,0004350 \pm 0,0001571$ (95 % KI $0,0001272 - 0,0007429$). Verdien er signifikant forskjellig fra en vanrett linje ($P = 0,0061$).

3.11.2 Haptoglobin og CRP

Haptoglobinetets regresjonslinje mot CRP er « $Y = 0,01864 * X + 1,151$ ». Om CRP øker fra 0 til 100 vil haptoglobinet øke fra 1,151 g/l til $1,151 + 1,86 = 3,01$ g/l. Det er nesten en tredobling. Om C1-INH hadde hatt samme akutfaserespons ville HAE- diagnostikken vært mye vanskeligere.



Figur 4: grafen viser sammenhengen mellom haptoglobin og CRP målt hos de samme pasientene for en dag (n=10375).

Linear reg.	Haptoglobin
	Y
Best-fit values	
Slope	0.01864 ± 0.0002340
Y-intercept when X=0.0	1.151 ± 0.01246
X-intercept when Y=0.0	-61.74
1/slope	53.64
95% Confidence Intervals	
Slope	0.01818 to 0.01910
Y-intercept when X=0.0	1.127 to 1.175
X-intercept when Y=0.0	-64.29 to -59.31
Goodness of Fit	
R square	0.3796
Sy.x	1.065
Is slope significantly non-zero?	
F	6347
DFn, DFd	1.000, 10373
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	10375
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	10375
Number of missing values	0
Equation	Y = 0.01864*X + 1.151

Tabell 8: Viser dataene som ligger til grunn for utregning av lineær regresjon for haptoglobin.

Stigningskoeffisienten er beregnet til $0,01864 \pm 0,0002340$ (95 % KI 0,018 – 0,01910) og den er signifikant forskjellig fra en vannrett linje ($p < 0,0001$).

4 Diskusjon

Oppgavens formål var å se på funksjonen til C1-inhibitorproteinet, både hvordan proteinet i seg selv fungerer, men samtidig også hvilken funksjon proteinet har i de ulike kaskadesystemene som det er med på å regulere. I tillegg har også proteinets rolle i arvet angioødem blitt sett på. Underveis har også temaene blitt særskilt belyst med publikasjoner fra et lokalt forskermiljø som handler om dette proteinet. De har sett på forskjellige aspekter av dets funksjon, og hvordan dette også kan påvirke de ulike kaskadesystemene i kroppen når man tilsetter det i suprafysiologiske mengder. I tillegg har forskermiljøet også publisert en del artikler som handler om diagnostikk og målinger av proteinet hos pasienter med arvet angioødem. Oppgaven har på dette viset tatt et bredt utgangspunkt med mål om å formidle kunnskap om C1-INH, og samtidig vise til hvordan de lokale publikasjonene kan ses sammen med dette. C1-inhibitor tar del i fire ulike kaskadesystemer, og kan derfor være sentralt i patofysiologien til flere sykdommer og tilstander, slik som det også har vært fremstilt i oppgaven. Den videre diskusjonen vil allikevel dreie mot to utvalgte punkter; i hvilken grad man har sett at C1-INH er en god hemmer av komplementsystemet, og C1-INH sin rolle i sepsis, slik det har vært fokusert på i forsøkene som blant annet omhandler koagulasjonssystemet.

I den følgende diskusjonen vil det være hovedfokus på disse utvalgte punktene:

- I hvilken grad C1-inhibitor er en god hemmer av komplementsystemet
- C1-inhibitor og sepsis
- C1-inhibitor som akutfaseprotein

4.1 Er C1-inhibitor en god hemmer av komplementsystemet?

Ut fra resultatene i kapittelet som handler om i hvilken grad C1-inhibitor er en god hemmer av komplement ser vi at felles for disse studiene er at det trengs høye doser av proteinet for oppnå en betydningsfull hemming av de ulike aktiveringsveiene for komplementsystemet. Videre er C1-INH i flere av studiene sammenlignet med andre hemmere av komplement, og mange av disse viser seg å være langt mer effektive, da de trengs i mindre doser enn C1-INH for å gi en tilsvarende hemming. Ut fra dette kan man anta at C1-INH ikke er en så god hemmer av komplementsystemet som man kanskje

tidligere har antatt, og hvis man ønsker å utnytte dette i klinikken må man bruke høye doser, som sannsynligvis vil være vanskelige å oppnå klinisk. C1-INH er heller ikke en spesifikk hemmer av komplementkaskaden, og å tilføre proteinet i høye doser for å dempe en av kaskadene kunne tenkes å gi negative effekter i de andre kaskadene.

Samtidig har denne oppgaven et ganske vidt fokus, og kun fire studier er lagt til grunn for denne konklusjonen, men trenden blant dem er ganske klar. Det hadde derfor vært interessant å stille seg det samme spørsmålet, om C1-INH er en god hemmer av komplementsystemet, og deretter brukt et systematisk litteraturstudium som metode for å bedre kunne svare på denne problemstillingen, og gjort systematiske søk og finne ut hva andre har funnet. I studiene som er presentert i denne oppgaven er effekten av C1-INH sådan undersøkt i ulike settinger, og det er ulike metoder som er brukt for å anslå effektiviteten. Utover å observere en trend blant disse, er det vanskelig å basere en konklusjon på rent vitenskapelige mål.

4.2 C1-inhibitor og sepsis

En viktig fellesnevner mellom de kaskadesystemene som C1-INH regulerer, er at de alle kan bli overaktivert ved sepsis. I mange av studiene som har blitt presentert i denne oppgaven har C1-INH blitt tilsatt i suprafysiologiske mengder, og dette er en av de behandlingene man tror kunne bli en del av sepsisbehandlingen i fremtiden. Hittil finnes det få kliniske studier med slik behandling, selv om det er mange artikler som forelår det. Ut fra resultatene som Mollnes, Nielsen og medarbeidere har kommet frem til, eksempelvis hvilken effekt C1-INH har på koagulasjonskaskaden og koagulasjonstid, kan tilførsel i suprafysiologiske mengder ha fordelaktige effekter i en situasjon med sepsis. Som vi også har sett har proteinet en del fordelaktige effekter i interkasjonen med bakterier og endotoksiner. En samling av alle disse effektene kan teoretisk sett gi økt overlevelse og redusert mortalitet ved sepsis.

Behandling med C1-INH viser seg å bedre overlevelsen i flere dyreforsøk med sepsis. Det finnes altså noen få studier som omhandler C1-INH ved sepsis.

Blant annet er det gjort det en dobbelt-blindet randomisert studie fra 2002 ved Caliezi *et al* (66), som undersøkte effekten av C1-INH på 40 pasienter med alvorlig sepsis eller septisk sjokk. De gav infusjon med C1-INH 6000 IE, deretter 3000 IE, 2000 IE og 1000 IE

med 12-timers intervaller. De observerte en signifikant økning i C1-INH og funksjonelt C1-INH, og gruppen som fikk C1-INH infusjon hadde signifikant lavere kreatininverdier etter 3 dager. Disse pasientene hadde også mindre grad av multippel organdysfunksjon bedømt med ulike skåringssystemer. Det var ikke rapportert om bivirkninger, men man så heller ingen forskjell i mortalitet mellom de to gruppene.

De samme pasientene var også gjenstand for en studie ved Zeerleder *et al* (67) hvor de undersøkte nivåene av elastase- α -1-antitrypsin-kompleks og laktoferrin når C1-INH var tilsatt. Disse proteinene er ellers økt når nøytrofile granulocytter er aktivert ved sepsis. Alle viste en økning, og pasienter som hadde høyere nivåer av elastase- α -1-antitrypsin hadde også høyere nivåer av komplementfaktorer og cytokiner. I tillegg hadde de mer uttalt organ dysfunksjon sammenlignet med dem med lave nivåer. Tilsetning av C1-INH gav en signifikant reduksjon av elastase α -1-antitrypsin-kompleks, i tillegg til redusert aktivering av komplement og frisetting av IL-8. De konkluderte med at C1-INH har noe effekt på organ dysfunksjon, men denne er ganske beskjeden.

I en åpen prospektiv studie fra Russland (68), så de på effekten av C1-INH tilsatt i doser på 12 000 IE, noe som gav reduserte død blant pasienter med sepsis. Dette var nokså oppsiktsvekkende, og det er ikke senere kommet studier som kan bekrefte funnet (69).

4.3 C1-inhibitor som akutfaseprotein

Da C1-INH så vidt øker ved en samtidig økning av CRP fra 0 til 100, kan vi anta at C1-INH i mindre grad er et akutfaseprotein. Målingene av haptoglobin, som viser nærmest tredobling av verdiene ved tilsvarende økning av CRP fra 0 til 100 understøtter dette funnet. Dette er viktig informasjon, da målinger av C1-INH ved samtidig inflammasjon potensielt kan tenkes å forstyrre diagnostikk av HAE. 2-3 x forhøyede C1-INH-prøvesvar fra en pasient med ca. 25 % normal verdi vil feilaktig kunne frikjenne en pasient med HAE. Funnene våre indikerer at det ikke er nødvendig med samtidig måling av CRP for korrekt HAE-diagnostikk. Samtidig er en svakhet med våre målinger at det optimalt sett burde vært målt C1-INH og CRP hos samme person både før og under inflammasjon for å få kunne fastslå dette med større sikkerhet. Dette er noe som kan tas med til videre studier. Dog er antallet såpass stort at om det virkelig var en stor stigning av C1-INH med økende CRP burde grafen vår vise en tydeligere tendens.

Det er ikke gjort forsøk på å finne en bedre regresjonlinje enn enkel lineær. Vi vet heller ikke hvorvidt HAE-pasienter har samme (lave) akutfaserespons av sitt C1-INH-protein som normale, men om noe ville vi ikke forvente en sterkere respons.

Dette er så vidt vi vet første gang en studie om sammenhengen mellom C1-INH og CRP er presentert, og den tilsier at HAE-diagnostikk ikke nødvendigvis behøver å måle CRP samtidig som C1-INH funksjonstest, antigenest og C4, som er standard diagnostisk prøvepanel i Norge.

5 Konklusjon

C1-inhibitor er en serinprotease med flere ulike funksjoner. Den virker inaktiverende på aktuelle proteaser i de ulike kaskadesystemene; komplementsystemet, kallikrein-kinin-systemet, koagulasjonen og fibrinolysen. I tillegg til disse egenskapene har proteinet også en viktig funksjon utenom den proteaseinaktiverende effekten som medieres via andre deler av proteinstrukturen enn serpindomenet. Proteinets sentral rolle ved arvet angioødem, og mangel på proteinet kan gi livsfarlige symptomer i form av laryngealt ødem. Forskergruppen ved Mollnes og medarbeidere har studert C1-INH i mange ulike sammenhenger. Blant annet viser proteinet seg å ikke være den mest effektive hemmeren av komplementsystemet sammenlignet med andre spesifikke hemmere. Samtidig vil tilførsel av suprafysiologiske mengder av proteinet kunne bedre overlevelsen for sepsis-pasienter. C1-INH er et beskjedent akutfaseprotein sammenlignet med CRP og haptoglobin, og inflammasjon vil ikke forstyrre diagnostikk av sykdommen arvet angioødem.

Referanser

1. Gregorek H, Kokai M, Hidvégi T, Füst G, Sabbouh K, Madaliński K. Concentration of C1 inhibitor in sera of healthy blood donors as studied by immunoenzymatic assay. *Complement Inflamm.* 1991;8(5-6):310–2.
2. Bock SC, Skriver K, Nielsen E, Thøgersen HC, Wiman B, Donaldson VH, et al. Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry (Mosc).* 1986 Jul 29;25(15):4292–301.
3. Rossi V, Bally I, Ancelet S, Xu Y, Frémeaux-Bacchi V, Vivès RR, et al. Functional characterization of the recombinant human C1 inhibitor serpin domain: insights into heparin binding. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2010 May 1;184(9):4982–9.
4. Zahedi R, MacFarlane RC, Wisnieski JJ, Davis AE. C1 inhibitor: analysis of the role of amino acid residues within the reactive center loop in target protease recognition. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2001 Aug 1;167(3):1500–6.
5. Bos IGA, Lubbers YTP, Roem D, Abrahams JP, Hack CE, Eldering E. The functional integrity of the serpin domain of C1-inhibitor depends on the unique N-terminal domain, as revealed by a pathological mutant. *J Biol Chem.* 2003 Aug 8;278(32):29463–70.
6. Huntington JA, Read RJ, Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature.* 2000;407(6806):923–6.
7. Smet B de, Boer J de, Agterberg J, Rigter G, Bleeker WK, Hack CE. Clearance of human native, proteinase-complexed, and proteolytically inactivated C1-inhibitor in rats. *Blood.* 1993 Jan 1;81(1):56–61.
8. Davis III AE, Mejia P, Lu F. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol.* 2008 Oct;45(16):4057–63.
9. Liu D, Cai S, Gu X, Scafidi J, Wu X, Davis AE. C1 inhibitor prevents endotoxin shock via a direct interaction with lipopolysaccharide. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2003 Sep 1;171(5):2594–601.
10. Prada AE, Zahedi K, Davis AE. Regulation of C1 inhibitor synthesis. *Immunobiology.* 1998 Aug;199(2):377–88.
11. Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3(1):118–27.
12. Tsiakalos A, Karatzaferis A, Ziakas P, Hatzis G. Acute-phase proteins as indicators of bacterial infection in patients with cirrhosis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2009 Nov;29(10):1538–42.

13. Bene L, Füst G, Fekete B, Kovács A, Horváth L, Prohászka Z, et al. High normal serum levels of C3 and C1 inhibitor, two acute-phase proteins belonging to the complement system, occur more frequently in patients with Crohn's disease than ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 2003 Jun;48(6):1186–92.
14. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. The complement system and innate immunity. 2001 [cited 2017 Mar 22]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/>
15. Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *Eur J Microbiol Immunol*. 2012 Jun;2(2):103–11.
16. Thurman JM, Holers VM. The Central Role of the Alternative Complement Pathway in Human Disease. *J Immunol*. 2006 Feb 1;176(3):1305–10.
17. Noris M, Remuzzi G. Overview of Complement Activation and Regulation. *Semin Nephrol*. 2013 Nov;33(6):479–92.
18. Ziccardi RJ. A new role for C-1-inhibitor in homeostasis: control of activation of the first component of human complement. *J Immunol*. 1982 Jun 1;128(6):2505–8.
19. Paréj K, Dobó J, Závodszy P, Gál P. The control of the complement lectin pathway activation revisited: Both C1-inhibitor and antithrombin are likely physiological inhibitors, while α 2-macroglobulin is not. *Mol Immunol*. 2013 Jul;54(3–4):415–22.
20. Jiang H, Wagner E, Zhang H, Frank MM. Complement 1 inhibitor is a regulator of the alternative complement pathway. *J Exp Med*. 2001 Dec 3;194(11):1609–16.
21. Mollnes TE, Høgåsen K, De Carolis C, Vaquero E, Nielsen EW, Fontana L, et al. High-dose intravenous immunoglobulin treatment activates complement in vivo. *Scand J Immunol*. 1998 Sep;48(3):312–7.
22. Fiane AE, Videm V, Lingaas PS, Heggelund L, Nielsen EW, Geiran OR, et al. Mechanism of complement activation and its role in the inflammatory response after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Circulation*. 2003 Aug 19;108(7):849–56.
23. Salvesen B, Nielsen EW, Harboe M, Saugstad OD, Mollnes TE. Mechanisms of complement activation and effects of C1-inhibitor on the meconium-induced inflammatory reaction in human cord blood. *Mol Immunol*. 2009 Feb;46(4):688–94.
24. Dézsi L, Horváth Z, Vécsei L. Intravenous immunoglobulin: pharmacological properties and use in polyneuropathies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016 Nov 1;12(11):1343–58.
25. Fiane AE, Videm V, Johansen HT, Mellbye OJ, Nielsen EW, Mollnes TE. C1-inhibitor attenuates hyperacute rejection and inhibits complement, leukocyte and platelet activation in an ex vivo pig-to-human perfusion model. *Immunopharmacology*. 1999 May;42(1-3):231–43.

26. Thorgersen EB, Ghebremariam YT, Thurman JM, Fung M, Nielsen EW, Holers VM, et al. Candidate inhibitors of porcine complement. *Mol Immunol.* 2007 Mar;44(8):1827–34.
27. Nielsen EW, Waage C, Fure H, Brekke OL, Sfyroera G, Lambris JD, et al. Effect of supraphysiologic levels of C1-inhibitor on the classical, lectin and alternative pathways of complement. *Mol Immunol.* 2007 Mar;44(8):1819–26.
28. Thorgersen EB, Ludviksen JK, Lambris JD, Sfyroera G, Nielsen EW, Mollnes TE. Anti-inflammatory effects of C1-Inhibitor in porcine and human whole blood are independent of its protease inhibition activity. *Innate Immun.* 2010 Aug;16(4):254–64.
29. Maas C, Govers-Riemslog JWP, Bouma B, Schiks B, Hazenberg BPC, Lokhorst HM, et al. Misfolded proteins activate Factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation. *J Clin Invest.* 2008 Sep 2;118(9):3208–18.
30. Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH. Recombinant prolylcarboxypeptidase activates plasma prekallikrein. *Blood.* 2004 Jun 15;103(12):4554–61.
31. Harpel PC, Lewin MF, Kaplan AP. Distribution of plasma kallikrein between C-1 inactivator and alpha 2-macroglobulin in plasma utilizing a new assay for alpha 2-macroglobulin-kallikrein complexes. *J Biol Chem.* 1985 Apr 10;260(7):4257–63.
32. van der Graaf F, Koedam JA, Bouma BN. Inactivation of kallikrein in human plasma. *J Clin Invest.* 1983 Jan;71(1):149–58.
33. Seip KF, Evjenth B, Hovland A, Dybwik KG, Johansen HT, Fure H, et al. Bradykinin-Induced Shock Increase Exhaled Nitric Oxide, Complement Activation and Cytokine Production in Pigs. 5 [Internet]. 2016 [cited 2017 Apr 23]; Available from: <https://brage.bibsys.no/xmlui/handle/11250/2430289>
34. Harald Thidemann Johansen (1) KFS (2) og EWN (3), Publisert 04. 05.2016 kl 16:45. Bradykininutløste angioødemer [Internet]. *Farmatid.* [cited 2017 Mar 21]. Available from: <http://www.farmatid.no/artikler/vitenskap/bradykininutloste-angioodemer>
35. Mullins LJ, Bailey MA, Mullins JJ. Hypertension, Kidney, and Transgenics: A Fresh Perspective. *Physiol Rev.* 2006 Apr 1;86(2):709–46.
36. Dieijen G van, Tans G, Rosing J, Hemker HC. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J Biol Chem.* 1981 Apr 10;256(7):3433–42.
37. Wuillemin WA, Minnema M, Meijers JC, Roem D, Eerenberg AJ, Nuijens JH, et al. Inactivation of factor XIa in human plasma assessed by measuring factor XIa-protease inhibitor complexes: major role for C1-inhibitor. *Blood.* 1995 Mar 15;85(6):1517–26.
38. Mitchell JL, Lionikiene AS, Georgiev G, Klemmer A, Brain C, Kim PY, et al. Polyphosphate colocalizes with factor XII on platelet-bound fibrin and augments its plasminogen activator activity. *Blood.* 2016 Dec 15;128(24):2834–45.

39. Levi M, Roem D, Kamp AM, de Boer JP, Hack CE, ten Cate JW. Assessment of the relative contribution of different protease inhibitors to the inhibition of plasmin in vivo. *Thromb Haemost.* 1993 Feb 1;69(2):141–6.
40. Landsem A, Nielsen EW, Fure H, Christiansen D, Ludviksen JK, Lambris JD, et al. C1-inhibitor efficiently inhibits Escherichia coli-induced tissue factor mRNA up-regulation, monocyte tissue factor expression and coagulation activation in human whole blood. *Clin Exp Immunol.* 2013 Aug;173(2):217–29.
41. Landsem A, Fure H, Mollnes TE, Nielsen EW, Brekke OL. C1-inhibitor efficiently delays clot development in normal human whole blood and inhibits Escherichia coli-induced coagulation measured by thromboelastometry. *Thromb Res.* 2016 Jul;143:63–70.
42. Nasjonal brukerhåndbok i Medisinsk Biokjemi [Internet]. [cited 2017 May 25]. Available from: http://brukerhandboken.no/index.php?action=showtopic&topic=bf1988ffffb37d232477&book_request=biokjemi
43. Kaplan AP. Angioedema. *World Allergy Organ J.* 2008 Jun 15;1(6):103–13.
44. Farkas H, Veszeli N, Kajdácsi E, Cervenak L, Varga L. “Nuts and Bolts” of Laboratory Evaluation of Angioedema. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016 Oct;51(2):140–51.
45. C1-inhibitor [Internet]. [cited 2017 May 6]. Available from: http://ous.prod.fpl.nhn.no/omoss_/avdelinger_/medisinsk-immunologi_/proteiner_/Sider/C1-inhibitor.aspx
46. Wagenaar-Bos IGA, Drouet C, Aygören-Pursun E, Bork K, Bucher C, Bygum A, et al. Functional C1-Inhibitor diagnostics in hereditary angioedema: Assay evaluation and recommendations. *J Immunol Methods.* 2008 Sep 30;338(1–2):14–20.
47. C3 og C4 [Internet]. [cited 2017 May 6]. Available from: http://ous.prod.fpl.nhn.no/omoss_/avdelinger_/medisinsk-immunologi_/proteiner_/Sider/C3-og-C4.aspx
48. Tosi M. Molecular Genetics of C1 Inhibitor. *Immunobiology.* 1998 Aug 1;199(2):358–65.
49. Bowen T, Cicardi M, Farkas H, Bork K, Longhurst HJ, Zuraw B, et al. 2010 International consensus algorithm for the diagnosis, therapy and management of hereditary angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2010;6:24.
50. Cicardi M, Aberer W, Banerji A, Bas M, Bernstein JA, Bork K, et al. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy.* 2014 May;69(5):602–16.

51. Craig TJ, Levy RJ, Wasserman RL, Bewtra AK, Hurewitz D, Obtulowicz K, et al. Efficacy of human C1 esterase inhibitor concentrate compared with placebo in acute hereditary angioedema attacks. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Oct;124(4):801–8.
52. Berinert «CSL Behring» - Felleskatalogen [Internet]. [cited 2017 Apr 28]. Available from: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/berinert-csl-behring-546794>
53. Cinryze «Shire Services BVBA» - Felleskatalogen [Internet]. [cited 2017 Apr 28]. Available from: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/cinryze-shire-services-bvba-579014>
54. Hofstra JJ, Kleine Budde I, van Twuyver E, Choi G, Levi M, Leebeek FWG, et al. Treatment of hereditary angioedema with nanofiltered C1-esterase inhibitor concentrate (Cetor®): multi-center phase II and III studies to assess pharmacokinetics, clinical efficacy and safety. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2012 Mar;142(3):280–90.
55. Ruconest «Pharming Group» - Felleskatalogen [Internet]. [cited 2017 May 6]. Available from: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/ruconest-pharming-group-569624>
56. Firazyr «Shire Orphan Therapies GmbH» - Felleskatalogen [Internet]. [cited 2017 May 6]. Available from: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/firazyr-shire-orphan-therapies-gmbh-559097>
57. Craig TJ, Li HH, Riedl M, Bernstein JA, Lumry WR, MacGinnitie AJ, et al. Characterization of anaphylaxis after ecallantide treatment of hereditary angioedema attacks. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2015 Apr;3(2):206–12.e4.
58. Nielsen EW, Johansen HT, Straume B, Mollnes TE. Effect of time, temperature and additives on a functional assay of C1 inhibitor. *J Immunol Methods*. 1994 Aug 1;173(2):245–51.
59. Fure H, Nielsen EW, Hack CE, Mollnes TE. A neoepitope-based enzyme immunoassay for quantification of C1-inhibitor in complex with C1r and C1s. *Scand J Immunol*. 1997 Dec;46(6):553–7.
60. Nielsen EW, Johansen HT, Holt J, Mollnes TE. C1 inhibitor and diagnosis of hereditary angioedema in newborns. *Pediatr Res*. 1994 Feb;35(2):184–7.
61. Nielsen EW, Fure H, Winge P, Mollnes TE. Identification of a C→T mutation in the reactive-site coding region of the C1-inhibitor gene and its detection by an improved mutation-specific polymerase chain reaction method. *Scand J Immunol*. 1998 Mar;47(3):273–6.
62. Nielsen EW, Johansen HT, Gaudesen O, Osterud B, Olsen JO, Høgåsen K, et al. C3 is activated in hereditary angioedema, and C1/C1-inhibitor complexes rise during physical stress in untreated patients. *Scand J Immunol*. 1995 Dec;42(6):679–85.

63. Lamark T, Ingebrigtsen M, Bjørnstad C, Melkko T, Mollnes TE, Nielsen EW. Expression of active human C1 inhibitor serpin domain in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2001 Jul;22(2):349–58.
64. Nielsen EW, Mollnes TE, Harlan JM, Winn RK. C1-inhibitor reduces the ischaemia-reperfusion injury of skeletal muscles in mice after aortic cross-clamping. *Scand J Immunol*. 2002 Dec;56(6):588–92.
65. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999 Feb 11;340(6):448–54.
66. Caliezi C, Zeerleder S, Redondo M, Regli B, Rothen H-U, Zürcher-Zenklusen R, et al. C1-inhibitor in patients with severe sepsis and septic shock: beneficial effect on renal dysfunction. *Crit Care Med*. 2002 Aug;30(8):1722–8.
67. Zeerleder S, Caliezi C, van Mierlo G, Eerenberg-Belmer A, Sulzer I, Hack CE, et al. Administration of C1 Inhibitor Reduces Neutrophil Activation in Patients with Sepsis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 Jul;10(4):529–35.
68. Lazareva NB, Igonin AA. [Safety and efficacy of purified human C1-esterase inhibitor in the treatment of patients with sepsis]. *Antibiot Khimioterapiia Antibiot Chemoterapy Sic*. 2009;54(1-2):42–6.
69. The complement system as another target for inhibition in se... : *Critical Care Medicine* [Internet]. LWW. [cited 2017 Jun 6]. Available from: http://journals.lww.com/ccmjournals/Fulltext/2012/03000/The_complement_system_as_another_target_for.45.aspx

Vedlegg: Kunnskapsevaluering/GRADE

Referanse: Fiane AE, Videm V, Johansen HT, Mellbye OJ, Nielsen EW, Mollnes TE. C1-inhibitor attenuates hyperacute rejection and inhibits complement, leukocyte and platelet activation in an ex vivo pig-to-human perfusion model. Immunopharmacology. 1999 May;42(1-3):231-43.			Design kontrollert før-og etter studie/ experimental study
			Dokumentasjonsnivå IIa
			GRADE moderate
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
To evaluate the effect of C1-INH in graft survival and assess the ability of C1-INH to modulate activation of the complement and contact systems, and to investigate possible secondary effects of leukocytes and platelets	Pig kidneys were perfused with fresh human blood to which either C1-INH (n=6) or human serum albumin (n=6) was added. The grafts were monitored and renal vascular resistance was calculated as MAP/flow. Rejection defined as 100 % increase in renal blood flow.	In all six experiments graft survival was significantly longer (p <0,0001) in the C1-INH group, mean 327 min (95 % CI 277 -376), than the HSA group, mean 79 min (49 - 109). There was a significant increase in the following: C1rs-C1-INH (p = 0,004) and in the HSA group (p < 0,0001), substantially more in the HSA group (p =0,0001). C4bc (p=0,001) in the C1-INH group, and in the HSA group (p<0,0001), substantially more in the HSA group (p<0,0001). C3bc (p=0,02) in the C1-INH group and in the HSA group (p<0,001), substantially more in the HSA group (p <0,0001). TCC increased significantly in the C1-INH (p =0,004) and in the HSA group (p=0,003), substantially more in the HSA group (p<0,001)	Limitations: The ability to study long-term matured immune responses in this model is prevented by the time constraints inherent in any isolated organ perfusion system with an approximate working time of 4-6 hours in autologous perfusion systems. Despite the limitations, the model has proved to be particularly valuable to study the HAR. Similar findings from Heckl-Östreicher et al (1996), and Dalmaso and Platt (1994).
Konklusjon	Blood samples were collected from the perfusion circuits before addition of C1-INH and HSA, and at 15, 60 and 180 min after start of perfusion. Specific complement activation products were quantified with EIA: the following were measured – C1rs-C1-INH, C4bc, C3bc, TCC.		
Land	Contact activation was assessed by measuring total concentration of kininogens		
NORWAY			
År datainnsamling	Platelet activation products were measured using EIA		
1998			

Referanse			Design experimental study/ kontrollert før og etter studie
Thorgersen EB, Ghebremariam YT, Thurman JM, Fung M, Nielsen EW, Holers VM, et al. Candidate inhibitors of porcine complement. Mol Immunol. 2007 Mar;44(8):1827-34.			Dokumentasjonsnivå Ia
			GRADE moderate
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
To investigate and compare the efficacy of selected candidate inhibitors of porcine complement in vitro for possible future application in vivo	Sera from three different pigs were each incubated with either zymosan, HAIGG or E.coli. Three groups of complement inhibitors were tested: - FUT-175 and c1_inh - Anti factor B and anti factor D - VCP (vaccinia virus complement control protein) Read out was the terminal C5b-9 complement complex (TCC)	-FUT-175 and C1-INH dose-dependently inhibited TCC formation in zymosan, HAIGG and E.coli activated porcine sera, but with different efficacy -complete inhibition of TCC was obtained using 0,2 mg/ml FUT-175, but required 16 mg/ml of C1-INH. - Anti factor B and anti factor D inhibited TCC dose-dependently, but in different ways. -Anti factor B at high dose, 1 mg/ml(completely inhibited TCC formation by zymosan, and almost completely by HAIGG, but not in sera activated with E.coli Anti factor D inhibited all three activators at low dose, and approximately 50 % TCC reduction was obtained VCP inhibited TCC formation efficiently and dose-dependent	Human C1-INh was used, but according to recent studies the reactive site of porcine and human C1-INH are highly homologous with similar complement inhibitory functions. Inhibition of TCC induced by all three activators required substantial amounts of the protein, which hardly would be attainable in vivo. The effect of VCP on porcine complement was not known prior to this study, which clearly documents a potent complement inhibitory effect by all activators tested. Several studies have however demonstrated the beneficial effects of VCP as a complement inhibitor in rodent disease models: collagen-induced arthritis, Jha et al 2005. Provided that VCP can be retained in circulation after intravenous administration in pigs, it will probably be an excellent candidate for future in vivo studies.
Konklusjon			
All candidates tested inhibited porcine complement activation, but in different ways and to different degrees.			
Land			
Norway			
År datainnsamling			
2006			

Referanse			Design kontrollert før/etter studie, experimental study
Nielsen EW, Waage C, Fure H, Brekke OL, Sfyroera G, Lambris JD, et al. Effect of supraphysiologic levels of C1-inhibitor on the classical, lectin and alternative pathways of complement. Mol Immunol. 2007 Mar;44(8):1819–26.			Dokumentasjonsnivå Ila
			GRADE Moderate
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
To investigate and compare the supraphysiologic effects of C1-INH on three complement pathway.	-Serum from healthy blood donors was collected and distributed into three different normal human serum pools (n>10 for each). -NHS was added into tubes containing PBS, C1-INH, albumin or EDTA, whereby NHS was diluted 5/7	-solid-phase classical and lectin pathway was dose-dependently and significantly reduced up to 85 % in the range of 2-28 times physiologic C1-INH concentration. -The Lectin pathway was more potently inhibited than the classical at low doses - a functional lectin pathway assay demonstrated a significant reduction of C4 deposition up to 86 % even at low concentration of C1-INH and documented the effect to be at the level of MBL/MASP	C1-INH's effect in the three different initiating pathways of complement varied considerably The classical pathway solid-phase was only modestly inhibited by C1-INH when high serum dilution was used, but at low serum dilutions which are more close to the physiological conditions the effect was more pronounced. The data indicate that C1-INH in high physiologic concentrations may have a selective impact in all three complement activation pathways.
Konklusjon	-Final concentrations of C1-INH were 0,5, 2,5 and 5,0 mg/ml which responds to 2,8, 14 and 28 times physiologic concentrations -corresponding final added concentrations of albumin were 0,5, 2,5 and 5,0 mg/ml -final concentration of EDTA was minimum 20 mM	-C1-INH had no effect on solid-phase alternative pathway activation, but significantly reduced cobra venom factor induced fluid phase activation up to 88%. -the negative controls albumin and IgG had no effect on complement activation	Complement is but one of several important biological cascades where C1-INH is an important regulator, notably coagulation, fibrinolysis and the kinin- kallikrein system are also involved in inflammation; in several diseases a tailored therapy of the immune system is wanted and in human disease in which cascade system activation is undesired, C1-INH in obtainable doses could be useful.
Land	-Identical experiments were done with the same serum pools, including IgG as supplement.	-the positive inhibitory controls compstatin, EDTA or MBL-deficient sera reduced complement activation by 82 – 100 %	
År datainnsamling	-C4 deposition as a function of MBL/MASP activity was measured by EIA		
2007			

Referanse			Design kontrollert før/etter studie.
Mollnes TE, Høgåsen K, De Carolis C, Vaquero E, Nielsen EW, Fontana L, et al. High-dose intravenous immunoglobulin treatment activates complement in vivo. Scand J Immunol. 1998 Sep;48(3):312-7			Dokumentasjonsnivå Ila
			GRADE Moderate
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
To investigate the in vivo effects of IVIG on complement in seven women with unexplained recurrent spontaneous abortion who were without evidence of autoimmune disease.	-seven women were selected for first-timetreatment with IVIG because of unexplained recurrent spontaneous abortion. They were all treated at the department of gynaecology and obstetrics, university Tor Vergata, Rome. -Treatment protocol: 0,5 g IVIG (alphaglobin) pr. kg body weight, infused during 3 hrs. The concentration was 5 g/100 ml, and total volumes were 500-700 ml	-There was a marked increase in immunoglobulin G (IgG)from (median range) 12,4 (9,4 - 15,9) to 26,8 (22,4 - 30,) G/L but no changes in IgA or IgM. -A significantly increased complement activation was demonstrated using neoepitope-specific enzyme immunoassays to the activation products C3bc (median increased from 9,8 to 31,2 AU/ml), Bb (0,66 - 1,66 g/ml), C5a (10,5 - 12,7 ng/ml) and TCC (0,81 - 2,19 AU/ml) (P=0,015 for all) - there was no changes in antigenic concentrations of individual complement components or regulators (c1q, C4, C3, C1-INH, C4b binding protein), and no decrease in complement hemolytic activity (classical and alternative CH50), which were all within the normal range.	To the authors knowledge, investigation of the fluid phase effect on high dose IVIG on complement in vivo has not been performed in humans before. Ideally, healthy individuals should be used to study such an effect on a normal functioning complement system, however, IgG have certain documented adverse effects, and therefore the patients selected was from a group undergoing such therapy. They found that there was a substantial increase in all three classical pathway activation products studies as well as close correlation between them, clearly indicating that the classical pathway was pathologically activated in these patients. The aim was however to investigate the effect of IVIG on complement in vivo, and an activation of the complement system was clearly demonstrated. They also said that its important to bear in mind that the amount of activation products detected in plasma does not necessarily reflect how detrimental the activation is, as the activationstimulus at the target, which is important for the pathogenesis, is not always reflected in a corresponding level of circulating activation products.
Konklusjon			
IVIG induced a significant activation of complement in vivo	-Blood samples were taken immediately before and 30 min after infusion -serum albumin, immunoglobulins (IgA, IgG, IgM) and antigen concentrations of C1q were measured using EIA	-the classical pathway activation products C1rs/C1-inhibitor complexes, C4bc and C4d were elevated in all patients before IVIG treatment and did not change significantly during treatment.	
Land	-A human serum pool from healthy blood donors was used as a reference defining 100 %		
År datainnsamling			
1998			

Referanse			Design Tverrsnittstudie?
Nielsen EW, Johansen HT, Holt J, Mollnes TE. C1 inhibitor and diagnosis of hereditary angioedema in newborns. <i>Pediatr Res.</i> 1994 Feb;35(2):184-7.			Dokumentasjonsnivå III
			GRADE moderate
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
To establish a range for the function of C1-INH in newborns and to see weather a diagnosis could be made in two babies born to mothers with HA	<p>Samples were taken from 100 censecutive newborns during spring 1991</p> <p>Inclusion criteria: born at term, ie +/- 14 days, 2) birth weight >2500 g, 3) Apgar score at 5 min >8, 4) no signs of maternal infection, and 5) no maternal medication except for å short period when four mothers were using antibiotics, axazepam or terbutaline</p> <p>Two babier born to mothers with HAE type 1 were included They fulfilled the above mentioned criteria</p> <p>Samples were taken from vessels in the umbilical cord.</p> <p>C1-INH antigen concentration in citrated plasma was determined with radial immunodiffusion</p> <p>Functional C1-INH activity was also measured</p>	<p>The data obtained in the 80 cord samples (2,5 – 97,5 percentile) were 0,11 – 0,22 g/L for C1-INH (adults 0,15 – 0,33 g/L), and 47,2 – 85,9 % for C1-INH function (percentage of adults)</p> <p>-In cord blood baby 1 had an antigenic value of 0,12 g/L (7,5 percentile) and C1-INH function of 61,8 % (42 percentile)</p> <p>- In cord blood baby 2 had an antigenic value of less than 0,05 g/L (0,106 g/L, <2,5 percentile) and 34,3 % (12,9 %), <2,5 percentile) for C1-INH function.</p> <p>-Baby 2 had marked lower C4 values yet much higher C4 activation products than baby 1.</p> <p>-at 4 month, baby 1 had an anitgenic C1-INH value of 0,24 g/L.</p> <p>At 6 months baby 2 had an antigenic value of 0,13 g/L, which is considerably low for the age.</p> <p>-at 19 months of age baby 2 had abdmoinal pain, distension and massive amounts of watery diarrhea. C1-INH concentrate (500 U) was administred and 4 weeks of symptoms resolved in 6 hours</p>	<p>The method of puncturing the fetal vessels in the new born placenta for cord blood has a possible disadvantage with a longer period of time from when the baby is born to when the sampel is drawn (median 14 min), which might lead to a declain in C1-INH values</p> <p>The mothers with HAE both recieved 100 U of C1-INH concentrate intravenously 2-4 hours before delivery. To the authors knowledge, C1-INH has no active transport over the placenta barrier, and the substitution of mothers are therefore not expected to interfere with the interpretation of the data.</p> <p>The results were in accordance with others in that complement values for term infants are generally in the range 60 – 100 % of adult normals.</p>
Konklusjon			
They present a reference area for C1-INH antigen and function. The method of umbilical cord blood sampling allows uncontaminated collection an yields generous amounts of blood for supplementary analyses.			
Land			
År datainnsamling			
1991			

