

Cuvânt Înainte

Imunologia este unul dintre domeniile cele mai dinamice ale științelor biologice. Funcția imunitară este esențială pentru organismul uman și animal și de aceea, disfuncțiile imunitare severe sunt incompatibile cu supraviețuirea. Pe de altă parte, activarea neadecvată a funcției imunitare are drept consecință inițierea sau progresia stărilor patologice de hipersensibilitate și a maladiilor autoimune, ceea ce a amplificat interesul pentru studiul Imunologiei.

Această lucrare este intitulată *Imunologie și Imunochimie*, pentru că accentuează în mod deosebit, studiul reactanților fundamentali ai imunității: antigene și anticorpi. Lucrarea prezintă într-o formă didactică, foarte accesibilă, mecanismele moleculare ale reactivității imunitare în diferitele sale ipostaze: răspunsul imun față de antigene moleculare, antigene de natură infecțioasă, autoantigene, antigene tumorale sau antigene de transplantare.

Conținutul acestei lucrări este rezultatul căutărilor de-a lungul mai multor ani și a încercării de a prezenta într-o formă concisă, coerentă și unitară, problematica majoră a Imunologiei, în contextul dovezilor tot mai numeroase și mai convingătoare, că funcția imunitară are nu numai rolul clasic de apărare antiinfecțioasă, ci este într-o continuă expansiune a implicării sale, atât în menținerea homeostaziei chimice a organismului, cât și în numeroase stări patologice.

Imunologie și Imunochimie este titlul unei lucrări care și-a propus ca deziderat, să consolideze un mod de gândire și de înțelegere a funcției de apărare ca o funcție biologică esențială, a cărei activare are nu numai efecte benefice, dar uneori generează manifestări patologice, așa cum sunt reacțiile de hipersensibilitate și conflictele imunitare care stau la baza progresiei maladiilor autoimune.

În construcția lucrării *Imunologie și Imunochimie* am pornit de la volumul “Imunobiologie și de la captivantele cursuri ținute, la începuturile Imunologiei în Facultatea de Biologie a Universității București, de Domnul Academician Profesor Doctor Docent G. ZARNEA, căruia îi aduc un respectuos omagiu pentru generozitatea efortului constructiv al Domniei Sale, investit în dezvoltarea disciplinelor microbiologice.

Lucrarea *Imunologie și Imunochimie* este materializarea eforturilor de actualizare și conectare cât mai trainică a domeniului, la realitățile științifice ale momentului.

Lucrarea se adresează tuturor studenților și absolvenților mai noi, dar mai ales celor vechi, ai facultăților de Biologie, Medicină umană și Medicină veterinară, precum și specialiștilor ale căror preocupări profesionale, practice sau teoretice, interferă cu domeniul Imunologiei.

Țin să mulțumesc anticipat tuturor aceluia care vor studia lucrarea *Imunologie și Imunochimie* și vor face observații critice întemeiate, de care voi ține seama într-o viitoare ediție a acestei cărți.

Autorul

INTRODUCERE

Imunologia studiază, în primul rând, funcția de apărare a organismului uman și animal, care face parte din categoria funcțiilor de relație și este esențială pentru supraviețuire. Sistemul imunitar este esențial pentru supraviețuirea organismelor multicelulare, datorită agresiunii permanente a agenților infecțioși (microorganisme și virusuri). Omul adult poartă pe suprafața mucoaselor și a tegumentului, un număr uriaș de celule bacteriene (circa 10¹⁴), mai multe decât propriile celule, unele având potențialul de a iniția procese infecțioase.

Disfuncția severă congenitală sau dobândită a funcției imunitare este incompatibilă cu viața.

Termenul de imunitate are o proveniență socială: în Roma antică, persoanele scutite de impozite către stat, erau considerate "îmune". Sensul termenului s-a extins, ulterior desemnând persoanele scutite de a suferi efectele infecției cu agenți patogeni.

Imunologia s-a născut și s-a dezvoltat ca un domeniu al Microbiologiei, bazându-se pe cunoștințele și conceptele Patologiei și Biochimiei.

În sensul clasic, restrâns al noțiunii, Imunologia studiază reactivitatea organismului animal și uman, consecutiv contactului cu agenții patogeni, mecanismele elaborării răspunsului imun, precum și particularitățile țesuturilor, celulelor și moleculelor care condiționează starea de imunitate. În sens clasic, noțiunea de imunitate definește starea de nereceptivitate sau de rezistență a organismului față de un agent patogen infecțios, în situația în care sunt îndeplinite condițiile pentru apariția unei maladii infecțioase. Din acest motiv, Imunologia s-a dezvoltat ca un domeniu al Microbiologiei.

În concepția clasică, s-a considerat că activarea funcției imunitare are un efect exclusiv benefic, protector pentru organism.

În concepția modernă, funcția imunitară se definește ca o proprietate biologică esențială a organismului uman și animal, care constă în capacitatea de a diferenția rapid și specific, substanțele proprii de cele străine.

Sistemul imunitar este tolerant față de substanțele proprii, deoarece “a învățat să le recunoască în timpul vieții embrionare, dar este dotat cu proprietatea de a recunoaște și de a diferenția prompt substanțele străine, față de care se activează și le îndepărtează din organism.

Toleranța imunitară este rezultatul unui proces de selecție a clonelor de limfocite, selecție ce are loc în perioada dezvoltării embrionare a limfocitelor, ele fiind celulele efectoare ale răspunsului imun. Selecția constă în eliminarea clonelor de limfocite potențial autoreactive (potențial reactive față de moleculele proprii)

Componentele chimice proprii organismului, pe care sistemul imunitar le tolerează, sunt incluse în noțiunea de self (self, englez = propriu), iar cele străine, care se abat de la structura chimică programată genetic a organismului, poartă denumirea de substanțe nonself sau antigene. Astfel, funcția imunitară este o funcție biologică esențială, prin intermediul căreia organismele diferențiază prompt și cu mare sensibilitate, componentele self de substanțele nonself.

Funcția imunitară are un rol determinant pentru păstrarea homeostaziei mediului intern și a individualității chimice a fiecărui organism, prin faptul că sistemul imunitar recunoaște și tolerează moleculele proprii, dar se activează la contactul cu substanțele străine care se abat de la programul biochimic tolerat.

După ce învață să tolereze self-ul, chiar din perioada dezvoltării embrionare, funcția imunitară realizează un permanent control de calitate a moleculelor self.

Așa cum aparatul genetic asigură stabilitatea și integritatea unei specii ca sistem biologic, sistemul imunitar asigură păstrarea homeostaziei biochimice a organismului.

Funcția imunitară este mediată de molecule cu rol de receptori de pe suprafața limfocitelor și de molecule solubile în umorile organismelor.

Obiectul de studiu al Imunologiei s-a diversificat odată cu progresul general al științelor biologice și în special, odată cu aprofundarea cunoașterii funcției de apărare. Începând din anii 60, interesul științific pentru Imunologie a crescut considerabil din două motive:

1) În primul rând s-a demonstrat că funcția imunitară este esențială pentru organism, insuficiența sa măbind riscul infecțiilor cu microorganisme patogene sau potențial patogene, iar disfuncția imunitară severă este incompatibilă cu viața.

2) S-a demonstrat că activarea funcției imunitare nu este totdeauna benefică pentru organism, ci uneori, stimularea ei determină leziuni tisulare severe, chiar ireversibile, asociate cu stările de hipersensibilitate sau inițiază evoluția unor stări patologice grave, ca de exemplu, maladiile autoimune. Exemplul clasic este oferit de infecția cu *Mycobacterium tuberculosis* sau cu *M. leprae*. Leziunile tisulare, materializate în existența granuloamelor, se datorează chiar răspunsului imun, care este așa de amplu încât produce manifestările patologice.

Stările de hipersensibilitate definesc o stare de reactivitate imunitară crescută și se caracterizează prin aceea că, la primul contact cu o substanță nonself, nu se produce un răspuns imun detectabil, ci organismul dobândește o stare specială de sensibilizare imunitară față de un antigen. La contactul secundar ulterior, chiar cu cantități foarte mici ale antigenului sensibilizant, organismul

răspunde cu manifestări patologice de intensități variabile, al căror rezultat final poate fi fatal. Așa se întâmplă în stările de hipersensibilitate (alergii) la polen, la diferite medicamente (de exemplu, penicilina), la veninul insectelor sau la diferite substanțe alimentare. Modificările patologice consecutive alergiilor pot fi locale sau generalizate.

Un domeniu vast, în continuă expansiune, dar relativ recent al Imunologiei îl constituie maladiile autoimune. În esență, maladiile autoimune semnifică întreruperea stării de toleranță perfectă pe care sistemul imunitar o manifestă față de componentele self. Datorită unor stări fiziologice legate de procese de îmbătrânire, unor procese infecțioase, datorită unor procese patologice degenerative sau ca urmare a utilizării substanțelor medicamentoase, în organism se produc modificări chimice tisulare care sunt detectate de celulele sistemului imunitar. Consecința este declanșarea unui răspuns imun față de componentele self modificate chimic. Astfel se inițiază un conflict autoimun, în cursul căruia sistemul imunitar generează efectorii săi - celule activate și molecule - care recunosc specific moleculele self modificate.

Respingerea grefelor de țesuturi și organe este consecința activării funcției imunitare. Antigenele țesutului grefat, solubile sau fixate pe suprafața celulelor din grefă, activează limfocitele (celulele efectoare ale răspunsului imun). Autogrefele sunt totdeauna tolerate. În condițiile unei reactivități imunitare normale, alogrefele și xenogrefele sfârșesc prin a fi respinse. Cu cât diferențele genetice și implicit biochimice între organismul donor și cel receptor de grefă sunt mai accentuate, cu atât grefa este respinsă mai repede.

Etapele dezvoltării Imunologiei ca știință

Imunologia este o știință relativ tânără, care a apărut inițial ca un domeniu a Microbiologiei, care la începuturile sale a studiat mecanismele reacțiilor de apărare a organismului uman și animal față de agresiunea infecțioasă. Imunologia a fost fundamentată de descoperirile lui Pasteur și Metchnikoff și păstrează încă legături de esență cu disciplina mamă - Microbiologia, deși astăzi ea este una dintre ramurile cele mai importante și mai dinamice ale științelor biologice.

Apariția Imunologiei ca știință a fost precedată cu milenii, de observații empirice referitoare la faptul că vindecarea unor maladii infecțioase era urmată de o stare de rezistență permanentă la reinfecție sau cel mult de forme ușoare de îmbolnăvire. Cu 2-3 secole î.C., în China și India s-a observat că unele maladii foarte grave (variola, pesta, ciuma), lasă în urmă o stare de rezistență permanentă la reinfecție sau cel mult, persoanele făceau forme foarte ușoare de îmbolnăvire.

În infecția variolică, apar leziuni caracteristice mai ales pe tegumentul feței. Mai întâi apar vezicule mici, pline cu lichid clar, al căror conținut se tulbură datorită infiltratului celular și fac crustă, iar după vindecare, lasă o cicatrice ce se păstrează toată viața (vărsat de vânt). S-a trecut la infectarea artificială a persoanelor sănătoase în scopul declanșării unei îmbolnăviri ușoare, care să instaleze starea de imunitate. Practica variolizării prin prizarea pe nas a mojaratului de cruste uscate, recoltate de la cei trecuți prin boală, era însoțită de infecții grave, datorită cantității mari de virus inhalat.

În 1418, procedeul variolizării a fost introdus în Anglia de Mary Wortley Montagu și s-a practicat o perioadă, cu toate riscurile îmbolnăvirii cu severitate necontrolată.

Vaccinarea antivariolică a fost introdusă de E. Jenner (1796). Ca vaccin, el a utilizat un virus de la bovine (cowpox). Metoda s-a bazat pe observația empirică a rezistenței în cursul marilor epidemii de variolă, a mulgătorilor care fuseseră infectați cu virusul cowpox. Acesta, produce o infecție pustulară și fiind înrudit antigenic cu virusul variolei, conferă protecție antivariolică. Vaccinarea persoanelor sănătoase s-a făcut cu lichidul recoltat din pustulele de pe ugerul vacilor.

Perioada științifică a Imunologiei a fost inaugurată de L. Pasteur, prin descoperirea unor vaccinuri cu o largă aplicație practică. Denumirea de vaccin a fost dată de Pasteur, în amintirea produsului recoltat de Jenner din leziunile de pe ugerul vacii. Denumirea s-a păstrat pentru toate produsele folosite în practică, pentru a crea o stare de rezistență preventivă față de eventualul contact cu agentul patogen.

Pasteur a fundamentat științific practica producerii și utilizării vaccinurilor. El a demonstrat că proprietățile biologice (patogenitatea și virulența) bacteriilor și virusurilor patogene nu sunt fixe. În anumite condiții, aceste proprietăți se pot diminua prin anumite artificii de tehnică, așa încât un agent virulent care de regulă determină o infecție mortală, poate fi transformat într-un agent care produce o infecție ușoară, fără semne clinice, dar creează o rezistență foarte solidă. Vaccinurile atenuate îndeplinesc aceste deziderate. Pasteur a atenuat virulența agenților patogeni prin două metode: prin învechirea culturilor și prin cultivarea la temperaturi ridicate. Pasteur a descoperit trei vaccinuri: al holerei găinilor, al antraxului la ovine și al rabiei.

Agentul patogen al holerei găinilor *Yersinia pestis* este o bacterie foarte virulentă. Un inocul de câteva celule este suficient pentru a produce îmbolnăvirea și moartea organismelor sensibile. Cultura virulentă de *Yersinia*, prin menținere la temperatura camerei (învechire) se atenuază și după inoculare la găinile normale, nu mai produce îmbolnăvirea. Păsările inoculate cu cultura bacteriană atenuată, devin rezistente la reinfecția cu o cultură virulentă, spre deosebire de păsările lotului martor, care se îmbolnăvesc și mor. Cultura bacteriană veche a creat o stare de imunitate, adică a avut rolul unui vaccin. Atenuarea virulenței prin învechirea culturii este un proces necontrolat și probabil se datorează modificărilor biochimice sau genetice ale celulelor, sub influența produselor de catabolism acumulate în mediul de cultură sau se datorează epuizării mediului în substanțele esențiale pentru creștere.

Agentul patogen al infecției cărbunoase (anthrax) este *Bacillus anthracis*, o bacterie sporulată. Sporul se formează la 37°C. Cultura bacteriană crescută la 42°C, își modifică proprietățile biologice, pierde capacitatea de sporulare (devine asporogenă). Aceste modificări se însoțesc de

pierderea progresivă a virulenței. Incubarea la 42o este o modalitate a obținerii dintr-o cultură virulentă, a unei culturi cu virulență progresiv atenuată pentru organismul gazdă(oaie, iepure, cobai, șoarece).

Cărbunele este o boală gravă a oilor, ce se transmite și la om. Pasteur a imaginat o schemă de vaccinare a ovinelor, începând cu un inocul bacterian virulent pentru șoarece și continuând cu inocul bacterian cu virulență mai mare. A creat o stare de imunitate a ovinelor, cărora le-a conferit rezistență la bacteriile foarte virulente.

Agentul infecțios al rabiei nu a fost evidențiat de Pasteur. Autorul a utilizat țesut nervos medular sau creier de la iepurele infectat experimental, pe care l-a modificat prin uscare în prezența potasei caustice. A obținut un vaccin care, administrat cât mai repede după mușcătura animalului rabid, creează o stare de rezistență, în absența căreia infecția rabică evoluează invariabil spre moarte.

Cercetările lui Pasteur au pus bazele Imunologiei medicale și ale obținerii și utilizării pe baze științifice a vaccinurilor. A urmat o perioadă în cursul căreia s-au înregistrat progrese importante în obținerea și administrarea vaccinurilor.

Bazele conceptului imunității humorale au fost puse de Behring și Kitasato (1890), care au evidențiat anticorpii serici, după imunizarea animalelor de laborator. Serurile imune pot fi folosite în scop terapeutic pentru a stopa sau a atenua evoluția unei boli infecțioase, cu condiția ca administrarea acestor seruri să fie foarte precoce. În 1923, Behring a organizat producția de seruri imune, preluată de Institutul Pasteur din Paris (înființat în 1894) și apoi de Institutul Babeș și de Institutul Cantacuzino.

În 1894, Pfeiffer a descris fenomenul de bacterioliză, demonstrând că serul sanguin al animalelor imunizate are proprietatea de a provoca liza celulelor bacteriene. El a demonstrat că bacterioliza necesită două componente: serul sanguin al animalului imunizat și o picătură de ser proaspăt de cobai. Procesul este foarte specific: serul produce numai liza celulelor bacteriene care au specificitate față de anticorpii serici.

J. Bordet a evidențiat că fenomenul lizei se produce și în cazul hematiilor, dacă sunt puse în contact cu serul sanguin de la iepurele imunizat cu hematii, la care se adaugă ser proaspăt de cobai, în care se găsește complementul (alexina).

Conceptul imunității mediate celular a fost formulat de Metchnikoff (1891). El a evidențiat că în organism există o serie de celule specializate, cu capacitatea de a recunoaște celulele străine și de a le îngloba prin procesul de fagocitoză, care sunt digerate și eliminate din celula fagocitară. Metchnikoff a făcut observații pe crustaceul *Daphnia magna*, ale cărui celule fagocitare înglobează și digeră sporii fungici (*Monospora bicuspidata*). Când infecția cu spori este masivă, capacitatea de apărare a organismului este depășită și gazda moare.

Cele două doctrine ale fenomenului imunitar, care s-au confruntat prin reprezentanții lor, au fost unificate de Wright (1903). El a demonstrat existența în ser a unor anticorpi naturali denumiți opsonine, care acționează în cooperare cu fagocitele.

În 1930, K. Landsteiner a evidențiat o structură antigenică pe suprafața hematiilor umane și a stabilit existența sistemului antigenic ABO, precum și a normelor ce trebuie respectate în practica transfuziei de sânge.

Ramon (1925) a demonstrat că unii agenți patogeni (ca de exemplu, al difteriei, al tetanosului) produc toxine foarte puternice. Aceste toxine au un potențial foarte ridicat: cantități foarte mici de toxine sunt suficiente pentru a provoca moartea animalelor de experiență. Tratarea preparatului de toxină cu formol 4‰ și menținerea amestecului la 39°C pentru o perioadă de timp, este urmată de pierderea completă a proprietăților toxice. Preparatul atoxic este inofensiv și poate fi administrat în cantități relativ mari, fără să determine efecte patologice. Preparatul atoxic își păstrează proprietățile imunogene și induce o stare de rezistență a organismelor imunizate. Sub acțiunea combinată a formolului și temperaturii, toxinele difterică și tetanică au fost transformate în anatoxine.

Cercetările de biochimie (1930-1950) au permis elucidarea structurii moleculare a antigenelor, a imunoglobulinelor și a haptanelor.

Studiul mecanismelor celulare ale proceselor imunitare (1950-1980) este marcat de progresele biologiei moleculare și de interferența cu Virologia, Microbiologia, Biologia celulară, Biofizica, Biochimia, Genetica. S-a evidențiat rolul esențial al limfocitului în fenomenele imunitare, precum și rolul plasmocitelor în sinteza și secreția anticorpilor.

McFarlane Burnet (1959) a elaborat teoria selecției clonale a răspunsului imun, iar J.F.A.P. Miller (1960) a stabilit rolul esențial al timusului în dobândirea competenței funcționale a limfocitelor T.

R. Good (1960) a evidențiat rolul bursei lui Fabricius în geneza sistemului imunitar la păsări.

J. Dausset (1954) a demonstrat că pe suprafața celulelor oricărui organism se găsește o serie de molecule (antigene), care conferă fiecărui organism o individualitate antigenică unică. Datorită acestor antigene, reacțiile care sunt determinate de o greșă de țesut sau de organ, pot evolua în mod diferit: între organisme foarte înrudite, greșă prinde foarte bine, iar o greșă între organisme cu diferențe majore de ordin genetic, produce o reacție de respingere, care este cu atât mai rapidă cu cât diferențele antigenice sunt mai mari. Antigenele suprafeței celulare care conferă individualitate biochimică unică fiecărui organism, se numesc antigene de histocompatibilitate. Evaluarea diferențelor celor doi parteneri (donor și receptor) în ceea ce privește moleculele de histocompatibilitate, este esențială înainte de greșărea organului.

După 1970, studiul sistemului imunitar corespunde unei abordări integratoare. După opinia lui N. K. Jerne (1985), "imunologia și-a pierdut statutul de disciplină izolată, fiind pe cale de a fi absorbită de biologia clasică.

După 1980, Imunologia s-a diversificat și s-a aprofundat, dar în același timp este mai unificată ca oricând, sub imperativul numitorului comun al înțelegerii funcției imunitare la nivel molecular. Abordările moleculare vor sta la baza tuturor cercetărilor viitoare, legate de funcția imunitară.

În perspectivă, orizontul de evoluție a Imunologiei se extinde asupra înțelegerii genelor codificatoare ale moleculelor efectoare și reglatoare ale răspunsului imun și ale mecanismelor acțiunii lor. Astfel vom înțelege diferențierea limfocitelor, activarea lor, mecanismele sintezei, secreției, recirculării limfocitelor și mecanismele acțiunii moleculelor efectoare. Ar urma utilizarea cunoștințelor imunologice pentru prevenirea maladiilor cu substrat imunitar (alergii, maladii autoimune), pentru prevenirea respingerii greșălor de țesuturi și organe și pentru imunoterapia neoplaziilor. Va fi o perioadă a reînțoarcerii aplicării Imunologiei moleculare, la nivelul întregului organism.

Diviziunile Imunologiei

Imunologia s-a născut ca un domeniu al Microbiologiei și s-a dezvoltat ca un domeniu al Bacteriologiei medicale, cu care a rămas în raporturi de dependență până către anul 1960. Treptat înșă, prin acumularea unui volum mare de date științifice care au demonstrat intervenția funcției imunitare și a reacțiilor imune în numeroase fenomene normale și patologice, Imunologia a devenit o știință de sine stătătoare. Consecința firească a implicării funcției imunitare într-o multitudine de procese normale și patologice, a fost aceea că din domeniul Imunologiei s-au desprins ramuri care, la rândul lor, tind să aibă o existență autonomă.

Imunobiologia este cea mai cuprinzătoare dintre ramuri. Ea studiază fenomenele imunitare ca manifestări ale unei funcții biologice esențiale ă funcția de apărare. Studiază substratul biologic al răspunsului imun (celulele imunitare, originea și mecanismele diferențierii lor, factorii celulari și humoralii care asigură diferențierea lor), mecanismele celulare și moleculare ale biosintezei anticorpilor, explică implantarea celulelor tumorale și geneza cancerului clinic în condițiile acțiunii efectorilor sistemului imunitar. Studiază mecanismele imunitare ale respingerii grefelor de țesuturi și organe, mecanismele reactivității imunitare în filogenie și ontogenie, precum și bazele celulare și moleculare ale stărilor de hipersensibilitate și ale maladiilor autoimune.

Imunochimia este o disciplină de graniță ce aparține Imunologiei și Biochimiei, care studiază funcția imunitară sub aspect biochimic. Preocuparea esențială a constat în studiul chimiei antigenelor și anticorpilor și al mecanismului lor de interacțiune în reacția antigen-anticorp. Datele referitoare la structura chimică a antigenelor și anticorpilor au pus bazele Imunochimiei, dar ulterior, domeniul și-a lărgit sfera de activitate și studiază următoarele aspecte:

- factorii moleculari ai răspunsului imun și în special ai imunității mediate celular;

- moleculele de histocompatibilitate;

- markerii antigenici specifici diferitelor populații de celule limfoide;

- moleculele cu funcție de receptor de antigen, pe suprafața celulelor limfoide;

- factorii de cooperare celulară în cursul elaborării răspunsului imun (interleuchine);

- componentele complementului etc.

Termenul de Imunochimie a fost introdus de chimistul suedez Arrhenius (1907). El și-a intitulat astfel studiul cu privire la reacțiile chimice care se produc în organismul uman și animal, după imunizare. Fondatorul Imunochimiei este P. Ehrlich. El a introdus metode cantitative în studiul reacțiilor antigen-anticorp și a elaborat o teorie generală asupra recunoașterii imune (teoria catenelor laterale sau a receptorilor). După 1950, Imunochimia s-a dezvoltat spectaculos, datorită descoperirilor din domeniul biochimiei, datorită utilizării unor metode fizico-chimice de analiză a macromoleculilor și prin aplicarea acestora la domeniul Imunologiei. S-a născut un set de metode, în esență biochimice, puse în slujba analizei moleculelor implicate în funcția imunitară. Domeniul s-a numit analiză imunochimică și utilizează metode care derivă din îmbinarea tehnicilor fizico-chimice cu cele imunologice. Imunochimia este deservită de metoda imunodifuziei, imunofluorescenței, RIA, ELISA, dializa la echilibru etc. Efectul utilizării acestor metode de investigare a fost cunoașterea mecanismelor moleculare care stau la baza răspunsului imun, îndeosebi humoral și aplicarea în laboratorul clinic, a unor noi metode de diagnostic.

În clinică, studiile de Imunochimie au propus noi metode de tratament, bazate pe interacțiunea unor molecule cu rol de vehicul pentru anticorpi, cu receptorii unor celule țintă (imunotoxine).

Imunogenetica studiază determinismul genetic al răspunsului imun: mecanismele genetice care asigură diversitatea anticorpilor și a antigenelor de histocompatibilitate.

Imunohematologia s-a născut odată cu stabilirea diferențelor antigenice ale eritrocitelor umane și cu precizarea grupelor sanguine (K. Landsteiner, 1901) și s-a dezvoltat după ce s-a stabilit existența unor diferențe fine între diferite tipuri de eritrocite și, în special, după descoperirea factorului Rh și a rolului său în patologia sarcinii.

Imunologia medicală umană și veterinară s-a dezvoltat în trei direcții:

- direcția profilactică, orientată spre descoperirea și producerea unor noi vaccinuri, capabile să creeze o stare de rezistență. Ea se preocupă, de asemenea, de schemele de vaccinare, de posibilitatea asocierii diferitelor vaccinuri și de posibilitatea stimulării răspunsului imun cu ajutorul adjuvanților;

- direcția terapeutică studiază posibilitatea obținerii serurilor imune. Ele conțin anticorpi și se administrează organismelor care prezintă riscul îmbolnăvirii prin infecții;

- direcția diagnosticului studiază posibilitatea identificării agenților etiologici ai diverselor maladii infecțioase, cu ajutorul reactanților imunologici (seruri imune și antigene).

Imunopatologia studiază fenomenele imunitare în relație cu diferite maladii. În multe situații patologice, răspunsul imun (activarea funcției imunitare) are efecte defavorabile, prejudiciante asupra organismului. Răspunsul imun se instituie drept cauză, dar în special ca mecanism, pentru producerea unor manifestări patologice. Afecțiunile generate de activarea sistemului imunitar (imunopatii) se grupează în două categorii:

- stările de hipersensibilitate (alergiile);

- maladiile autoimune.

Imunopatologia studiază, de asemenea, imunodeficiențele (înăscute și dobândite), imunitatea de transplant și imunitatea antitumorală, răspunsul imun în maladiile infecțioase virale și bacteriene, precum și în maladiile parazitare.

Serologia (Imunoserologia) s-a dezvoltat ca o ramură practică, dedicată studiului tehnicilor de explorare a reacțiilor imune in vitro.

p

8

p

p

CARACTERIZAREA GENERALĂ

A ANTIGENELOR

GR. MIHĂESCU, CAMELIA MIHĂESCU

Convențional, antigenele se definesc ca substanțe străine, care, consecutiv introducerii în organismul uman sau animal pe o cale parenterală (alta decât cea digestivă), declanșează sinteza anticorpilor cu care se combină specific. Definiția este incompletă din câteva motive.

1. Calea digestivă de administrare a antigenelor nu exclude totdeauna posibilitatea declanșării răspunsului imun. Pentru agenții infecțioși care se multiplică în tractul digestiv, administrarea orală asigură o bună imunizare (de exemplu, vaccinul polio se administrează oral, deși calea parenterală este mai eficientă).
2. Unele substanțe nonself sunt în mod eronat considerate ca neantigenice, deoarece, deși in vivo stimulează reactivitatea imunitară și induc sinteza unei cantități mici de anticorpi, in vitro nu produc reacții vizibile antigen-anticorp.
3. Față de unele antigene, organismele nu declanșează răspunsul imun, ci manifestă o stare de toleranță.
4. Unele molecule în stare nativă nu induc un răspuns imun, ci numai după cuplarea covalentă cu o moleculă purtător. Molecula nativă își păstrează proprietatea de a se combina specific cu anticorpii sintetizați. Astfel de molecule se numesc haptene.

J. F. Bach (1976) definește antigenele ca fiind molecule care, consecutiv introducerii în organism pe o cale adecvată, induc un răspuns imun materializat prin proliferarea celulelor limfoide și sinteza moleculelor de recunoaștere (anticorpi și receptori celulari), cu care se combină in vivo și in vitro.

Modelul general de structură a unui antigen

O moleculă antigenică este alcătuită din două componente;

- componenta purtător (“carrier”), care corespunde celei mai mari părți a moleculei:
- grupările determinante de specificitate sau epitopi, localizate pe suprafața componentei purtător și formate din secvențe specifice de monomeri. Epitopii, prin secvența proprie a monomerilor și prin configurația spațială specifică, conferă individualitate chimică și specificitate antigenică moleculei nonself. Grupările determinante de specificitate sunt echivalenții moleculari și funcționali ai haptenei.

Grupările determinante de specificitate se găsesc în număr variabil pe suprafața purtătorului și pot fi identice atât în ceea ce privește compoziția chimică, cât și configurația spațială (ca în cazul antigenelor polizaharidice cu epitopi repetitivi) sau sunt diferite, atât ca secvență a monomerilor cât și în privința configurației spațiale. Fig. 1. Modelul general de structură a unui antigen. Cea mai mare parte a oricărei molecule antigenice este reprezentată de gruparea carrier, pe care sunt localizați epitopii cu diferite configurații spațiale, stimulatori ai reactivității imunitare. Unii epitopi pot fi unici, iar alții sunt multipli. Uneori, epitopii stimulează sinteza anticorpilor cu afinități diferite.

Proprietățile definitorii ale antigenelor

În studiile experimentale asupra imunogenității unor molecule sintetice, M. Sela (1969) a descris două proprietăți esențiale ale antigenelor:

1. Imunogenitatea sau antigenitatea este proprietatea unui antigen complet, format din gruparea carrier și epitopi, de a declanșa un răspuns imun, humoral sau celular, ori de câte ori pătrunde în organism pe o cale adecvată. Proprietatea de imunogenitate este asociată cu gruparea carrier a moleculei de antigen, grupare care într-o oarecare măsură influențează și specificitatea anticorpilor.

2. Specificitatea definește capacitatea antigenului întreg sau numai a epitopilor săi de a se combina specific cu anticorpii sau cu receptorii celulari a căror sinteză a fost indusă. Proprietatea de specificitate este dependentă, în primul rând de epitopi, dar este influențată într-o măsură mai mare sau mai mică și de gruparea carrier.

Noțiunea de imunogen, uneori, este distinctă de aceea de antigen. Noțiunea de imunogen este mai restrictivă și semnifică proprietatea unei substanțe, în stare nativă, de a stimula răspunsul imun, fără să necesite conjugarea cu o altă moleculă.

Noțiunea de antigen este mai largă, deoarece desemnează molecule nonself care sunt imunogene în stare nativă sau devin imunogene după conjugarea cu o moleculă purtător. Antigenul poate fi uneori incapabil, în forma sa nativă, să stimuleze răspunsul imun.

CLASIFICAREA ȘI IMUNOGENITATEA ANTIGENELOR

După originea lor, antigenele sunt exogene și endogene.

Antigenele exogene sunt cele mai numeroase și pot fi împărțite în trei categorii: 1) naturale; 2) artificiale; 3) sintetice.

Antigene naturale

Antigenele naturale formează categoria cea mai cuprinzătoare. Aici sunt incluse toate macromoleculele naturale din virusuri, microorganisme, fungi, plante și animale.

După dimensiuni se disting antigene moleculare ("solubile") și antigene corpusculare.

Antigenele moleculare (solubile) constituie gruparea cea mai numeroasă, care include toate tipurile de macromolecule: proteine, polizaharide, lipide, acizi nucleici.

Antigenele corpusculare ("insolubile") sunt reprezentate de virusuri și de celule (procariote și eucariote).

Antigenele moleculare

Cele mai studiate antigene sunt proteinele și polizaharidele, la care se adaugă conjugatele: glicoproteine, nucleoproteine, lipoproteine, peptidoglicani, glicolipide.

Proteinele sunt cele mai numeroase și mai importante antigene moleculare. Diversitatea lor chimică, generată de variația secvenței de aminoacizi este uriașă. Practic, fiecare tip de moleculă proteică nonself din lumea vie este un antigen pentru organismul animal și uman, deoarece are o secvență unică de aminoacizi, care determină o structură secundară și tridimensională proprie și implicit, existența unor epitopi proprii ca secvență a aminoacizilor și conformație spațială.

Imunogenitatea este o proprietate generală a proteinelor, a celor cu rol structural (colagenul, cheratina, elastina, fibroina viermelui de mătase, proteinele capsidului viral), a celor cu rol funcțional (miozină, actină, albumină, hemoglobină, mioglobină, enzime, hormoni, imunoglobuline), a celor cu rol de depozit de aminoacizi (ovalbumina, cazeina, gliadina din semințele de grâu). Toate proteinele și polipeptidele cu o greutate moleculară mai mare de 1000 D sunt imunogene, într-o măsură mai mare sau mai mică.

De cele mai multe ori, pentru antigenele proteice, nu se face distincția dintre epitopii inductori ai răspunsului imun și gruparea carrier, deoarece proteinele posedă un spectru continuu de determinanți antigenici, ce corespund unor secvențe discrete ale suprafeței moleculare localizate în zonele cele mai expuse contactului cu receptorii sistemului imunitar. Antigenitatea moleculelor globulare este determinată adeseori, de configurația lor spațială, rezultată din plierea tridimensională. Pentru cele mai multe proteine globulare (mioglobina, hemoglobina, lizozimul,

ribonucleaza etc.), aproape toți determinanții antigenici sunt conformaționali, adică sunt rezultatul plierii spațiale a moleculei, iar alții sunt secvențiali, adică sunt reprezentați de o secvență particulară de aminoacizi. Moleculele proteice fibrilare (cheratina, colagenul, fibroina) au configurații mai simple decât cele globulare, catenele lor fiind aranjate sau răsucite pe o singură dimensiune. Determinanții antigenici ai acestor proteine sunt secvențiali, formați din 3-6 aminoacizi.

Sistemul imunitar al unui organism recunoaște un număr limitat de determinanți antigenici ai unei molecule proteice. Epitopii, conformaționali sau secvențiali, care stimulează răspunsul imun in vivo, iar in vitro induc proliferarea limfocitelor, se numesc epitopi dominanți. O parte a determinanților antigenici ai unei molecule native, cel mai adesea, sunt neimunogeni (imunosențioși), nefiind accesibili sistemului imunitar al organismului, dar se pot exprima într-un anumit set de condiții de imunizare (gazdă, adjuvant etc.). Aceștia sunt epitopi interni ai proteinelor globulare. Un determinant intern poate fi silențios în molecula nativă, dar devine imunostimulator după clivarea enzimatică a moleculei, in vivo sau in vitro. De aceea, M. Sela a recomandat utilizarea termenului de “grupare imunodominantă”, pentru epitopul sau epitopii care se exprimă în anumite condiții (gazdă, adjuvant, cale de administrare) și determină specificitatea răspunsului imun.

Fig.2. Epitopii dominanți sunt localizați la suprafața moleculei globulare. Epitopii subdominanți devin accesibili după clivarea moleculei în etapa prelucrării în macrofag, iar epitopii criptici sunt inaccesibili fenomenului de recunoaștere imunitară.

Imunogenitatea antigenelor proteice se modifică în diferite condiții.

Denaturarea moleculelor native sub acțiunea agenților chimici și a căldurii, modificarea configurației moleculei sub acțiunea agenților reducători sau hidroliza enzimatică, modifică imunogenitatea. Anticorpii specifici față de proteina nativă precipită slab sau de loc proteina denaturată termic sau chimic.

Formaldehida și glutaraldehida sunt agenți de legare încrucișată a moleculelor proteice, constituind rețele multimoleculare stabile. Acești agenți produc denaturarea proteinelor și modifică funcțiile celor cu activitate biologică (toxine, enzime). Astfel, exotoxinele tratate cu formaldehidă, își pierd proprietățile toxice, dar rămân imunogene. Formaldehida și glutaraldehida se folosesc pentru conservarea antigenelor cu greutate moleculară mică (peptide), dar sunt mai puțin utilizate pentru conservarea proprietăților antigenice ale moleculelor mari. Agenții chimici de legare încrucișată modifică imunogenitatea moleculelor proteice prin schimbarea conformației moleculei și mascarea epitopilor sau prin modificarea chimică a aminoacizilor epitopului.

Denaturarea semnifică deplierea structurii răsucite a moleculelor proteice și are loc prin modificarea pH, prin încălzire, prin reducerea legăturilor S-S sub acțiunea ureii și a beta-mercaptoetanolului sau a acidului performic. Prin denaturare, proteina își pierde nu numai funcția biologică, dar își modifică specificitatea antigenică. De exemplu, cele 4 punți S-S ale RN-azei, între resturile de cistină, sunt reduse de β -mercaptoetanol și transformate în 8 resturi de cisteină, cu pierderea totală a activității enzimatice. Anticorpul față de RN-aza pancreatică bovină nativă nu precipită moleculele de RN-ază denaturată prin reducerea legăturilor S-S. Invers, anticorpul față de RN-aza denaturată, nu precipită RN-aza nativă. Modificarea specificității anticorpilor sugerează că reducerea legăturilor S-S determină pierderea epitopilor conformaționali.

Proteinele denaturate reversează greu la forma nativă, chiar prin restabilirea condițiilor de mediu.

Hidroliza enzimatică modifică configurația spațială a moleculelor proteice native și diminuează imunogenitatea lor, cu atât mai mult cu cât fragmentele rezultate au dimensiuni mai mici. Prin clivare enzimatică se anulează imunogenitatea epitopilor conformaționali și se relevă epitopi care în molecula nativă au statutul de epitopi criptici.

O atenție specială s-a acordat studiului imunogenității unor proteine ale căror proprietăți biologice active sunt ușor de evaluat: enzime, inhibitori enzimatici, hormoni proteici, toxine, imunoglobuline (în calitatea lor de antigene), proteine ale capsidului sau ale învelișului viral.

Enzimele sunt antigenice, indiferent de originea lor. Reacția moleculelor de enzimă cu anticorpul specific a constituit o modalitate de determinare a poziției epitopilor. Anticorpul față de diferiți epitopi ai moleculei de enzimă modifică în grade foarte diferite activitatea ei catalitică. Dacă anticorpul este specific față de epitopi localizați la nivelul situsului activ al enzimei, molecula își pierde activitatea față de substrat, deoarece legarea anticorpilor la situsul activ inhibă competitiv legarea moleculelor de substrat. Gradul de inhibiție a activității enzimatice este cu atât mai accentuat, cu cât molecula este mai mare. Efectul inhibitor al anticorpilor nu se produce dacă enzima a legat deja substratul specific. Dacă grupările determinante de specificitate ale moleculei de enzimă sunt situate în afara situsului catalitic, activitatea enzimei este parțial inhibată, datorită modificărilor conformaționale care survin după reacția antigen-anticorp, sau rămâne intactă. Foarte rar, complexul enzimă-anticorp are un efect catalitic superior, comparativ cu enzima nativă.

Hormonii sunt molecule slabimunogene, datorită uniformității relative a structurii lor chimice în regnul animal. Anticorpul specific față de majoritatea hormonilor proteici se obține prin asocierea lor prealabilă cu adjuvantul Freund. Imunogenitatea hormonilor este într-o relație directă cu

gradul deosebirilor chimice existente între hormonul exogen și hormonul produs de organismul receptor. Consecința este sinteza anticorpilor antihormon.

Proprietățile antigenice ale insulinei sunt bine cunoscute, datorită utilizării clinice a hormonului. Molecula de insulină este alcătuită din două catene polipeptidice, cu un număr total de 51 de aminoacizi: 21 ai catenei A și 30 ai catenei B. Cele două catene sunt reunite prin punți S-S. Structura moleculelor de insulină de la diferite specii este foarte asemănătoare, 47 din cei 51 de aminoacizi fiind identici. Deosebirile se găsesc în catena A pentru aminoacizii 8, 9 și 10 (la bovine Ala, Ser, Val, la om sunt Thr, Ser, Ile, iar la ovine Ala, Gly, Val). În catena B, diferența este limitată la aminoacidul C-terminal. Aceste mici diferențe ale secvenței de aminoacizi nu modifică funcția hormonului. De aceea, insulina, indiferent de proveniență, este la fel de eficientă pentru tratamentul diabetului uman. Micile diferențe de secvență, în general, nu sunt sesizate de organismul receptor. Totuși, după administrare prelungită, organismele receptoare cu reactivitate imunitară mai înaltă, sintetizează anticorpi anti-insulină.

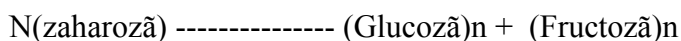
Polizaharidele, deși au complexitate structurală relativ mare, condiționată de multitudinea posibilităților de legare a atomilor de carbon, sunt molecule slabimunogene în stare nativă, comparativ cu proteinele. Antigenitatea lor este conferită de succesiunea unităților componente, de configurația spațială a moleculei și de greutatea moleculară. Cele cu greutatea mai mică de 50 kD nu sunt imunogene. Polizaharidele sunt antigene cu epitopi secvențiali repetitivi și cel puțin uneori, în funcție de originea polizaharidului și de specia imunizată, sunt imunogeni.

Din punctul de vedere al structurii moleculare, se disting două tipuri de polizaharide: a) cele care au o catenă centrală pe care se inseră ramificațiile laterale; b) polizaharide lipsite de o catenă centrală, iar ramificațiile sunt dispuse aleatoriu, fără nici o simetrie. Rolul catenelor centrale în conferirea imunogenității este controversat, dar ramificațiile laterale au o importanță deosebită pentru determinarea specificității antigenice a polizaharidelor. Din punctul de vedere al compoziției chimice pot fi homo- sau heteropolizaharide, iar în ceea ce privește sarcina, pot fi neutre sau încărcate. Oligo- și polizaharidele pot dobândi o structură terțiară (globulară). Uneori, configurația spațială a polimerului glucidic este determinantă pentru specificitatea sa antigenică. Schimbările conformaționale ale polizaharidelor se produc mai ușor decât ale proteinelor, pentru că au bariere energetice scăzute. Pentru polizaharide, denaturarea este practic necunoscută, ceea ce le conferă stabilitate. Dacă imunogenitatea polizaharidelor native este slabă, adeseori ele se comportă ca haptene, adică devin antigenice după cuplarea cu un purtător proteic, rezultând lectine, cu o foarte largă distribuție în lumea vie. În calitate de haptene, polizaharidele au proprietatea de specificitate, adică se combină cu anticorpii complementari față de complexul glicoproteic.

Din motive de ordin practic, cele mai studiate polizaharide din punct de vedere antigenic sunt cele de origine bacteriană: dextranul și polizaharidele capsulare.

Dextranii sunt polimeri ramificați de glucoză, resturile glucozil fiind unite mai ales prin legături de tip α 1-6, dar în funcție de specia producătoare, punctele de ramificație ale catenelor polimere pot fi 1-2, 1-3 sau 1-4.

Dextranii sunt sintetizați în special de unele bacterii lactice, din zaharoză, după reacția: Dextranază



Dextranii au greutatea moleculară foarte diferite (până la 106 D), în funcție de gradul de polimerizare. Nu sunt imunogeni și de aceea se folosesc ca înlocuitori ai plasmiei. Prin transfuzii repetate cu soluții de dextran la om și prin injectare repetată la șoarece, s-au sintetizat anticorpi antidextran. Specificitatea anticorpilor antidextran este foarte înaltă. În serul animalelor imunizate cu dextrani s-au detectat două tipuri de anticorpi: unii specifici față de resturile de glucozil legate 1-2 și alții specifici față de resturile de glucozil legate 1-3, ce nu dau reacții încrucișate, deși deosebirea dintre cele două categorii de molecule de dextran constă numai în modul diferit de legare a resturilor de glucozil între ele.

Polizaharidele capsulare se pot găsi fie sub forma moleculelor libere ("solubile"), fie sub formă corpusculară (atașate celulelor bacteriene capsulate).

Variațiile biochimice ale polizaharidelor capsulare, determinate de compoziția glucidică a catenei, de secvența monomerilor sau de modul de legare a lor în catenă, conferă tulpinilor bacteriene, specificitate antigenică de tip. La *Str. pneumoniae* s-au identificat peste 80 de tipuri antigenice ale polizaharidelor capsulare. În compoziția lor intră hexoze, pentoze, derivații lor aminați, metilați etc. Specificitatea antigenică a polizaharidelor capsulare depinde atât de compoziția chimică, cât și de succesiunea monomerilor în catena polizaharidică. Ca vaccinuri, polizaharidele induc starea de toleranță.

În stare purificată sunt molecule neimunogene, datorită uniformității lor structurale în lumea vie. Injectarea lor la animale nu induce sinteza anticorpilor. Acizii nucleici nativi sunt conjugate nucleoproteice, în care acizii nucleici au rolul de haptene. Majoritatea epitopilor conjugatului sunt conformaționali. O fracție din anticorpii anti-conjugat se combină cu acizii nucleici. Anticorpii anti-acizi nucleici se combină cu acizii nucleici în stare pură, indiferent de proveniență. Proteinele asociate acizilor nucleici conferă o nouă specificitate antigenică și determină sinteza anticorpilor care se combină cu proteina putător.

Experimental, anticorpul anti-acizi nucleici se obține pe una din următoarele căi:

1. Imunizarea cu bacteriofagi din seria T par (T2, T4, T6), supuși șocului osmotic. ADN al acestor fagi se deosebește de ADN din celulele eucariote, prin prezența 5-hidroxi-metilcitozinei glicozilate, în locul citozinei. Anticorpul are specificitate față de bazele glicozilate, ceea ce explică lipsa reacțiilor încrucișate cu alți acizi nucleici.

2. Imunizarea cu ribosomi din celulele vegetale sau animale. Anticorpul sintetizat reacționează cu ARN de origine bacteriană, vegetală sau animală, precum și cu polinucleotidele sintetice (poli-A, poli-C, poli-U), dar nu reacționează cu ADN nativ și nici cu ADN denaturat.

3. Imunizarea cu conjugate haptena-proteină, în care haptena este reprezentată de baze azotate, ribonucleozide, dezoxiribonucleozide, nucleotide, dinucleotide și trinucleotide. Anticorpul sintetizat reacționează atât cu haptena cât și cu ADN nativ sau denaturat.

4. Imunizarea cu complexe formate din acizi nucleici și albumină metilată. Cele două molecule formează un complex necovalent, datorită interacției dintre grupările negative ale acizilor nucleici și cele pozitive ale proteinei. Anticorpul sintetizat reacționează cu complexul molecular, cu proteina, cu acidul nucleic nativ și denaturat de diferite origini.

5. Anticorpul anti-acizi nucleici se găsește în sângele pacienților cu lupus eritematos diseminat (LED).

Anticorpul sintetizat față de acizii nucleici cu rol de haptene în conjugatele cu proteine nu are specificitate, deoarece precipită ADN monocatenar, ARN de diferite origini, poliribonucleotide și acizii nucleici dublu catenari.

Lipidele sunt molecule neimunogene în stare nativă, dar se pot cupla cu proteinele și în conjugatul format au rolul de haptene. Din punct de vedere imunologic, cele mai importante lipide sunt fosfatidele (sfingomielina și cefalina) și glicosfingolipidele (galactocerebrozida).

O haptena lipidică cu o importanță practică deosebită este cardiolipina, din cordul mamiferelor. În sângele indivizilor infectați cu *T. pallidum* se găsește anticorp care reacționează cu cardiolipina înalt purificată (reacție încrucișată), extrasă din cordul bovin.

Un alt antigen lipidic este antigenul Forssman, inductor al sintezei anticorpilor hemaglutinanți și în prezența complementului, hemolitici.

Studiul imunogenității lipidelor a fost îngreunat de insolubilitatea lor în apă. Problema reactivității anticorpilor cu antigenele lipidice a fost depășită parțial, prin utilizarea lipidelor auxiliare (lecitina și colesterolul) în suspensia antigenică. Disponibilitatea liposomilor a permis studiul imunogenității lipidelor asociate cu membranele.

Haptene

Haptenele(haptein, grec = a apuca) sunt substanțe chimice naturale sau de sinteză, cu moleculă mică, a căror imunogenitate este condiționată de cuplarea cu o moleculă purtător, dar își păstrează proprietatea de specificitate, adică reacționează cu anticorpii specifici a căror sinteză a fost indusă de haptena conjugată cu o moleculă cu rol de purtător.

Denumirea de “haptenă” a fost introdusă de Landsteiner pentru a caracteriza din punct de vedere funcțional un extract alcoolic de rinichi de cal, neimunogen ca atare pentru iepure, dar capabil să se combine cu anticorpii sintetizați după imunizarea iepurelui cu extractul alcoolic de rinichi de cal, cuplat cu o moleculă purtător. El a propus ca în categoria haptenelor să fie cuprinsă orice substanță naturală sau sintetică, cu greutate moleculară mică sau mare, care în formă nativă nu poate să inducă un răspuns imun detectabil, dar dobândește capacitatea imunogenă, după cuplarea sa in vivo sau in vitro, cu o moleculă purtător cu greutate moleculară mare. Conjugatul este imunogen nu numai în raport cu epitopii moleculei purtător, ci și cu epitopul haptenei.

Din punct de vedere funcțional, haptenele s-au numit “jumătăți de antigen”, deoarece au numai una din cele două proprietăți esențiale ale antigenelor: nu sunt imunogene, dar își păstrează proprietatea de specificitate. De aceea, termenul “antigenic” nu este sinonim cu cel de “imunogenic”. Haptena este un antigen, dar în forma sa nativă, nu este imunogenă.

În general, haptenele sunt molecule mici, deși uneori, macromoleculele pot funcționa ca haptene. Extractul alcoolic de rinichi de cal este o haptenă complexă. Haptenele simple sunt reprezentate de polinucleotide, alcooli, formaldehida, unele medicamente etc.

Utilizând haptenele simple, prin reacții de cuplare cu o moleculă purtător s-au obținut antigene artificiale. Haptena din complexul molecular are rolul grupării determinante de specificitate.

Studiul imunogenității conjugatelor haptenă-moleculă purtător a permis determinarea mărimii grupărilor determinante de specificitate ale antigenelor și indirect, determinarea situsului de combinare a anticorpilor. Pe aceiași cale s-a evaluat specificitatea, afinitatea și heterogenitatea anticorpilor. Haptenele au fost folosite pentru studiile de cristalografie cu raze X a unui complex antigen-anticorp.

Haptene autocuplante sunt molecule cu greutate moleculară mică, a căror particularitate constă în aceea că, după injectare, în organism se combină spontan cu proteinele tisulare și formează conjugate haptenă-proteină, in vivo. Conjugatele haptenă-proteină induc sinteza anticorpilor și determină procese de hipersensibilitate sau inițiază maladii autoimune. Astfel se comportă derivații dinitrofenolului substituiți cu clor sau fluor, unii produși de degradare a penicilinei.

Antigenele corpusculare

Antigenele corpusculare sunt, în esență, antigene moleculare asociate virusurilor și celulelor. Proteinele capsidale și glicoproteinele învelișului viral sau proteinele prezentate pe suprafața celulelor infectate cu virusuri, sunt foarte imunogene și stimulează răspunsul imun al gazdei. De aceea, imunitatea consecutivă infecției virale este, de obicei, de lungă durată.

Antigenele bacteriene sunt fie solubile (eliminate în mediul extracelular), fie corpusculare (legate de celulă). Din prima categorie fac parte exotoxinele și polizaharidele capsulare libere, iar din cea de a II-a, antigenul somatic O (endotoxina bacteriilor Gram negative), antigenele polizaharidice din glicocalix, flagelina, pilina, acizii teichoici, mureina etc.

Antigenele eritrocitare sunt glicoproteine ale suprafeței eritrocitare, cu determinism biochimic cunoscut, în sistemul A, B, 0. Glicoproteinele eritrocitare de grup sanguin se găsesc și pe suprafața celulelor tisulare, dar și în secrețiile exocrine (salivă, suc gastric etc.), la circa 75% dintre indivizi, denumiți "secretori". Glicoproteinele din secreții sunt hidrosolubile și studiul lor a fost mai ușor decât al moleculelor eritrocitare.

Grupările glucidice ale glicoproteinelor membranei eritrocitare au rol dominant în determinarea specificității de grup sanguin, așa cum au evidențiat studiile de digestie enzimatică controlată. Eritrocitele tuturor grupelor sanguine au un precursor antigenic comun în antigenul H (codificat de gena H), bine exprimat pe suprafața antigenelor de grup 0 și în cantități progresiv descrescând pe hematii de grup A, B și Ab.

Specificitatea antigenică de grup 0 este conferită de L-fucoză. Grupul A are o genă ce codifică sinteza glicozil-transferazei, enzimă ce adaugă N-acetil-D-galactozamina, la galactoza preterminală a moleculei H. De aceea, specificitatea antigenică a eritrocitelor de grup A este conferită de trizaharidul N-acetil-galactozamină, galactoză și L-fucoză:

N-acetil galactozamină (α 1-3) Gal \bar{n} R (R = restul catenei polizaharidice)

α 1-2

Fuc

Indivizii de grup B au o genă ce adaugă D-galactoza (în loc de N-acetil galactozamină) la galactoza preterminală a moleculei H, având un determinant antigenic format din două resturi terminale de D-galactoza și L-fucoza.

Fig. 3. Oligozaharidele cu rol de epitopi determinanți ai grupelor sanguine ABO. Oligozaharidul este ancorat în membrana eritrocitului prin intermediul sfigomielinei, denumită ceramidă. 85% din indivizii umani secretă substanțele de grup sanguin în salivă. La indivizii "secretori", oligozaharidele sunt prezente sub forma conjugatelor cu polipeptidele codificate de genele secretoare (după Roitt, 1997).

Prezența restului de fucoză (adică antigenul H) este esențială pentru expresia epitopilor A și B. Gena H și antigenul său lipsesc la fenotipul Bombay. De aceea, transferazele A și B nu pot adăuga glucidele specifice la restul Gal al polizaharidului și antigenele de grup A și B nu sunt exprimate.

Exprimarea antigenelor ABO pe hematii poate fi modificată prin tratamentul in vitro cu glicozidaze: o α -glicozidază (extrasă din bobul de cafea verde) poate cliva restul de Gal de pe hematii de grup B și le convertește în hematii de grup 0, ce pot rămâne funcționale după transfuzia la subiecții

de grup 0.

Antigenele de histocompatibilitate (descrise de J. Dausset, 1958) sunt molecule de suprafață ale majorității țesuturilor. Din punct de vedere biochimic, ele sunt strict specifice fiecărui organism uman și animal și conferă individualitate biochimică proprie fiecărui organism. Se numesc și antigene de transplantare, deoarece, după grefarea unui țesut sau a unui organ, moleculele de histocompatibilitate se comportă ca antigene și declanșează răspunsul imun al organismului receptor, care determină respingerea grefei.

Antigenele individuale de histocompatibilitate se evidențiază prin reacția de respingere a grefei. În funcție de raportul genetic dintre donor și receptor, antigenele de histocompatibilitate aparțin următoarelor categorii:

1) autoantigenele includ antigenele proprii de histocompatibilitate, care, în condiții normale sunt tolerate de sistemul imunitar. Sub acțiunea unor factori fizici, chimici sau biologici, antigenele de histocompatibilitate se modifică devenind autoantigene, generatoare ale conflictelor autoimune;

2) izoantigenele cuprind antigenele de transplantare comune organismelor identice din punct de vedere genetic, care aparțin unei linii genetice pure (inbred). Verificarea purității genetice a unei populații de organisme se face prin transplantul de piele. Dacă grefa este acceptată, organismele respective aparțin aceleiași linii inbred. Termenii “izoantigen” și “inbred” nu au corespondență pentru populația umană;

3) aloantigenele (alos = altul) includ molecule care, după injectare declanșează răspunsul imun la organisme ale aceleiași specii, dar diferite genetic, de organismul donor. Aloantigenele sunt inegal răspândite la indivizii unei specii și induc răspunsul imun la organismele care nu posedă antigenul respectiv. Aloantigenele se evidențiază după imunizarea unui organism, cu o suspensie celulară provenită de la organisme ale aceleiași specii, dar aparținând unui alotip diferit;

4) heteroantigenele (xenoantigene, xenos = străin) includ molecule care se găsesc în/pe celulele tuturor indivizilor unei specii și care se comportă ca antigene față de organismele altei specii. Heteroantigenele se evidențiază prin sinteza anticorpilor față de antigenele celulelor provenite de la un organism al unei specii diferite.

Celulele unei specii diferite aduc în organismul receptor nu numai heteroantigene, ci și aloantigene și chiar autoantigene. De aceea injectarea unui heteroantigen este una dintre cele mai utilizate metode pentru a induce sinteza autoanticorpilor.

Antigenele de organ sunt molecule specifice care conferă particularitățile biochimice și funcționale ale celulelor unui organ. De exemplu, proteinele hepatice sau ale glandei mamare diferă de proteinele țesutului renal al aceluiași organism.

Antigene artificiale

La origine, antigenele artificiale sunt antigene naturale, modificate chimic prin cuplarea, cel mai adesea covalentă, cu una sau mai multe molecule mici, care le conferă o nouă individualitate antigenică și o nouă specificitate de combinare cu anticorpii, în raport cu molecula de origine.

Antigenele artificiale s-au obținut, în principal, pornind de la moleculele proteice. Prin legarea moleculelor proteice cu diferite haptene s-au obținut trei tipuri de antigene artificiale:

a) conjugate haptenă-proteină, prin reacția de diazotare, iodurare și respectiv substituție nucleofilă;

b) conjugate proteină-proteină, prin intermediul unor agenți bifuncționali de legare (diizocianații și carbodiimidele);

c) proteine legate de suporturi insolubile, prin reacția de diazotare sau prin intermediul carbodiimidelor.

a) Conjugatele haptenă-proteină au fost utilizate de Landsteiner, în studiile cu privire la mecanismele răspunsului imun. În conjugate, haptenele îndeplinesc rolul de epitopi (grupări determinate de specificitate), iar moleculele proteice au rolul de carrier. Răspunsul imun nu este orientat strict față de epitopii haptenici, ci și față de determinanți antigenici ai grupării carrier.

Cuplarea haptenă-purtător necesită existența unei grupări reactive a haptenei, care să se lege covalent cu grupările funcționale ale purtătorului, cu condiția păstrării integrității funcționale a celor doi reactanți. Haptenele se pot cupla cu purtători foarte diverși, dar proteinele naturale (albumina, globulinele) furnizează conjugate foarte imunogene.

Landsteiner a cuplat amino-benzen-sulfonatul cu molecule proteice, prin reacția de diazotare și a obținut azoproteine:

După cuplarea haptenei cu Tir, His sau Lys din structura unei proteine, rezultă un antigen artificial care induce formarea a două categorii de anticorpi cu specificități diferite, după cum reacționează cu haptena, sau cu molecula purtător.

Conjugatele azoproteice au permis studiul influenței configurației spațiale a haptenei, asupra specificității antigenice. Gruparea sulfonat a fost legată în poziția orto, meta sau para a haptenei aminobenzen. Antiserurile obținute au specificitate față de fiecare izomer. Izomerul meta al aminobenzen-sulfonatului, cuplat cu proteina, păstrează capacitatea de a precipita cu anticorpii specifici față de proteina nativă, în timp ce conjugatele cu izomerii orto- și para- dau reacție foarte slabă de precipitare. Concluzia este că izomerii de poziție induc modificări sterice (conformaționale) ale haptenei.

Conjugatele haptena-proteină se pot obține prin reacția de iodurare. Proteinele puternic iodurate își modifică specificitatea antigenică. Ele induc sinteza anticorpilor care dau reacții încrucișate de precipitare cu proteinele iodurate heterologe. Semnificația este că prin iodurare, proteinele își pierd specificitatea antigenică. Toate proteinele iodurate induc sinteza anticorpilor față de o grupare iodurată, în special față de tirozina iodurată, indiferent de specificitatea grupării purtător.

O altă reacție de obținere a conjugatului haptena-proteină este cea de substituție nucleofilă. Cele mai folosite haptene sunt 2,4-dinitrofenolul(DNP) și 2,4,6-trinitrofenolul(TNP).

Mecanismul molecular al cuplării este următorul: un atom de H din gruparea OH⁻, NH₂⁺ sau S-SH a proteinei, este înlocuit de gruparea haptenică prin eliminarea apei. Proteina pierde electroni, iar nucleul benzenic îi acceptă. Grupările donoare de electroni sunt OH⁻, NH₂⁺, S-SH.

Grupările DNP și TNP sunt cuplate cu proteina purtător sub forma 2,4-dinitrobenzen-sulfonatului de Na, a 2,4,6-trinitrobenzen-sulfonatului de Na sau subforma derivaților halogenați.

Reacția dintre o proteină și 2,4-dinitrobenzen-sulfonatul de sodiu ilustrează mecanismul atacului nucleofilic, reacție în care proteina cedează electroni, iar nucleul benzenic îi acceptă.

b) Conjugatele proteină-proteină se obțin prin intermediul agenților bifuncționali de legare: diizocianații și carbodiimidele. Deoarece grupările ciano au reactivitate diferită, reacția de cuplare se realizează în trepte. De exemplu, gruparea din poziția 4 a toluilen-diizocianatului este mai reactivă decât gruparea ciano din poziția 2. Aceasta permite ca una dintre proteine să se cupleze în poziția 4, iar ulterior, într-o nouă etapă a reacției, cea de a II-a proteină se va cupla la gruparea ciano din poziția 2:

Carbodiimidele, utilizate ca agenți bifuncționali pentru cuplarea proteinelor, sunt considerate anhidride simetrice ale ureii:





Uree Carbodiimida simetrică Cianamida asimetrică

Carbodiimidele pot fi substituite simetric sau asimetric cu molecule proteice:



Agenții bifuncționali de cuplare permit obținerea conjugatelor proteice (conjugate anticorpi-feritină, insulină-albumină), dar se folosesc și ca mediatori ai legării diferitelor molecule proteice pe suprafața eritrocitelor.

Marcajul cu feritină este deosebit de important din punct de vedere practic, deoarece se folosește pentru evidențierea electrono-optică, la nivelul membranei, a diferitelor molecule proteice.

c) Conjugatele proteină-suport insolubil se obțin prin cuplarea proteinelor cu un suport insolubil, prin reacția de diazotare, prin intermediul carbodiimidelor sau al BrCN. Ca suporturi insolubile se folosesc derivați celulozici: sephadex, sepharoză, agaroză etc. Legarea proteinei de suport, prin reacția de diazotare, se face prin intermediul tirozinei, lizinei, histidinei, triptofanului sau argininei.

Conjugatele anticorpi-suport insolubil se numesc imunosorbenti și sunt folosiți cu o eficiență deosebită pentru purificarea proteinelor dintr-un amestec, datorită specificității lor de combinare cu anticorpii corespunzători, fixați într-o coloană de material inert. Antigenul complementar specificității de legare a anticorpului fixat în coloană, se leagă necovalent de imunosorbent, după care poate fi eluat cu un agent chimic.

Anticorpii pot fi imobilizați pe un suport insolubil, prin tratamentul cu un agent de legare încrucișată (glutaraldehydă), dar multe din situsurile reactive pot fi denaturate sau rămân ascunse. Fig. 4. Principiul funcțional al imunosorbentilor utilizați în cromatografia de afinitate. Coloana conține sefaroză, pe care sunt fixate moleculele de anticorp. Amestecul de antigene este trecut prin coloană, unde va fi reținut numai antigenul care recunoaște specific anticorpul fixat.

Cel mai bun suport de imobilizare este agaroză, un polizaharid obținut prin fracționarea agarului. Agaroză este rezistentă la acțiunea degradativă a enzimelor bacteriene și a agenților chimici și poate fi regenerată. Este disponibilă sub forma sferelor poroase hidratate, cu diametrul de 40-300 μm și conține 2-8% agaroză în soluție apoasă.

În coloana de imunosorbent se pot fixa nu numai anticorpii, ci și antigenele sau chiar celule intacte.

Imunosorbenții se folosesc în activitatea de cercetare și în clinică, pentru prepararea unor produse biologice și a medicamentelor.

Antigene sintetice

Antigenele sintetice sunt polimeri de aminoacizi, cu secvență cunoscută, obținuți in vitro. Proprietățile imunogenice ale homopolimerilor (poli-Lys, poli-Glu, poli-Pro) și ale heteropolimerilor au fost studiate de M. Sela. Studiul imunogenității heteropolimerilor are avantajul că oferă posibilitatea studiului influenței compoziției chimice, a greutatei moleculare și a conformației moleculare, ușurând studiul imunochimic al grupărilor determinante de specificitate antigenică.

Catenele polipeptidice sintetice pot fi lineare sau ramificate. Cele ramificate rezultă prin atașarea polimerilor lineari, la o catenă polifuncțională. Ramificarea se obține mai ușor cu aminoacizi aromatici.

Homopolimerii nu sunt imunogeni, cu excepția poli-L-Pro, poli-L-Glu, poli-L-Arg, poli-L-Lys. Copolimerii formați din doi aminoacizi nu sunt totdeauna imunogeni, dar cei rezultați prin polimerizarea a trei aminoacizi diferiți sunt totdeauna imunogeni. Cu cât compoziția lor este mai heterogenă, imunogenitatea este mai accentuată. Prezența aminoacizilor aromatici conferă o anumită rigiditate a epitopilor și implicit, o imunogenitate superioară.

Pentru a fi imunogeni, copolimerii trebuie să fie catabolizați de aparatul enzimatic al celulelor care prelucrează și prezintă antigenul. Polipeptidele formate din D-aminoacizi sunt slab

imunogene, datorită incapacității organismului de a cataboliza polimerul. Polipeptidele sintetice s-au dovedit a fi foarte utile în studiile de imunochimie, cu privire la:

- determinarea mărimii grupării determinante de specificitate și indirect, a situsului de combinare a anticorpilor specifici;
- rolul dimensiunilor moleculei asupra proprietăților de imunogenitate;
- rolul configurației spațiale a moleculei în conferirea proprietății de imunogenitate;
- identificarea epitopilor secvențiali și conformaționali.

p

8

p

p

Determinanții antigenici

De cele mai multe ori, antigenele sunt macromolecule complexe sau chiar celule întregi, dar răspunsul imun, după injectarea lor în organism, este orientat predominant față de situsuri discrete, strict limitate ale antigenului, denumite grupări determinante de specificitate (gds), situsuri antigenice, determinanți antigenici sau epitopi.

Epitopul este regiunea limitată a antigenului care induce un răspuns imun specific, se combină cu situsul activ al moleculei de anticorp și determină specificitatea reacției antigen-anticorp.

Antigenele proteice prezintă cea mai mare diversitate de epitopi, atât în privința compoziției chimice, cât și a configurației spațiale. Studiile de cristalografie cu raze X permit identificarea atomilor individuali ai unei molecule și determinarea mobilității lor, exprimată în factori de temperatură atomică. Factorii de temperatură ridicată corespund regiunilor moleculare cu mobilitate înaltă (regiuni calde). În molecula proteică, epitopii corespund zonelor moleculare cu o mobilitate înaltă a atomilor. La temperatura biologică, aceste secvențe necesită cantități mici de energie, pentru a trece dintr-o conformație în alta. Invers, regiunile moleculare cu mobilitate atomică redusă au factori termici de valoare scăzută (regiuni reci) și necesită o cantitate mai mare de energie pentru schimbarea conformației. Adeseori, epitopii antigenici sunt localizați în regiunile calde ale moleculei.

Capacitatea unei regiuni a moleculei de antigen de a funcționa ca epitop (adică de a stimula răspunsul imun) se numește imunopotență.

Mărimea grupării determinante de specificitate s-a apreciat indirect prin determinarea mărimii haptenei capabilă să "umplă" complet situsul de combinare al anticorpului. În acest scop s-a utilizat sistemul dextran-antidextran, într-o reacție de precipitare. Dextranul cu greutate moleculară de 50 kD este imunogen și prin injectare repetată la iepure, se obține serul imun anti-dextran. Artificial se prepară oligozaharide cu dimensiuni controlabile. Reacția de precipitare dextran-anticorpi specifici este inhibată progresiv de oligozaharidul de glucoză și este completă în prezența hexazaharidului. Oligomerul cu 6 resturi de glucoză corespunde celui mai bun ligand care se cuplează cu anticorpii anti-dextran (ligandul este orice moleculă capabilă să formeze un complex cu o altă moleculă). Heptazaharidul, ca și oligozaharidele cu mai puțin de 6 resturi de glucoză inhibă mai puțin eficient reacția de precipitare a sistemului dextran-antidextran.

Fig. 5. Oligozaharidul format din 6-7 resturi de glucoză, blochează cu cea mai mare eficiență, reacția de precipitare dintre dextran și anticorpii specifici antidextran. Oligozaharidele mai mari sau mici nu se combină eficient cu anticorpii și inhibă într-o măsură progresiv mai mică reacția de precipitare cu dextranul.

Cercetări similare s-au făcut cu homopolimeri de aminoacizi (poli-Lys, poli-Ala), legați de proteine purtător. Serul imun obținut pe iepure, față de aceste conjugate, conține predominant anticorpi specifici față de haptena homopolimerică. Reacția de precipitare dintre serul specific și conjugatul haptena-proteină, este inhibată de pentamerul de alanină, ceea ce denotă că acesta se leagă cu cea mai mare afinitate de situsul de combinare al anticorpului. Pentamerul corespunde mărimii epitopului antigenic al conjugatului și reflectă, indirect, mărimea situsului de combinare al anticorpilor specifici.

În concluzie, mărimea unui epitop polizaharidic corespunde la 6-8 unități monomerice, iar pentru antigenele proteice, epitopul are 4-6 aminoacizi.

Valența antigenului s-a definit convențional prin numărul de epitopi ai unui antigen. Numărul de epitopi ai unei molecule antigenice variază în raport cu mărimea și complexitatea sa structurală.

Valența se evaluează prin numărul moleculelor de anticorp care reacționează cu o moleculă de antigen. Pentru evaluarea numărului de epitopi ai unui antigen, trebuie avut în vedere că molecula de anticorp este bivalentă (leagă doi epitopi), dar și faptul că un antiser nu conține anticorpi față de toți epitopii unui antigen.

Studiile privind reacția antigen-anticorp in vitro, au condus la concluzia existenței a trei tipuri de valențe antigenice (epitopi):

- valențele funcționale conformaționale sunt conferite de epitopii conformaționali, situați la suprafața moleculei native de antigen și sunt accesibili sistemelor imunitare de recunoaștere specifică a moleculei. Numărul lor este proporțional cu greutatea moleculară a antigenului și este dependent de complexitatea conformațională a moleculei. Un situs antigenic, teoretic, s-ar găsi la fiecare câteva mii de daltoni;
- valențele funcționale interne sunt reprezentate de epitopi interni, care, în molecula nativă sunt inaccesibile sistemului imunitar. Ele devin funcționale, in vivo, după degradarea parțială a moleculei, în celulele care prelucrează antigenul;

- valențe nefuncționale, reprezentate de epitopi criptici care nu devin funcționale după prelucrarea antigenului in vivo, dar se pot releva după clivarea enzimatică in vitro a moleculei.

Numărul total al epitopilor unui antigen nu se cunoaște, dar se poate evalua cu aproximație, după degradarea parțială a moleculei de antigen. De exemplu, albumina serică bovină nativă are 6 situsuri funcționale conformaționale. După scindarea enzimatică menajată in vitro, rezultă 9 fragmente peptidice, fiecare dintre ele dând reacție de precipitare cu serul anti-albumină nativă. Pentru ca reacția de precipitare să aibă loc, sunt necesari cel puțin doi epitopi, ceea ce înseamnă că molecula de albumină serică bovină are cel puțin 18 epitopi, care devin funcționali după scindarea enzimatică a moleculei și induc sinteza anticorpilor specifici.

Efectul de carrier

Antigenele prezintă o dualitate funcțională evidentă, conferită de faptul că specificitatea răspunsului imun este orientată predominant, dar nu exclusiv, față de grupările determinante de specificitate. La rândul său, suportul macromolecular (carrier) are proprietatea de imunogenitate, dar conferă și un grad de specificitate a răspunsului imun. Rezultatele experimentale cu conjugate haptena-proteină (dinitrofenol-albumină serică) au evidențiat că în cazul în care suportul carrier este nonself, răspunsul imun este mai intens. Antigenul artificial s-a obținut prin cuplarea DNP cu albumina de șoarece. Injectarea conjugatului la șoarece induce un răspuns imun slab, cu un titru scăzut al anticorpilor anti-DNP(anti-haptena). Conjugatul DNP-albumină serică bovină, injectat la șoarece, stimulează intens răspunsul imun primar anti-haptena, ceea ce demonstrează că gruparea carrier are rol modulator asupra răspunsului imun.

Rolul grupării carrier în reactivitatea imunitară a fost evidențiat prin evaluarea titrului anticorpilor după stimularea secundară. Animalele stimulate repetat cu haptena A, cuplată cu purtătorul B, produc un răspuns imun secundar intens, cu anticorpi anti-haptena și anti-carrier. Însă, în răspunsul imun secundar, dacă stimularea s-a făcut cu haptena A, cuplată cu un carrier diferit (C) titrul anticorpilor anti-haptena nu crește. Acest fenomen curios s-a denumit "efect de carrier".

Un purtător eficient pentru stimularea răspunsului imun trebuie să fie imunogenic, adică să stimuleze răspunsul celulelor T. Moleculele neimunogene sunt purtători ineficienți ai haptenelor, pentru stimularea răspunsului imun. Aceasta arată că mecanismele de recunoaștere pentru haptena și pentru gruparea purtător sunt diferite.

Imunizarea cu conjugate haptena-carrier, a indus numai sinteza anticorpilor specifici anti-haptena, dacã purtãtorul a fost un antigen T-dependent. Moleculele neimunogene nu au calitãți de carrier pentru haptene.

“Efectul de carrier denotã cã haptena și epitopii purtãtorului sunt recunoscuți separat, de limfocitele B și respectiv T. Cele douã subpopulații de celule coopereazã pentru a induce sinteza anticorpilor cu specificitate de haptena.

Factorii care condȚioneazã

imunogenitatea

Antigenul este o substanțã nonself, care, la contactul cu celulele sistemului imunitar, declanșeazã sinteza anticorpilor specifici și a receptorilor celulari cu care se combinã in vitro și in vivo. Definiția este nesatisfãcãtoare, pentru cã se referã la ce face antigenul, fãrã sã-l defineascã în termeni proprii. Definierea completã a antigenului este rezultatul însumãrii unei serii de proprietãți, fiecare dintre ele fiind o condiție necesarã a imunogenitãții, dar nu și suficientã.

Condițiile imunogenitãții au fost deduse prin studii experimentale, utilizând antigene artificiale și sintetice.

1. Caracterul strãin al moleculei este condiția majorã a imunogenitãții. O moleculã nonself este cu atãt mai imunogenã, cu cãt este mai diferitã de moleculele organismului receptor. In esențã, caracterul nonself al unei molecule nu este strict dependent de raporturile taxonomice ale organismului donor cu cel receptor de antigen, ci este consecința deosebirilor de structurã molecularã.

Cele mai multe proteine ale unei specii sunt nonself pentru alte specii, dar uneori, proteinele omologe ale unor specii sunt lipsite reciproc de imunogenitate. De exemplu, hemoglobina de cal nu este imunogenã pentru iepure, deși celelalte proteine de cal sunt imunogene. Caracterul nonself nu implicã în mod obligatoriu existența unor molecule cu totul noi, neîntãlnite la organismul receptor, ci numai modificãri minime ale moleculei, conferite de existența câtorva aminoacizi diferiți în anumite poziții ale catenei proteice. Pentru restul secvenței, molecula nonself poate fi asemãnãtoare proteinelor proprii organismului receptor de antigen. Micile diferențe de secvențã a aminoacizilor, au rolul de epitopi. De regulã, proteinele apãrute timpuriu

în evoluție au un grad superior de asemănare chimică interspecifică și sunt slab imunogene pentru speciile înrudite (de exemplu, albumina serică), iar cele apărute mai târziu (de exemplu, globulinele serice) sunt mai heterogene și mai imunogene.

2. Mărimea moleculei influențează imunogenitatea moleculelor nonsell. Pentru a fi imunogenă, o moleculă trebuie să aibă dimensiuni care să depășească un prag limită. Moleculele cu o bună imunogenitate sunt mai mari de 10 kD. Cu cât o moleculă este mai mare, cu atât numărul epitopilor săi este mai mare. Secvențele de aminoacizi cu rol de epitopi au șansa repetării de mai multe ori într-o moleculă mai mare. Proteinele mari (de exemplu, ovalbumina ƒ 40 kD, albumina serică - 70 kD, hemocianina ƒ 6000 kD) sunt foarte imunogene, iar cele cu moleculă mică (insulina ƒ 5,7 kD, histonele ƒ 6 kD, glucagonul ƒ 3,5 kD) sunt puțin imunogene. Glucagonul este cea mai mică moleculă naturală față de care s-au obținut anticorpi, iar cea mai mică moleculă sintetică imunogenă este un polipeptid de 1,4 kD.

Pentru polizaharide, limitele minime pentru imunogenitate sunt mai mari. Dextranii sunt antigenici dacă au peste 50 kD, cu variații mari de răspuns imun de la o specie la alta (omul și șoarecele răspund bine, cobaiul ƒ foarte puțin).

Moleculele mici neimunogene sau slab imunogene pot dobândi o imunogenitate optimă, după adsorbția pe particule inerte de colodiu, caolin sau de cărbune. Acestea au rol de purtători și asigură creșterea taliei moleculare.

3. Complexitatea moleculară. Dimensiunile mari ale unei molecule nonsell nu sunt totdeauna suficiente pentru a-i conferi imunogenitate. De exemplu, moleculele de polimeri sintetici (poliacrilamida, nylonul) sunt foarte mari, fiind formate dintr-un număr mare de monomeri repetitivi, dar nu sunt imunogene pentru că nu au complexitatea moleculară minimă necesară.

Moleculele naturale, în special proteinele au un grad înalt de complexitate, datorită diversității monomerilor componenți. Fiecare tip de moleculă proteică are o configurație tridimensională unică, determinată de secvența specifică de aminoacizi.

Proteinele globulare au cea mai mare complexitate antigenică, derivată din configurația lor terțiară. Ele posedă epitopi exprimați pe suprafața moleculei native, accesibili fenomenului de recunoaștere de către celulele sistemului imunitar și epitopi interni, care pot stimula răspunsul imun, după clivarea enzimatică a moleculei în celulele specializate pentru prelucrarea antigenelor. De exemplu, serul imun anti- albumină serică bovină precipită cu fiecare din cele 9 fragmente peptidice rezultate prin clivajul enzimatic al moleculei native, ceea ce sugerează că în

vivo, molecula este scindată și astfel se relevă epitopi interni, față de care se sintetizează anticorpi specifici.

Complexitatea unei molecule nu depinde numai de diversitatea monomerilor, ci și de secvența lor și de efectul secvenței asupra structurii secundare, terțiare și eventual quaternare a moleculei.

4. Starea fizică a antigenului. Imunogenitatea unei molecule este condiționată de o anumită rigiditate a epitopilor săi. Lipsa rigidității ar explica imunogenitatea redusă a gelatinei, o proteină denaturată, derivată din hidroliza colagenului, foarte bogată în glicocol (21-35%).

În mod obișnuit, rotația liberă a unei molecule are loc numai între C α și legătura peptidică. Glicocolul nu realizează ramificații ale catenei polipeptidice în poziția C α , ceea ce face ca molecula de gelatină să prezinte rotații libere în jurul axului longitudinal. Gelatina are o proporție foarte mică de aminoacizi aromatici (Tir, His), iar cisteina și triptofanul lipsesc.
Legarea

L-Tir, în proporție de 2% mărește gradul de imunogenitate a gelatinei. Complexul induce sinteza anticorpilor care precipită gelatina nativă.

5. Solubilitatea. Condiția solubilității unui antigen pentru a fi imunogen este sugerată de următoarele observații:

- polimerii macromoleculari sintetici care nu sunt solubilizați, adică nu sunt hidrolizați, sunt lipsiți de imunogenitate;
- organismele cu echipamente enzimatice hidrolitice mai active (șoarece) elaborează un răspuns imun mai amplu față de un antigen greu solubil (de exemplu, polizaharidul de pneumococ), în raport cu organismele care hidrolizează mai greu (de exemplu, iepurele);
- antigenele corpusculare (celule, virioni) devin imunogene după solubilizarea și eliberarea componentelor imunogene în macrofag, unde are loc degradarea menajată a antigenelor.

Hidroliza enzimatică a antigenului nu este totdeauna o condiție prealabilă obligatorie a imunogenității. Studiile cu antigene sintetice au arătat că, în momentul recunoașterii de către celulele sistemului imunitar, o parte a epitopilor sunt intacti, identici cu aceia ai moleculei native.

6. Accesibilitatea determinantilor antigenici. Pentru ca un epitop să fie imunogen, trebuie să fie expus la suprafața moleculei, pentru a fi accesibil mecanismelor de recunoaștere imunitară. De exemplu, un polimer de L-Lys, cu rol de purtător pentru tripeptidul Tir-Ala-Glu este imunogen. După mascarea epitopilor tripeptidici cu catene de poli-Ala, molecula își pierde imunogenitatea. Fig. 6. Rolul accesibilității determinantilor antigenici în imunogenitate. Copolimerul multicatenar format din acidul L-glutamic (G) și tirozina (T), legat prin intermediul poli L-alaninei (A-A), de purtătorul polilizină este imunogen. Același copolimer, legat direct de purtătorul polilizină, dar mascat de polialanină, este neimunogen.

7. Configurația spațială a moleculei este un factor decisiv pentru imunogeneză. Studiile privind imunogenitatea antigenelor sintetice, au evidențiat că cel mai adesea, anticorpul se formează față de o anumită secvență de aminoacizi, care are rol de epitop. Dar, uneori, anticorpul este specific față de configurația spațială a unui determinant antigenic. Concluzia a reieșit din specificitatea distinctă a anticorpilor față de două polipeptide sintetice cu aceeași compoziție chimică, dar cu configurații spațiale diferite. În primul caz, determinantul antigenic este tripeptidul Tir-Ala-Glu, legat de un polimer sintetic, cu rol de purtător. La iepure, se sintetizează anticorpi specifici față de tripeptidul Tir-Ala-Glu.

În al II-lea caz, prin polimerizarea tripeptidului se obține o moleculă cu structura periodică a secvenței Tir-Ala-Glu, care dobândește configurație α -helicală. După imunizarea iepurelui, se sintetizează anticorpi care precipită moleculele cu structură spațială α -helicală, dar nu precipită tripeptidul simplu. Pe baza acestor observații, M. Sela recunoaște existența a două tipuri de determinanți antigenici:

- determinanți secvențiali, a căror specificitate este dată de secvența subunităților componente (aminoacizi, monozaharide), indiferent de structura spațială a moleculei. Epitopii secvențiali sunt comuni pentru toate polipeptidele care au secvențe de aminoacizi identice sau asemănătoare și existența lor este o sursă a reacțiilor imune încrucișate; Fig. 7. Tipuri de epitopi. Epitopi secvențiali și conformaționali, continui și discontinui.

- determinanți antigenici conformaționali, a căror specificitate derivă din configurația spațială a moleculei. Epitopii conformaționali sunt de două feluri: continui și discontinui. Cei discontinui sunt formați din regiuni distincte ale moleculei, care ajung în juxtapoziție când molecula se pliază în configurația sa nativă.

Menținerea integrității determinantilor conformaționali este condiționată de integritatea legăturilor S-S. După fragmentarea enzimatică a moleculei, epitopii conformaționali discontinui își pierd integritatea și semnificația funcțională, iar cei continui au o soartă variabilă: își pierd sau își păstrează configurația avută în molecula nativă.

Importanța epitopilor conformaționali a fost evidențiată pentru molecula de lizozim din albușul de ou de găină. Bucla formată de aminacizii 64-80 este închisă de o legătură S-S între două resturi de cisteină. Secvența buclei a fost sintetizată artificial și legată de polimerul Ala-Lys, cu rol de carier. Complexul format induce sinteza anticorpilor la iepure, specifici față de această secvență, dar dau reacție de precipitare și cu molecula nativă de lizozim. Fig. 8. Bucla formată din aminoacizii 64-80 ai secvenței moleculei de lizozim din albușul de ou, formează un determinant conformațional.

În general, anticorpilor care se sintetizează față de antigenele proteice naturale au specificitate, în primul rând, față de epitopii conformaționali și mai rar față de cei secvențiali, ceea ce denotă că sistemul imunitar recunoaște molecula nativă sau regiuni ale ei, cu configurația spațială inițială.

În concluzie, studiul antigenelor sintetice a avut un rol decisiv pentru definirea condițiilor de imunogenitate. Polizaharidele sunt molecule cu o slabă imunogenitate, corespunzătoare unei complexități moleculare limitate. Acizii nucleici și lipidele sunt molecule neimunogene în stare nativă, dar după cuplarea cu un suport proteic, îndeplinesc rolul de haptene și devin foarte imunogene. Din această cauză, nucleoproteinele și lipoproteinele sunt antigene foarte eficiente. Proteinele native sunt imunogene, dar pentru exprimarea la un nivel superior a acestei proprietăți, trebuie să îndeplinească condițiile enumerate. Acestea, luate în parte, sunt necesare, dar nu suficiente. O bună imunogenitate este rezultatul cumulării unui număr cât mai mare de condiții.

Un antigen ideal trebuie să fie greu degradabil (pentru o persistență cât mai lungă în organism), să fie timodependent și să aibă un număr cât mai mare de semnale imunogene (epitopi), conectate într-un ansamblu funcțional, denumit imunon.

Antigene endogene

Antigenele endogene sunt componente celulare și tisulare proprii (self), față de care, în condiții normale, sistemul imunitar nu manifestă reactivitate. Totuși, unele componente tisulare, în

anumite condiții, pot să stimuleze reactivitatea imunitară. Se disting două categorii de antigene endogene: 1) antigene sechestrate (mascate) și 2) antigene alterate.

Antigenele sechestrate sunt substanțe cu localizare intracelulară și de aceea nu sunt accesibile sistemului imunitar pentru a fi recunoscute în cursul dezvoltării ontogenetice. Sub acțiunea unor factori (fizici, chimici, biologici), inductori ai unor procese de liză celulară, moleculele cu localizare intracelulară se pot elibera și sunt recunoscute ca nonself de sistemul imunitar. De exemplu, anticorpii antimitocondriali care caracterizează ciroza biliară primitivă, se sintetizează după liza unor celule și eliberarea acestor organite.

Alteori, unele componente tisulare sunt separate de sistemul imunitar, prin bariere anatomice:

- proteinele cristalinelor, delimitate de cristaloidă, se eliberează în cursul intervențiilor chirurgicale, după traumatisme care sparg capsula sau după afecțiuni care permeabilizează cristaloida. Ele sunt recunoscute ca molecule nonself și stimulează răspunsul imun anti-cristalin, ce poate afecta irisul, procesele ciliare și coroida;
- proteinele spermatică, în stările de spermatoză, induc sinteza locală a autoanticorpilor în structurile epididimului. Anticorpii recunosc specific un antigen al spermatozoizilor și rezultatul este imobilizarea sau chiar aglutinarea, cu consecința sa, sterilitatea imunitară;
- caseina din lapte poate stimula reactivitatea autoimunitară.

Antigenele alterate sunt molecule normale ale suprafeței celulare, legate de membrană, care, din diferite cauze (uzură fiziologică sau sub acțiunea diferiților factori fizici, chimici, biologici) își modifică structura chimică și sunt recunoscute ca molecule nonself. De exemplu, unele medicamente, după legarea cu diferite molecule din plasmă sau de pe suprafața eritrocitelor, le modifică conformația nativă și acestea sunt recunoscute ca nonself. Virusurile induc sinteza în celula infectată, a antigenelor proprii, dar adeseori moleculele specific virale determină modificarea unor molecule self, care sunt recunoscute ca molecule străine și inițiază conflictul autoimun.

În condiții normale, antigenele sechestrate și alterate sunt neutralizate și eliminate, fără consecințe patologice. În 1900, Ehrlich a formulat conceptul "horror autotoxicus", care semnifică preponderența acțiunii mecanismelor homeostatice. În condițiile unei reactivități imunitare crescute, activarea răspunsului imun față de aceste componente chimice are drept consecințe, declanșarea bolilor autoimune, considerate ca fiind expresia patologică a funcției imunitare.

Antigene heterofile

Antigenele heterofile sunt substanțe neidentice, dar înrudite chimic, prezente la numeroase specii de organisme: om, animale, plante, microorganisme. Particularitatea dominantă constă în faptul că ele induc sinteza anticorpilor care dau reacții încrucișate: anticorpii specifici față de un antigen al grupului heterofil, reacționează (într-o reacție de precipitare sau de aglutinare) cu oricare dintre antigenele grupului.

Prototipul antigenelor heterofile este antigenul de tip Forssman, descoperit în 1911 în țesuturile de cobai. J. Forssman a descoperit că serul imun obținut prin imunizarea iepurelui cu omogenat tisular de cobai, aglutinează eritrocitele de berbec. Este o reacție încrucișată, pe care autorul a denumit-o reacție heterologă. Termenul “heterolog” s-a păstrat pentru reacțiile încrucișate previzibile, pe care le manifestă diferite antigene înrudite (de exemplu, albumina serică de om și de primat). Denumirea “heterofil” s-a atribuit reacțiilor încrucișate pe care le produc antigene neînrudite.

Regnul animal poate fi împărțit în specii Forssman pozitive (cobai, hamster, șoarece, oaie, capră, cal, pisică, câine, pui de găină etc.) și specii Forssman negative (om, iepure, șobolan, maimuțe, bou, gâscă). Nici unele nici altele nu au vreun grad de înrudire genetică.

Absența antigenului Forssman pe suprafața celulelor tisulare la iepure, este foarte importantă din punct de vedere practic. Serul imun anti-antigen Forssman se obține prin imunizarea iepurelui cu o suspensie de hematii de berbec. În contact cu hematiile de berbec, serul imun obținut pe iepure, produce aglutinarea lor, iar în prezența complementului se produce liza. Anticorpii specifici față de antigenele hematiei de berbec dau reacție încrucișată cu antigenele tisulare ale grupului Forssman, dar și cu antigene de origine bacteriană. Antigene de tip Forssman s-au identificat ulterior, prin reacții serologice, în celulele unor bacterii patogene (*Str. pneumoniae*, *Shigella*, *Salmonella*) și chiar în celulele microbiotei din tractul digestiv, ceea ce explică prezența anticorpilor naturali anti-hematie de berbec, în serul uman.

Reacțiile imune încrucișate pe care antigenele de tip Forssman le dau cu serul imun obținut față de unul din antigenele grupului se explică prin asemănarea structurii chimice a acestor molecule. Cele mai multe antigene heterofile sunt glicoproteine sau glicolipide, în care grupările glucidice au rolul de haptene. Componentele glucidice ale antigenelor heterofile sunt foarte asemănătoare din punct de vedere chimic, chiar dacă aparțin unor organisme cu poziție sistematică foarte diferită. Antigenul Forssman este un glico-sfingolipid, la care determinantul antigenic este format din două resturi de N-acetil-galactozamină.

Polizaharidele antigenelor de tip Forssman, în stare purificată, nu sunt imunogene, sunt rezistente la fierbere și chiar la autoclavare.

Cele mai importante sisteme heterofile sunt cele cu semnificație biologică sau importanță medicală: sistemul Forssman, sistemul Paul-Bunnell (P-B) și sistemul Hanganutziu-Deicher(H-D).

Anticorpul caracteristic mononucleozei infecțioase (Paul și Bunnell, 1932) apar la 90% dintre pacienții infectați cu virusul Epstein-Barr și sunt IgM care se evidențiază într-o reacție de aglutinare cu eritrocite de ovine sau bovine. Anticorpul seric recunoaște două antigene distincte: un antigen prezent numai pe eritrocitele bovine (B) și un al II-lea antigen, existent atât pe eritrocitele de bovine cât și pe cele de ovine (BS). Majoritatea pacienților cu mononucleoză infecțioasă sintetizează anticorpi anti-B și anti-BS, dar o mică proporție conțin numai anticorpi anti-B. Anticorpul P-B se sintetizează față de un antigen, ce pare a fi o glicoproteină codificată de virus.

Anticorpul H-D, descriși de Hanganutziu (1924) și Deicher (1926) sunt declanșatori ai maladiei serului, la pacienții care au primit injecții de ser heterolog. Sinteza lor este indusă de antigenul H-D, care se găsește în țesuturile mamiferelor, dar lipsește din țesuturile normale umane, însă re apare în unele țesuturi umane patologice (limfoame și mieloame). Din punct de vedere chimic, antigenul H-D este acid N-glicolil-neuraminic.

Alte antigene heterofile. Antigenele grupului Rh se găsesc pe eritrocitele maimuței *Macacus rhesus* și pe eritrocitele a circa 85% dintre indivizii umani.

Antigenul H de pe eritrocitele umane de grup 0 este foarte asemănător cu un polizaharid al celulelor de *Yersinia pestis* (agentul ciumei), iar antigenul eritocitar uman de grup A este asemănător cu un antigen al virusului variolei (smallpox). Dezavantajul asemănării chimice dintre antigenele unor agenți patogeni și antigenele de grup sanguin este evident: indivizii umani de grup sanguin 0 și A reacționează mai slab la contactul cu antigenele asemănătoare, iar procesul infecțios se instalează mai rapid.

O importanță practică deosebită au antigenele heterofile de *T. pallidum* și cele de *Proteus ox19*. Frația majoră a anticorpilor specifici față de *T. pallidum* aglutinează o suspensie de celule bacteriene de *Proteus ox19*. Aceiași fracție a anticorpilor se combină cu cardiolipina, ceea ce permite ca în reacția de fixare a complementului pentru determinarea infecției cu *T. pallidum* să se utilizeze antigenul cardiolipinic, mult mai ușor de obținut.

Adjuvanții

Substanțele sau amestecurile de substanțe, care în asociație cu un antigen sau injectate simultan cu acesta, intensifică răspunsul imun specific față de antigenul respectiv sunt denumite adjuvanți (adjuvere, latin = a ajuta).

Punctul de plecare al introducerii adjuvanților în practica imunologică a fost un fapt de observație: după asocierea unui vaccin bacterian celular, cu un vaccin macromolecular (anatoxină), răspunsul imun antitoxină este mult mai intens decât în cazul în care cele două vaccinuri se administrează separat. După injectarea vaccinului celular anti-tifoparatic A și B, împreună cu anatoxina tetanică (TAB), titrul anticorpilor față de anatoxina tetanică este de 20-30 de ori mai mare decât în cazul injectării separate a anotoxinei tetanice. Explicația acestui fenomen a fost dată ulterior: la locul injectării vaccinului, corpii celulari bacterieni determină un proces inflamator, adică un aflux local de celule efectoare ale răspunsului imun (limfocite, macrofage). Macrofagele captează și fixează anatoxina într-un stoc, de unde este eliberată treptat și astfel se prelungește durata de stimulare a sistemului imunitar.

Cel mai cunoscut și folosit pentru studiul experimental al imunogenității antigenelor este adjuvantul Freund, o emulsie de apă în ulei mineral de parafină. Antigenul se suspendă în apă. Emulsia de apă în ulei se realizează cu un emulgator care conține grupări lipofile și hidrofile (lanolina, arlacel A). Acesta este adjuvantul Freund incomplet. După adăugarea celulelor omorâte de *M. tuberculosis*, rezultă adjuvantul Freund complet. Principiul imunostimulator al celulelor de *M. tuberculosis* este reprezentat de glicolipidele și glicolipoptidele (denumite ceruri) din structura peretelui celular. Glicolipoptidele sunt formate din acizi micolici esterificați cu un polizaharid (arabinogalactan) ce conține arabinoză, galactoză, manoză, la care se leagă un fragment peptidic ce conține D și L-alanină, acid D-glutamic, acid diaminopimelic.

Fig. 9. Reprezentarea schematică a interacțiunii moleculelor componente ale adjuvantului Freund.

Adjuvantul Freund determină următoarele efecte: a) persistența antigenului în organism prin întârzierea degradării sale și eliberarea treptată în circulație; b) picăturile de emulsie vehiculează antigenul pe cale limfatică, în tot organismul, inclusiv spre ganglionii limfatici, unde se va declanșa răspunsul imun; c) adjuvantul Freund complet și incomplet fac imunogene doze mici de antigene, care altfel nu ar fi imunogene și măresc semnificativ titrul anticorpilor față de oricare antigen.

Amestecul de adjuvant și antigen se administrează subcutan sau intradermic. Administrarea intravenoasă anulează efectul adjuvantului. Este posibilă administrarea decalată la interval de câteva zile (mai întâi a adjuvantului), dacă cele două injecții se fac în același loc.

Efectul stimulator al adjuvantului Freund este foarte intens pentru dozele mici de antigen. Este foarte eficient în asociație cu antigenele proteice, stimulând sinteza IgG. Utilizarea sa la om este limitată de efectele secundare pe care le produce (artrita de adjuvant).

Endotoxinele bacteriilor Gram negative (Salmonella, Brucella, Bordetella etc.) au efect adjuvant. Ele sunt în același timp adjuvanți, antigene, toxine și factori pirogeni. Efectul maxim se obține numai dacă endotoxina se administrează simultan sau la mai puțin de 6 ore după injectarea antigenului. Nu se adaugă vaccinurilor umane pentru că produce febră.

Sărurile de aluminiu (Al(OH)_3 , $\text{Al(SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), fosfatul de aluminiu și cele de calciu au efect adjuvant, deoarece se combină cu imunogenul și formează un complex insolubil la situsul subcutan sau intramuscular al injectării, măbind intervalul de timp în care celulele imunitare pot fi activate. Se stimulează afluxul de fagocite și funcția de fagocitoză.

Compușii aluminiului sunt singurii adjuvanți acceptați în clinica umană și veterinară, deși prezintă unele dezavantaje: stimulează răspunsul imun mediat humoral, dar nu și imunitatea mediată celular; vaccinurile care conțin compuși ai Al nu pot fi conservate prin îngheț și nici liofilizate și de aceea necesită transport refrigerat.

Alți adjuvanți acționează prin stimularea activității enzimelor lizosomale. Vitamina A și sărurile de beriliu, de siliciu, sărurile quaternare de amoniu mobilizează macrofagele la locul injectării și stimulează activitatea lor fagocitară și degradativă.

1 Emulsia este o suspensie de picături mici ale unui lichid în alt lichid, cu care nu este miscibil.

IMUNOGLOBULINELE (ANTICORPII)

Existența anticorpilor a fost demonstrată de Behring și Kitasato (1890), în serul animalelor imunizate experimental cu toxina tetanică. Serul lor neutralizează toxina in vitro și o face inofensivă pentru animalele de experiență. Autorii au folosit denumirea de “anticorp” pentru a desemna substanțele protectoare ce apar în ser, cu specificitate față de un antigen corpuscular (bacterii).

Heidelberger (1930) a purificat anticorpul din ser și a evidențiat că aparține fracției proteice. Tiselius și Kabat (1938) au demonstrat experimental că, de cele mai multe ori, funcția de anticorp este asociată cu fracția gama a proteinelor serice și le-au dat denumirea de gamaglobuline.

În 1970, prin consens între specialiști, OMS a stabilit ca substanțele cu proprietăți de anticorp, să fie grupate în categoria imunoglobulinelor, pornind de la faptul că toate substanțele din acest grup au funcție imunitară și sunt cuprinse în fracția globulinică a serului. Anticorpul nu sunt numai gamaglobuline. Există și alte globuline cu funcție de anticorp, după cum există și gamaglobuline care nu au activitate de anticorp (de exemplu, proteinele patologice Bence-Jones).

Fig.10. Mobilitatea electroforetică a imunoglobulinelor serice. IgG are cea mai heterogenă sarcină electrică și migrează în regiunile gama și beta. IgE are mobilitate similară cu a IgD, dar nu poate fi identificat pe electroforegramă datorită nivelului seric scăzut.

Anticorpul sunt imunoglobuline care se sintetizează în organism după pătrunderea unui antigen și au proprietatea de a se cupla specific cu antigenul inductor și de a-i anihila acțiunea nocivă. Termenul de “anticorp” în accepțiunea sa actuală, a fost folosit de Ehrlich (1891) în lucrarea “Studii experimentale asupra imunității”.

Anticorpul formează 20% din totalul proteinelor plasmatiche, dar se găsesc și în lichidele extravasculare, în secrețiile exocrine (salivă, lapte, lacrimi) și ca molecule receptor de antigen pe suprafața limfocitelor B.

Moleculele de anticorpi au cea mai mică mobilitate electroforetică. Deși sunt asemănătoare ca structură, moleculele de imunoglobuline formează o familie de o diversitate imensă, neîntâlnită la nici o altă proteină. Diversitatea lor uriașă este ordonată în clase și subclase, în primul rând pe baza compoziției în aminoacizi. Heterogenitatea compoziției în aminoacizi se reflectă în sarcina lor electrică, foarte diferită. La electroforeză, celelalte proteine serice migrează ca o bandă compactă, cu o mobilitate caracteristică, deoarece moleculele lor sunt omogene în ceea ce privește sarcina electrică, la un pH dat. Imunoglobulinele migrează ca o bandă largă, fiind heterogene, nu numai prin secvența aminoacizilor, ci și prin sarcina electrică.

Structura moleculei de imunoglobulină

Structura moleculei de imunoglobulină (Ig) s-a stabilit prin analiza proteinelor omogene secretate de plasmocitoame, cu metodologii complexe: biochimice, analitice, cristalografia prin difracție cu raze X.

Unitatea structurală de bază a moleculei de Ig este monomerul. Acesta este o unitate tetrapeptidică, formată prin asocierea a două lanțuri grele (H, Heavy = greu), fiecare având circa 450 de aminoacizi și o greutate moleculară cuprinsă între 50-76 kD și două lanțuri ușoare (L, Light = ușor), fiecare având circa 216 aminoacizi și o greutate moleculară de 25 kD. Cele 4 catene polipeptidice sunt legate între ele prin punți S-S și se răsucesc în spirală - atât unul față de altul, dar și fiecare separat față de propria-i axă, rezultând o configurație tridimensională, stabilizată prin 16-24 legături S-S și prin alte interacțiuni necovalente. Monomerul tetrapeptidic tridimensional are formă de T sau de Y.

În funcție de secvența aminoacizilor, fiecare lanț polipeptidic este alcătuit din două regiuni distincte:

a) regiunea constantă (C) corespunde jumătății C-terminale a celor 4 catene polipeptidice. Are o secvență relativ uniformă a aminoacizilor și asigură unitatea structurală și funcțională a moleculei de Ig;

b) regiunea variabilă (V) cuprinde o secvență de circa 110 aminoacizi în jumătatea N-terminală a celor 4 catene polipeptidice. Mărimea sa nu este fixă, deoarece intervin inserții sau deleții de 3-6 aminoacizi. Regiunile variabile ale fiecărei perechi de catene formează situsul de combinare al moleculei de Ig, care conferă specificitate de legare cu antigenul.

Variabilitatea maximă a secvenței de aminoacizi a catenei L se concentrează în pozițiile 24-34, 50-55, 89-97, iar a catenei H, la secvențele

30-36, 50-56, 86-91 și 95-100. Aceste secvențe formează regiunile hipervariabile sau regiunile determinante de complementaritate (RDC), față de configurația spațială a epitopului.

Aminoacizii acestor secvențe intră în alcătuirea situsului de combinare al moleculei de Ig.

Secvențele relativ invariante se numesc regiuni cadru (RC) și formează 80-85% din regiunea variabilă a moleculei de Ig. Variația secvenței aminoacizilor la nivelul regiunilor cadru este limitată la 5%. Secvența regiunilor cadru și a celor determinante de complementaritate alternează astfel: RC1, RDC1, RC2, RDC2, RC3, RDC3, RC4, RDC4.

Aproape de jumătatea catenelor H se găsește o secvență de circa 15 aminoacizi, în care sunt grupate toate resturile de cisteină ce formează punți S-S intercatenare. Această secvență se numește regiunea balama. Este sensibilă la acțiunea proteazelor fiind clivată de papaină, pepsină etc. La IgM și IgE, regiunea balama lipsește, dar cea omologă balamalei este clivată de proteaze. Regiunea balama asigură flexibilitatea moleculei de Ig, permițând mobilitatea fragmentelor Fab, care, teoretic, pot forma unghiuri variabile, între 0-180°, conferind moleculei o geometrie variabilă. Cele 16-24 legături S-S ale monomerului tetrapeptidic sunt constante ca număr și localizare pentru diferitele clase de Ig. Se disting 3 categorii de punți S-S:

- legături intercatenare H-H sau L-H, ale unui monomer. Legăturile L-L s-au descris la IgA2 și la proteinele Bence-Jones, care sunt dimeri de lanțuri L;

- legături intracatenare, care determină structura terțiară a fiecărui lanț polipeptidic.

- legături intercatenare, între lanțurile H ce aparțin unor monomeri diferiți, la IgA2 și IgM, care formează complexe moleculare polimerice:

moleculei de Ig se formează prin plierea fiecăreia din cele 4 catene polipeptidice și prin răsucirea lor în spirală. Domeniile sunt regiuni globulare ale moleculei, legate între ele prin secvențe lineare scurte. Domeniile se pliază într-o conformație stabilă, conferită de secvența proprie de aminoacizi. Comparativ cu secvențele lineare, domeniile pliate sunt mai rezistente la proteoliză.

Catena L are două domenii: unul corespunzător regiunii variabile (VL) și altul corespunzător regiunii constante (CL).

Catena H are 4 domenii: unul corespunzător regiunii variabile (VH) și trei domenii ale regiunii constante: CH1, CH2, CH3.

Fig. 11. a. Reprezentarea schematică a structurii primare a moleculei de imunoglobulină.

Fig. 11. b. Localizarea diferitelor funcții ale moleculei de anticorp.

Fiecare catenă H a moleculelor de IgM și IgE are 5 domenii: unul în regiunea variabilă (VH) și 4 în regiunea constantă (CH1 și CH4).

Secvența de legătură între regiunea constantă (CH1) și cea variabilă a fiecărei catene se numește zonă de comutare (s = switch).

Fiecare domeniu are o formă cilindrică sau globulară, cuprinde o secvență de circa 60 de aminoacizi și este stabilizat prin interacțiuni necovalente de tip trans, cu domeniul omolog din lanțul opus și de tip cis, cu domeniul vecin al aceleiași catene.

Domeniile fiecărui lanț, împreună cu cele omologe ale lanțului opus, formează unități funcționale denumite module. Cooperarea lor funcțională este ilustrată de faptul că domeniile VL și VH separate, au o capacitate foarte limitată de legare a antigenului, în timp ce forma lor asociată (care constituie situsul de legare al moleculei) este foarte eficientă în legarea antigenului.

Fig. 12. Reprezentarea schematică a domeniilor pliate și stabilizate ale moleculei de IgG.

Moleculele de imunoglobuline există sub două forme: secretate, ca anticorpi în umorile organismului și legate de membrana limfocitelor B, îndeplinind funcția de receptori de antigen. Forma legată prezintă o secvență hidrofobă la capătul C-terminal, de circa 30 de aminoacizi, care străbate membrana și se ancorează în structura ei.

Metodele de clivare și de denaturare chimică a moleculei de imunoglobulină au contribuit la înțelegerea structurii și funcției sale. Clivarea s-a realizat cu enzime proteolitice (papaină, pepsină, tripsină) sau prin cianoliză cu BrCN.

Fig. 13. Clivajul enzimatic al moleculei de IgG1 umane. Pepsina clivează catena H și eliberează fragmentele F(ab')₂ și regiunea Fc (segmentul cristalizabil). Hidroliza prelungită taie fragmentul Fc' în peptide scurte. Papaina clivează molecula în regiunea balama (la restul 224) și eliberează două fragmente Fab și un fragment Fc (după Roitt, 1984).

Papaina scindează molecula de imunoglobulină la nivelul regiunii balama (aminoacidul 224) și eliberează două fragmente Fab (Fragment antigen binding) și fragmentul Fc (cristalizabil). Fiecare fragment Fab (50 kD) conține un lanț L întreg și jumătatea N-terminală a lanțului H, notată cu Fd (difficult), care cuprinde domeniile VH și CH1. Fragmentul Fab poate fi scindat transversal și rezultă fragmentul Fv (variabil) format din domeniile VL și VH, separat de domeniile CL și CH1.

Fragmentul Fc (50 kD) este format din jumătățile C-terminale ale celor două catene H, unite printr-o legătură S-S și prin legături necovalente.

Pepsina clivează lanțurile H sub regiunea balama și eliberează fragmentul Fc', mai mic decât fragmentul Fc papainic și două fragmente Fab' legate între ele (Fab')₂, prin punți S-S intercatenare.

BrCN scindează lanțurile polipeptidice la nivelul secvențelor cu Met, pe care o transformă în homoserină. Fragmentele rezultate sunt heterogene ca mărime, în funcție de frecvența metioninei. Polipeptidele rezultate prin clivare enzimatică, cât și prin cianoliză, se separă prin tehnici cromatografice.

Denaturarea moleculei de imunoglobulină prin reducerea legăturilor S-S. Agenții reducători (mercaptoetanolul, mercaptoetanolamina, ditiotreitoul) au o grupare SH liberă și reduc legăturile S-S intercatenare și intracatenare.

HO - CH₂ - CH₂ - SH (Mercaptoetanolul)

Legăturile intercatenare (H-H sau H-L) sunt reduse mai ușor, iar cele intracatenare, care stabilizează bucele domeniilor moleculei de imunoglobulină, sunt dissociate mai greu.

Reducerea legăturilor S-S este reversibilă. După îndepărtarea agentului denaturant, renaturarea este rapidă și completă. Din acest motiv, agenții denaturanți se încorporează în sistemul supus denaturării. Denaturarea se poate stabiliza prin diferite metode chimice.

Funcțiile moleculei de imunoglobulină

În ansamblul efectorilor sistemului imunitar, moleculele de imunoglobulină îndeplinesc două categorii de funcții:

- funcții de specificitate
- funcții grupate sub denumirea de activități biologice efectoare

Specificitatea imunoglobulinei față de un antigen este exprimată prin capacitatea de recunoaștere fină a epitopului complementar al antigenului și de combinare cu acesta. Specificitatea moleculei de imunoglobulină este conferită de situsul său de combinare. Marea diversitate a moleculelor de anticorpi, asigură o diversitate uriașă a situsurilor de combinare, de ordinul a 10^8 și 10^9 specificități de legare.

Specificitatea de legare este dată de structura spațială a situsului de combinare cu antigenul, conferită de resturile de aminoacizi ale regiunilor hipervariabile ale catenelor H și L.

Aminoacizii care formează situsul de combinare al moleculei de imunoglobulină, prin plierea regiunilor hipervariabile, delimitează o cavitate moleculară ce diferă ca formă și mărime.

Cavitatea prezintă substructuri (proeminente și depresiuni), pe care le formează secvențele hipervariabile, în timp ce restul regiunilor variabile ale celor două catene conferă structura tridimensională a cavității moleculare.

Potrivirea spațială dintre situsul de combinare al moleculei de anticorp și epitopul specific, din punctul de vedere al configurației spațiale, este perfectă. Eventualele imperfecțiuni geometrice pot fi ocupate de moleculele de apă. Potrivirea perfectă a celor două unități combinante este sugerată de metafora “cheie-broască”.

După combinarea cu antigenul, modificările spațiale ale situsului de combinare a anticorpului sunt minime, nedectabile. Epitopul antigenic are un rol important în potrivirea conformațională perfectă cu situsul de combinare a anticorpului, deoarece corespunde unei regiuni moleculare cu factor de temperatură mai ridicată, ceea ce sugerează o flexibilitate mai accentuată a secvenței moleculare respective.

Flexibilitatea unui determinant antigenic îi permite să se adapteze mai ușor într-un situs de legare preexistent al moleculei de anticorp, chiar dacă epitopul nu se potrivește exact geometriei situsului de combinare a anticorpului. Datorită flexibilității epitopului, legarea antigenului cu anticorpul se aseamănă cu “întâlnirea a doi nori” și nu cu aceea a “două pietre”.

Anticorpilor specifici față de secvențele peptidice mobile (calde) ale antigenului proteic, se leagă cu afinitate mai mare de proteina nativă. Aceste rezultate sunt foarte importante din punct de vedere practic, pentru selectarea segmentelor peptidice în vederea obținerii vaccinurilor sintetice subunitare.

Dimensiunile situsului de combinare s-au dedus indirect, prin determinarea mărimii haptenei care blochează reacția de combinare a anticorpilor cu antigenul nativ: oligozaharidul format din 6-8 unități monomerice ocupă complet situsul de combinare al moleculei de anticorp. Oligozaharidele mai mici inhibă parțial reacția specifică de precipitare. Pentru anticorpilor specifici față de antigene proteice, tetrapeptidele au blocat cu maximă eficiență reacția de precipitare dintre anticorpi și antigenul nativ.

Funcțiile biologice efectoare sunt amorsate de reacția antigen-anticorp. Numărul funcțiilor biologice efectoare este mai mic și sunt dependente de regiunile constante ale moleculei de imunoglobulină.

Fiecare domeniu al regiunii constante a moleculei de imunoglobulină îndeplinește anumite funcții:

- legarea antigenului pe imunoglobulinele de suprafață care funcționează ca receptori pe limfocitele B, declanșează proliferarea și diferențierea lor, iar legarea antigenului cu imunoglobulinele citotrope pentru mastocite, declanșează degranularea acestor celule;
- după cuplarea cu antigenul, moleculele de imunoglobulină expun fragmentul Fc, recunoscut ulterior de receptorii specifici pentru Fc de pe suprafața monocitelor, macrofagelor, PMNN. Astfel se stimulează procesul de fagocitoză a celulelor nonself tapetate cu imunoglobuline, denumit imunofagocitoză;
- celulele K, prin intermediul receptorilor pentru Fc, interacționează cu celulele nonself tapetate cu IgG și realizează liza de contact prin fenomenul de citotoxicitate;
- interacțiunea antigen-anticorp generează un semnal care se transmite regiunii Fc. Aceasta își modifică configurația spațială și expune un situs de recunoaștere (pentru IgG situat între Glu 318 și Lys 322), de care se leagă C1q;
- regiunea balama este transductoare de semnale și are un rol important în flexibilitatea moleculei de imunoglobulină, permițând variația unghiului dintre fragmentele Fab: ele trec reversibil de la forma T la Y. Geometria variabilă a moleculei de imunoglobulină mărește eficiența de legare a antigenului, deoarece ajustează poziția celor două situsuri de combinare ale anticorpului, în funcție de distanța la care se găsesc determinanții antigenici pe suprafața unui antigen particulat (virus sau celulă);
- regiunea balama a moleculelor de IgG și IgD este sensibilă la acțiunea enzimelor proteolitice, iar a moleculei de IgA este rezistentă.

Componenta glucidică a imunoglobulinei îndeplinește următoarele funcții;

- realizează și menține o conformație a moleculei de imunoglobulină, esențială pentru secreție;
- mărește solubilitatea moleculelor de imunoglobulină;
- are rol de spațiator între domeniile unui lanț și între catenele moleculei;

- participă la funcțiile citotrope ale moleculei de imunoglobulină;
- are rol în legarea C1q, componentă a sistemului complement.

Heterogenitatea anticorpilor

Moleculele de imunoglobuline din plasma oricărui organism sunt foarte heterogene, atât datorită diversității epitopilor față de care s-au sintetizat în ceea ce induce variații ale secvențelor hipervariabile ale moleculei, cât și datorită variațiilor secvenței de aminoacizi în regiunile constante ale moleculei.

Heterogenitatea anticorpilor este ordonată în clase, subclase, tipuri, alotipuri și idiotipuri, pe baza variației secvenței de aminoacizi. Moleculele de imunoglobuline au calități duble: ele se comportă nu numai ca molecule de recunoaștere, care recunosc specific antigenul, dar la rândul lor sunt recunoscute ca antigene. Pentru sporirea gradului de imunogenitate, moleculele de imunoglobuline se asociază cu adjuvantul Freund și se injectează la animale de experiență. Variațiile de structură chimică a imunoglobulinelor se comportă ca determinanți antigenici și induc sinteza anticorpilor anti-imunoglobulină. Variațiile de ordin chimic ale imunoglobulinelor se evidențiază prin metode imunochimice de precipitare între moleculele de imunoglobulină cu rol de antigen și anticorpii anti-imunoglobulină din serul imun.

Din punctul de vedere al manifestării imunopotenței determinanților antigenici ai imunoglobulinelor, s-au definit trei nivele de heterogenitate: izotipică, alotipică și idiotipică.

Heterogenitatea izotipică

Heterogenitatea izotipică (izos = același) definește variantele biochimice ale imunoglobulinelor, comune pentru toți indivizii unei specii. Variantele biochimice se datorează variațiilor secvenței de aminoacizi în regiunea constantă a catenei H. Ele se comportă ca determinanți antigenici după injectarea în organismul altei specii. Pentru identificarea epitopilor izotipici ai moleculelor de imunoglobulină umană, acestea, în asociație cu adjuvantul Freund, se injectează la iepure.

Fiecare individ al unei specii exprimă toate variantele antigenice izotipice caracteristice speciei.

Variantele antigenice izotipice ale imunoglobulinelor umane s-au identificat inițial, în regiunea constantă a catenei H.

Există 5 variante antigenice distincte ale catenelor H în regiunea constantă, notate cu g, m, a, d, e, corespunzătoare celor 5 clase de imunoglobuline: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. Serul imun față de un determinant antigenic de clasă nu dă reacții încrucișate cu celelalte tipuri de determinanți, deoarece catenele H ale diferitelor clase de imunoglobuline prezintă diferențe mari de ordin chimic între domeniile echivalente, care merg până la circa 60% din totalul aminoacizilor.

Determinanții antigenici ai unei clase de imunoglobuline sunt comuni tuturor indivizilor unei specii și se evidențiază în serul imun heterolog, obținut prin imunizarea organismelor altei specii. De exemplu, un antiser față de lanțul uman, obținut pe iepure, va precipita numai anticorpul clasei IgG din orice ser uman.

Ulterior, determinanții antigenici s-au identificat și în regiunile constante ale catenelor L. Determinanții antigenici ai catenelor L determină tipurile de imunoglobuline.

Catena L are două variante antigenice, notate cu k și l, care se găsesc la toate cele 5 clase de imunoglobuline. Cele două tipuri structurale de lanțuri L (k și l) prezintă deosebiri de secvență a aminoacizilor în regiunea constantă și nu au determinanți antigenici comuni. De aceea, nu dau reacții imune încrucișate. Serul imun heterolog anti-moleculă de imunoglobulină umană cu catena L_k, obținut pe iepure, precipită toate moleculele de imunoglobulină umană care conțin catena L_k, indiferent de clasă. Serul imun anti-L_k nu precipită moleculele de imunoglobulină care conțin catena L_l.

O moleculă de imunoglobulină are două catene de tip k sau l. Formula generală a diferitelor clase de imunoglobuline este

g_2k_2 (sau g_2l_2), m_2k_2 (m_2l_2), a_2k_2 (a_2l_2).

Catenele L de tip k și l determină tipurile moleculare de imunoglobuline. La om, raportul Ig k/ l este 7/3, iar la șoarece este 19/1, valori care probabil reflectă raportul numeric al genelor codificatoare pentru cele două tipuri de catene.

Izotipurile catenelor H nu influențează funcția de specificitate a moleculelor de imunoglobuline: același antigen poate fi legat de oricare din cele 5 clase de imunoglobuline.

Pe lângă variantele antigenice menționate în clase și tipuri s-au identificat diferențe mai subtile ale moleculelor de IgG și IgA, în ceea ce privește proprietățile fizice, chimice și biologice, diferențe care corespund subclaselor antigenice. Aceasta înseamnă că, pe lângă determinanții antigenici de clasă, există și alte variante antigenice ale regiunii constante ale catenei H, corespunzătoare subclaselor. Ele se notează cu litera clasei, urmată de o cifră: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, respectiv IgA1, IgA2.

Moleculele de imunoglobuline ale subclaselor au în comun determinanții antigenici proprii fiecărei subclase, aducând un nivel superior de heterogenitate a catenelor H.

Diferențele secvenței de aminoacizi ai catenei H, între diferite subclase sunt mici: 24 de aminoacizi între IgG1 și IgG4. Cea mai importantă deosebire constă în numărul legăturilor S-S intercatenare.

Moleculele diferitelor subclase sunt sintetizate de celule diferite.

Variantele alotipice

Descoperirea alotipiei (allos = altul) a pornit de la următorul fapt de observație: în serul pacienților cu artrită cronică reumatoidă se găsesc molecule de tip special, încadrate în categoria factorilor reumatoizi (FR). Factorii reumatoizi sunt molecule de auto-anticorpi, adică IgM anti-IgG.

Factorii reumatoizi se evidențiază in vitro, prin capacitatea lor de a determina aglutinarea eritrocitelor tapetate cu o doză subaglutinantă de anticorpi specifici antieritrocitari (IgG).

Grubb (1956) a observat că FR seric, uneori, aglutinează hematiile tapetate cu auto-anticorpi specifici (care se sintetizează în anemia hemolitică autoimună) ale unor pacienți, iar alteori, reacția de hemaglutinare nu se produce, testul evidențierii FR in vitro fiind fals negativ. Concluzia reacției de hemaglutinare pe care, uneori, FR din serul pacienților de artrită reumatoidă o produce asupra hematiilor tapetate cu o doză subaglutinantă de anticorpi specifici, a fost următoarea: autoanticorpii de pe suprafața eritrocitelor unor indivizi cu anemie hemolitică autoimună, posedă determinanți antigenici diferiți, pe care FR poate să-i recunoască. Astfel s-a dedus că moleculele de imunoglobulină de la indivizi diferiți, sunt diferite din punct de vedere antigenic. În consecință, imunizarea unui individ cu imunoglobulinele provenite de la alt individ

al aceleiași specii, determină sinteza anticorpilor față de determinanții antigenici ai moleculelor imunoglobulinice ale donorului.

Imunoglobulinele sunt aloantigene ineficiente dacă sunt injectate ca proteine solubile în organismul uman. De aceea, transfuziile de sânge total, de plasmă sau injectarea imunoglobulinelor solubile, de cele mai multe ori, nu induc sinteza anticorpilor anti-imunoglobuline ale donorului. Moleculele de imunoglobuline devin antigenice după asocierea lor cu adjuvantul Freund.

Semnificația variantelor antigenice alotipice ale moleculelor de imunoglobuline este analogă celei a antigenelor de grup sanguin. Fenomenul este general, adică și alte molecule provenite de la un organism pot fi imunogene pentru alte organisme ale aceleiași specii, la care se comportă ca aloantigene.

Variantele alotipice ale imunoglobulinelor se detectează în reacția de precipitare cu aloantiseruri obținute pe organisme ale aceleiași specii, dar cu alotip diferit de acela al organismului donor al antigenului imunoglobulinic.

Variantele moleculare alotipice sunt consecința existenței genelor alele perechi (aa), o caracteristică generală a organismelor diploide. Prin mutații succesive, în același locus, apar mai multe alele care formează o serie polialelică - a1, a2, a3 ÖÖ an. Genele alele ocupă același locus pe cromosomii omologi, ca și gena de tip sălbatic a. Fiecare individ va avea o combinație de gene alele: aa1, aa2 Ö.. aan sau a1a2, a1a3 ÖÖ a1an, cu variante antigenice distincte.

Allotipurile imunoglobulinelor sunt rezultatul variațiilor secvenței aminoacizilor în regiunile constante ale catenelor H și L, ceea ce le conferă un grad superior de heterogenitate, consecință a alelelor codominante la același locus.

Pentru moleculele imunoglobulinice umane s-au descris trei categorii de markeri alotipici:

- factorii Gm (gama marker), numerotați de la 1 la 25, pe catena H a subclaselor de IgG. De exemplu, markerul G1m(a) pe moleculele de IgG1 are secvența Asp-Glu-Leu-Thr-Lys, iar moleculele altor indivizi au secvența Glu-Glu-Met-Thr-Lys, adică doi aminoacizi diferiți. Pentru IgG3 sau descris 14 alele;

- factorii A2m(1) și A2m(2), identificați pe catenele H ale subclasei IgA2;
- factorii Km(Inv), pe catenele Lk, în număr de trei;
- două variante alelice pentru IgE.

Foarte rar, determinanții antigenici alotipici sunt localizați în domeniile variabile ale moleculei.

Ca și în alte sisteme alelice, indivizii pot fi homozigoți sau heterozigoți pentru genele care codifică markerii. Genele se exprimă codominant și se transmit în descendență după mecanismul mendelian. De exemplu, alotipurile b4b5 pe catenele L ale imunoglobulinelor de iepure se exprimă astfel: un organism homozigot b4b4 sau b5b5 exprimă alotipul b4, respectiv b5. Dar genotipul b4b5 rezultat în descendența lor exprimă markerul b4 pe o fracție a moleculelor și markerul b5, pe restul moleculelor de imunoglobuline.

Variantele idiotipice

Idiotipul (idios = individual) este reprezentat de o populație omogenă de molecule de anticorpi, sintetizate de descendenții unei clone celulare, care recunosc și se combină cu un singur determinant antigenic (epitop).

Specificitatea idiotipică a unei populații de anticorpi s-a dedus pe cale experimentală:

- antigenul (celule de *S. typhi*) s-a injectat la organismele A și B (iepuri), identice din punct de vedere genetic. Se sintetizează anticorpi aglutinanți

anti *S. typhi*;

- anticorpul aglutinant 1 (produși de organismul A) s-au injectat la organismul C (iepure din aceeași linie genetică). Se sintetizează anticorpi anti-anticorpi 1, evidențiați în reacția de precipitare.

Surprinzător, anticorpul anti-anticorp 1 nu precipită anticorpul 2, deși anticorpul 1 și anticorpul 2 au aceeași specificitate față de antigenul *S. typhi*, iar organismele A, B, C aparțin aceluiași alotip.

Concluzia este că anticorpul 1 și anticorpul 2, deși au aceeași specificitate față de antigenul de *S. typhi*, la rândul lor, au determinanți antigenici proprii. De aceea, anticorpul anti-anticorp 1 nu precipită anticorpul 2, sintetizat de un alt organism. Moleculele de anticorpi cu aceeași specificitate de combinare față de un antigen, sintetizate de organisme identice genetic, au o individualitate antigenică distinctă, denumită specificitate idiotipică.

Heterogenitatea idiotipică este consecința determinanților idiotipici, localizați în regiunile hipervariabile ale catenelor H și L. Specificitatea idiotipică a moleculelor de anticorpi sintetizați de o clonă de celule este conferită de unicitatea secvenței de aminoacizi de la nivelul secvențelor hipervariabile ce participă la formarea situsurilor de combinare, care determină epitopi cu caracter strict individual denumiți idiotopi. Unii idiotopi sunt localizați chiar în interiorul situsului de combinare sau în imediata sa vecinătate. Dovada o constituie faptul că legarea epitopului specific de situsul de combinare a anticorpului, blochează într-o măsură mai mare sau mai mică, legarea anticorpilor anti-idiotipici. Fig. 14. Ilustrarea diagramatică a heterogenității anticorpilor.

Colecția de idiotopi ai situsului de combinare a unei molecule de imunoglobulină formează idiotipul ei. Idiotipul este rezultatul configurației spațiale unice a regiunilor hipervariabile ale catenelor H și L, conferită de o secvență unică a aminoacizilor.

Repertoriul idiotipurilor este de același ordin de mărime cu acela al specificității situsurilor de combinare. Pentru situsul de combinare al moleculei de imunoglobulină s-a propus denumirea de paratop.

La alcătuirea idiotipului participă ambele catene. Cele două catene dissociate nu pot să lege anti-idiotipul sau îl leagă cu o eficiență foarte scăzută.

IgG

Imunoglobulinele reprezintă circa 20% din totalul proteinelor serice. IgG este dominantă cantitativ în serul uman normal, reprezentând 70-75% din cantitatea totală de imunoglobuline. Concentrația sa medie în ser este de 1250 mg/100 ml, cu variații individuale normale între 800 și 2000 mg/100 ml.

IgG este cea mai heterogenă dintre imunoglobuline în ceea ce privește sarcina electrică. Din această cauză, în câmpul electroforetic se distribuie în fracțiile g 1 și g 2 ale serului.

Din punct de vedere structural, IgG este un monomer cu greutatea moleculară de 150 kD și cu constanta de sedimentare 7S. Componenta glucidică reprezintă circa 3% din greutatea moleculară a IgG.

Fig. 15. Modelul structural al IgG1. Domeniile variabile ale celor două catene (VH și VL) formează situsul de legare a antigenului. Cercurile negre indică poziția grupărilor glucidice. HR = regiunea balama.

IgG se sintetizează tardiv în răspunsul imun primar, dar este imunoglobulina predominantă a răspunsului imun secundar și se distribuie uniform în compartimentele intra- și extravasculare.

IgG se prezintă sub forma a 4 variante antigenice, conferite de compoziția în aminoacizi a catenei g: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Proporția normală a celor 4 subclase este de 66% pentru IgG1, 23% pentru IgG2, 7% pentru IgG3 și 4% pentru IgG4.

IgG3 este mai grea, datorită catenei g 3 și are o regiune balama extinsă, codificată de câțiva exoni, iar IgG4 are o regiune balama scurtă și rigidă, ceea ce produce o nepotrivire sterică pentru fixarea complementului.

IgG este singura imunoglobulină care traversează placenta, asigurând astfel protecția fătului și nou-născutului în primele luni de viață. Pe membrana sincițio-trofoblastului se găsesc receptori pentru regiunea Fc a IgG, care mediază transferul placentar al moleculei.

In vivo, funcția esențială a IgG este neutralizarea toxinelor bacteriene. IgG activează sistemul complement și produce liza celulelor bacteriene și a particulelor virale, dar are și rol opsonizant. In vitro, IgG participă la reacțiile de aglutinare și precipitare.

Termenul de înjumătățire al IgG este de 21 de zile.

În toate serurile imune, o proporție de 5-15% din moleculele de IgG, pare să conste din molecule asimetrice, cu un singur situs funcțional de legare (molecule monovalente). Aceste molecule nu participă la reacțiile secundare *in vitro* (aglutinare, precipitare). Celălalt situs este blocat stereochimic de un polizaharid bogat în manoză, legat de primul domeniu constant (CH1).

IgA

Unitatea de bază a structurii IgA este monomerul, alcătuit din două catene grele (H) cu specificitate de clasă (izotipică) a și două catene ușoare (L) de tip l sau k.

Unitatea monomerică (l)₂ sau (a-k)₂ are o tendință constantă de a produce structuri moleculare polimerice, formate din 2, 3, 4 sau 5 monomeri (10S, 13S, 15S, respectiv 17-18S), care în ser se găsesc în concentrații descrescânde.

La microscopul electronic, molecula de IgA monomeră are aspectul literei Y. Complexele dimerice au forma a două litere Y, așezate una în prelungirea celeilalte. Cele două fragmente Fc formează un lanț lung și rigid.

IgA se găsește atât în plasma sanguină, cât și în secrețiile externe: salivară, lacrimală, gastrică vaginală, intestinală, biliară, pancreatică, lactată.

Pe baza unor diferențe de structură moleculară (numărul punților S-S, secvența aminoacizilor în regiunea balama) au fost descrise două subclase de IgA: IgA1 și IgA2. Ele diferă prin 22 de aminoacizi, în primul rând datorită deleției a 13 aminoacizi din regiunea balama a IgA2, dar care se găsesc la IgA1. Această diferență structurală conferă rezistență moleculei de IgA2 la acțiunea unor proteaze bacteriene, care clivează specific IgA1 în regiunea balama.

În funcție de localizare se disting IgA serică și IgA din secreții.

Fig. 16. Structura IgA1 umană. Sunt indicate pozițiile punților disulfurice inter- și intracatenare, precum și poziția ipotetică a catenelor polizaharidice. O punte disulfurică suplimentară stabilizează domeniul C a 2 și o alta leagă lanțul J în polimerul de IgA.

IgA serică este reprezentată în primul rând de IgA1 (90%) și este monomerică în proporție de 80%. Catenele L și H sunt reunite prin două punți S-S. Subclasa IgA2 reprezintă numai 10% din IgA serică. Pe baza markerilor alotipici ai catenei H, IgA2 se subdivide în două variante alotipice: A2m1 (la populațiile cauziene) și A2m2 (la populațiile mongoloide-negroide)

Funcțiile IgA seric nu sunt bine precizate, datorită dificultăților de purificare. Rolul său cel mai important ar fi acela de a îndepărta cantități mici de antigene, provenite din alimente sau antigenele solubile ale microorganismelor, absorbite în circulația generală. Eliminarea timpurie împiedică accesul acestor antigene la celulele sistemului imunitar și stopează declanșarea unui răspuns imun de amploare, care ar devia forțele de apărare a organismului, de la funcția sa esențială, aceea a protecției antiinfecțioase.

In vivo, IgA nu activează complementul pe calea clasică și nu produce liza antigenelor celulare, dar moleculele agregate in vitro de IgA1 și IgA2 activează calea alternă. Funcția opsonizantă a IgA este controversată. IgA nu produce reacții de precipitare cu antigenele moleculare.

IgA din secreții (sau IgA secretor) se găsește în secreția mucoaselor (digestivă, respiratorie, urinară), în secreția biliară și pancreatică. De aici derivă și denumirea sa improprie, IgA secretoare (sIgA), deși mai corectă ar fi denumirea de "IgA din secreții".

Fig.17. Structura sIgA1 umană. Piesa secretoare, probabil este răsucită în jurul dimerului de IgA și se leagă prin punți disulfurice de domeniul C a 2 al fiecărui monomer. Piesa J este amplasată la joncțiunea celor doi monomeri. Puntea disulfurică ce leagă domeniul C a 2 de regiunea balama nu este figurată (după Roitt, 1984).

sIgA se găsește în special în formă dimerică (80%), iar restul ca monomer sau alt tip de polimer. Compartimentul seric al IgA nu influențează semnificativ concentrația IgA din secreții și invers, IgA din secreții nu este absorbit în circulație.

sIgA se sintetizează local, în structurile limfoide asociate mucoaselor: în mucoasa tractului respirator, dar mai ales cea nazală, a tractului digestiv (în special în mucoasa antrului piloric și a intestinului subțire), în lamina propria a acinilor secretori ai glandelor salivare și mamare, în glandele lacrimale. În toate aceste structuri se găsesc numeroase plasmocite și precursorii lor. Imunizarea orală stimulează în primul rând, sinteza IgA.

Structura moleculei de sIgA

Molecula de sIgA este alcătuită din doi monomeri de IgA, legați prin catena J (joining) și o catenă suplimentară, denumită componentă secretoare (CS). Formula generală a sIgA dimer este (IgA)₂ J CS și are greutatea moleculară de 385 kD și constanta de sedimentare 10S.

Complexul molecular (IgA)₂ J CS este foarte rezistent la proteoliză datorită conformației speciale dobândită după legarea catenei J și a catenei CS, precum și datorită capacității sale de a se lega de mucinele din secreții.

Catena J este un glicopeptid de 15-16 kD (136 aminoacizi) și se sintetizează în plasmocitele producătoare de IgA. Este bogat în acizi glutamic și aspartic și conține un oligozaharid legat de Asp din poziția 43. Conține 7-8 resturi de cisteină. Lanțul J se leagă prin punți S-S de regiunea Fc a IgM polimeric și de sIgA. Prezența catenei J s-a stabilit la imunoglobulinele polimerice de la toate clasele de vertebrate, iar ARNm pentru catena J s-a detectat la numeroase nevertebrate. În complexe moleculare cu un grad superior de polimerizare, numai două molecule de IgA sau IgM se leagă prin intermediul catenei J, celelalte fiind legate una de alta prin punți S-S. Polimerizarea moleculelor de IgA în citoplasma celulei producătoare este esențială pentru transportul lor la suprafața mucoasei. Lanțul J se găsește în citoplasma limfocitelor B, în cursul diferențierii spre plasmocit. Aproape toate limfocitele din structurile limfoide asociate mucoaselor (digestivă, respiratorie), din țesutul interstițial mamar, salivar și lacrimal, exprimă lanțul J intracelular. Catena J este sintetizată și de unele celule care produc IgG sau IgD din aceste structuri, dar este degradată în citoplasmă. Plasmocitele din măduva osoasă care produc IgA sau IgG sunt negative pentru lanțul J.

Componenta secretoare a sIgA este o glicoproteină din categoria betaglobulinelor, neînrudită cu imunoglobulinele, bogată în glucide (8,7%). Secvența catenei cuprinde 750 de aminoacizi, distribuiți în trei domenii: domeniul citoplasmatic (103 aminoacizi), transmembranar (23 aminoacizi) și extracelular (circa 625 aminoacizi), la care se adaugă o secvență semnal de 18 aminoacizi, care este clivată după sinteză.

Componenta secretoare se sintetizează în celulele epiteliale ale mucoaselor. După prelucrarea în complexul Golgi (unde are loc glicozilarea), CS migrează pentru a fi integrată în plasmalema bazală și laterală a celulelor. Sinteza CS este independentă de IgA. La noul născut, CS se sintetizează în săptămâna a 8-a (înainte de apariția plasmocitelor). Este prezentă chiar la persoanele în ale căror secreții IgA lipsește.

Funcțiile componentei secretoare. Componenta secretoare are rol de receptor pentru moleculele dimere și polimere de IgA și IgM, care au legat lanțul J (receptor poli-Ig). Legarea lanțului J pare

să determine o schimbare conformațională a acestor molecule. Moleculele de IgA secretate ca monomeri, ca și polimerii care nu au legat lanțul J nu se pot complexa cu CS și trec în circulație.

IgA dimeric trebuie să ajungă în contact cu celulele epiteliale, pentru a fi transportat la suprafața mucoasei. Teoretic, IgA polimeric poate veni în contact cu celulele epiteliale care au lanțul CS inserat în membrană, pe una din următoarele două căi:

- difuzia liberă prin țesutul conjunctiv adiacent plasmocitelor din lamina propria a mucoasei, unde are loc sinteza;

- translocația din circulație la nivelul capilarelor mucoasei.

Componenta secretoare este inserată în membrana laterobazală a celulei epiteliale. Din această poziție, prin domeniul său extracelular, CS leagă dimerii de IgA care conțin lanțul J, printr-un mecanism necunoscut. Una din ipotezele privind mecanismul legării presupune că CS s-ar înfășura în jurul dimerului de IgA, extinzându-se de la o regiune balama la cealaltă, mărind astfel rezistența dimerului la proteoliză. Complexul format este endocitat în vezicule de pinocitoză și este eliberat pe fața luminală a celulelor epiteliale, în secreția lor externă. Un astfel de transport are loc în celulele epiteliale ale mucoasei tubului digestiv, ale mucoasei bronșice, la nivelul epiteliului vezicii biliare și al tractului biliar, al acinilor glandelor mamare, al acinilor pancreatici și salivari. CS leagă chiar complexe imune care conțin IgA polimeric, formate în lamina propria a mucoasei. Acestea sunt transferate la suprafața luminală a epiteliului prin același mecanism ca și IgA polimeric. Anihilarea pe această cale a antigenelor este foarte importantă în tractul intestinal, unde componentele antigenice alimentare și ale microbiotei pot dobândi acces la lamina propria.

Fig.18. Reprezentarea schematică a diferitelor trepte care se succed în generarea sIgA și IgM umane, pe calea transportului epitelial mediat de receptorul de poli-Ig (pIgR). IgA polimeric care conține lanțul J (IgA-J) și IgM pentameric (IgM-J) sunt secretate de plasmocitele locale. Componenta secretorie (CS) este sintetizată în reticulul endoplasmic granular (REG) al celulelor epiteliale și se maturează prin glicozilare în complexul Golgi. În rețeaua transgolgiană (TG), este fosforilat și este expus ca receptor de poli-Ig, pe membrana plasmatică bazolaterală. Endocitoza ligandului complexat cu receptorul de poli-Ig, ca și a receptorului poli-Ig liber, este urmată de transcitoza la endosomiile apicale și în final are loc clivarea receptorului poli-Ig și eliberarea moleculei Ig în secreții (după Brandtzaeg și col., 1998).

Rolul CS în transportul IgA la suprafața mucoaselor este argumentat de faptul că bolnavii cu deficit al sintezei sale, nu au IgA în secreții, deși nivelul IgA seric este normal.

Transportul transepitelial al sIgA este asociat cu o pierdere continuă de receptori, care, spre deosebire de alți receptori, după exocitoză la suprafața celulei epiteliale nu sunt recirculați și nici nu se refac prin sinteză de novo.

Funcțiile efectoare ale sIgA Fig. 19. Reprezentarea schematică a fenomenului de “excludere imună”, pe care-l produc anticorpii din secreția mucoasei intestinale. Înainte de imunizare, o mică parte a antigenului proteic ingerat, scapă digestiei intraluminale, este preluat de enterocit și transportat în spațiile intercelulare. După imunizare, anticorpii din secreția intestinală, leagă antigenul formând complexe Ag-Ac. Legarea antigenului la suprafața celulelor epiteliale este blocată. Antigenele complexate cu anticorpii în învelișul mucos, pot fi degradate de enzimele pancreatice adsorbite la suprafața intestinului. Astfel, scade cantitatea de antigen disponibil pentru absorbția de către celulele intestinale.

Studiul funcțiilor efectoare ale IgA este îngreunat de dificultățile obținerii sIgA în stare pură.

Funcția biologică esențială a sIgA este apărarea organismului față de antigenele moleculare care ar putea fi înglobate (prin endocitoză) la nivelul mucoaselor (în special cea digestivă) și de a asigura protecția față de agenții patogeni care tind să pătrundă de la exterior pe calea mucoaselor digestivă, respiratorie, genito-urinară. sIgA formează complexe cu următoarele tipuri de antigene;

- cu antigenele moleculare adsorbite la suprafața mucoaselor, având rol în “excluderea imună” a acestora. Excluderea imună este o funcție majoră a sIgA, ce constă în limitarea penetrării materialelor antigenice prin epiteliul mucoasei. Deoarece IgA este ineficient în activarea complementului și nici nu stimulează fagocitoza, excluderea imună este un mecanism, în primul rând, neinflamator.

- cu antigenele celulare bacteriene, realizând imobilizarea și aglutinarea acestora. Astfel, este prevenită pătrunderea lor în organism;

- blochează legarea virusurilor de receptorii celulelor epiteliului respirator și ale mucoasei digestive;

- neutralizează efectul toxinelor (botulinică, tetanică, holerică);

- este imunoglobulina predominantă în salivă și constituie principalul mecanism de apărare în cavitatea orală, prin acțiune sinergică cu alți factori antibacterieni (lizozim, lactoferină, peroxidază salivară și mucine).

Prezența sIgA în colostru și în lichidul amniotic sugerează rolul său foarte important în conferirea imunității pasive a noului născut, atât la om cât și la animale. Rezistența noilor născuți, hrăniți natural este net superioară comparativ cu a celor hrăniți artificial.

Concentrația sIgA în colostrul uman este foarte mare în primele 24-48 de ore de lactație (6-88 mg/ml) și diminuează brusc datorită diluției într-un volum secretor mult sporit. Concentrația foarte mare a sIgA în colostru se datorează eliberării unor cantități mari într-un volum mic de secreție. Glanda mamară are un număr relativ mic de celule producătoare de anticorpi, deoarece nu este stimulată antigenic. Originea sIgA în glanda mamară are două surse:

- o sinteză locală foarte intensă în plasmocitele din țesutul conjunctiv subiacent epiteliului acinilor glandulari;

- transportul IgA din sânge.

sIgA din secreția mamară, la nivelul mucoasei digestive a noului născut, nu este transportat în circulația acestuia decât într-o mică măsură, în primele ore de viață (la om) sau zeci de ore la alte mamifere. La unele mamifere (ovine, bovine), sIgA din secreția lactată maternă este transportat foarte activ în circulația noului născut. Efectul protector antiinfecțios al sIgA de origine maternă se exercită prin faptul că moleculele rămân legate de celulele epiteliale ale mucoasei digestive și blochează astfel aderența microorganismelor și a virusurilor.

Moleculele de IgA nu sunt transferate prin placentă. Sângele noului născut nu conține IgA. Nivelul seric al IgA caracteristic adultului, este atins

la 9-10 luni.

În condiții naturale, în tractul intestinal se sintetizează IgA față de multe antigene exogene. IgA din secreția intestinală poate să treacă intactă prin tubul digestiv și să-și păstreze activitatea.

Persoanele cu deficit congenital al IgA (1/500-700) au sensibilitate mare la infecțiile mucoaselor, deși celulele epiteliale sintetizează CS. Aceleași persoane sunt predispuse la maladii autoimune, deoarece, în absența sIgA, mucoasa digestivă este traversată de o mare diversitate de antigene, care induc sinteza unor anticorpi ce interacționează nu numai cu antigenul exogen inductor, ci și cu componente moleculare proprii.

In vivo, sIgA nu activează cascada complementului, dar moleculele agregate artificial, in vitro, activează calea alternă.

Fig. 20. Structura IgM pentameric. Catenele grele de IgM uman au 5 domenii. Monomerii sunt legați prin punți disulfurice între domeniile Cm3 și Cm4. Sunt reprezentate catenele oligozaharidice, ca și poziția ipotetică a catenei J (după Roitt, 1984).

IgM

Caracteristica structurală a IgM este prezența unui lanț greu al izotipului m, alcătuit din 576 aminoacizi. IgM conține 5 grupări prostetice oligozaharidice, care constituie 12% din greutatea moleculară totală. Secvența de aminoacizi a lanțului H cu specificitate antigenică m este organizată în 5 domenii: unul variabil și 4 constante (Cm1, 105 amino-acizi și Cm4, 111 aminoacizi), codificați de exoni diferiți. Lipsește regiunea balama, fiind înlocuită cu domeniul CH2, sensibil la acțiunea proteazelor.

IgM se găsește sub două forme:

- monomeră, legată de membrane
- polimeră, liberă în ser.

IgM legat de membrana unor limfocite, are în plus o secvență COOH-terminală, hidrofobă, formată din 41 de aminoacizi, care întrerupe transportul lanțurilor m prin membrană și ancorează

molecula în structura sa. IgM este molecula majoră cu rol de receptor de antigen, pe suprafața limfocitelor B.

IgM serică are structura unui pentamer ($L_2 m_2$), cu greutatea moleculară de 950 kD. Fiecare pentamer conține un lanț polipeptidic J, bogat în cisteină, foarte acid, cu rol în polimerizarea monomerilor. Cele 5 unități monomere sunt așezate radiar, cu regiunile Fc orientate spre centru, unite prin punți S-S, formate între domeniile CH3 și prin lanțul J. Brațele (Fab)₁₀ sunt orientate spre exterior, chiar în unghi drept față de discul (Fc)₅

La microscopul electronic, pentamerul IgM are aspect de stea cu 5 brațe, dispuse în jurul discului central. Fiecare braț are forma literei Y. Brațele pot lua poziții diferite, ceea ce denotă existența unei zone mobile pentru fiecare subunitate. Fiecare unitate monomerică este mobilă la nivelul articulației în discul central, astfel că după legarea cu epitopii de pe o suprafață membranară, IgM poate adopta configurația asemănătoare unui crab, iar regiunile multiple Fc devin accesibile lui C1q.

IgM poate să existe în formă hexamerică, de 10-20 de ori mai eficientă în liza mediată de activarea C, decât în varianta pentamerică.

Valența pentamerului este teoretic 10, dar aceasta s-a determinat numai în reacția cu haptenele mici. În reacția cu antigenele complexe, valența scade la 5 sau chiar mai puțin, datorită probabil insuficienței flexibilității a moleculei. Valența IgM este dependentă de natura ligandului.

Funcțiile IgM. IgM este receptorul major de antigen pe suprafața limfocitelor B mature.

IgM seric are funcții aglutinante, fiind de 1000 de ori mai eficient decât IgG în legarea antigenelor particulate. IgM reprezintă 5-10% din cantitatea totală de anticorpi serici, cu valori normale între 84-170 mg la 100 ml de sânge.

IgM activează complementul(C), producând liza antigenului celular și ingestia rapidă a complexelor solubile. De aceea, IgM este foarte eficient în reacția de apărare față de bacteriemii și față de toxine(difterică, tetanică, botulinică, toxina din veninul de șarpe).

IgM este principala opsonină imunoglobulinică a serului.

Afinitatea IgM (care semnifică forța de legare dintre un epitop și un paratop) poate să fie slabă, dar aviditatea globală (energia medie a interacțiunii IgM cu epitopii multipli ai unui antigen) este foarte mare față de antigenele complexe și față de celule, ambele având epitopi repetitivi.

Cea mai mare parte a anticorpilor IgM se sintetizează în stadiul timpuriu al răspunsului imun primar față de un antigen. IgM se sintetizează ca rezultat al activării policlonale, nespecifice, a limfocitelor B, produsă de virusul Epstein-Barr la om sau de LPS la șoarece. Anticorpilor sintetizați după stimularea policlonală a limfocitelor, leagă o varietate de antigene: virusuri, bacterii, protozoare, paraziți și fungi.

În plasmă se găsesc anticorpi “naturali” sau “spontani” a căror sinteză are loc în afara stimulărilor antigenice. Termenul “natural” se folosește pentru a distinge aceste imunoglobuline, de cele care se sintetizează după imunizare. Majoritatea anticorpilor naturali aparțin izotipului IgM. Ei reacționează nu numai cu o diversitate de antigene nonspecific, ci și cu molecule self: cu hormoni (insulina, tiroglobulina), cu constituienți celulari (ADN, miozina, actina, tubulina etc.), cu fragmentul Fc al IgG autolog (FR = factorul reumatoid).

IgM reprezintă forma sub care se găsesc anticorpilor naturali ai grupelor sanguine (aglutininele a și b), precum și anticorpilor față de antigenul somatic O (endotoxina) al bacteriilor Gram negative sau cei detectabili prin reacția Wassermann, după infecția cu *T. pallidum*.

IgM trece greu sau nu trece în lichidele interstițiale și nici prin bariera placentară.

Nivelul seric al IgM de la adult este atins la 10 luni. IgM este izotipul cel mai bine conservat în evoluție, fapt evidențiat prin relativa constanță a secvenței de aminoacizi.

Fig. 21. Structura IgE umană. Molecula este formată din 4 domenii constante și un domeniu variabil. Este indicată poziția punților disulfurice inter- și intracatenare, precum și poziția catenelor oligozaharidice. Clivajul enzimatic al IgE poate elibera fragmentele F(ab)₂, fragmentele Fc și Fc₁.

IgE

Denumirea de IgE vine de la “eritem”, deoarece această clasă de anticorpi este unul din mediatorii reacțiilor vasculare eritematoase.

IgE a fost izolată și caracterizată de Ishizaka (1966), dintr-un mielom producător al acestui izotip. Molecula de IgE are două catene L identice cu catenele L ale celorlalte clase de imunoglobuline și două catene grele H cu specificitate antigenică e, fiecare cu câte 550 de aminoacizi, distribuiți în 5 domenii: 4 domenii în regiunea constantă și unul în regiunea variabilă. Catenele H sunt reunite prin două legături S-S, localizate în domeniul C2.

Conținutul glucidic este de până la 11,7%.

IgE este sintetizată în celule din mucoasa respiratorie, gastrointestinală și în ganglionii regionali.

În sânge, IgE se găsește în concentrații foarte mici (250 ng/ml). Nivelul său caracteristic adultului este atins la 10-15 ani. IgE nu străbate bariera placentară.

Concentrația serică a IgE crește în parazitoze și în stările alergice. În cazurile de astm alergic, concentrația IgE ajunge la 1550 ng/ml.

IgE este o moleculă citotropă: interacționează in vivo prin regiunea Fc, cu receptorii specifici de pe suprafața mastocitelor și bazofilelor, dar și in vitro cu celulele aceleiași specii sau ale speciilor înrudite. Incălzirea serului la 56°C anulează activitatea citotropă a IgE.

Rolul fiziologic principal al IgE pare a fi acela de protecție a situsurilor anatomice expuse traumatismelor și pătrunderii agenților patogeni. IgE recrutează factorii plasmatici și celulele efectoare, stimulând reacția inflamatorie acută.

IgE ar fi unul din efectorii mecanismelor de îndepărtare a paraziților intestinali. Acțiunea sa s-ar exercita prin efectul chimiotactic pozitiv față de eozinofile, în focarul de parazitoză și prin stimularea contracțiilor rapide și prelungite a musculaturii netede. IgE mărește permeabilitatea vasculară și permite anticorpilor serici și celulelor eozinofile să penetreze mucoasa și să participe la reacțiile de apărare. Eozinofilele eliberează conținutul enzimatic al lizosomilor și produc liza parazitului.

IgE este declanșatoare a reacțiilor de hipersensibilitate imediată de tip anafilactic. În reacțiile de hipersensibilitate imediată, mastocitele și bazofilele care leagă IgE se activează. Activarea ar fi rezultatul formării unor punți antigenice între moleculele de IgE adiacente, care leagă un

antigen(alergen) multivalent. Moleculele de IgE conectate prin puntea antigenică generează semnalul activării celulare, a cărei consecință este eliberarea moleculelor vasoactive (histamina, serotonina, ECF, SRSA).

Fig.22. Structura IgD umană. Schema ilustrează poziția punților disulfurice inter- și intracatenare, precum și poziția ipotetică a catenelor oligozaharidice.

IgD

IgD s-a descoperit în 1965 ca o proteină de mielom, cu proprietăți speciale, care nu are specificitate antigenică a IgG, IgA sau IgM, dar precipită cu anticorpii specifici față de catenele L ale imunoglobulinelor și este alcătuită din cele 4 catene. Ulterior IgD s-a identificat în serul uman normal, dar și la toate speciile de mamifere și păsări.

IgD se găsește în sânge, în cantitate foarte mică (0,2% din cantitatea totală de imunoglobuline).

Molecula de IgD este monomeră. Lanțurile L sunt în special de tip I, iar catenele H au specificitate antigenică d. Lanțul H are 4 domenii: 3 în regiunea constantă și unul în regiunea variabilă. Regiunea balama este foarte extinsă și este sensibilă la acțiunea proteazelor.

Funcții. Aproape toată cantitatea de IgD are rol de receptor de antigen, împreună cu IgM, pe suprafața majorității limfocitelor B mature. Moleculele membranare au un domeniu transmembranar și o scurtă extensie citoplasmatică, analogă formei membranare a catenei m. Cele două izotipuri membranare (d și m) au același tip de catenă L, iar situsul lor de legare este identic, adică recunosc același epitop. Nu există molecule hibride m/d, deoarece cele două catene H nu se împerechează. Raportul dintre cele două izotipuri de pe suprafața limfocitelor B este variabil și semnificația funcțională a acestui raport nu se cunoaște.

IgD scade pe suprafața limfocitelor B de memorie și dispare complet pe măsură ce celulele se diferențiază spre plasmocit.

IgD seric are o concentrație de 3-40 mg/ml, fiind produs de un număr mic de plasmocite splenice și tonsilare. Sinteza într-un număr mic de celule și timpul de înjumătățire scurt (de 2,8 zile) explică nivelul seric scăzut al IgD. Numărul mic de plasmocite producătoare de IgD explică raritatea mieloamelor producătoare de IgD. După stimularea antigenică repetată nu se

sintetizează anticorpi ai izotipului IgD. IgD nu are funcție de anticorp efector. După stimularea limfocitelor B care au ca receptor de suprafață molecule de IgD, diferențierea nu urmează o cale din care să rezulte celule angajate în secreția de IgD. La pacienții cu deficit al sintezei de IgA, în glandele lacrimale, în parotide și în glandele nazale, plasmocitele producătoare de IgA sunt înlocuite cu cele producătoare de IgD, iar în mucoasa intestinală, cu cele care sintetizează IgG și IgM. Totuși, IgD nu este o imunoglobulină caracteristică secrețiilor, deoarece în secreții nu este mai concentrată decât în ser.

Fig. 23. Reprezentarea grafică a distribuției cantitative a diferitelor clase de imunoglobuline în umorile interne și externe.

INTERACȚIUNI ANTIGEN-ANTICORP

Reacțiile Ag-Ac sunt consecința proprietății esențiale a imunoglobulinelor, aceea a specificității de legare cu determinantul antigenic care a indus sinteza lor.

Cele mai multe date referitoare la natura interacțiunii s-au obținut în reacția dintre anticorpii specifici față de haptene și epitopul haptenei. Haptenele au avantajul că, teoretic, prezintă un singur epitop.

Reacția Ag-Ac poate fi considerată ca prototip al interacțiunilor macromoleculare, dar se deosebește de interacția enzimă-substrat prin două caracteristici:

- reacțiile Ag-Ac, in vivo, sunt totdeauna reversibile, deoarece anticorpii nu alterează ireversibil antigenul, așa cum o enzimă modifică substratul ei;
- heterogenitatea anticorpilor nu are echivalență la alte categorii de proteine.

Reacțiile Ag-Ac pot fi clasificate, după efectele pe care le produc: reacții primare, secundare și terțiare.

Reacțiile primare semnifică recunoașterea specifică și legarea celor doi reactanți. Reacțiile primare se studiază prin metoda dializei la echilibru, a imunofluorescenței, RIA.

Reacțiile secundare pot să apară *in vitro*, ca o consecință directă, dar nu obligatorie, a interacțiunii primare. Ele se evidențiază în timp prin fenomene de aglutinare sau de precipitare, în funcție de natura antigenului.

Reacțiile terțiare exteriorizează consecințele biologice ale reacțiilor primare *in vivo*. Ele au un caracter complex, deoarece sunt influențate de factorii organismului: de concentrația complementului, de mediatorii eliberați de alte celule (mastocite), de afinitatea receptorilor de antigen. Reacțiile terțiare pot fi protectoare, dacă au ca efect imobilizarea bacteriilor, neutralizarea toxinelor și a virusurilor sau pot avea efecte nocive: șoc anafilactic, anafilaxie locală, hemoliză intravasculară.

Bazele moleculare ale interacțiunii Ag-Ac

Interacțiunile Ag-Ac, *in vivo* sunt totdeauna reversibile. Factorii care condiționează interacțiunea Ag-Ac sunt:

- complementaritatea structurală dintre determinantul antigenic și situsul de combinare al anticorpului. Acesta este factorul exclusiv al specificității reacției. Complementaritatea structurală presupune adaptarea conformațională a celor două grupări reactante și a fost gândită în termeni structurali, pe principiul cheie-broască;
- complementaritatea electrochimică a grupărilor reactante este consecința complementarității structurale și semnifică intrarea în acțiune a unor forțe intermoleculare care stabilizează și consolidează interacțiunea celor două grupări. Formarea legăturilor intermoleculare necesită existența unor grupări atomice suficient de apropiate pe cele două molecule. Distanța dintre ele este invers proporțională gradului de complementaritate.

Deși complementaritatea structurală strictă nu este obligatorie, o potrivire spațială cât mai înaltă este mai favorabilă interacțiunii. Ea se exprimă prin congruența suprafețelor de contact care furnizează forțe de atracție intermoleculară ce stabilizează complexul.

La interacțiunea Ag-Ac participă următoarele tipuri de legături necovalente: legăturile de H, forțele electrostatice, legături van der Waals și legături hidrofobe. Toate sunt forțe nespecifice cu valoare mică și natura lor face ca reacția să fie reversibilă.

Legăturile de H se formează când doi atomi au în comun un nucleu atomic de H (un proton). Protonul comun se găsește între doi atomi de N sau de O sau între unul de N și unul de O. Nucleul de H este legat covalent de unul dintre cei doi atomi (de N sau de O). Legătura de H are energia de legare de 3-7 kcal/mol.

Fig. 24. Forțele intermoleculare implicate în formarea complexului Ag-Ac. Acțiunea acestor forțe necesită un contact strâns între cele două grupări reactante. Legăturile de H rezultă prin formarea unei punți de H între doi atomi apropiați. Forțele electrostatice se datorează atracției grupelor ionice cu sarcini opuse situate la periferia celor două lanțuri proteice. Forțele Van der Waals rezultă prin interacțiunea între diferiți nori electronici, reprezentați sub forma dipolilor oscilanți. Legăturile hidrofobe, care pot contribui cu jumătate din forța de legare Ag-Ac, sunt produse prin asociația grupărilor nepolare și hidrofobe, de unde moleculele de apă sunt excluse. Distanța optimă între grupările reactive variază cu tipul de legătură.

Forțele electrostatice (coulombiene sau ionice) sunt rezultatul atracției dintre atomi sau dintre grupe de atomi cu sarcină electrică opusă, situate pe cele două grupări reactante: de exemplu, între un cation (Na^+) și un anion (Cl^-) sau între COO^- și NH_3^+ . Energia de legare a acestor forțe este semnificativă la distanțe foarte mici (sub 100 Å) dintre grupările reactante. Juxtapunerea exactă a ionilor favorizează acțiunea acestor forțe. Energia de legare este de 5 kcal/mol și variază invers proporțional cu pătratul distanței dintre cele două grupări reactante ($1/d^2$).

Legăturile van der Waals, cele mai slabe forțe de interacțiune, sunt active pe distanțe foarte mici dintre grupările reactante. Energia de legare este de 1-2 kcal/mol. Legăturile van der Waals nu se bazează pe o separare permanentă a sarcinilor electrice, ci pe fluctuații ale acestora, induse de apropierea moleculelor. La o distanță intermoleculară limită se formează câmpuri electrice instantanee, cu efect polarizant asupra moleculelor învecinate. Între atomii suficient de apropiați, apare o forță de atracție reciprocă indusă de sarcina dipol fluctuantă, pe care un dipol o induce în dipolul învecinat. Aceste forțe se mai numesc și forțe de dispersie. Intensitatea lor depinde de distanța dintre grupările implicate și este invers proporțională cu puterea a 7-a a distanței. Valoarea lor este optimă la 1-2 Å.

Legăturile hidrofobe (sau apolare) apar între grupări nepolare (neionizate) în soluții apoase și sunt consecința tendinței de excludere a rețelei ordonate de molecule de apă, dintre molecula de antigen și cea de anticorp. Aceste legături sunt favorizate de aminoacizii cu grupări apolare, care

au tendința de asociere, diminuând numărul moleculelor de apă din vecinătatea lor. Prin eliminarea moleculelor de apă dintre grupările reactante, distanța dintre situsurile active scade foarte mult și crește valoarea forțelor stabilizatoare.

Complementaritatea spațială sau forțele intermoleculare nu sunt, fiecare în parte, suficiente pentru a forma legături stabile. Pentru stabilitatea interacțiunii Ag-Ac sunt necesare ambele condiții. Cu cât energia de legare a reactanților este mai mare, cu atât complexe Ag-Ac sunt mai stabile.

Interacțiunea grupărilor reactante ale antigenului și anticorpului este definită de doi parametri: afinitatea și aviditatea anticorpilor.

Fig.25. Măsurarea afinității anticorpilor prin dializa la echilibru. Interacțiunea Ag-Ac este reversibilă. În interiorul sacului de dializă, haptena este parțial sub formă liberă și parțial legată cu anticorpii, în funcție de afinitatea anticorpilor. Prin membrana sacului de dializă poate difuza numai haptena liberă și concentrația sa externă va egala concentrația haptenei libere din interiorul sacului. Măsurarea concentrației haptenei în sacul de dializă permite calculul cantității de haptena legată de anticorpi. Reînnoirea constantă a tamponului duce la disocierea totală și la pierderea haptenei din sacul de dializă, ceea ce denotă natura reversibilă a legăturii Ag-Ac (după Roitt, 1997).

Afinitatea anticorpilor măsoară forța de legare dintre un determinant antigenic și situsul complementar de legare al unui anticorp specific. Afinitatea este rezultanta forțelor de atracție și de respingere, care mediază interacțiunea celor doi reactanți. Forța acestor interacțiuni se măsoară în reacția dintre un antigen monovalent (a unei haptene) cu anticorpii specifici. O interacțiune cu afinitate înaltă presupune structuri complementare perfecte, în timp ce complementaritatea imperfectă a grupărilor reactante determină o afinitate scăzută, deoarece forțele de atracție sunt active numai pe distanțe foarte mici și sunt diminuate de forțele de respingere.

Metoda de măsurare a afinității anticorpilor este dializa la echilibru. Metoda se bazează pe proprietatea haptenelor mici, monovalente (care nu dau reacții de precipitare cu anticorpii specifici), de a traversa membrana de dializă, impermeabilă pentru anticorpi, ca și pentru complexe haptena-anticorpi.

Soluția concentrată de anticorpi se repartizează într-un sac de dializă și se imersează într-un volum cunoscut de soluție tampon, la pH 7,4, ce conține o concentrație cunoscută a haptenei. Haptena liberă difuzează prin membrană, în compartimentul cu anticorpi și se combină parțial cu aceștia. La echilibru, se măsoară concentrația haptenei libere la exterior, egală cu concentrația haptenei libere din interior. Concentrația totală a haptenei în sacul de dializă este mai mare, deoarece o proporție a moleculelor sale este legată de anticorpi.

Diferența dintre concentrația inițială și cea finală a haptenei, în compartimentul exterior, măsoară afinitatea ei de legare cu anticorpii specifici, în condițiile unui exces de molecule haptene, care favorizează disocierea complexelor antigen-anticorp.

Aviditatea este un parametru al interacțiunii Ag-Ac, care rezultă din multivalența antigenului. Cele mai multe antigene posedă mai mult decât un determinant antigenic. De exemplu, celulele bacteriene sau virionii, dar și polizaharidele, au pe suprafață un număr mare de determinanți antigenici repetitivi. Antigenele proteice au totdeauna determinanți antigenici multipli, dar diferiți.

Antigenele multivalente leagă un număr echivalent de molecule de anticorpi. Energia totală de legare a epitopilor multipli ai unui antigen, cu situsurile anticorpilor specifici este mult superioară comparativ cu energia separată a fiecărei interacțiuni dintre situsul de combinare și epitop. Aviditatea caracterizează energia medie de legare a unui antigen multivalent cu anticorpii specifici și măsoară forța rezultantă a afinității dintre epitopii multipli ai unui antigen și paratopii complementari. Complexele Ag-Ac formate de antigenele multivalente sunt stabile, disocierea lor fiind dificilă, deoarece este necesară ruperea tuturor legăturilor existente.

Afinitatea furnizează date cu privire la natura fizico-chimică a reacției Ag-Ac, iar aviditatea este semnificativă pentru antigenele naturale multivalente.

Afinitatea și aviditatea condiționează proprietățile fiziologice ale anticorpilor. Cei cu afinitate mare sunt mai eficienți în reacțiile biologice: în protecția antibacteriană și antivirală, în reacția de precipitare in vitro.

Complexele Ag-Ac formate de anticorpi cu afinitate mică, persistă în circulație și se depun pe membrana bazală a glomerulilor renali. Complexele formate de anticorpii cu afinitate mare se elimină rapid din circulație, fără efecte defavorabile asupra funcției renale.

Interacțiunea Ag-Ac este caracterizată permanent prin formarea și anularea diferitelor tipuri de legături intermoleculare. In vivo, probabil toate reacțiile Ag-Ac sunt reversibile, dar reacțiile secundare, in vitro (aglutinarea, precipitarea), în condițiile echilibrului reactanților, sunt ireversibile.

BAZELE MOLECULARE ALE REACȚIILOR IMUNE ÎNCRUCIȘATE

Trăsătura dominantă a reacțiilor Ag-Ac este specificitatea, derivată din însăși caracterul răspunsului imun. In general, anticorpii reacționează numai cu antigenul homolog, adică antigenul inductor al sintezei lor, dar există și excepții, când anticorpii unui ser imun reacționează și cu antigene heterologe, adică altele decât cel folosit la imunizare, dar înrudite chimic cu acesta.

Molecula de imunoglobulină, cu o structură tridimensională unică, poate să lege un număr de determinanți antigenici diferiți, similari ca structură chimică cu antigenul inductor sau cu o structură chimică distinctă, dacă epitopul său se potrivește spațial, cel puțin cu o zonă limitată a situsului de combinare al anticorpului.

Energia interacțiunii anticorpului cu antigenele heterologe este totdeauna mai mică. Posibilitatea ca o moleculă de anticorp să interacționeze cu antigene heterologe stă la baza multispecificității imunoglobulinelor sub aspect molecular și a reacțiilor încrucișate sub aspect serologic.

Din punct de vedere molecular, posibilitatea legării unor epitopi diferiți, cu un anticorp unic în ceea ce privește situsul său de combinare, se explică prin faptul că la nivelul subunităților sale structurale, se leagă epitopi diferiți, cu dimensiuni mai mici și configurație complementară acestora.

Capacitatea unui situs de combinare al unei molecule de anticorp, de a lega două antigene diferite, corespunde reactivității serologice încrucișate adevărate. Legarea epitopilor heterologi se face totdeauna cu afinitate mai mică. Pentru antigenele proteice, reactivitatea încrucișată este determinată de existența unor epitopi asemănători din punct de vedere spațial, cu mici diferențe

ale secvenței de aminoacizi, care induc ușoare modificări ale epitopilor. Esența reactivității încrucișate adevărate este că situsul moleculei de anticorp leagă epitopi diferiți.

O altă cauză de ordin molecular a reacțiilor încrucișate o constituie heterogenitatea configurației spațiale a situsului de combinare al moleculelor de anticorpi ale unui ser imun. Heterogenitatea anticorpilor este consecința faptului că nu există nici un antigen care să aibă un singur epitop. Cea mai simplă haptenă poate induce sinteza câtorva specificități de combinare a anticorpilor. Heterogenitatea specificității de combinare a anticorpilor unui ser imun, mărește șansa unei reacții cu antigene heterologe.

Din punct de vedere serologic, capacitatea anticorpilor unui ser imun, cu diferite specificități de legare, de a reacționa imunologic cu antigene heterologe se numește reactivitate încrucișată de tip II și reflectă capacitatea unei subpopulații a anticorpilor serici de a lega un antigen heterolog.

Exemple de reacții imune încrucișate

Reacțiile imune încrucișate au fost inițial detectate pentru serurile imune față de celulele bacteriene, datorită complexității antigenice a acestora. Orice celulă bacteriană conține un număr mare de antigene distincte (flagelare, somatice, capsulare, piliare, fimbriale, etc.). Serul imun specific conține anticorpi (în diferite proporții) față de toate categoriile de antigene celulare, unele fiind comune mai multor linii bacteriene.

La rândul lor, moleculele mari conțin numeroși determinanți antigenici, unii dintre ei putând fi comuni moleculelor omologe ale diferitelor specii.

Reacțiile încrucișate sunt mai frecvente pentru antigenele care au epitopi de natură glucidică, deoarece glucidele realizează polimeri cu configurații spațiale limitate ca diversitate.

Antigenele heterofile de tip Forssman, de natură polizaharidică, cu o largă distribuție în lumea vie (om, animale, plante, microorganisme), se caracterizează prin capacitatea lor de a reacționa cu un ser imun specific față de unul din antigenele grupului.

Antigenele proteice din surse taxonomice înrudite, dau frecvent reacții încrucișate. De exemplu, antiserul față de albumina de ou de găină, precipită albumina din oul de rață; albumina serică

bovină și cea equină sau fibrinogenul uman și cel bovin reacționează încrucișat cu serul imun obținut față de una din aceste proteine. Anticorpii anti-Hbg de cal, sintetizați de iepure, reacționează nu numai cu antigenul specific, dar și cu Hbg a unor specii înrudite: zebra, vaca, porcul, însă reacționează foarte puțin cu Hbg de rozătoare, de păsări, de amfibieni.

Reacția Ag-Ac a fost un instrument util pentru determinarea diferențelor structurale dintre proteinele omologe, care constau în secvența aminoacizilor. Cu cât două specii de organisme sunt mai apropiate filogenetic, cu atât proteinele lor omologe sunt mai asemănătoare și dau reacții încrucișate mai intense.

Capacitatea antigenelor distincte, dar înrudite chimic, de a induce sinteza anticorpilor care reacționează încrucișat, a creat complicații în tratamentul bolnavilor cu diabet insulino-dependent. Insulina de origine animală (porcină, bovină, ovină), asemănătoare cu cea umană, a determinat la unii pacienți aflați sub tratament de lungă durată, sinteza anticorpilor anti-insulină, datorită micilor deosebiri ale secvenței aminoacizilor din pozițiile 8, 9, 10. Anticorpii specifici față de insulina unei specii, reacționează cu insulina celorlalte specii.

8 9

10

bovină	Ala	Ser	Val	
Insulina	oaie	Ala	Gly	Val
cal	Thr	Gly	Ileu	
porc	Thr	Ser	Ileu	

Altă complicație a derivat din utilizarea preparatelor de insulină, contaminate cu proinsulină. Insulina este sintetizată în celulele B ale insulelor Langerhans, ca proinsulină, care se deosebește de proinsulină printr-o secvență de 20 de aminoacizi la capătul N. După scindarea acestei secvențe rămâne proinsulina, la care aminoacidul 1 din catena A și aminoacidul 30 din catena B, sunt legați prin catena C (33 aminoacizi). Peptidul C are rol în formarea punților S-S între catenele A (21 aminoacizi) și B (30 aminoacizi).

Injectarea preparatelor de proinsulină determină formarea autoanticorpilor anti-insulină. Eliberarea proinsulinei în organism prin liza celulelor insulare B are același efect.

Reacțiile imune încrucișate reciproce sunt frecvente, dar nu obligatorii. De exemplu, serul imun de iepure anti-albumină serică bovină precipită ovalbumina, dar reacția reciprocă nu are loc.

Reacții încrucișate între antigene microbiene și tisulare. Serul imun anti-polizaharid capsular de *Str. pneumoniae* aglutinează eritrocitele umane de grup A (a căror specificitate antigenică este conferită de N-acetil-galactozamină), iar serul imun anti *E. coli* aglutinează eritrocitele umane de grup B (a căror specificitate antigenică este conferită de galactoză).

Serurile imune de la pacienții cu maladii infecțioase reacționează cu antigenul microbial omolog, dar uneori, și cu antigene ale gazdei. O astfel de reacție este foarte interesantă, deoarece poate sta la originea intoleranței față de self, după un proces infecțios. Un exemplu este cazul anticorpilor ce apar la pacienții infectați cu *T. pallidum*, care se combină cu cardiolipina. Anticorpi reactivi față de cardiolipină se găsesc de asemenea, în serul pacienților infectați cu *M. leprae* și la cei cu lupus eritematos sistemic. Cardiolipina liberă în circulație nu este imunogenă, dar devine imunogenă după asocierea cu învelișul extern de *T. pallidum*, ceea ce explică sinteza anticorpilor la cei infectați, dar lipsește în celulele de *M. leprae*.

Reactivitatea încrucișată a stat la baza explicației reacțiilor autoimune care se produc între antigene ale mușchiului cardiac sau antigene valvulare și anticorpii anti-proteină M de *Str. haemolyticus*.

SISTEMUL IMUNITAR

Existența tuturor organismelor vii este condiționată de activitatea unor mecanisme de rezistență și de imunitate, capabile să protejeze individualitatea lor chimică, prin mecanisme de recunoaștere și diferențiere a substanțelor proprii (self) de cele străine (nonself). În mod normal, aceste mecanisme sunt perfect tolerante față de moleculele self, dar se activează și reacționează mai mult sau mai puțin viguros pentru a îndepărta, a neutraliza sau a distruge substanțele nonself.

Mecanismele de rezistență și imunitate sunt prezente pe toată scara evolutivă a organismelor, începând cu bacteriile și se complexează în evoluție.

Celulele bacteriene posedă mecanisme de protecție a individualității genetice, reprezentate de:

- fenomenele de restricție mediate de prezența unor sisteme enzimaticice specifice (enzime de restricție), care recunosc moleculele străine de ADN, le clivează la nivelul unor situsuri specifice, rezultând fragmente mai mici, sensibile la acțiunea exo- și endonucleazelor;
- fenomenele de reparație genetică dependente de activitatea unor sisteme enzimaticice care recunosc modificările ADN induse de mutații sau de lipsa de fidelitate a mecanismelor de replicare, transcriere și traducere genetică, corectându-le fie complet (sistemele error free) sau minimalizând erorile în cazul sistemelor reparatorii predispușe la erori (error prone systems).

La plantele superioare, mijloacele de apărare specifică, aparent sunt absente, dar există o gamă largă de modalități de apărare nespecifică:

- continuitatea și integritatea țesuturilor epidermice, acoperite sau impregnate cu substanțe impermeabile pentru virusuri și microorganisme;
- rezistența fiziologică conferită de conținutul înalt de zaharuri reducătoare, prezența taninurilor, a diferiților acizi organici, a pseudoanticorpilor cu activitate hemaglutinantă în sucurile vegetale.

La protozoare, procesele de recunoaștere asigură selecția hranei, identificarea partenerilor pentru conjugare la parameci, iar la cele parazite, procesele de recunoaștere mediază interacțiunea cu gazda.

MECANISME DE APĂRARE

LA NEVERTEBRATE

Deși nu au sistem limfoid, nevertebratele recunosc și răspund la substanțele nonself, la fel de eficient ca și vertebratele. La ele funcționează o diversitate de mecanisme, unele fiind inductibile. Răspunsul este de scurtă durată și nu are specificitate față de agentul infecțios patogen. Răspunsul imun al nevertebratelor se aseamănă calitativ cu cel înăscut al vertebratelor mediat de celulele fagocitare și de moleculele neimunoglobulinice.

La nevertebrate, apărarea organismului este asigurată de bariere fizico-chimice complexe: secreția mucoasă care acoperă corpul celenteratelor, anelidelor, moluștelor și protocordatelor, omoară potențialii patogeni. Exoscheletul dur al celenteratelor, moluștelor, artropodelor, echinodermelor și protocordatelor, formează o barieră protectoare eficace față de agenții infecțioși. Majoritatea nevertebratelor superioare au sistem circulator cu celule albe, denumite hemocite sau celomocite, în funcție de natura cavității corpului. Lipsesc hematiile.

În mediul intern al nevertebratelor se găsesc fagocite, factori antimicrobieni constitutivi și inductibili cu efect neutralizant și litic, factori de coagulare a macromoleculor străine. Toate nevertebratele, chiar cele care nu au cavități ale corpului (spongieri, anemone, viermi lași), au fagocite, uneori de mai multe tipuri. Ca și la vertebrate, fagocitele sunt efectorii răspunsului inflamator, sintetizează enzime lizosomale și posedă mecanisme citocide dependente de superoxid.

Reacțiile de apărare (repararea tisulară, fagocitoza, reacția de încapsulare) sunt mediate de fagocite și de celulele hemostatice. Ingestia microorganismelor invadatoare este rezultatul acțiunii fagocitelor, iar un număr mare de microorganisme și de metazoare parazite este încapsulat de celulele hemostatice și de tip fagocitar. Endoparazitul care pătrunde în organismul nevertebratelor este fagocitat, sau dacă are dimensiuni prea mari, este încapsulat. Incapsularea este rezultatul unei fagocitoze fruste. Adeseori, endoparazitul încapsulat, este omorât sub acțiunea intermediarilor toxici ai unei cascade enzimatică.

La nevertebrate lipsesc limfocitele și moleculele de imunoglobuline, dar acestea sunt compensate de o varietate de factori umorali de apărare: aglutinine, lizozim, bactericide, enzime lizosomale, factori de imobilizare. La insecte s-au detectat peste 15 tipuri de proteine antibacteriene inductibile în câteva ore după injectarea unui antigen.

Nevertebratele nu au proteinele cascadei complementare, dar viermii, insectele, crustaceii conțin sistemul profenoloxidazei. Componentele acestui sistem sunt activate de o serie de enzime. La capătul cascadei de activare se formează enzima activă fenoloxidaza, cu rol esențial în îndepărtarea substanțelor nonself. Fig.26. Un mecanism posibil de activare a profenoloxidazei la fenoloxidază, la artropode. Activarea este stimulată de leziunile tisulare, de infecția cu microorganisme, de schimbări ale concentrației ionilor de Ca^{2+} și ale valorii pH, care pot duce la coagularea plasmei și generarea factorilor care mediază evenimentele ulterioare ale imunității (după Roitt, 1997).

Fagocitoza este foarte activă și este stimulată de aglutininele și bactericidele cu rol de opsonine. Din punct de vedere funcțional, aglutininele și bactericidele sunt similare anticorpilor. Acestea sunt lectine, cu rolul de a lega componenta glucidică a glicoproteinelor de pe suprafața celulelor nonsell, rezultatul fiind aglutinarea.

Lectinele sunt molecule care au apărut timpuriu în evoluție și sunt ubicvitare: se găsesc la bacterii, plante, nevertebrate și vertebrate. Ele tapetează microorganismele invadatoare și au rolul de a le imobiliza, dar au și rol opsonizant, ușurând fagocitoza. În funcție de specificitatea lor de legare cu glucidele, lectinele sunt foarte diferite.

În corpul gras al insectelor superioare s-au caracterizat circa 100 de peptide antimicrobiene, a căror sinteză rapidă este indusă de infecție. Din punct de vedere structural sunt de două tipuri:

- peptide ciclice, care conțin punți S-S (de exemplu, drosmycina), active față de bacteriile Gram pozitive și față de fungi;
- peptide lineare (cecropine bogate în Gly și Pro), active față de bacteriile Gram negative.

Componentele celulare și humorale cu funcții protectoare mediază reacții de apărare nespecifice (înăscute), fără răspuns accelerat la stimularea antigenică secundară.

ORGANIZAREA SISTEMULUI IMUNITAR

LA VERTEBRATE

La vertebrate, apărarea este asigurată de mecanisme complicate celulare și humorale, de rezistență și imunitate. Funcția esențială a sistemelor de apărare este protecția față de agenții patogeni invadatori. Interacțiunea permanentă cu microorganismele are un rol hotărâtor în dobândirea complexității structurale și funcționale a sistemului imunitar. Dovada o constituie faptul că la animalele germ-free (axenice), numărul limfocitelor B și titrul anticorpilor serici naturali sunt de 5-10 ori mai mici decât la organismele convenționale. Evoluția a generat tipuri celulare specializate, tot mai eficiente funcțional, care neutralizează, sechestrează, omoară sau îndepărtează agenții infecțioși.

La vertebrate, reacțiile de apărare sunt rezultatul acțiunii unor factori humoral nespecifici (complement, substanțe bactericide) și specifici (anticorpi) și a unor populații de celule specializate, cu acțiune nespecifică (fagocite) sau specifică (limfocite).

Din punct de vedere structural, în concepția modernă, sistemul imunitar al organismelor superioare este considerat ca un organ difuz sui-generis, alcătuit dintr-un număr foarte mare de molecule și celule, reunite într-o rețea de interacțiuni complexe, a cărei funcție este asigurarea integrității și individualității structurale a organismului.

În concepția restrictivă a lui N.K. Jerne, sistemul imunitar este reprezentat în exclusivitate de limfocite, iar într-o accepțiune mai largă, pe lângă limfocite, în alcătuirea sistemului imunitar intră o serie de celule accesorii cu rol esențial în declanșarea răspunsului imun: macrofagele și o serie de celule înrudite (celulele Lagerhans din tegument, celulele dendritice și cele interdigitate).

Se apreciază că numărul limfocitelor, la adultul normal, este de 10¹², iar al moleculelor de imunoglobuline, de ordinul a 10²⁰. Impreună, aceste componente formează organul difuz, cu greutatea de circa 910 g (1-2% din greutatea corpului), a cărei existență este adeseori ignorată, datorită caracterului său difuz, în tot organismul. Celulele și moleculele sistemului imunitar sunt prezente în toate țesuturile, dar în unele organe (splină, ganglioni limfatici, plăci Peyer, amigdale, timus), componentele celulare au o densitate maximă.

Sistemul imunitar este unul din cele mai complexe ale organismului. Complexitatea lui derivă din structura de rețea complicată de comunicații intercelulare, din ubicvitata sa în organism și din efectele multiple pe care le determină un număr mic de categorii celulare. Sistemul imunitar este considerat un adevărat "creier mobil".

Din punct de vedere structural și funcțional, sistemul de apărare al organismelor superioare prezintă numeroase dualități:

- existența unui compartiment al rezistenței nespecifice și neadaptative (înăscută) și a unui compartiment cu acțiune specifică și adaptativă (sistemul imunitar);
- prezența a două populații înclinate de limfocite (T și B), care mediază imunitatea celulară și respectiv humorală;

- activitatea limfocitelor este modulată fie stimulator, fie inhibitor, sub acțiunea unor celule și a unor factori humorali;
- existența organelor limfoide centrale (primare) și periferice (secundare);
- existența unui răspuns imun primar și a unui răspuns imun secundar;
- dualitatea structurală (două perechi de catene polipeptidice) și funcțională (bivalența) a moleculei de anticorp;
- comportamentul dublu al moleculei de anticorp: molecula de anticorp recunoaște epitopul specific și la rândul ei este recunoscută de molecule cu rol receptor.

Numărul celulelor sistemului imunitar (cu un ordin de mărime superior neuronilor) și al moleculelor sale nu reflectă fidel potențialul de apărare a organismului, deoarece în cursul răspunsului imun are loc proliferarea și amplificarea numerică a limfocitelor, precum și a potențialului de biosinteză. La aceasta se adaugă o rată înaltă de reînnoire și refacere a rezervelor sale celulare.

La om se produc zilnic un miliard de limfocite ce trec în circulație. Circulând și recirculând prin rețeaua vaselor sanguine și limfatice, celulele și moleculele sistemului imunitar asigură supravegherea organismului, recunoașterea moleculelor și a celulelor nonself, pentru a le elimina.

Limfocitele

Sistemul imunitar este reprezentat de țesuturi derivate din mezoderm, a căror principală componentă celulară este limfocitul. De aici derivă denumirea de sistem limfoid. În ultimul timp se folosește denumirea de "limfon", care semnifică totalitatea organelor limfoide primare și secundare, precum și celulele componente cu funcția de a recunoaște antigenul.

Limfocitele sunt celule care în cursul elaborării răspunsului imun, recunosc specific antigenul și de aceea se mai numesc imunocite. De aici derivă denumirea de sistem imunocitar, echivalentă celei de sistem limfoid. Toate celulele acestui sistem poartă pe suprafața lor, molecule cu rol receptor, capabile să recunoască specific determinanții antigenici străini.

Sistemul imunitar funcționează pe baza interacțiunii dintre semnal (antigen) și receptorul specific limfocitar preformat.

În concepția modernă, limfocitul este celula centrală a sistemului imunitar. Ea nu este celula “cap de serie” așa cum o considerau vechii histologi, ci prezintă o extraordinară capacitate de reactivitate și diferențiere.

Numărul limfocitelor.

Copiii au un număr mai mare de limfocite și de aceea vârsta trebuie considerată ca un parametru fiziologic de variație, în evaluarea numerică a acestor celule. Ele reprezintă 25-33% din totalul leucocitelor, adică circa 2100 celule/mm³ de sânge. Valori mai mici de 1500 limfocite/mm³ semnifică starea de limfocitopenie și cel mai adesea semnifică un deficit numeric al limfocitelor T.

Până în anii 1950, limfocitele erau distinse numai după dimensiuni: mari, mijlocii și mici. Cele mai multe limfocite circulante au dimensiuni mici: 7-10 μm diametru. La microscopul optic, pe frotiul colorat May Grunwald și Giemsa, limfocitele se disting de celelalte după dimensiuni, sunt agranulare și au cel mai mare raport nucleocitoplasmatic. Limfocitele mari au un raport nucleocitoplasmatic mai mic și în citoplasmă se găsesc granulații azurofile. Se numesc limfocite granulare mari (LGL). In vitro, limfocitele sunt neaderente și nu fagocitează.

Astăzi, Imunologia are la bază conceptul unei heterogenități funcționale nelimitate a limfocitelor, care derivă din diversitatea specificității receptorilor suprafeței lor.

Populația de limfocite care are receptori identici de antigen și recunoaște un singur epitop (sau câțiva înrudiți) formează o clonă. Toate celulele unei clone sunt descendente ale unei singure celule-mamă. În consecință, în organism sunt tot atâtea clone de limfocite, câte tipuri de determinanți antigenici există (teoretic) în natură. Corespondența complementarității spațiale dintre receptorii limfocitari de antigene și epitopii antigenici asigură posibilitatea elaborării unui răspuns imun specific, după contactul limfocitelor cu oricare dintre epitopi.

Caracterizarea funcțională a limfocitelor este rezultatul cercetărilor întreprinse după anul 1960. În raport cu organul limfoid primar în care se produce diferențierea și maturarea, Roitt și col. (1966) au împărțit limfocitele în două categorii distincte;

- limfocite T, care se diferențiază și se maturează în timus;
- limfocite B, care se diferențiază și se maturează în bursa lui Fabricius la păsări și în echivalenții ei funcționali, la mamifere.

În funcție de capacitatea lor de a interacționa cu antigenul specific, limfocitele sunt:

- incompetente (imature), cele care nu recunosc antigenul;
- competente (mature), cele care recunosc antigenul specific.

Starea de competență este condiționată de prezența receptorilor prin intermediul cărora antigenele sunt recunoscute. Pe suprafața unei celule pot fi până la 100 000 de molecule receptoare identice, care așteaptă întâlnirea cu substanțele nonselb corespunzătoare.

După ce limfocitul și-a dobândit competența în unul din organele limfoide primare, poate să rămână în repaus, dacă organismul nu a recepționat mesajul antigenic corespunzător. Aceste limfocite sunt neangajate (neinformate sau naive). Cele care au venit în contact cu antigenul specific sunt limfocite angajate (informate). Ele constituie substratul material al memoriei imunologice și ori de câte ori se vor reîntâlni cu antigenul, vor produce un răspuns imun rapid și amplu.

După durata vieții, limfocitele sunt:

- cu viață scurtă (efectoare ale răspunsului imun);

- cu viață lungă (de memorie). Ele recirculă în organism perioade îndelungate (de ordinul anilor). La om, limfocitele de memorie ar supraviețui circa 10 ani, fără să se dividă.

În raport cu funcția pe care o îndeplinesc, se disting următoarele categorii de limfocite:

- efectorie, cele care direct sau indirect, prin molecule efectorie, neutralizează antigenul;
- reglatoare, cele care realizează echilibrul optim al răspunsului imun.

Limfocitele B

Limfocitele B reprezintă 5-15% din totalul limfocitelor circulante și constituie o diviziune funcțională majoră a populației limfocitare. Împreună cu descendenții lor diferențiați (limfoblastul, plasmocitul), limfocitele B sintetizează anticorpi, efectorii răspunsului imun mediat humoral (RIMH).

Limfocitul B imunocompetent (matur, neangajat) sintetizează cantități mici de molecule ale unui izotip de imunoglobuline, care rămân legate de membrana limfocitului, având rol de receptori de antigen, adevărate "antene" de detectare a antigenului specific.

Sub aspectul specificității de legare a antigenului, fiecare organism posedă milioane de clone de limfocite B, adică mici populații celulare identice, descendente din aceeași celulă mamă, care recunosc și leagă același antigen și produc anticorpi cu aceeași configurație spațială a situsului de combinare.

După activare, toți descendenții limfocitului B sintetizează imunoglobuline și le secretă ca anticorpi, cu aceeași specificitate de legare pe care a avut-o receptorul.

Receptorul de antigen al limfocitelor B. Majoritatea limfocitelor B umane din sângele periferic exprimă două izotipuri de imunoglobuline pe suprafața lor: IgM și IgD sau numai IgD. Situsurile de legare ale celor două izotipuri sunt identice. Numai 10% dintre limfocitele B au pe suprafața lor, ca receptor de antigen, molecule de IgG, IgA sau IgE. Cele care au ca receptor molecule de IgA, sunt localizate în țesutul limfoid asociat mucoaselor.

Moleculile receptoare de imunoglobulină sunt inclavate cu capătul

C-terminal în membrană. Intre IgM legat de membrană (IgMm), cu funcția de receptor de antigen și IgM seric (IgMs), sunt două deosebiri majore:

- IgMm conține o secvență C-terminală hidrofobă, prin care se ancorează în membrana limfocitelor mature neangajate, care nu au venit în contact cu antigenul;

- IgMm este monomer, iar IgM seric este pentamer.

Secvența C-terminală a IgMm cuprinde 25 de aminoacizi hidrofobi ce formează domeniul transmembrantar, urmat de o secvență cationică Lys-Val-Lys. Ca la toate proteinele ancorate în membrană, acest domeniu formează un α -helix, cu o lungime suficientă pentru a străbate membrana. Fiind hidrofobă, secvența de aminoacizi are interacțiuni strânse cu lipidele membranei. Secvența cationică se extinde în citoplasmă, măbind gradul de stabilitate a moleculei în membrana celulară.

După stimularea antigenică, sinteza se comută la IgM seric. Trecerea de la IgMm la IgMs este rezultatul unor diferențe ale modului de prelucrare a ARN premesager. Copia de ARN premesager pentru sinteza catenei μ (H) are două situsuri potențiale de clivare și atașare a resturilor de poli-A, ce marchează capătul ARNm. După stimularea antigenică, din ARN premesager sunt clivate secvențele codificatoare ale domeniului C-terminal hidrofob și se sintetizează molecule de IgM fără secvența C-terminală de aminoacizi hidrofobi.

Comutarea IgMm --- IgMs nu modifică lanțul L al moleculei. Cele două forme ale IgM au domenii identice VH și VL, adică au aceeași specificitate de legare a antigenului (au același idiotip).

Limfocitul B are receptori membranari pentru substanțele mitogene, pentru complement (C3b), pentru regiunea Fc a imunoglobulinelor, pentru insulină etc. Receptorul pentru C3b funcționează și ca receptor pentru virusul Epstein-Barr. Limfocitele B neactivate au receptori de mică afinitate pentru IL-2, dar după stimularea antigenică, ele exprimă rapid, receptori pentru IL-2 de înaltă afinitate. Limfocitele B răspund la efectul stimulator al IL-2, prin proliferare rapidă și secreția IgM. Pe suprafața limfocitelor B se găsesc la densitate înaltă, moleculele CMH II.

Limfocitele T

Limfocitele T reprezintă până la 80% din totalul limfocitelor circulante. Valorile normale în sânge, pentru limfocitele T sunt cuprinse între 1620-4320/mm³, între una și 18 luni de viață și între 590-3090/mm³, după 18 luni.

Proporția limfocitelor T se poate determina prin metoda rozetelor cu hematii de berbec sau prin metoda imunofluorescenței cu anticorpi monoclonali față de receptorul de antigen.

Limfocitele T mature exprimă markerul* CD4** sau CD8. Aceste molecule aparțin suprafamiliei imunoglobulinelor. Celulele CD4 au de obicei funcție helper, iar cele ce exprimă markerul CD8 sunt citotoxice.

Limfocitele T îndeplinesc funcții complexe, atât efectoare ale răspunsului imun mediat celular cât și reglatoare, prin intermediul unor factori humorali pe care-i secretă, denumiți limfochine. Limfocitele T realizează următoarele funcții:

• lizează celulele care exprimă molecule nonsel pe suprafața lor;

• reglează răspunsul imun;

• mediază reacțiile de hipersensibilitate întârziată.

Aceste funcții sunt rezultatul heterogenității funcționale și se datorează activării unor subpopulații distincte de limfocite T:

- limfocite T_c (T_{c1}, citotoxice sau citolitice) exprimă pe suprafața lor markerul T8 (CD8);

- limfocite T_h (helper) au pe suprafață markerul CD4. Acestea sunt cele mai numeroase, reprezentând 60-65% din numărul total de limfocite T ale organismului uman;

- limfocite T_s (supresoare), purtătoare ale markerului CD4;

- limfocite TD sau TDH (delayed hypersensitivity) exprimă markerul CD8.

Funcțiile limfocitelor Th se realizează prin intermediul limfochinelor secretate. În funcție de limfochinele pe care le sintetizează, limfocitele Th se clasifică în două subseturi: Th-1 și Th-2.

Celulele Th-1 (Th-c) secretă IFN gama, IL-2 și TNF beta (citochine de tip 1, stimulative ale imunității mediate celular). Citochinele de tip 1 produc următoarele efecte: stimulează reacția de citotoxicitate și inflamatorie asociată cu reacțiile de hipersensibilitate întârziată. În esență, limfocitele Th-1 au rol în edificarea unui răspuns imun mediar celular (RIMC).

Celulele Th-2 (Th-b) secretă citochine de tip 2: IL-4, IL-5, IL-6 și IL-10 (dar nu secretă IL-2) și stimulează activitatea limfocitelor B de memorie. Citochinele tip 2 (IL-4, IL-5) stimulează răspunsul imun humoral față de paraziții extracelulari (stimulează diferențierea limfocitelor B spre plasmocit) și instalarea stărilor alergice prin capacitatea lor de a induce sinteza IgE și de a stimula mastocitele. În esență, limfocitele Th-2 sunt implicate în edificarea răspunsului imun mediat humoral (RIMH). Prin toate aceste efecte, limfocitele Th sunt amplificatoare ale răspunsului imun

Limfocitele CD8 (T citotoxice) reprezintă 25-35% dintre limfocitele T circulante. Funcția lor constă în efectul litic prin contact celular direct asupra celulelor infectate cu virusuri, malignizate sau alogene.

Limfocitele TD sunt mediatore ale reacțiilor de hipersensibilitate întârziată (delayed) de tip tuberculinic. Ele secretă limfochine cu efecte locale asupra macrofagelor și limfocitelor din focarul inflamator.

Limfocitele Ts sunt inhibitoare ale amplitudinii răspunsului imun, după epuizarea antigenului. Ele au rolul de a diminua intensitatea RIMC și RIMH, menținând în limite fiziologice intensitatea reacțiilor imunitare. Se pare că își exercită rolul supresor asupra răspunsului imun, prin inhibarea activității limfocitelor Th, dar au și efect supresor direct asupra limfocitelor T și B efectoare. Limfocitele Ts au rol important în inducerea stării de toleranță față de antigenele exogene, ca și față de moleculele self. Deficiențele funcționale ale limfocitelor Ts creează predispoziții pentru maladiile autoimune.

Distincția funcțională între limfocitele TCD4 și TCD8 nu este totdeauna netă. Unele clone de limfocite TCD4 au proprietăți citotoxice, iar unele clone TCD8, după contactul cu antigenul, proliferază și secretă limfochine, ca și limfocitele TCD4.

Receptorul de antigen al limfocitelor T (RCT)

Deși moleculele de anticorpi au fost printre primele a căror structură chimică s-a identificat, caracterizarea biochimică a receptorului de antigen al celulelor T s-a făcut foarte greu, deoarece nu a existat un echivalent celular T al tumorilor de mielom. Molecula cu rol de receptor de antigen a limfocitelor T s-a identificat recent, după ce a fost posibilă cultivarea liniilor de hibridom de celule T.

Moleculele receptoare de antigen ale limfocitelor T au o largă

variație biochimică, corespunzătoare specificității de legare a spectrului foarte larg de antigene.

Ca și în cazul anticorpilor, pentru receptorul de antigen al celulelor T, se folosește termenul de “idiotip” (Ti), pentru a desemna o moleculă a RCT cu un set unic de epitopi asociați, derivați din configurația sa spațială unică, complementară pentru legarea specifică a unui epitop antigenic.

Pentru izolarea și identificarea receptorului Ti s-au utilizat anticorpi monoclonali (AMC) anti- Ti, care precipită specific moleculele Ti dintr-un amestec complex de proteine membranare. Examinarea peptidelor în imunoprecipitatele diferitelor clone de celule T, prin metoda electroforezei în SDS-poliacrilamidă, a evidențiat că RCT este un heterodimer și constă dintr-o glicoproteină de 80-90 kD, care în condiții reducătoare se disociază în două peptide de 40 și respectiv 43 kD. Molecula întreagă constă dintr-o pereche de lanțuri peptidice, similare ca dimensiuni, legate prin punți S-S.

Lanțul α

Lanțul β

Fig. 27. Structura receptorului de antigen al limfocitului T. Molecula este un heterodimer format din lanțurile α și β , care se extind prin membrana celulară și au scurte porțiuni citoplasmatică. Complexul T3 este alcătuit din 4 subunități proteice (γ , δ și 2 ϵ), localizate în dublul strat lipidic și în citoplasmă.

Cele două peptide sunt distincte și s-au notat α și β . Lanțul α are 248 aminoacizi, cu punctul izoelectric la pH = 5,0-5,5. Lanțul β are 282 aminoacizi, iar punctul izoelectric este la pH 6,5-7,0.

Fiecare catenă are 4 domenii: unul variabil ($V \alpha$, respectiv $V \beta$), unul constant ($C \alpha$, respectiv $C \beta$), unul transmembranar și unul intracitoplasmatic. Astfel alcătuită, molecula RCT face parte din suprafamilia moleculelor imunoglobulinice. Prin dimensiuni se aseamănă cu lanțul L al imuno-globulinelor: domeniul variabil al fiecărui lanț are 110 aminoacizi, dar pentru că se ancorează în membrană, se aseamănă cu lanțul H.

Domeniile variabile (α și β) sunt extrem de variabile (ca și regiunile variabile ale celor două catene ale imunoglobulinelor) și participă la formarea situsului de combinare al RCT.

Situsul de combinare al RCT este alcătuit din regiunile hipervariabile sau regiunile determinante de complementaritate $\bar{N}RDC$ (3 ale catenei α și 4 ale catenei β) și este aplatizat, adaptat funcției sale de a lega suprafața aplatizată a moleculelor CMH.

La om, RCT heterodimer este asociat cu molecula T3, o grupare de trei peptide asociate necovalent. Funcția probabilă a lui T3 este aceea de transductor al semnalului de activare, de la Ti la citoplasmă, constituind, prin modificări conformaționale, un canal de trecere a ionilor de Ca^{2+} prin membrană, după ce receptorul a legat epitopul specific.

S-au identificat două tipuri de RCT: Fig. 28.a. Subseturi majore de celule T

Fig. 28.b. Subseturi funcționale de celule T CD4+

Subseturi de limfocite T, în funcție de tipul de RCT (RCT-1, RCT-2). Limfocitele RCT-1 au un repertoriu restrâns de interacțiuni cu antigenul, dar nu manifestă fenomenul restricției CMH. Limfocitele RCT-2 exprimă CD4 sau CD8, care determină recunoașterea antigenului asociat cu moleculele CMH II sau CMH I. Limfocitele TCR-2+ CD4+ sunt divizate pe baza limfochinelor pe care le secretă, în subseturi de celule Th1 (stimulatoare ale IMC) și Th2 (stimulatoare ale IMH) (după Roitt, 1997).

- RCT-2 este heterodimerul format din polipeptidele α și β , legate prin punți S-S, prezent pe suprafața a circa 90% dintre limfocitele T;

- RCT-1 este asemănător structural cu RCT-2, dar constă din polipeptidele γ și δ , cu o altă specificitate antigenică, identificată prin intermediul anticorpilor monoclonali. Se găsește pe suprafața a 0,5-15% dintre limfocitele T circulante umane, dar este mai frecvent pe limfocitele intraepiteliale ale mucoasei intestinale.

Limfocitele T γ/δ exprimă markerul CD3 și recunosc antigenul printr-un mecanism asemănător cu acela al limfocitelor T α/β , adică recunosc epitopii asociați cu moleculele CMH I și II, dar frecvent par să interacționeze cu molecule CMH neclasice, iar specificitatea interacțiunii lor cu epitopii antigenici este limitată. Aceste limfocite pot să recunoască antigene neconvenționale, ca de exemplu, proteinele de șoc termic și antigenele nepeptidice (glucidice).

În general, limfocitele cu RCT-1 (γ/δ) sunt negative pentru markerul CD4 și pentru CD8, deși unele exprimă nivele scăzute ale unuia dintre markeri.

Unele studii sugerează că aceste celule contribuie la răspunsul inițial al gazdei, la diferiți agenți infecțioși: virusuri, bacterii (în special micobacterii), paraziți, dar și la răspunsul anti-tumoral. Ele par să constituie "prima linie de apărare". Ipoteza este în acord cu localizarea lor anatomică, la poarta de intrare în organism, în țesuturile nelimfoide (tegument, intestin), dar și în situsurile inflamatorii. Limfocitele T γ/δ se aglomerează în focarele inflamatoare cronice (membrana sinovială, leziunile asociate cu lupusul eritematos diseminat).

La rumegătoare, 30-80% din totalul limfocitelor T circulante au receptor γ/δ , valorile maxime înregistrându-se la organismele nou-născute. La alte specii, numărul acestor limfocite T este mic. Abundența lor numerică la rumegătoare este corelată, probabil, cu bacteriemia masivă care însoțește procesul digestiv.

În esență, markerii RCT și CD3 sunt definatorii pentru limfocitele T.

Limfocitele T au un marker distinctiv pe suprafața lor, față de limfocitele B: Thy 1 (CD90). Acest marker poate fi exprimat și pe alte tipuri celulare și lipsește la o mică proporție a limfocitelor T.

Celulele NK

Celulele NK (natural killer) reprezintă circa 15% din totalul limfocitelor sanguine. Ele derivă din măduva osoasă și au origine comună (același progenitor), ca și celulele T. In vitro, sunt neaderente și nefagocitare, ceea ce le aseamănă cu limfocitele. Din punct de vedere morfologic, celulele NK sunt mari, granulare (LGL, large granular lymphocytes), având citoplasmă mai bogată decât celelalte limfocite, cu granulații azurofile.

Celulele NK nu au nici unul din receptorii de antigen caracteristici limfocitelor T sau B și de aceea au fost denumite celule "nule".

Celulele NK au pe suprafața lor unii markeri caracteristici limfocitelor: au receptor pentru $Fc \gamma$ de mică afinitate, formează rozete E, au receptor de mică afinitate pentru IL-2, produc IL-2 și IFN γ . Au și receptori caracteristici seriei mieloide.

În dezvoltarea lor, celulele NK nu sunt dependente de timus.

Celulele NK au viață scurtă și reprezintă o linie importantă, primordială în evoluție, cu rol esențial în mecanismele de apărare înăscută a organismului: sunt active în respingerea grefelor și a celulelor modificate sub raport antigenic. Funcția celulelor NK este de a recunoaște și de a liza anumite celule tumorale și celule infectate cu virusuri. Celulele NK au lizat celulele liniilor B limfoblastoide transformate de EBV, deficiente în molecule CMH I, dar nu au mai lizat aceste ținte după transfecția cu genele HLA-B sau HLA-C. Mecanismul recunoașterii celulelor

purtătoare de molecule nonself nu este cunoscut. Se admite că celulele NK recunosc moleculele CMH și se activează când receptorii lor nu întâlnesc moleculele CMH pe suprafața celulelor țintă sau când moleculele CMH au o densitate mai mică decât cea normală. Efectul interacțiunii este liza celulei țintă.

Acțiunea definitivă a celulelor NK este citotoxicitatea. Ele lizează fără restricție CMH, celulele tumorale sau pe cele infectate cu virusuri.

Activitatea celulelor NK este foarte înaltă la șoarecele nud (fără timus) sau la șoarecii timectomizați neonatal. După activare, celulele NK eliberează IFN γ .

Cel mai studiat receptor membranal al celulelor NK este receptorul de mică afinitate pentru Fc al IgG (CD16).

O subpopulație distinctă a celulelor NK o reprezintă celulele K (killer). Ele sunt tot LGL, dar spre deosebire de celulele NK, exprimă receptorul de mare afinitate pentru Fc γ . Acțiunea lor principală este citotoxicitatea mediată de anticorpi (ADCC), față de celulele modificate antigenic.

In vitro, limfocitele T din sânge, sub acțiunea stimulatorie a unor citochine (IL-2, IFN α) diferențiază o subpopulație, care au fost denumite LAK (lymphokine activated killers). In vitro, prin adăugarea IL-2 și a antigenului tumoral, devin citotoxice față de celulele tumorale omologe.

* Markerii de suprafață ai limfocitelor T umane s-au identificat cu dificultate, datorită naturii outbred a populației. S-au notat cu literele TCD, urmate de o cifră, în ordinea descoperirii: TCD1, TCD2 etc. Anticorpii monoclonali au constituit instrumentul esențial de lucru. Cel mai cunoscut este markerul TCD4, deoarece funcționează ca receptor pentru HIV. Este un glicopeptid cu o regiune extracelulară formată din 4 domenii, un domeniu transmembranar și unul citoplasmatic, iar CD8 este dimeric și prezintă un domeniul asemănător cu domeniul variabil al moleculei de imunoglobulină.

** CD (cluster designation) se referă la grupele (cluster) de anticorpi monoclonali utilizați pentru identificarea subpopulațiilor de limfocite. Fiecare grupă de AMC are specificitate față de un anumit marker celular.

BAZELE GENETICE ALE DIVERSITĂȚII RECEPTORILOR DE ANTIGEN

Funcția imunitară se bazează pe interacțiunea specifică dintre receptorii limfocitari și epitopii nonself. Diversitatea specificității de legare a receptorilor limfocitari este paradigma pe care se clădește întregul edificiu al științei imunologice. Diversitatea receptorilor caracterizează ambele populații de limfocite.

Limfocitele B ale vertebratelor sintetizează anticorpi cu o mare diversitate a specificității situsului de combinare (108- 109 tipuri diferite, care leagă un număr echivalent de epitopi antigenici diferiți). Înțelegerea determinismului genetic al acestei uriașe diversități a întârziat mult față de alte aspecte ale funcționalității sistemului imunitar.

Prima teorie modernă cu privire la specificitatea anticorpilor a fost teoria “lanțurilor laterale” a lui Ehrlich (1900). Lanțurile laterale sunt receptori preformați, inserați în membrana limfocitelor

Legarea antigenului pe receptorul membranelor al limfocitului va stimula celula să sintetizeze molecule identice cu receptorul de antigen, care trec în ser ca anticorpi. Această teorie a anticipat teoria selecției clonale, precum și ideea că sistemul imunitar poate genera receptori cu mult înainte de a veni în contact cu antigenul. Receptorii limfocitari sunt preformați, au o structură asemănătoare cu aceea a anticorpilor serici și rămân în așteptarea întâlnirii cu antigenul specific. Ehrlich consideră, însă, în mod eronat, că o celulă posedă receptori pentru mai multe antigene. Teoria a fost abandonată când Landsteiner a arătat că sinteza anticorpilor este indusă și de antigenele artificiale (conjugate haptentă-proteină), neîntâlnite niciodată în natură și astfel specificitatea anticorpilor a fost explicată prin teoriile instructive (Breinl și Haurovitz, 1930). Aceste teorii atribuiă un rol important grupărilor determinante de specificitate. Epitopii ar pătrunde în celula care sintetizează anticorpi și ar acționa ca matriță, imprimând polipeptidelor în curs de sinteză, o configurație spațială complementară.

Teoriile instructive au fost infirmate după evidențierea diversității enorme a moleculelor de anticorpi, care se sintetizează după stimularea cu un antigen, precum și de faptul că o celulă B și descendenții ei produc anticorpi cu o specificitate unică față de un epitop.

În 1959, Mc Farlane Burnet a formulat teoria selecției clonale, care postulează că sistemul imunitar este reprezentat de un număr uriaș de clone de limfocite, corespunzător unui număr echivalent de epitopi. Clona este o populație de celule identice din punct de vedere genetic, descendente ale unei singure celule de origine. Diversitatea clonelor este reflectată în specificitatea fiecăreia de a recunoaște un anumit epitop și este generată în timpul diferențierii celulelor limfoide din celulele de origine. Toate celulele unei clone poartă pe suprafața lor, molecule identice de imunoglobulină, care funcționează ca receptori specifici de antigen. După interacțiunea cu antigenul, molecula receptor va fi sintetizată și secretată, cu o rată foarte înaltă, ca anticorp. Epitopii antigenici selecționează din această colecție imensă, clonele de limfocite care au receptori complementari din punctul de vedere al configurației spațiale și determină proliferarea și diferențierea lor în celule producătoare de anticorpi. Toate celulele clonei au aceeași specificitate pentru antigen. Fig. 29. Ilustrarea schematică a teoriei selecției clonale. Fiecare clonă de limfocite are pe suprafața sa, un receptor de antigen, specific pentru un epitop antigenic complementar. La pătrunderea în organism, antigenul selectează acele clone care pot să lege specific epitopii complementari. Celulele selectate sunt stimulate să se dividă și să se diferențieze în celule efectoare mature și celule de memorie.

Sistemul imunitar funcționează pe principiul “gata făcut”, adică receptorul de antigen preexistă pe suprafața limfocitelor, astfel încât problema diversității anticorpilor trebuie explicată pe baze genetice.

Teoria selecției clonale este argumentată de câteva dovezi experimentale:

- limfocitele imunocompetente au specificități distincte pentru diverse antigene: de exemplu, numai 1-2% dintre limfocite leagă albumina serică bovină. Numărul celulelor care leagă un anumit antigen crește mult după imunizarea cu antigenul respectiv;
- limfocitele unei clone au receptori și produc anticorpi cu o singură specificitate, față de un singur epitop. Faptul că inițial se sintetizează IgM și ulterior IgG, nu este un contraargument, deoarece anticorpii celor două clase au regiuni variabile identice și au aceeași specificitate de legare cu epitopul;
- clona de celule cu specificitate de legare a unui epitop se poate elimina selectiv prin pasajul celulelor pe o coloană de afinitate, cu bile de sticlă tapetate cu antigenul specific. Celulele care au receptori pentru antigen aderă de coloană, iar celelalte trec, ceea ce denotă că limfocitele sunt

angajate să răspundă la un antigen, înainte de a se întâlni cu el, prin receptorii lor specifici preformați;

- incubarea limfocitelor cu un antigen puternic radiomarcant, produce moartea numai a celulelor care îl leagă specific.

Mecanismele genetice ale diversității imunoglobulinelor

Susținută de dovezi experimentale, teoria selecției clonale este acceptată. Se pune problema modalității de codificare genetică a sintezei unei mari diversități moleculare de anticorpi. Potențialului imens al unui organism de a sintetiza milioane de tipuri de molecule diferite de anticorpi, ar trebui să-i corespundă un număr egal de gene codificatoare. Generarea potențialului uriaș de diversitate genetică s-a explicat în diferite moduri:

- teoria liniei germinale consideră că genele care codifică sinteza domeniilor VL și VH se găsesc în celula germinală. În genomul fiecărui individ s-ar găsi un număr imens de cistroni care s-ar transmite ereditar. Pentru cele 108 și 109 specificități de legare ale moleculelor de anticorpi, ar exista tot atâtea gene codificatoare. Teoria nu explică modalitățile de păstrare în cursul evoluției, a acestui număr uriaș de gene și nici posibilitatea sintezei anticorpilor specifici față de antigenele sintetice;

- teoria recombinărilor somatice presupune existența unui număr limitat de cistroni codificatori ai domeniilor variabile ale moleculei de anticorp, în linia germinală. Diversificarea specificității de combinare a anticorpilor s-ar realiza prin recombinări somatice între un număr limitat de cistroni, asociate cu diviziunile celulare în cursul diferențierii limfocitelor;

- teoria mutațiilor somatice consideră că repertoriul genelor pentru sinteza imunoglobulinelor este construit de novo în cursul dezvoltării sistemului imunitar, pornind de la un număr mic de gene ale liniei germinale, prin mutații la nivelul celulelor somatice. Selecția pozitivă (păstrarea viabilității clonelor limfoide cu receptori pentru antigenele exogene) s-ar face sub influența antigenelor care selecționează și stimulează proliferarea celulelor mutante, care sintetizează anticorpi cu situs de combinare complementar. Teoria presupune persistența în organism, pentru perioade lungi de timp, a unui număr mare de antigene, ceea ce este improbabil;

- teoriile mixte presupun existența unui număr limitat de cistroni codificatori ai domeniului variabil (V), în celulele liniei germinale. Diversificarea imensă a potențialului de codificare și sinteză s-ar face prin recombinări somatice între acești cistroni, în timpul diviziunilor celulare, declanșate de recunoașterea și stimularea antigenică.

Ipoteza lui Dreyer și Bennett (1965) explică diversitatea anticorpilor prin însăși particularitățile lor de structură. Existența unei singure gene codificatoare pentru regiunile V și C ale moleculei de imunoglobulină este improbabilă, deoarece nu este posibil ca o genă să sufere atâtea variații corespunzătoare capătului NH₂ al catenei polipeptidice și să rămână constantă pentru secvența codificatoare a capătului COOH. Nu se cunoaște nici o situație în care segmentul ADN corespunzător regiunii constante a unei proteine să fi rămas nemodificat, iar cel codicator al regiunii variabile să fie expus fenomenelor mutaționale cu o frecvență atât de mare.

Singura modalitate de a explica variabilitatea regiunii N-terminale și constanța regiunii C-terminale este acceptarea ideii că molecula de imunoglobulină este codificată de mai multe gene distincte în cel puțin două - una pentru regiunea variabilă și una pentru regiunea constantă.

În acord cu această ipoteză, în celulele limfoide embrionare ar exista câteva sute de gene codificatoare ale regiunii variabile și o genă pentru regiunea constantă, care s-ar asocia la întâmplare în cursul diferențierii limfocitelor B. O moleculă funcțională de imunoglobulină s-ar sintetiza ori de câte ori recombinarea genetică aduce în limfocitul precursor al plasmocitului, o genă V în apropierea genei C corespunzătoare. Astfel s-ar forma cuplurile de gene funcționale VL-CL și VH-CH, codificatoare ale celor două catene.

Ipoteza venea în contradicție cu câteva dogme ale biologiei celulare și moleculare:

- dogma conform căreia, o genă codifică un polipeptid;
- dogma constanței genomului pe toată perioada de dezvoltare a unui organism;
- dogma imposibilității rearanjării genelor într-o celulă somatică;
- dogma continuității informației genetice. Din aceste motive, ipoteza nu a fost acceptată.

Teoria genelor multiple codificatoare ale unei molecule de imunoglobulină a fost confirmată ulterior prin tehnica cineticii de hibridare (Leder și Swan, 1971). Autorii au arătat că atât în celulele limfoide embrionare cât și în celulele tumorii de mielom, regiunea constantă a catenelor H și L ale moleculei de imunoglobulină este codificată de o singură genă, iar regiunea variabilă este codificată de mai multe gene.

Prin tehnica hibridării, s-a comparat distribuția genelor codificatoare în ADN din două surse:

- dintr-o tumoră de mielom de șoarece, ce secretă un lanț k;
- din celulele limfoide embrionare (imature) de șoarece, ce nu sintetizează imunoglobuline.

ADN din ambele surse a fost clivat cu enzime de restricție, în fragmente separate ulterior prin electroforeză.

Fragmentele codificatoare ale lanțului k au fost identificate prin hibridare cu ADNc, obținut prin transcrierea inversă a ARNm al lanțului k. S-au folosit două tipuri de ARNm ale lanțului k:

- un fragment pentru lanțul Lk întreg (cu domeniile Vk și Ck);
- un fragment corespunzător jumătății 3' a ARNm, codificator al domeniului Ck;

Pentru ambele categorii de molecule de ARNm s-au obținut fragmentele de ADNc corespunzătoare.

În proba cu ADN obținut din limfocitele embrionare, ADNc al fragmentului Ck a hibridat cu un fragment de ADN ce conține gena Ck, iar ADNc pentru întregul lanț k a hibridat atât cu fragmentul genei Ck, cât și cu un alt fragment de ADN rezultat prin clivarea cu enzimele de restricție, care probabil conține gena Vk.

În concluzie, în celulele limfoide embrionare, cele două gene codificatoare ale catenei k se găsesc situate la distanță, în fragmente de restricție diferite.

În proba cu ADN obținut din celulele limfoide de mielom, ambele probe de ADNc, corespunzătoare domeniului Ck și lanțului întreg Vk au hibridat într-un singur fragment.

În concluzie, în limfocitele mature, cele două fragmente codificatoare ale lanțului k se găsesc în vecinătate imediată, în același fragment de restricție.

În esență, genele funcționale pentru sinteza imunoglobulinelor în celulele mature sunt rezultatul rearanjării prin procese de transpoziție, a unor segmente genice mici, moștenite în ADN al liniei germinale. Rearanjările au loc în limfocite, pe măsură ce ele se diferențiază din celule imature precursore, în limfocite B producătoare de anticorpi.

Singurul mecanism care aduce cele două gene într-un ansamblu funcțional este reunirea prin transpoziție și recombinarea genetică a celor două secvențe de ADN pentru a forma o genă activă L și o genă activă H.

Polipeptidele L și H sunt codificate de trei grupuri de gene nelincate:

- grupul genelor H, pentru sinteza catenelor γ , μ , α , δ , ϵ (situat pe cromosomul 14 la om și 12 la șoarece);
- grupul genelor k, codificatoare ale lanțului Lk (situat pe cromosomul 2 și respectiv 6);
- grupul genelor λ pentru sinteza catenei L λ (situat pe cromosomul 22 și respectiv 6).

Fiecare din aceste familii cuprinde un număr controversat de gene codificatoare ale regiunii variabile, situate separat, la distanță, de gena codificatoare a regiunii constante a moleculei de imunoglobulină.

Genele pentru catena L a imunoglobulinei de șoarece s-au studiat prin clonarea fragmentelor de ADN într-un fag ce se replică în celulele de E. coli. S-a obținut astfel o cantitate suficient de mare de ADN al genelor codificatoare pentru catenele Lk și L λ , atât din limfocitele embrionare, cât și din celulele limfoide mature de mielom, producătoare de imunoglobuline.

Gena codificatoare a lanțului λ este formată din 4 segmente separate, ordinea lor în direcția 5' --- 3' fiind $L\lambda$, $V\lambda$, $J\lambda$ și $C\lambda$.

Segmentul genic $L\lambda$ codifică 15-20 de aminoacizi ai secvenței leader de la extremitatea N-terminală a catenei polipeptidice. Această secvență este clivată pe măsură ce lanțul străbate membrana reticulului endoplasmic și lipsește din molecula de imunoglobulină matură

Segmentul genic $V\lambda$ codifică cea mai mare parte a regiunii variabile a lanțului λ , specificând legarea aminoacizilor de la poziția 1 la 97.

Segmentul genic $J\lambda$ (J , joining = legare) codifică restul regiunii variabile, adică aminoacizii între pozițiile 98-110.

Segmentul genic $C\lambda$ codifică secvența constantă a catenei L , între pozițiile 111-214.

Familia de gene codificatoare ale catenei L_k este organizată asemănător cu a genelor $L\lambda$: secvențe leader L_k , așezate în tandem cu cele circa 250 de segmente genice V_k , 5 segmente genice J_k strâns legate între ele (din care unul este defectiv) și la o distanță de 1000 pb se găsește un singur segment genic C_k .

Genele pentru catena H a imunoglobulinelor au o organizare asemănătoare celei a genelor catenei L . Segmentele genice codificatoare ale catenei H sunt mai numeroase și au o organizare mai complexă, deoarece conțin în plus secvențe codificatoare D (diversity), intercalate între secvențele VH și JH . Cele circa 12 secvențe genice D codifică fiecare 5-15 aminoacizi și amplifică diversitatea biochimică a anticorpilor. Ele conferă cea mai mare variație biochimică a catenei H .

Secvențele genice VH par a fi în număr de câteva sute. Fiecare segment VH este asociat cu segmentul LH , codificator al secvenței leader. La șoarece sunt 200-300 de segmente genice VH , 10-20 segmente D , 4 gene JH și 10 gene CH , iar la om sunt circa 100 segmente genice VH (din care circa jumătate sunt funcționale), circa 30 de gene D și 9 gene J , din care 6 sunt funcționale. Genele VH sunt diseminate în 4 aglomerări.

Genele CH, codificatoare ale regiunii constante ale claselor și subclaselor de catene H, se găsesc în ordinea: μ , δ , γ_3 , γ_1 , ϵ , θ (nefuncțională), α_1 , γ_2 , γ_4 , ϵ , α_4

Fiecare segment genic CH conține mai mulți exoni. Fiecare exon codifică un domeniu structural al moleculei de imunoglobulină.

Asamblarea genei active pentru catena L. Pentru a rezulta o genă funcțională Lk, unul din cele circa 250 segmente genice V_k se unește cu unul din cele 4 segmente genice funcționale J_k, printr-un proces de recombinare probabilistică. Împreună cu gena C_k, se formează ansamblul VJC, codificator al catenei L_k, transcris ulterior în ARN premesager. Prin procesul de clivare și înădire, intronii sunt eliminați și rezultă ARNm pentru catena L_k. Se sintetizează lanțul polipeptidic, iar secvența leader este clivată în cursul transferului prin membrana reticulului endoplasmic. Rearanjarea funcțională a genei pentru catena L, stopează rearanjarea genelor ce codifică același izotip (fenomenul excluderii alelice). Fig. 30. Recombinarea genelor umane codificatoare ale catenei L_k a imunoglobulinelor. Gena funcțională în limfocitul B matur, rezultă prin recombinarea uneia din numeroasele gene V, cu una din cele 4 gene J funcționale și gena C_k. Recombinarea poate avea loc între oricare din gene ilustrează aranjarea genică între V₂ și J₄ și C_k.

Asamblarea genei active pentru catena H este similară asamblării genei active pentru catena L, dar mai complexă, deoarece implică recombinarea a trei regiuni genice distincte ale domeniului variabil: V_H, D și J_H. Inițial s-ar realiza legarea segmentelor genice D și J_H, urmată de transpoziția uneia din genele V_H în vecinătatea complexului D-J_H, pe unul din cromosomii celulei pre-B. Rearanjările sunt posibile datorită secvențelor de recunoaștere ale genelor V, D, J.

De cele mai multe ori, rearanjările genice au loc intracromosomal și foarte rar intercromosomal. Dacă rearanjarea este nefuncțională, are loc rearanjarea genelor în celălalt cromosom pereche. În general, rearanjarea are loc la situsul k , iar dacă rearanjarea în cei doi cromosomi este neproductivă, este inițiată rearanjarea la situsul λ .

La complexul V_H-D-J_H este translocată una din genele CH, care codifică clasa și subclasa catenei H. Fig. 31. Modelul organizării genei umane codificatoare a catenei H. Genele regiunii V_H sunt multiple (50-300), fiecare cu secvența leader. Reunirea segmentului genic D cu gena J_H precede legarea genei V de perechea DJ_H. Intronul genei leader (L) este îndepărtat prin clivarea și reunirea exonilor ARN. Reunirea alternativă poate genera imunoglobulina de membrană (m) sau secretată (s). Cifrele indică numărul aproximativ de gene de segmente genice. Eu = regiune activatoare; Su = regiunea de comutare (switch) (după Potter, 1998).

Imensa diversitate a specificității de legare a anticorpilor este generată prin câteva mecanisme:

1) Diversitatea combinațiilor posibile prin asamblarea întâmplătoare a segmentelor genice. De exemplu, cele circa 250 segmente genice V_k și cele 4 segmente funcționale J_k produc circa 1000 (250×4) combinații V_k-J_k . Pentru gena H există posibilitatea unui număr superior de combinații VH și D și JH : circa 250 segmente VH , 12 segmente D și 4 segmente JH ($250 \times 12 \times 4 = 12000$).

2) Flexibilitatea joncțională a segmentelor genice. În momentul asamblării complexelor VH și D și JH sau VL și JL se produc deleții, aditii, substituții de baze, care modifică circa 3 aminoacizi la fiecare joncțiune. Numărul variantelor biochimice ale moleculelor de imunoglobulină crește de 3 ori pentru lanțul L (1000×3) și de 9 ori pentru catena H ($12\ 000 \times 9 = 100000$).

Aditiile și delețiile care însoțesc legarea segmentelor genice $VL-JL$ trebuie să se facă astfel încât să se păstreze unicul cadru de citire al tripletelor pentru fiecare segment genic V și J. Dacă legarea segmentelor genice introduce sau pierde 1 sau 2 nucleotide (sau alt număr nedivizibil cu 3), secvența în aval nu va fi citită. Aceasta este o rearanjare genică neproductivă.

Segmentele genice D pot fi citite în toate cele 3 cadre de citire, în diferite recombinări V-D-J, ceea ce contribuie semnificativ la diversitatea anticorpilor.

3) Diversitatea combinatorială prin împerecherea întâmplătoare a catenelor H și L. Dacă oricare lanț L poate fi împerecheat cu oricare lanț H, vor rezulta peste 108 variante de imunoglobuline ($100000 H \times 3000 L$).

4) Aditii de nucleotide în regiunea N. Cea mai variabilă regiune a moleculei de anticorp este cea de a III-a secvență determinantă de complementaritate a catenei H (aminoacizii 86-91), locul de unire a segmentelor genice $VH-D$ și $D-JH$. Aici se găsesc scurte secvențe de aminoacizi, foarte variabile, denumite regiuni N. Ele sunt codificate de secvențe de nucleotide adăugate de enzima terminal-deoxinucleotidil-transferază (TdT), activă în celulele limfoide imature, capabilă să adauge nucleotide la capătul 3' al catenei de ADN în curs de sinteză, fără să necesite matriță. Activitatea TdT este minimă la făt și la noul-născut, dar este stimulată postnatal. Enzima acționează preponderent pe genele catenei H, dar regiunile N s-au identificat și la joncțiunile V-J ale catenei L.

5) Mutațiile somatice. Un număr de ordinul milioane de variante ale regiunii V pot să apară prin substituții unice de nucleotide în segmentul genic V. Acesta este fenomenul hipermutației somatice a domeniilor variabile, care este activat mai ales în condițiile imunizării intense, ceea ce explică creșterea afinității anticorpilor pentru epitopul stimulator.

Hipermutația somatică este mecanismul esențial pentru generarea diversității anticorpilor. La om, hipermutația somatică se produce în prezența antigenului și are loc în centrul germinativ din țesutul limfoid periferic.

Rearanjările genice se produc, inițial, la nivelul genei pentru sinteza catenei H. Catena H apare prima în citoplasma limfocitelor. Ulterior are loc rearanjarea genelor ce codifică sinteza catenei L.

Rearanjarea genelor se desfășoară continuu în limfocitele B din măduva osoasă hematogenă. Limfocitele care nu generează o rearanjare genică productivă sunt eliminate, nefiind utile sistemului imunitar. Probabil că pentru o rearanjare productivă sunt necesare, statistic, multe altele neproductive, ceea ce presupune că pentru fiecare limfocit funcțional se pierde un număr mare de celule. Teleonomic însă, risipa este justificată de importanța esențială a funcției imunitare pentru organism.

Mecanismele de recombinare genică permit ca în contextul existenței a mai puțin de 1000 de gene în linia germinală, organismul să producă o mare diversitate de anticorpi (câteva miliarde), ceea ce constituie repertoriul imunoglobulinelor.

Descoperirea mecanismelor genetice de transpoziție, generatoare a uriașei diversități a specificității de combinare a anticorpilor, a deschis o nouă cale a înțelegerii asupra modului în care informația genetică poate să fie diversificată.

Mecanismele de transpoziție sunt active în limfocitele B, dar și în celulele liniei T, în care codifică o diversitate asemănătoare a receptorului de antigen al acestor celule, dar nu au fost identificate pentru alte gene.

Mecanismele genetice ale generării diversității RCTi

Mecanismele genetice generatoare ale diversității specificității de legare a RCTi sunt asemănătoare cu cele care generează diversitatea imunoglobulinelor. Calculele teoretice sugerează că există posibilitatea a cel puțin 1014 combinații TCR 2.

Genele codificatoare pentru Ti s-au studiat după clonarea ADNc, obținut prin metoda hibridării substructive***. S-a studiat distribuția genelor atât în celulele T embrionare, cât și în limfocitele T mature. Se cunosc mai bine genele care codifică lanțul β . Ele sunt plasate în 4 regiuni distincte, care corespund segmentelor V, D, J, C. Nu se cunoaște numărul genelor în fiecare regiune.

Prima treaptă este sinteza ADNc din ARNm al limfocitelor T. ADNc este hibridat cu ARNm în mare exces, din limfocitele B. Secvențele de ADNc care nu hibridează cu ARNm, probabil vor reprezenta secvențele de ARNm specifice numai limfocitelor T.

Regiunea C are două segmente genice distincte: C β 1 și C β 2. Regiunea J are două grupuri de minigene: J β 1 și J β 2, fiecare cu câte 7 segmente genice (unul este nefuncțional). Regiunea D are un număr nedefinit de gene (D1 - Dy), iar regiunea V are circa 30 de gene.

Formarea unei gene funcționale implică rearanjarea celor 4 segmente genice, dar rearanjările sunt mai versatile decât ale genelor codificare pentru moleculele de imunoglobuline și rezultă mai multe variante: Vb - Jb ; Db \bar{n} Db; Db \bar{n} Jb; Vb \bar{n} Db \bar{n} Jb. Tipul dominant de recombinare pare a fi V - D - J - C.

Diversitatea RCT se realizează prin mai multe mecanisme:

- numărul mare de gene V, D, J;
- asocierile combinatoriale diverse ale segmentelor V \bar{n} D- J. Ele sunt mai diversificate decât ale genelor pentru imunoglobuline, fiind posibile rearanjări D \bar{n} D și V \bar{n} J;
- diversitatea joncțională prin deleție sau adiție de baze, la legarea segmentelor V, D, J.

Rearanjările genice pentru RCTi se produc în timocitele imature, în zona corticală a timusului, înainte de a ajunge în zona medulară. Fig. 32. Genele codificatoare ale receptorului limfocitar de

antigen. Catenele α , β și γ , δ sunt codificate de gene V (ale regiunii variabile), gene D, J și o regiune genică constantă (C).

Rearanjarea genelor V β pe unul din cromosomi, supresează rearanjarea genelor pe cromosomul pereche (excludere alelică), astfel că fiecare celulă exprimă un singur tip de catenă RCT β . Rearanjarea genelor alele α nu este supusă fenomenului excluderii alelice și de aceea fiecare celulă are două tipuri de receptori de antigen (RCT), fiecare având propriul său lanț α , dar lanțul β este comun. Surprinzător, celulele CD8 din epiteliul intestinal, care sunt generate extratimic, au RCT format din homodimeri α - α .

***Metoda hibridării substructive (prin scădere) este o cale de a îmbogăți o anumită secvență de nucleotide înainte de clonarea ADNc. Metoda se folosește în cazurile în care sunt disponibile două tipuri celulare foarte asemănătoare ale unui organism, dar proteina de interes este sintetizată de un singur tip. Această metodă a fost folosită pentru a identifica proteina receptor de antigen a limfocitelor T, absentă pe suprafața limfocitelor B.

DEZVOLTAREA ONTOGENICĂ

A SISTEMULUI IMUNOCITAR

Limfocitele T și B se diferențiază dintr-o celulă stem (celulă mamă, tulpină, de origine), care nu a fost identificată, fiind doar ipotetică, deoarece nu are caractere structurale distinctive.

Celula stem este de origine mezenhimală. La păsări și mamifere, celula stem apare în mezenhimul paraaortic al embrionului, având un potențial foarte înalt de multiplicare și diferențiere.

Celula stem este pluripotentă, chiar totipotentă, deoarece prin multiplicare și diferențiere, generează toate categoriile de celule sanguine: granulocite, monocite, limfocite, mastocite, megacariocite, eritrocite. Diferențierea inițială a celulei stem este pe linie eritrocitară și mieloidă, iar diferențierea pe linie limfoidă este ulterioară și simultană cu procesul de maturare.

Maturarea limfocitelor semnifică dobândirea imunocompetenței, adică a capacității de a recunoaște specific antigenul și de a se activa.

Din mezenhimul paraaortic, celula stem migrează în sacul vitelin, unde, pentru un interval de timp se desfășoară hematopoeza.

Sacul vitelin este sediul esențial al diferențierii celulelor stem pe cale limfoidă, la păsări și mamifere, înainte de migrarea lor în ficat și splină. După cultivarea embrionului total de șoarece, fără sacul vitelin, înainte de migrarea și colonizarea sa cu celule stem limfoide, nu s-a evidențiat diferențiere celulară pe cale limfoidă. Ulterior în viața embrionară, funcția hematopoetică este preluată de ficat și splină. În aceste organe, celulele stem se divid cu o rată înaltă și se diferențiază pe linie eritrocitară, mieloidă (granulocitară), monocitară, limfoidă.

În ultima parte a vieții embrionare, funcția hematopoetică este preluată de măduva osoasă, chiar dacă ficatul și splina păstrează o activitate hematopoetică foarte limitată și un scurt interval după naștere.

Celulele limfoide diferențiate în măduva osoasă, la păsări, migrează inițial în splină și ficat, iar de aici migrează în organele limfoide centrale (timus și bursa lui Fabricius).

La mamifere, din măduva osoasă, limfocitele migrează în ficat și splină. Unele își dobândesc competența imunitară chiar în măduva osoasă, în ficat sau în splină, organe care îndeplinesc funcțiile bursei la păsări, iar altele migrează în timus. Acesta este circuitul primar al limfocitelor, în care se produce diferențierea independentă de antigen, în cursul căreia limfocitele devin imunocompetente. Această etapă se desfășoară în organele limfoide primare (timus, bursa lui Fabricius și echivalenții bursali ai mamiferelor). În cursul ei, limfocitele dobândesc receptori specifici de antigen.

Fig. 33. Diferențierea celulelor stem în limfocite T și B are loc în timus și respectiv, în măduva osoasă. Limfocitele mature migrează în țesuturile limfoide (după Black, 1996).

Fig. 34. Un model al căilor de diferențiere a celulelor sanguine din celulele stem hematopoetice, în raport cu condițiile de mediu. Celulele stem și cele imature sunt delimitate de linii întrerupte (după Ikuta, 1992).

A II-a fază a diferențierii limfocitelor este dependentă de antigen și se produce în circuitul secundar. Limfocitele imunocompetente trec în circuitul sanguin și de aici migrează în țesuturile limfoide secundare, de unde, pe cale limfatică se reîntorc în sânge. În circuitul secundar, limfocitele au șansa întâlnirii cu antigenul specific receptorului lor, se activează, proliferază și se diferențiază spre stadiile de celule efectoare și celule cu memorie. Fig. 35. Diferențierea limfocitelor are loc în două etape: 1) diferențierea independentă de antigen în măduva osoasă și în organele limfoide primare; 2) diferențierea dependentă de antigen în organele limfoide secundare.

Mecanismele moleculare care condiționează migrarea limfocitelor din splină și ficat, în organele limfoide primare, nu se cunosc. Este un proces aleatoriu sau este programat de receptori celulari, eventual dobândiți în aceste organe. Dacă este un proces condiționat, înseamnă că în ficat, celulele limfoide sunt deja pre-B (prebursocite) și vor migra în bursa lui Fabricius și respectiv pre-T (prelimocite), care vor migra în timus.

Rolul bursei lui Fabricius în diferențierea limfocitelor B

Bursa lui Fabricius este un organ limfoepitelial și se dezvoltă ca un diverticul dorsal al intestinului terminal, situat lângă cloacă. Primordiul bursal se observă la embrionul de 4 zile de incubație, ca un mugure epitelial în regiunea cloacală. Pe măsură ce crește, mugurele se vacuolizează și vacuolele prin coalescență, formează lumenul bursal. Pe suprafața internă a cavității bursale, epiteliul formează pliuri longitudinale, proliferază și constituie aglomerări celulare (muguri epiteliali) în lamina propria. Formarea mugurilor epiteliali este dependentă de interacțiunea celulelor epiteliale cu țesutul mezenhimal. Celulele stem limfoide din sacul vitelin colonizează mugurele epitelial în zilele 8-11 de dezvoltare embrionară. Fiecare mugure epitelial este colonizat de 1-3 celule stem limfoide prebursale. Celulele limfoide proliferază intens și formează medula foliculilor bursali.

Atât celulele epiteliale ale bursei cât și celulele stem ale liniei limfoide proliferază intens în cursul vieții embrionare, dar și 2-4 săptămâni după ecloziune. La 4 săptămâni după ecloziune, bursa conține circa 10 000 de foliculi, fiecare având circa 105 limfocite.

Celulele stem limfoide prebursale sunt originare în mezenhimul embrionar. Înainte de a ajunge în bursă, genele pentru sinteza imunoglobulinelor s-au rearanjat, fiind angajate în dezvoltarea pe

linia B. La 12 zile de incubare, în interiorul bursei apar celule care exprimă IgM membranar, iar la ecloziune, circa 90% din celulele bursale au IgM pe suprafața lor și sub 1% exprimă IgG sau IgA.

Celulele epiteliale din zona medulară formează o rețea laxă, având o structură internă de tip secretor. În zona medulară, pe lângă celulele epiteliale se găsesc limfocite, plasmocite, fagocite. Regiunea medulară și cea corticală sunt separate prin membrana bazală. La suprafața lumenului bursal, celulele epiteliale se diferențiază în epiteliul asociat foliculului, cu funcția de a fagocita și de a transporta materialul antigenic, din lumenul bursal, în regiunea medulară. Celulele epiteliale din epiteliul asociat foliculilor și cele din medula bursală sunt diferite în privința capacității de a fagocita și a activității enzimatică.

La ecloziune, bursa are 30-40 mg, atinge dezvoltarea maximă (3-4 g) la 2-4 luni și se menține până la 4-6 luni, când începe să involueze și se atrofiază la maturitatea sexuală, când dispar complet structurile limfoide și epiteliale.

Bursectomia la ecloziune nu împiedică migrarea limfocitelor B la periferie, pentru că procesul începe timpuriu în dezvoltarea embrionară. Îndepărtarea chirurgicală a primordiului sau ablația chimică a epiteliului bursal prin tratament cu testosteron, se poate face la 2-5 zile de incubare, înainte ca foliculii bursali să fie populați de celulele stem limfoide. La pasărea adultă timectomizată, numărul de limfocite B în organele limfoide periferice nu este influențat. Se găsesc plasmocite și anticorpi, dar cu un repertoriu foarte limitat al specificității de legare, ceea ce denotă o maturare extrabursală foarte limitată a limfocitelor B. Concluzia este că bursa lui Fabricius nu este strict necesară pentru asamblarea genelor codificatoare ale sintezei imunoglobulinelor și nici pentru diferențierea limfocitelor B, dar are un rol esențial pentru diversificarea clonală a limfocitelor B, adică pentru diversificarea repertoriului lor antigenic.

Bursa lui Fabricius este un organ limfoid specializat în care se produce diversificarea somatică extensivă a genelor rearanjate pentru sinteza anticorpilor, cât și expansiunea clonală a limfocitelor.

Spre deosebire de mamifere, la care generarea diversității celor circa 10⁹ specificități de legare a anticorpilor se face prin legarea combinatorială a segmentelor genice V-D-J (pentru catena H) și a segmentelor genice V-J (pentru catena L), linia aviană de evoluție a vertebratelor a exploatat o altă strategie pentru generarea diversității specificității de legare a moleculelor de anticorpi. În timpul dezvoltării embrionare a puiului de găină, potențialul generării diversității genetice prin procese de recombinare genică este limitat, deoarece regiunea variabilă a catenei H și a catenei L este codificată de secvențe genice funcționale unice V și J. Conversia genică are loc cu o rată mare între singura genă funcțională V (VH1 sau VL1) și un grup de pseudogene V. De aceea,

rearanjarea genelor în celulele embrionare ale liniei limfoide, înainte de migrarea în bursă, va produce o diversitate foarte limitată a specificității de legare a anticorpilor. Micromediul bursal selectează și favorizează diferențierea celulelor stem bursale care suferă o conversie genică productivă, iar celelalte (circa 90%), probabil cu conversie neproductivă, mor prin apoptoză în interiorul bursei.

Între celulele epiteliale ale bursei și celulele liniei limfoide se stabilesc interacțiuni foarte strânse, esențiale pentru diversificarea specificității antigenice a limfocitelor B. Efectul bursei este mediat de factori humorali, ca de exemplu, bursopoetina, un polipeptid mic, capabil să inducă diferențierea limfocitelor B in vitro.

Diferențierea limfocitelor B la mamifere

Diferențierea liniei celulare B este ulterioară diferențierii liniilor eritrocitară și mieloidă.

La mamifere, primul organ în care are loc diferențierea celulelor B, este ficatul fetal. Inițial, ficatul primește celule precursorale ale liniei limfoide generate în sacul vitelin, dar ulterior el însuși devine sediul funcției hematopoetice. Aceiași funcție de stimulare a diferențierii limfocitelor B ar avea-o splina fetală și chiar sângele circulant, care străbătând diferite organe dobândește capacitatea de a induce maturarea limfocitelor B.

Studiul diferențierii limfocitelor B în ficatul fetal este îngreunat, deoarece ficatul nu se poate extirpa (așa cum se pot extirpa timusul și bursa lui Fabricius), iar numărul limfocitelor este mic comparativ cu al celulelor liniei eritrocitare.

Celulele precursorale ale liniei B generate în ficatul embrionar și ulterior în măduva osoasă, nu exprimă markeri imunoglobulinici de suprafață. Ele își dobândesc competența imunitară în măduvă, în ficat sau în splină. Maturarea (dobândirea competenței) constă în exprimarea receptorului imunoglobulinic membranar. În genomul lor are loc rearanjarea genelor V, D, J ale catenei H. Odată cu rearanjarea genică, limfocitele suferă o tranziție rapidă și devin limfoblaste mari, care se divid. Prin diviziune rezultă celule pre-B mici, care exprimă catena μ în citoplasmă, dar nu exprimă Ig de membrană (μ cit+, L-, Igm-). Ulterior se rearanjează genele k ale catenei L și numai dacă genele k nu se rearanjează cu succes, se recombina genele α . După sinteza catenei L, moleculele de imunoglobulină se exprimă pe suprafața limfocitului.

Rearanjarea într-o combinație funcțională a genelor unuia din cei doi cromosomi, împiedică recombinarea genelor în cromosomul pereche, sugerând o explicație pentru fenomenul excluderii alelice.

Prima imunoglobulină de suprafață a limfocitelor B este IgM, ca proteină integrată, cu o densitate de peste 200 000 de molecule/celulă. Limfocitele B care exprimă pe suprafața lor numai molecule IgM sunt considerate imature. Alături de IgM pot să coexiste IgA sau IgG. Pe măsură ce diferențierea limfocitelor B progresează, alături de IgM apare IgD, care treptat devine dominantă cantitativ. Limfocitele B mature, în repaus (neangajate) au pe suprafața lor, nivele mai înalte de IgD decât IgM. Acestea sunt celule imunocompetente.

Limfocitele B care nu reușesc să genereze o rearanjare funcțională a genelor pentru sinteza catenelor H și L, sunt eliminate într-un stadiu timpuriu al diferențierii lor.

După stimularea antigenică, limfocitele B mature secretă IgM, IgG (una din subclase), IgA sau IgE. Nu se diferențiază o linie celulară care să sintetizeze izotipul IgD.

Timusul la mamifere și rolul lui în diferențierea limfocitelor T

Timusul este un organ limfoid voluminos, așezat în partea superioară a mediastinului anterior. Are origine epitelială dublă: derivă din ectodermul perechii a III-a de pungi branhiale și din endodermul celei de III-a pungi faringiene. Primordiile epiteliale fuzionează și formează primordiul timic epitelial, care pierde legătura cu faringele și lumenul dispare.

Timusul este primul organ limfoid care apare la păsări și mamifere. Primordiul timic este străpuns de celulele stem limfoide (la șoarece, în ziua a 11-a de dezvoltare embrionară), cu originea în sacul vitelin. Ulterior în cursul dezvoltării fetale, celulele limfoide vin din ficat, iar după naștere, din măduva osoasă. La fătul uman, la 20 de săptămâni de sarcină, timusul este dezvoltat complet.

Arhitectura timusului

Timusul este alcătuit din doi lobi. Fiecare lob este împărțit incomplet, prin septuri conjunctive, în lobuli. Lobulii conțin o rețea de celule epiteliale, printre care sunt diseminate numeroase celule limfoide (timocite).

Epiteliul timic este diferențiat zonal: zona corticală și zona medulară. Fig. 36. Componentele stromale ale micromediului timic.

La animalele tinere, zona corticală formează 80% din țesutul timic. Celulele epiteliale sunt de formă stelată, cu numeroase prelungiri fine care se interconectează, formând un citoreticulum. Numărul limfocitelor este mai mare decât al celulelor epiteliale. Limfocitele sunt mici și pe secțiunile colorate cu hematoxină, zona corticală este întunecată, datorită raportului nucleocitoplasmatic înalt al limfocitelor imature. Majoritatea limfocitelor (80-85%) sunt imature, dublu pozitive (exprimă nivele înalte ale moleculelor CD4 și CD8) și au un nivel scăzut de molecule RCT. Ele stau în ochiurile unei rețele de celule epiteliale și celule dendritice care exprimă molecule CMH. Moleculele CMH au rol esențial în selecția pozitivă a limfocitelor, adică maturarea lor în celule T mature. O mică proporție a limfocitelor sunt blaste.

Zona medulară este formată dintr-o rețea densă de celule epiteliale mai mari, de formă ovoidă, cu prelungiri citoplasmice scurte, bogate în organite secretoare. În ochiurile rețelei se găsește un amestec de limfocite cu un singur marker, CD4+ sau CD8+, dar exprimă RCT α - β , cu o densitate net superioară. Raportul celulelor CD4+/CD8+ este 2/1. Limfocitele sunt situate printre celulele prezentatoare de antigen (celule dendritice, interdigitate și macrofage). Un număr mic (sub 1%) de limfocite timice exprimă RCT γ - δ , diseminate în cortex și medula.

În zona medulară apar două tipuri de structuri, derivate din celule epiteliale: corpusculii Hassal formați din celule epiteliale dispuse concentric, cu aspect general de degenerescență și cavitățile chistice, căptușite de celule epiteliale columnare prevăzute cu microvili. Fig. 37. Reprezentare schematică a arhitecturii generale a timusului. Subregiunile timusului sunt prezentate în dreapta figurii, iar constituienții lor celulari, în stânga (după Hood și colab., 1984).

Timusul este bogat inervat, cu fibre adrenergice și colinergice, iar neurotransmițătorii oxitocina, vasopresina și neurofizina sunt sintetizați endogen de celulele perivascularare medulare și de celulele "nurse" (celule epiteliale mari, asociate cu un număr mare de limfocite), ceea ce sugerează raporturile strânse ale timusului cu sistemul nervos.

În raport cu distribuția limfocitelor, timusul are 4 regiuni funcționale:

- regiunea subcapsulară, bogată în limfocite imature (pre-T), abia intrate în timus;
- cortexul timic, în care limfocitele se divid cu o rată înaltă;
- joncțiunea cortico-medulară, formată dintr-un cordon de macrofage "santinelă", cu rolul unei site celulare;
- regiunea medulară, cu relativ puține limfocite, care poartă markerii de suprafață proprii limfocitelor mature.

Timusul evoluează, atingând adeseori o dezvoltare maximă odată cu maturitatea sexuală, după care începe involuția, asociată cu sensibilitatea sa la hormonii steroizi. La șoarece, involuția începe la 6 săptămâni. La om, involuția timică începe după pubertate, țesutul reducându-se cu circa 3% pe an, până la 35-40 de ani și cu 1% pe an după aceea. Dimensiunile nu se reduc, deoarece țesutul timic este înlocuit de țesut gras.

Atrofia glandei timice poate fi accelerată de corticosteroizi. Producerea unor cantități crescute de corticosteroizi sau terapia cu corticosteroizi accelerează atrofia timică. Fenomenul se numește involuție de stress, pentru că nivelul de corticosteroizi crește în stările de stress și în cele clinice. Steroizii au acțiune citolitică asupra timocitelor corticale. Limfocitele medulare sunt relativ rezistente, datorită enzimei 20 α -hidroxil steroid-dehidrogenazei.

Maturarea limfocitelor T în timus

Dezvoltarea repertoriului limfocitelor T, este un proces complex de evenimente de selecție pozitivă și negativă, ce implică interacțiunea moleculelor de suprafață și necesită influența micromediului timic. Limfocitele T au raporturi spațiale strânse cu celulele stromale epiteliale. Acestea furnizează "semnale educaționale" care orientează maturarea limfocitelor în două direcții:

- dobândirea RCT și a capacității de a recunoaște antigenele exogene;
- dobândirea toleranței față de self;

- eliminarea celulelor T self-reactive, precum și a celor care nu generează combinația genică a unui receptor funcțional.

Celulele pre-T se diferențiază în ficatul fetal și în măduva osoasă. Ele conțin o enzimă specifică - terminal deoxynucleotidil-transferaza (TdT) - cu localizare nucleară. În cortexul timic, limfocitele pre-T exprimă markerii CD2 și CD3 pe membrana citoplasmatică. Pe măsură ce maturarea progresează, limfocitele fiind încă în cortexul timic, exprimă markerii CD4 și CD8. După expresia la mică densitate a moleculelor CD4 și CD8, se rearanjează genele care codifică RCT și celulele devin triplu pozitive (RCT+, CD4+, CD8+). Acestea suferă procesele de selecție, prin care se elimină celulele T autoreactive și se selectează celulele care recunosc moleculele CMH I și CMH II. Când limfocitul T imatur migrează în zona medulară, se pierde fie markerul CD4, fie CD8. În acest stadiu dispare markerul TdT.

Celulele CD4 + și CD8+ se dezvoltă din celule progenitoare dublu pozitive pentru cei doi markeri, iar acestea își au originea în celule dublu negative.

Dobândirea toleranței față de self. În zona corticală a timusului, limfocitele "învață" să tolereze selful, fenomen ce constă în selecția celulelor care recunosc moleculele CMH exprimate pe suprafața celulelor epiteliale. Aproximativ 90% dintre celulele pre-T care ajung în zona corticală, nu reușesc să traverseze joncțiunea cortico-medulară. Ele sunt supuse unui proces de selecție pozitivă ce constă în supraviețuirea limfocitelor care recunosc moleculele CMH ale celulelor epiteliale. Selecția pozitivă constă în supraviețuirea limfocitelor care recunosc și interacționează cu afinitate medie, cu moleculele CMH. Limfocitele care nu generează un receptor care să recunoască moleculele CMH, ca și cele care leagă cu mare afinitate moleculele CMH, potențial inductoare ale conflictelor autoimune (selecție negativă), sunt eliminate prin apoptoză.

În zona medulară, selecția limfocitelor continuă, prin eliminarea clonelor reactive față de self. Medula timică are particularități funcționale proprii, care favorizează inducerea toleranței față de self. În contrast cu cortexul, medula este deschisă circulației libere a proteinelor de origine sanguină și în structura ei se găsesc CPA (celule prezentatoare de antigen) originare în măduva osoasă (macrofage, celule dendritice, și interdigitate). Aceasta semnifică faptul că moleculele self din sânge ajung în timus și induc toleranța celulelor T imature. Moleculele self care nu intră în sânge (de exemplu, moleculele tisulare), nu ajung în timus și nu induc selecția negativă. Față de aceste molecule este posibilă întreruperea stării de toleranță. Fig.38. Diferențierea celulelor T în timus. Celulele autoreactive cu specificitate pentru antigenele self neexprimate în timus, pot să devină tolerante prin contactul extratimic cu antigenele. TCR1 = receptor γ , δ ; pre-TCR2 = receptor pre-T α , β ; TCR2 = receptor matur α , β ; TdT = terminal deoxinucleotidil transferaza (după Roitt, 1997, modificată).

Prin selecție negativă, în zona medulară, sunt eliminate limfocitele T self-reactive, adică cele cu potențialul de a se activa față de antigenele self asociate moleculelor CMH. Eliminarea acestor celule este esențială pentru inducerea toleranței față de self. Sunt de asemenea eliminate celulele T care nu generează o combinație genică pentru codificarea unui receptor funcțional de antigen. Se maturează limfocitele care generează receptori specifici față de epitopii nonself.

Selecția negativă este dependentă de cantitatea de antigen ce ajunge în timus. De exemplu, un antigen abundent (albumina) realizează o concentrație mare în timus și determină o selecție negativă completă, adică elimină întregul spectru de limfocite T cu receptori de înaltă și joasă afinitate. De aceea, toleranța față de albumină nu va fi niciodată întreruptă și nu se cunosc maladii autoimune cu reactivitate limfocitară față de albumină. Alte molecule pătrund în timus, în cantități mici, pe cale sanguină (de exemplu, insulina) și selecția negativă este incompletă, adică sunt eliminate numai celulele T cu receptor de mare afinitate pentru antigen. În condiții experimentale, prin injectarea antigenului la concentrații mari, toleranța față de aceste molecule poate fi întreruptă și se poate stimula reactivitatea autoimună.

Se consideră că exprimarea RCT și a moleculei CD4, ce interacționează cu moleculele CMH II, inhibă exprimarea moleculelor CD8, sau diferențierea celulelor cu un singur marker (CD4 ori CD8) este un proces stochastic.

Rezultatul final al diferențierii limfocitelor T în timus, constă în generarea receptorilor celulelor T, cu capacitatea de a tolera selful, asociat cu moleculele CMH, și de a reacționa la moleculele nonself, ceea ce este esențial pentru interacțiunile celulare în cursul elaborării răspunsului imun.

Numărul celulelor T mature în organele limfoide secundare rămâne constant, la o valoare ridicată, în condițiile în care timusul involuează treptat. Constanța numerică a celulelor T este atribuită duratei lungi de viață a acestor limfocite, dar nu este exclusă producerea de novo în alte țesuturi (intestin, ficat, măduvă osoasă).

Factorii celulari și humoralii ai diferențierii limfocitelor

Pe baza datelor experimentale acumulate se poate deduce existența a cel puțin două mecanisme active asupra diferențierii limfocitelor în organele limfoide centrale. Mecanismele propuse nu se exclud. Coexistența și sinergismul lor demonstrează importanța organelor limfoide centrale în controlul procesului de diferențiere și complexitatea acestuia. Majoritatea cercetărilor au vizat

factorii de diferențiere ai timusului, dar rezultatele pot fi extrapolate asupra factorilor bursali ai diferențierii limfocitelor B la păsări.

S-au conturat două ipoteze referitoare la factorii de diferențiere ai limfocitelor: ipoteza celulară și ipoteza hormonală (humorală).

În acord cu ipoteza celulară a micromediului epitelial al timusului, diferențierea limfocitelor T s-ar realiza prin contactul direct al pretimocitelor cu epiteliul timic. Experiențele de extirpare a timusului la animalele nou născute, cu sistem imunitar imatur au evidențiat că prezența timusului funcțional este o condiție esențială pentru funcția optimă a imunității mediate celular. Extirparea timusului la animalele nou-născute este urmată de instalarea "sindromului de epuizare" (Miller, 1961), ale cărui simptome se manifestă progresiv mai intens și în esență reflectă incapacitatea organismului de a se apăra față de infecțiile virale și fungice (disfuncția imunității mediate celular). Grefa timusului (de la organisme singenice) le restabilește treptat starea normală.

Extirparea timusului la organisme mature a evidențiat că absența timusului este compatibilă cu viața, fără manifestarea unor deficiențe notabile. S-a dedus astfel, că mecanismele celulare de contact al limfocitelor cu celulele epiteliului timic ar fi active numai în primele faze ale maturării limfocitelor T, dar absolut necesare pentru diferențierea lor.

După datele actuale, mecanismul celular al influenței timice nu este suficient pentru diferențierea celulelor T. S-a emis ipoteza hormonală, care consideră că procesul de diferențiere și maturare imunitară ar continua după ce timocitele părăsesc timusul. Hormonul secretat de celulele epiteliului timic ar exercita o acțiune stimulatorie asupra diferențierii limfocitelor, atât intratimic cât și la distanță, după trecerea sa în circulație, asupra celulelor limfoide circulante sau localizate în organele limfoide secundare, continuând astfel influența directă a epiteliului timic.

În favoarea existenței unui factor hormonal timic s-au adus argumente experimentale, care pot fi grupate în două categorii:

a) Experiențe de restabilire a funcției imunitare sub acțiunea factorilor timici: de exemplu, îndepărtarea timusului la șoarecele nou-născut este urmată de pierderea imunității mediate celular. Implantarea subtegumentară a unei grefe de timus, plasată într-o cameră specială cu pereți poroși, permeabilă pentru molecule, dar impermeabilă pentru celule, restabilește imunocompetența, ceea ce demonstrează că nu este strict necesar contactul limfocitelor cu celulele epiteliului timic. Este suficient ca mediatorul (mediatorii) chimic secretat de timus să fie prezent în organism pentru a se produce maturarea limfocitelor T. Pe de altă parte, șoarecii-

femele timentomizate la naștere, își recapătă competența imunitară în timpul sarcinii, sub influența hormonilor timici fetali, care trec în circulația maternă.

b) Evidențierea factorilor timici prin metode biochimice: unii hormoni au fost izolați din timus, iar alții din sânge. Nu sunt întru-totul asemănători hormonilor convenționali, pentru că nu se pot substitui complet țesutului timic și pentru faptul că unele molecule din categoria hormonilor timici pot fi generate și în alte țesuturi. Factorii serici de origine timică dispar după timentomie și reapar după grefa de timus. Existența factorilor serici de origine timică argumentează în favoarea ipotezei că imunocompetența se dobândește atât în faza timică a limfocitelor, cât și la distanță, după ce limfocitele au părăsit timusul.

Denumirea factorilor de imunocompetență variază mult, în funcție de origine, proprietăți biochimice, efecte biologice.

Din timusul de vițel s-au extras câteva polipeptide, iar unele s-au preparat pe cale sintetică. O serie de componente manifestă activitate imunobiologică: timulina, timopoetina, timozinele.

Timozinele (evidențiate de Goldstein) din cea de 5-a fracție proteică de extract timic de vițel, reprezintă un grup de polipeptide cu greutatea moleculară cuprinsă între 1000 și 15 000 D, stabile la 80°. Prin combinarea metodelor analitice de cromatografie analitică și gel-filtrare, din această fracție s-au izolat 16 polipeptide. Ele induc, in vitro, sinteza MIF de către limfocite, precum și diferențierea celulelor formatoare de anticorpi. De asemenea, timozinele restabilesc funcțiile imunitare la animalele timentomizate neonatal și la persoanele vârstnice, la care competența imunitară diminuează datorită involuției timusului. Din acest amestec de polipeptide, cel mai activ este un polipeptid de 108 aminoacizi (12 kD), a cărui secvență a fost determinată.

Timopoetina este un hormon polipeptidic al timusului de vițel, izolat de Goldstein, format din 49 de aminoacizi, evidențiat în primul rând datorită efectelor sale asupra transmiterii neuromusculare și mai puțin prin efectele sale asupra sistemului imunitar. Bolnavii atinși de myasthenia gravis prezintă, de regulă, o hiperplazie timică (timom). S-a creat sistemul experimental al acestei maladii, ceea ce a permis izolarea unui polipeptid care modifică transmiterea neuromusculară, iar la indivizii bolnavi provoacă oboseala musculară. S-au identificat două variante de timopoetină, care diferă prin doi aminoacizi și stimulează activitatea limfocitelor T.

Timulina (Factorul timic seric, FTS) s-a izolat din serul uman, din serul de porc și din timusul de vițel. În acord cu criteriile clasice ale endocrinologiei și fiziologiei, timulina este singurul polipeptid de origine timică recunoscut ca hormon, adică este secretată și reglată de timus.

Timulina lipsește în serul șoarecelui nud, iar la animalele convenționale, dispare după timentomie, dar reapare după grefa timică. Este un peptid cu greutatea moleculară de 900 D, cu următoarea secvență a celor 9 aminoacizi: Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn. Concentrația FTS depinde de vârstă și scade odată cu scăderea greutatei timusului. Timulina are activitate biologică numai când este cuplată equimolar cu Zn. Echilibrul Zn este alterat la vârstnici.

Se pare că hormonii timici acționează asupra limfocitelor T, după ce acestea au părăsit timusul. Efectul lor stimulator se exercită asupra tuturor categoriilor funcționale de limfocite T: helper, citotoxice, supresoare.

Ubiquitina este un polipeptid ce conține 74 de aminoacizi (8,4 kD) care se găsește în timus și în majoritatea țesuturilor la animale și chiar la plante. In vitro, stimulează diferențierea limfocitelor precursorale ale liniei T și B, ceea ce explică păstrarea funcției imunitare după timentomizarea animalelor mature.

ORGANELE LIMFOIDE SECUNDARE (PERIFERICE)

Sistemul limfatic, alcătuit din vasele limfatice, limfă și organele limfoide secundare, este parte integrantă a sistemului vascular sanguin al veretebratelor, dar la mamifere are rol esențial în transportul și distribuția antigenelor, anticorpilor și a celulelor imunocompetente. Celulele tumorale se diseminează (metastazează) frecvent pe cale limfatică.

Funcția primară a sistemului limfatic este de a colecta lichidul proteic interstițial, care rezultă prin extravazarea continuă la nivelul capilarelor sanguine și de a-l readuce în sistemul vascular sanguin, menținând astfel constanța volumului plasmei sanguine circulante.

La originea sistemului limfatic se găsesc capilarele limfatice, delimitate de o membrană bazală subțire, de care sunt atașate lax celulele endoteliale. Prin așezarea lor, aceste celule au rolul unor valve, care favorizează intrarea limfei în capilar și limitează ieșirea. Membrana bazală este continuă și este înconjurată de fibre musculare netede. Invelișul muscular al vaselor limfatice manifestă contracții ritmice intrinsece, care generează o presiune de câțiva mm Hg, favorizând

circulația limfei. Fig.39. Principiul formării limfei. Presiunea hidrostatică la capătul arterial al capilarului determină ieșirea fluidului proteic prin peretele capilar. La capătul venos, presiunea hidrostatică este mică și presiunea coloid-osmotică a proteinelor plasmatică determină reintrarea apei, electroliților și cristalozilor în circulație. Proteinele nu pot fi reabsorbite și împreună cu o parte a apei și sărurilor, sunt drenate prin limfă. Diametrul capilarului permite trecerea hematiilor, iar leucocitele, fiind mai mari, trebuie să se deformeze. Aceasta creează o rezistență la curgere, ceea ce determină o cădere a presiunii între capătul arterial și cel venos al capilarului (după Hall,1998).

Confluența capilarelor limfatice formează vase mai mari, prevăzute cu numeroase valve bicuspide ce împiedică curgerea gravitațională a limfei.

Limfa mamiferelor poate fi compartimentată în limfă periferică, intermediară și centrală.

Limfa periferică (cea care nu a trecut printr-un ganglion limfatic) are un conținut scăzut de celule albe (sub 1000/mm³), de dimensiuni mici, din care circa 85% sunt celule T și circa 10% sunt celule cu voal.

Limfa intermediară (din segmentul vascular în care se găsesc ganglionii limfatici) conține un număr mare de limfocite mici (20 000/mm³), dintre care 75% sunt limfocite T care au extravazat la nivelul venulelor postcapilare din ganglioni.

Limfa centrală se găsește în vasele limfatice în aval de ganglioni, ce se unesc pentru a forma trunchiurile limfatice mari (intestinal, toracic, ductul limfatic drept, ductul cervical).

La mamifere, pe traseul vaselor limfatice care transportă limfa de la periferie spre marile vene de la baza gâtului, se găsesc ganglionii limfatici.

Sistemul limfoid este alcătuit din limfocite, ca element celular esențial și din organele limfoide primare și secundare.

Organele limfoide secundare reprezintă suportul anatomic al răspunsului imun și sunt reprezentate de următoarele tipuri de structuri:

- ganglionii limfatici, splină, țesuturi limfoide organizate asociate cu suprafețele mucoase (tonsile, plăci Peyer, țesutul limfoid asociat mucoasei gastrointestinale(GALT), respiratorii (BALT));

- altele sunt formațiuni limfoide difuze, reprezentate de aglomerări de diferite categorii de celule în care predomină limfocitele, asociate cu tractul gastrointestinal, respirator și urogenital.

Țesuturile limfoide au localizări strategice, la porțile de intrare a antigenelor în organism: tegumentul sau mucoasele. Aici se găsesc aglomerări de limfocite și celule care transportă și prezintă antigenele. Ele interacționează funcțional, pentru a capta și neutraliza materialele nonself.

Organele limfoide secundare au următoarele particularități funcționale:

- sunt populate tardiv cu limfocite care și-au dobândit competența funcțională în organele limfoide primare;

- la nivelul lor, limfopoeza este diminuată sau inexistentă;

- la nivelul capilarelor care le irigă, limfocitele părăsesc fluxul sanguin;

- extirparea lor totală este imposibilă, datorită caracterului difuz;

- conțin proporția covârșitoare a limfocitelor, segregate în arii distincte: aria celulelor T conține un număr mic de limfocite B, dar are un număr mare de celule dendritice, cu rolul de a prezenta antigenele pentru activarea limfocitelor T și B; aria celulelor B conține în principal foliculi primari, ce reprezintă situsurile în care limfocitele B activate, proliferază și formează centrul germinal, înainte de a se diferenția în celule producătoare de anticorpi și celule de memorie; Fig. 40. Rețeaua ganglionilor limfatici.

Aglomerarea celulelor cu funcție imună în țesuturi limfoide secundare mărește eficiența reactivității imunitare prin distribuția limfocitelor T și B în arii ce favorizează interacțiunea lor cu celulele care prezintă anti-genul și prin caracterul de rețea, care permite circulația limfocitelor în ariile în care antigenele sunt concentrate.

Ganglionii limfatici

Ganglionii lim-fatici sunt organe lim-foide secundare, situate în grupuri pe traseul vaselor limfatice care drenează ariile superficiale ale pielii sau viscerele, cu dimensiuni de la câțiva mm până la 1cm. Suprafața lor este acoperită cu o capsulă conjunctivă din care pornesc numeroase trabecule ce străbat parenchimul ganglionar. Capsula este formată din țesut colagenic dens. În structura ganglionului limfatic se distinge stroma, formată din fibre și celule reticulare. Celulele reticulare sunt fibroblaste mari, ramificate, care produc fibre reticulare. În ochiurile rețelei se găsesc celule limfoide, macrofage, vase limfatice și sanguine, care formează parenchimul ganglionar.

Ganglionii limfatici au o vascularizație dublă: limfatică și sanguină. Limfa este adusă în ganglion prin cele 5-8 vase limfatice aferente, care se varsă în sinusul subcapsular. De aici, printre trabeculele conjunctive, pornesc radiar sinusurile corticale, care ulterior devin sinusuri medulare. Acestea se continuă cu vasele limfatice eferente.

Parenchimul ganglionar are o structură diferențiată zonal. Se disting zona corticală și cea medulară.

Zona corticală este divizată în două subzone:

- corticala externă foarte bogată în limfocite B;
- corticala profundă (paracorticală), populată de limfocite T (la șoarecele nud Ț atimic- corticala profundă este atrofiată).

În subzona corticală externă se găsesc numeroase aglomerări de limfocite, denumite foliculi limfoizi primari, formați în special din limfocite mici. Au diametrul de circa 1 mm și sunt distribuiți printre limfocitele dispersate uniform. Foliculii primari sunt formați din limfocite B mici, mature, neangajate, împachetate strâns. O componentă nelimfoidă importantă a foliculilor

primari o constituie aglomerările de celule foliculare dendritice(CFD). Prin receptorii lor pentru complement și pentru Fc, CFD concentrează complexe imune în aria limfocitelor B.

După stimularea antigenică, în timpul elaborării răspunsului imun, foliculii primari devin foliculi limfoizi secundari, datorită proliferării celulare intense, cu o zonă centrală formată din celule limfoide mai mari (celule B de memorie), macrofage și celule foliculare dendritice, denumită centru germinativ. Centrul germinativ este sediul proliferării celulare intense după stimularea antigenică.

Subzona corticală profundă (paracortex) este o arie limfoidă situată sub cortex, între foliculi și zona medulară. Limfocitele și limfoblastele sunt dense, iar celulele prezentatoare de antigen (în special celule interdigitate, celule cu voal) sunt diseminate printre limfocite. Paracortexul este o arie T-dependentă, limfocitele T în repaus și activate fiind majoritare. Intern față de paracortex sunt cordoanele medulare, populate cu macrofage și plasmocite, care duc spre sinusul medular. Unitatea funcțională a paracortexului este cordonul paracortical, care se întinde de la baza foliculului, până la cordonul medular subiacent. Cordonul paracortical are un diametru de 100-1000 μm și este spațiul în care celulele dendritice prezintă antigenul, rarelor clone de limfocite T specifice și favorizează activarea lor.

Zona medulară conține țesut limfoid dens, sub forma unor cordoane așezate printre sinusurile medulare. În cordoane predomină limfocitele B producătoare de anticorpi (plasmablaste și plasmocite mature), asociate cu macrofage, celule T. Sinusurile limfatice sunt căptușite cu celule, a căror suprafață apicală prezintă denivelări care încetinesc percolarea limfei prin ganglion.

Antigenele care au penetrat barierele protectoare de suprafață ajung în ganglionii limfatici prin vasele limfatice aferente. Macrofagele care căpтуșesc sinusurile limfatice, preiau antigenele și le transferă zonelor T-dependentă și T-independentă, unde sunt recunoscute de limfocitele care au receptori specifici. Stimularea limfocitelor din foliculii primari, de către antigenele T-independente, induce dezvoltarea foliculilor secundari, cu formarea centrilor germinali în care se găsesc și sunt reținute limfocitele B de memorie. Celulele B activate de antigen, migrează în cordoanele medulare și se diferențiază în plasmocite producătoare de anticorpi. Anticorpii părăsesc ganglionul limfatic prin vasul limfatic eferent. Fig. 41. Structura unui ganglion limfatic. Sub capsula conjunctivă se găsește sinusul subcapsular, tapetat cu celule fagocitare. Limfocitele și antigenele pătrund în ganglion prin vasele limfatice aferente. Cortexul conține aglomerări de limfocite B (foliculi limfoizi). Majoritatea foliculilor posedă un focar de celule proliferante, denumit centru germinativ. Zona paracorticală conține, în esență, limfocite T, majoritatea fiind în contact cu celule interdigitate, prezentatoare de antigen. Fiecare ganglion are o vascularizație arterială și venoasă proprie. Limfocitele circulante intră în ganglion la nivelul endoteliului specializat al venulelor post-capilare ale zonei paracorticale. Medula conține limfocite T și B și majoritatea plasmocitelor organizate în cordoane. Limfocitele părăsesc ganglionul numai prin vasul limfatic eferent.

Antigenele T-dependente ajung în ganglioni odată cu limfa aferentă, fiind transportate de celulele cu voal în zona paracorticală. Activarea și proliferarea celulelor T produc creșterea în volum a ariei T-dependente.

Sângele circulă în direcție opusă limfei. Artera aferentă pătrunde în ganglion la nivelul hilului și se continuă cu arteriolele, care formează un bogat plex capilar. La nivelul cortexului profund, din plexul capilar se formează venulele postcapilare cu endoteliu înalt. La acest nivel, limfocitele părăsesc circulația sanguină prin celulele endoteliale și se distribuie în zonele caracteristice: limfocitele B țin în cortexul extern, iar limfocitele T țin în cortexul profund (paracortex). După ce străbat lent teritoriile ganglionare specifice, limfocitele trec în zona medulară. Aici se colectează sinusurile limfatice medulare, care drenează limfa spre vasele limfatice eferente. Limfocitele părăsesc ganglionul prin vasele limfatice eferente.

Circulația lentă a sângelui în vasele din ganglionul limfatic, permite unui număr mare de limfocite să treacă din sânge în limfă, unde pot întâlni antigenul corespunzător. Se mărește astfel șansa ca un număr mic de limfocite imunocompetente să întâlnească antigenul specific și să reacționeze proliferativ.

Organizarea ganglionului limfatic trebuie să favorizeze interacțiunile dintre antigene și limfocite. Ganglionii conțin numeroase celule capabile să prelucreze și să prezinte antigenele: macrofage, celule dendritice, celule interdigitate și celule cu voal. În ganglioni, populația celulară se reînnoiește continuu, prin traficul celulelor limfoide și al celulelor accesorii

Funcțiile ganglionului limfatic sunt următoarele:

- filtrarea limfei și epurarea componentelor nonspecific (celule bacteriene, toxine etc.) de către fagocitele ganglionare;
- este suportul material al proliferării limfocitelor și al sintezei anticorpilor, după stimularea antigenică. Limfa eferentă este filtrată și îmbogățită în anticorpi și în limfocite. Fig. 42. Structura splinei. Splina este alcătuită din pulpă roșie și pulpă albă. Pulpă roșie înconjură ariile pulpei albe. Pulpă albă conține foliculi primari și centrii germinativi, ca și în ganglionul limfatic.

După stimularea antigenică inductoare a răspunsului imun mediat humoral, în subzona corticală externă (a celulelor B) se produc ample modificări citologice, iar după administrarea unui antigen timodependent, modificările citologice apar și în subzona corticală profundă (a celulelor T).

Splina

Splina este cel mai mare organ limfoid, cu rol important în funcția imunitară. Splina este acoperită de o capsulă conjunctivă, cu puține fibre musculare și incapabilă de contracții ample, de la care pornește o rețea de trabecule conjunctive, ce împart țesutul splenic în com-partimente comunicante. În fiecare compartiment se găsesc pulpa albă și pulpa roșie, sprijinită pe țesutul conjunctiv reticular .

În trabeculele conjunctive se găsesc arterele trabeculare (ramificații ale arterei splenice). Când ating diametrul de circa 200 μm, arterele părăsesc trabeculele conjunctive și pătrund în parenchimul splenic. Ele dau ramificații laterale (arteriole), fiecare arteriolă fiind acoperită de un manșon dens de țesut limfoid. În jurul arteriolei se găsesc limfocite, distribuite într-o stromă conjunctivă, ce formează teci limfoide periarteriolare (PALS = periarteriolar lymphoid sheaths) sau manșoane coaxiale de limfocite, în jurul arteriolelor. Arteriola are o poziție centrală în manșonul limfoid.

Fig. 43. Structura pulpei albe a splinei. Pulpa albă este împărțită într-o zonă centrală bogată în celule T în teaca limfoidă periarteriolară (PALS) înconjurată de foliculi primari care conțin celule B. În fiecare folicul primar se găsește o aglomerare de celule foliculare dendritice (FDC). Pulpa albă este separată de pulpa roșie (RP) prin sinusul marginal (MS). Sinusul marginal este inclus într-un strat de limfocite ale zonei marginale (MZ). Adiacente sinusului marginal sunt macrofagele metalofile, care se crede că au rol important în reglarea traficului în spațiile pulpei roșii și albe. Canalele colapsate (CC) par a fi ariile prin care limfocitele intră și ies din pulpa albă. CA = arteriola centrală.

Totalitatea tecilor periarteriolare (manșoane limfoide coaxiale) formează pulpa albă a splinei. Manșoanele au o zonă internă, bogată în limfocite T și o zonă externă bogată în limfocite B, grupate în aglomerări denumite foliculi. Limfocitele pulpei albe se văd pe secțiunea țesutului ca zone alb-cenușii, înconjurată de pulpa roșie. Fig. 44. Topografia regiunilor timo-dependente (TD) și timo-independente (TI) în splină. Teaca limfocitară periarteriolară constituie regiunea TD, în timp ce foliculii limfoizi și țesutul limfoid adiacent reprezintă zona TI.

Unele arteriole, după ieșirea din manșonul limfoid (pulpa albă) dau numeroase ramificații “în perie”, denumite arteriole penicilate, care pătrund în pulpa roșie.

Pulpa roșie înconjură pulpa albă și este formată din cordoane de țesut splenic (cordoane Billoth) situate printre sinusurile venoase. Unele capilare arteriale se pot conecta cu sinusurile venoase, dar majoritatea arteriolelor penicilate se deschid în cordoanele Billoth (circulație deschisă). Sinusurile venoase sunt canale vasculare, delimitate de endoteliu și o membrană bazală. Endoteliul este perforat de spații poligonale mari, așezate ordonat.

Cordoanele Billoth sunt formate dintr-o rețea tridimensională de celule reticulare și fibre reticulare, care formează o unitate funcțională cu adventicea sinusurilor. În această rețea se deplasează celulele splenice libere cu funcție fagocitară (macrofage). Cordoanele Billoth comunică cu sistemul venos al splinei.

Splina este un filtru al sângelui, legat pe o derivație a mării circulații.

La nivelul cordoanelor Billoth, circulația are caracter “deschis”, deoarece sângele vine în contact direct cu celulele splenice. În ochiurile cordoanelor Billoth se găsesc sinusurile. Ele sunt capilare cu diametrul neuniform, tapetate cu celule din seria macrofagelor, care au rolul de a fagocita antigenele particulare. În sinusuri se deschide o parte din arteriolele penicilate (circulație închisă).

Macrofagele din peretele sinusurilor și din cordoanele de țesut splenic rețin și captează hematiile îmbătrânite și plachetele. Macrofagele exprimă receptori pentru Fc al IgG, astfel că elementele figurate tapetate cu IgG (autoanticorpi) sunt fagocitate. Prin îmbătrânire, eritrocitele își pierd acidul sialic de pe suprafață, expunând manoză și galactoză, care sunt recunoscute de celulele splenice.

Alte arteriole, după ieșirea din manșonul limfoid se termină în sinusul zonei marginale, care se deschide într-un sinus venos al pulpei roșii. Zona marginală constă dintr-o rețea fină de fibre reticulare, în ochiurile căreia se găsesc limfocite B. Sinusul marginal este adiacent foliculilor limfatici și constă din spații vasculare aplatizate, ce se continuă cu sinusurile pulpei roșii. Peretele său este foarte permeabil și permite trecerea limfocitelor din sânge în pulpa albă (în teaca periarteriolară). Sinusul zonei marginale formează granița dintre pulpa albă și pulpa roșie și reprezintă zona de schimb celular dintre cele două compartimente. Din pulpa albă, limfocitele trec în sinusurile marginale, apoi în sinusurile pulpei roșii și de aici în sistemul venos al splinei.

În pulpa albă se găsesc foliculii limfoizi primari. Ei sunt localizați la periferia tecii limfoide periarteriolare sau în imediata ei vecinătate. În manșoanele limfoide periarteriolare, limfocitele au o distribuție selectivă: celulele T segregă predominant în tecile periarteriolare, iar celulele B, în foliculii limfoizi.

Antigenele din sânge sunt preluate de macrofagele zonei marginale și ajung în pulpa albă. Sinteza anticorpilor față de antigenele circulante este una din funcțiile majore ale splinei. Celulele B activate în pulpa albă, migrează în pulpa roșie, unde se găsește majoritatea plasmocitelor. În zona marginală se găsește majoritatea celulelor NK.

Splina nu are circulație limfatică. La nivelul splinei, limfocitele ies din sânge prin peretele capilarelor zonei marginale, care este foarte permeabil și se distribuie în pulpa albă, iar de aici străbat drumul invers și ajung în pulpa roșie, în sinusurile venoase. Acestea comunică atât cu capilarele zonei marginale, cât și cu sistemul venos al splinei.

Limfocitele părăsesc splina prin vena splenică.

Sistemul imunitar al mucoaselor

Mucoasele (digestivă, respiratorie, genitală, urinară), din punctul de vedere al contactului cu antigenele, constituie structurile cele mai vulnerabile ale organismului uman și animal. În special la nivelul intestinului, contactul permanent cu microorganismele creează condițiile pătrunderii acestora în mediul intern. Mucoasele reprezintă nu numai o entitate anatomică, ci și una funcțională imunologic. Particularitățile lor structurale și funcționale tind să le delimiteze tot mai mult de aparatul imunitar sistemic.

Sistemul imunitar al mucoaselor, la mamifere, este o rețea integrată de țesuturi, formate din celule specifice, celule limfoide și molecule cu funcție imunitară, protectoare față de infecțiile pe calea membranelor mucoase. La nivelul structurilor de contact cu antigenele, sistemul imunitar al mucoaselor este divizat anatomic și funcțional: structurile BALT (bronchus associated lymphoid tissue) și GALT (gut associated lymphoid tissue). La rozătoare, structurile BALT sunt bine dezvoltate, având rolul de a răspunde la antigenele inhalate. La om, structurile BALT propriu-zise nu se dezvoltă, iar țesuturile limfoide majore echivalente sunt tonsilele palatine și formațiunile adenoide (tonsilele nazofaringiene). Împreună, ele formează o barieră fizică de țesuturi limfoide, care constituie inelul Waldeyer. Tonsilele și adenoidele se descriu ca NALT (nasal associated lymphoid tissue). Structurile limfoide asociate mucoaselor (MALT) includ

câteva categorii de celule antigen-reactive: celule B, pozitive pentru moleculele CMH II, macrofage, celule Langerhans, celule dendritice, celule foliculare dendritice, plasmocite. Aceste celule sunt fie distribuite difuz, fie organizate în structuri anatomice distincte: foliculi limfoizi, plăcile Peyer, amigdalele.

Amigdalele (tonsilele palatine) sunt așezate în unghiurile mandibulare. Dimensiunile unei amigdale măsoară 2,5 cm lungime, 1,5 cm lățime și 1 cm grosime. Tonsilele și adenoidele sunt singurele structuri limfoide asociate tractului digestiv, acoperite de o capsulă care aderă intim de țesutul limfoid subiacent. Pe fața internă (care privește spre vestibulul faringian) se găsesc deschiderile criptelor tonsilare. Criptele pătrund adânc în masa limfoidă a tonsilei, ușurând contactul celulelor reactive (macrofage și limfocite), cu antigenele care pătrund pe care digestivă și respiratorie. Circa 50% dintre celulele tonsilare sunt limfocite B, constituite în foliculi care conțin centrii germinali. Majoritatea limfocitelor B au ca receptor de antigen IgG, iar restul sunt IgM+ și IgA+. Circa 40% din celulele tonsilare sunt limfocite T. Fig.45. Rolul potențial al NALT pentru dezvoltarea imunității mucoaselor. Tonsila palatină prezintă cripte adânci. Schema ilustrează categoriile majore de celulele prezentatoare de antigen, (LC = celule Langerhans, Mf = macrofage; FDC = celule foliculare dendritice), centrul germinativ al celulelor B și ariile parafoliculare cu celule T (TDA). Limfocitele efectoare și cele de memorie recirculă pe calea sistemului imunitar comun al mucoaselor (după McGhee, 1998).

Apendicele este o structură limfoidă asociată intestinului, prezentă numai la iepure, maimuțe antropoide și la om. Prezintă structuri limfoide cu organizare similară plăcilor Peyer, cu un dom bine definit, aglomerări de celule B organizate în foliculi și arii interfoliculare bogate în celule T. Epiteliul domului este permeabil, permițând trecerea liberă a antigenelor solubile și a celor particulate, ca și a bacteriilor.

Foliculii limfoizi sunt structuri asociate, caracteristice mucoasei intestinale, care se găsesc fie ca foliculi solitari de 0,5-2,0 mm, foarte numeroși în partea terminală a ileonului, fie ca foliculi agregați ce formează plăcile Peyer. Foliculii (solitari sau agregați) sunt localizați în corionul mucoasei, dar pătrund și în submucoasă.

Fig. 46. Structura schematică a unei plăci Peyer și a unui ganglion mezenteric. HEV = venule cu endoteliu înalt; CG = centru germinativ.

O placă Peyer conține 20-30 de foliculi agregați. Are formă circulară sau alungită (eliptică), cu axul mare orientat în lungul intestinului. Sunt mai numeroase în ileonul terminal. Lungimea este variabilă, între 1-12 cm, iar lățimea, între 0,8-1cm. Plăcile Peyer ocupă marginea liberă a intestinului(niciodată marginea mezenterică). Ele se formează în cursul dezvoltării fetale, ating

nu-mărul maxim la pubertate (peste 200) și scad încet cu vârsta. Se estimează că 10% din celulele limfoide umane sunt asociate cu structurile limfoide ale tractului gastro-intestinal

Fiecare folicul al plăcii Peyer este format dintr-o aglomerare de macrofage, limfocite, plasmocite. Ariile interfoliculare sunt bogate în limfocite T. Structura foliulară individualizată este separată de lumenul intestinal prin structuri specializate, denumite domuri: domul epitelial, alcătuit

din celule epiteliale diferențiate, de aspect cuboidal, ale mucoasei intestinale și domul conjunctiv subepitelial.

La nivelul domului, epiteliul intestinal prezintă puține celule mucoase și puțini microvili, dar există în schimb, o categorie de celule specializate funcțional, denumite celule M (membraneous), atașate de enterocite prin complexe jonționale. Prezența vimentinei și cheratinei în celulele M este dovada originii lor epiteliale. La nivel microscopic, celulele M se recunosc prin asocierea lor strânsă cu limfocitele intraepiteliale. Ele au pliuri membranare mari, bazolaterale, în care stau limfocitele intraepiteliale. Celulele M formează o “umbrelă” deasupra unui spațiu în care se găsesc limfocite intraepiteliale, macrofage, celule dendritice.

Celulele M au rolul de a pinocita antigenul solubil din lumenul intestinal, dar preiau și antigenul particulat (virusuri, bacterii, protozoare). Înglobarea antigenului nu este urmată de degradare lizosomală, ci antigenul intact este transportat în vezicule spre membrana laterobazală. Prin fuziune, antigenul este eliberat în spațiul laterobazal, unde este transferat celulelor subiacente, unele specializate în prelucrarea și prezentarea antigenelor, fenomen denumit translocație. Antigenele sunt prelucrate în celulele dendritice și în macrofagele subepiteliale și sunt prezentate limfocitelor locale sau sunt transferate celulelor interdigitate și prezentate celulelor T interfoliculare. Celulele interdigitate care prezintă antigenul, derivă din celulele dendritice care au înglobat antigenul. Fig. 47. a. O placă Peyer. b. Reprezentarea schematică a mecanismului funcțional al plăcii Peyer. Detaliu al celulei M. După înglobarea și transportul de către celula M, antigenul este prelucrat de macrofage sau de celulele dendritice, care se transformă în celule interdigitate (IDC) și apoi este prezentat limfocitelor în ariile celulelor T ale plăcii Peyer și ale ganglionilor limfatici mezenterici (MLN). E = enterocit; L = limfocit; m = macrofag/celulă dendritică (după Sminia, 1998).

O placă Peyer are 3 regiuni structurale: domul, foliculii cu centrii germinali (zona celulelor B) și aria parafoliculară (populată de celulele T, în special celule Th). Plăcile Peyer sunt populate inițial de limfocite T. Dezvoltarea centrilor germinali (ai limfocitelor B) este dependentă de antigenul microbiotei intestinale, pentru că la animalele germ-free, plăcile Peyer sunt slab dezvoltate și lipsesc centrii germinali. La organismele timentomizate neonatal și la cele congenital atimice,

ariile interfoliculare sunt sărace în limfocite T. Pentru completa dezvoltare a plăcilor Peyer, sunt necesare atât influențele stimulative ale timusului, cât și contactul cu microbiota intestinală.

Structurile limfoide asociate tractului digestiv sunt lipsite de învelișul capsular și de vasele limfatice aferente. În lipsa vaselor limfatice, lichidul interstițial care scaldă structurile limfoide îndeplinește funcția limfei aferente.

Limfocitele foliculare au raporturi de vecinătate cu epiteliul și de aceea se numesc foliculi asociați epiteliului. Foliculul limfoid, ca unitate structurală a plăcii Peyer, este străpuns de o arteriolă ascendentă, ce se termină într-o rețea capilară situată sub epiteliul folicular. Aceste capilare se continuă cu venulele postcapilare din ariile interfoliculare T-dependente.

Limfocitele libere, diseminate în mucoasa tractului digestiv au distribuție difuză. Ele se găsesc în lamina propria și în stratul epitelial al mucoasei, printre enterocite. Este o populație heterogenă de limfocite: cele din lamina propria sunt în proporții egale limfocite T și B, dar și un număr mare de plasmocite. În mucoasa intestinală se găsesc limfocite B, cu markerul IgE⁺, numărul lor fiind crescut la persoanele cu alergii alimentare. În submucoasa gastrointestinală, în special în vecinătatea vaselor de sânge, se găsesc mastocite cu receptori de mare afinitate pentru IgE.

Limfocitele intraepiteliale sunt în special limfocite T citotoxice(75%) și limfocite B, cu markerul IgA⁺. Majoritatea limfocitelor B sunt în curs de diferențiere spre plasmocite. Ele sunt primele care recunosc antigenele luminale ce traversează mucoasa pe o cale independentă de celulele M. Limfocitele T intraepiteliale mediază hipersensibilitatea întârziată cu specificitate de antigen și au funcție citotoxică.

Celulele limfoide din structurile organizate(plăcile Peyer) sunt neangajate. Ele au rolul de a iniția răspunsul imun, după interacțiunea cu antigenele care traversează celulele M. Limfocitele difuze din lamina propria sunt în mare parte activate, având funcția de a produce IgA.

Funcțiile MALT. Sistemul imunitar al mucoaselor are o funcționalitate precisă: să excludă antigenele exogene, înainte ca ele să pătrundă în mediul intern și să evite sau să minimalizeze expunerea aparatului imunitar sistemic, la antigenele moleculare sau celulare care tind să pătrundă în mediul intern. În același timp, țesutul limfoid asociat mucoaselor trebuie să rămână insensibil la microbiota normală a mucoaselor. MALT are calitatea de “zonă de control” a organismului, la contactul cu antigenele, dar are și rol reglator asupra funcționalității aparatului imunitar sistemic. Așa se explică faptul că administrarea orală a unui antigen la om sau animale, în esență, nu produce un răspuns imun sistemic, ci de obicei, un răspuns imun al mucoasei. Mecanismul nu este cunoscut, dar sistemul imunitar al mucoaselor împiedică răspunsul imun

amplu al aparatului imunitar sistemic, la un număr foarte mare de antigene intestinale, în special de origine alimentară. Antigenele complexe bacteriene sau virale pot iniția un răspuns imun complex, prin intermediul aparatului imunitar al mucoaselor. Deficiențele funcționale ale MALT expun organismul și aparatul imunitar sistemic, unei permanente stări de activare, care depășește limitele fiziologice, consecința fiind instalarea maladiilor autoimune.

Prin epiteliul folicular, microorganismele dobândesc acces la structurile limfoide ale foliculului. Consecința este benefică, deoarece, astfel se inițiază răspunsul imun protector față de microorganismele luminale. Din acest punct de vedere, celulele M formează un sistem de avertizare timpurie. Pătrunderea microorganismelor la nivelul epiteliului folicular are și consecințe nefavorabile, deoarece acesta poate fi o cale de acces a microorganismelor patogene (S.typhi), la structurile submucoase.

Limfocitele B din foliculii limfoizi ai plăcilor Peyer se găsesc într-o stare de proliferare activă. Totuși, numărul plasmocitelor este mic, ceea ce reflectă posibilitatea ca limfocitele B din structurile GALT, să migreze în alte mucoase, înainte de a se diferenția în plasmocite.

Tabel comparativ privind principalele caracteristici ale organelor limfoide primare și secundare

Organe limfoide primare

Organe limfoide secundare

Originea La zona de trecere între ectoderm și endoderm. Conțin celule derivate din ectoderm din mezoderm (limfocite) .In mezoderm

Momentul dezvoltării sau după naștere Foarte timpuriu în viața embrionară Tardivă în cursul vieții fetale

Rolul Sunt populate timpuriu cu celule precursorale ale limfocitelor și au rol în dobândirea competenței imunitare a acestora. Sunt populate tardiv numai de limfocite mature.

Durata funcției lor La adult suferă o involuție progresivă, care la vârstele înaintate este însoțită de o deficiență a funcțiilor imunitare. Persistă toată durata vieții

Activitatea mitotică a limfocitelor Este intensă și independentă de stimularea antigenică
Intensă numai după stimularea antigenică

Formarea centrilor germinativi de reacție Absentă Foarte intensă

Efectele extirpării precoce Reducerea numărului de limfocite și diminuarea rapidă a reactivității imunitare Nu este posibilă. După blocarea imunitară diminuează, dar totdeauna rămân celule imunocompetente.

Efectele extirpării tardive Reducerea numărului de limfocite și limitarea reactivității imunitare
Imposibilă

Funcția esențială Centre de proliferare, maturare și diseminare a limfocitelor. Focare ale răspunsului imun.

Fig. 48. Reprezentarea schematică a circuitului global al limfocitelor. (1) Limfoblastele din măduvă ajung pe cale sanguină în splină și timus. După maturare, limfocitele sunt eliberate în sânge. (2) Limfocitele mature intră în splină și o părăsesc. (3) Limfocitele mature pot intra în structurile MALT și în țesuturile periferice. (4) Limfocitele părăsesc MALT și țesutul periferic pe calea limfaticelor. (5) Limfocitele intră în ganglionul limfatic, trecând prin celulele specializate care câpтуșesc venulele postcapilare. (6) Limfocitele părăsesc ganglionul limfatic pe cale limfatică și reintră în sânge prin ductul toracic.

RECIRCULAREA LIMFOCITELOR

Organele limfoide primare (măduva oaselor, timusul, bursa lui Fabricius) au rolul de a produce limfocite mature neangajate (“virgine”). După ce părăsesc organele limfoide primare, limfocitele au proprietatea constitutivă de a recircula în organele limfoide secundare și în compartimentul terțiar nelimfoid, în absența stimulului inflamator.

Organele limfoide secundare sunt reprezentate de ganglionii limfatici, de splină și de structurile MALT. Funcția lor este de a acumula și prezenta antigenele, atât limfocitelor neangajate cât și celor de memorie.

Țesuturile nelimfoide ale compartimentului terțiar sunt reprezentate de restul țesuturilor organismului. În mod obișnuit, ele conțin puține celule limfoide, dar în focarele de inflamație se acumulează populații limfocitare numeroase, în special limfocite de memorie.

Țesutul limfoid secundar este suportul structural al reacțiilor celulare ale răspunsului imun. La acest nivel se produce contactul limfocitelor cu antigenul specific. Faptul impune, ca o condiție funcțională esențială, recircularea continuă a limfocitelor pentru a întâlni și a recunoaște antigenul. Din acest punct de vedere, limfocitele au o particularitate funcțională unică: părăsesc sângele ca și celulele mieloide (neutrofile, monocite), trec în organele limfoide secundare și în compartimentul terțiar, dar, spre deosebire de cele mieloide, se reîntorc în fluxul sanguin. Recircularea sânge-țesuturi limfoide secundare-sânge se repetă tot restul vieții limfocitelor și este independentă de stimularea antigenică. Milioane de limfocite trec zilnic prin fiecare organ limfoid secundar, astfel încât fiecare antigen pătruns în organism pe o cale sau alta, va fi expus întregului repertoriu de receptori de antigen ai limfocitelor.

Capacitatea limfocitelor de a recunoaște și de a coloniza anumite țesuturi limfoide a fost denumită ecotaxis sau homing.

Fig. 49. Recircularea limfocitelor și a celulelor prezentatoare de antigen. Limfocitele neangajate părăsesc timusul și migrează în organele limfoide secundare (splină, ganglioni limfatici). Celulele prezentatoare de antigen (celulele dendritice și fagocitele mononucleare), după ce părăsesc măduva, trec în sânge, apoi intră în țesuturi, înglobează antigenul și îl transportă în țesuturile limfoide pentru a fi prezentat celulelor T și B. Limfocitele activate migrează din țesuturile limfoide și se acumulează preferențial la situsurile infecției sau ale inflamației.

Mecanismele homing au un rol esențial în menținerea diviziunilor funcționale ale organelor limfoide și în orientarea limfocitelor mature neangajate și a celor de memorie. Recircularea realizează dispersia populațiilor de limfocite efectoare și de memorie, spre ariile cele mai expuse invaziei antigenice, dar realizează și supravegherea țesuturilor în raport cu prezența antigenelor.

Soluția naturală pentru această funcție a fost compartimentarea sistemului limfoid în organe individualizate și țesuturi care sunt conectate și unificate printr-un trafic limfocitar orientat și prin recirculare.

Recircularea limfocitelor este impusă de modul de organizare a sistemului limfoid: fiecare organ limfoid drenează un teritoriu definit al organismului. Astfel, antigenul injectat subcutan sau intradermic este transportat la ganglionii limfatici regionali. Antigenul injectat intravenos ajunge în splină, iar cele care pătrund la nivelul mucoaselor (digestivă, respiratorie, genito-urinară) ajung la structurile limfoide MALT (GALT și BALT).

Limfocitele care recunosc antigenul la nivelul țesuturilor limfoide secundare, se activează și inițiază răspunsul imun, iar cele care nu au întâlnit antigenul specific, trec prin țesuturile limfoide în câteva ore, se reîntorc în sânge pentru câteva minute și își reiau un nou circuit.

Celulele limfoide mature (competente) se găsesc concentrate în organele limfoide secundare. Cele din sânge constituie numai o porție mică din totalul limfocitelor.

Din totalul limfocitelor, numai o porție foarte mică, (2%) recirculă în unitatea de timp, pe traseul sânge → ganglionii limfatici → limfă → canal toracic → sânge, iar restul rămân în organele limfoide secundare.

Limfocitele cu cea mai înaltă rată de recirculării sunt celulele T de memorie. Limfocitele T și B neangajate (naive), recirculă cu o rată mult mai scăzută între organele limfoide secundare, până întâlnesc antigenul sau mor. Cele care au întâlnit antigenul specific, se activează. Una din primele consecințe ale activării este exprimarea intensă a unor molecule de suprafață, din categoria integrinelor, care mediază aderența fermă a limfocitului de componentele matricei extracelulare. Limfocitele care recunosc antigenul sunt reținute selectiv în organul limfoid secundar.

Efectul pe termen mai lung al stimulării antigenice este expansiunea clonală a limfocitelor și diferențierea lor în celule efectoare ale răspunsului imun și celule de memorie. Aceste categorii au proprietăți de migrare (homing) net diferite față de limfocitele neangajate.

Limfocitele efectoare și cele de memorie dobândesc capacitatea de a migra în compartimentul terțiar (adică în organele nelimfoide). Pe de altă parte, ele manifestă o selectivitate pronunțată a compartimentului de homing, adică după activare, recirculă preferențial în formațiuni limfoide de aceeași categorie cu cele care au fost activate la contactul primar cu antigenul.

Limfocitele T γ/δ recirculă preferențial în țesuturile epiteliale neinflamate.

Importanța fenomenului de homing. Fenomenul de homing este foarte important în procesul genezei embrionare a organelor limfoide primare, deoarece asigură migrarea în timus, respectiv în bursa lui Fabricius și echivalenții ei, a precursorilor limfocitelor T și B (pre-T și pre-B). Procesul recirculării permite ca limfocitele mature neangajate să dobândească acces la structurile care concentrează antigenele ce au pătruns pe cale tegumentară sau pe calea mucoaselor și să întâlnească epitopul specific. Limfocitele T activate, proliferază și se diferențiază. Atât cele activate, cât și cele de memorie manifestă selectivitate de organ, adică recirculă în același tip de organ limfoid secundar. Migrarea cu specificitate de organ, a celulelor T de memorie, mărește eficiența răspunsului imun, deoarece reîntâlnesc antigene asemănătoare celor care le-au indus activarea primară. Mecanismul migrării selective este puțin înțeles. Probabil implică mecanisme de trafic selectiv, controlat de molecule membranare. La organismul adult, limfocitele recoltate din ductul toracic migrează preferențial în MALT, iar cele din ganglionii limfatici se reîntorc în ganglioni, în ariile timo-dependente. Limfocitele T și B recoltate din splină, după transferul în organismul receptor, se distribuie în compartimentele T și B ale organelor limfoide secundare. Majoritatea limfocitelor din măduva osoasă, migrează în ariile timo-independente.

Ariile timo-independente (populate de limfocite B) ale organelor limfoide secundare sunt: foliculii cortexului extern din ganglionii limfatici, foliculii din plăcile Peyer și foliculii zonei periferice din pulpa albă a splinei.

Ariile timo-dependente (populate de limfocite T) sunt: cortexul profund al ganglionilor (paracortex), manșonul limfoid periarteriolear al pulpei albe a splinei și zonele interfoliculare ale plăcilor Peyer.

Bazele moleculare ale fenomenului de homing

Fig. 50. Secvența de evenimente ce reglează migrarea limfocitelor din sânge prin pereții venulelor cu endoteliu înalt (HEV), în organele limfoide. Mișcarea de rostogolire a limfocitelor pe suprafața celulelor endoteliale este convertită repede în aderență stabilă dependentă de integrine, în 1-3 s. Migrarea transendotelială a limfocitului aderent este reglată de un “stimul de migrație” exprimat de celulele endoteliale înalte. Bazele moleculare ale stadiului final al migrației prin membrana bazală nu se cunosc, dar probabil este reglată de chimioatracții eliberați de ganglionul limfatic (după Ager, 1998).

Fiziologia recirculării limfocitelor se bazează, în esență, pe reglarea proprietății lor de aderență și mobilizare. Limfocitele au proprietatea rară, de a-și regla proprietățile adezive, toată durata vieții. Dacă în sânge limfocitele nu trebuie să adere între ele sau de alte celule circulante și nici de endotelii, trecerea lor în spațiul extravascular necesită aderența fermă de celulele endoteliale.

Traficul limfocitar implică evenimente complexe, care duc la recrutarea celulelor din fluxul sanguin. Procesul implică încetinirea deplasării limfocitelor, la contactul cu endoteliul vascular, apoi aderența strânsă de celulele endoteliale, urmată de migrarea transendotelială.

Fenomenul migrării preferențiale a limfocitelor din sânge, în țesuturile limfoide specifice (homing), este explicat prin existența moleculelor cu rol de aderență, denumite generic adezine, atât pe suprafața limfocitelor cât și pe suprafața venulelor cu endoteliu înalt (HEV).

Adezinele suprafeței limfocitelor sunt receptori specifici de homing, iar cele de pe suprafața celulelor endoteliale ale venulelor au rol de antireceptori. Atât unele cât și altele aparțin familiei integrinelor. Ambele categorii de molecule mediază interacțiunea selectivă a celulelor sanguine cu endoteliul vascular, ca o condiție a migrării în țesuturi și se numesc selectine.

Selectina L se găsește pe suprafața celor mai multe leucocite circulante: limfocite, neutrofile, monocite. Spre deosebire de celelalte două tipuri (E,P), selectina L este exprimată constitutiv pe suprafața celulelor. Rolul ei este medierea tranzitului leucocitelor în situsul inflamator, dar și în orientarea specifică a recirculării constitutive spre ganglionii limfatici periferici.

Deoarece fenomenul recirculării limfocitelor este permanent, selectinele corespunzătoare sunt exprimate de asemenea permanent, atât pe celulele endoteliale ale venulelor cât și pe limfocite.

Interacțiunea limfocitelor cu selectinele endoteliale s-a studiat in vitro, prin incubarea limfocitelor cu secțiuni subțiri de țesut limfoid. Limfocitele se leagă specific de venulele cu endoteliu înalt (HEV) și în proporție nesemnificativă, de endoteliul altor vase sanguine.

Limfocitele B aderă preponderent de HEV din plăcile Peyer, iar limfocitele T aderă preferențial de HEV din ganglionii limfatici.

După legarea specifică a receptorilor limfocitari de antireceptorii celulelor endoteliale, se inițiază evenimentele al căror rezultat este extravazarea limfocitelor din țesuturile limfoide secundare.

Trecerea limfocitelor din fluxul sanguin, prin peretele vascular, are loc în mai multe etape:

- deschiderea joncțiunilor strânse dintre celulele endoteliale (în 5-10 minute);
- migrarea selectivă a limfocitelor T și B, în ariile caracteristice, în orele următoare.

Recircularea limfocitelor în structurile limfoide ale mucoaselor

Recircularea limfocitelor în structurile limfoide ale mucoaselor (GALT și MALT) are particularități distincte față de recircularea limfocitelor în celelalte organe limfoide secundare. Principala diferență constă în aceea că, într-o măsură importantă, sistemul imunitar al mucoaselor este separat din punct de vedere funcțional, de aparatul imunitar sistemic. Separarea este rezultatul modului preferențial de recirculare a limfocitelor în GALT și BALT și anume, limfoblastele generate în structurile limfoide ale tractului gastrointestinal circulă în ductul toracic și au tendința de a se reîntoarce în aceleași structuri limfoide.

Limfocitele recirculă în sânge și reintră în țesutul limfoid secundar. Celulele mature, neangajate, se distribuie aleatoriu în structurile MALT și asigură existența întregului repertoriu de receptori de antigen.

Limfa ductului toracic este calea finală comună a întregii cantități de limfă generată sub nivelul diafragmei, majoritatea având originea în teritoriul intestinal. În ductul toracic se găsesc limfocite mari (blaste). Celulele efectoare și de memorie manifestă un homing preferențial, care menține compartimentarea limfocitelor. Limfocitele stimulate și blastele generate în structurile MALT, după ce sunt descărcate în sânge, extravazează rapid în lamina propria și revin cu o mare probabilitate în aceleași structuri sau se distribuie în structuri limfoide omologe, asociate altor mucoase. Multe se transformă în plasmocite care sintetizează IgA. Pentru că celulele stimulate la nivelul tractului gastrointestinal recirculă spre alte situsuri mucoase (plămân, glande mamare, tractul urogenital) s-a propus conceptul de "sistem imunitar comun al mucoaselor". Chiar dacă proporția limfocitelor care recirculă preferențial la nivelul diferitelor mucoase (tractul respirator și urogenital) este limitată, fenomenul este foarte important, deoarece sugerează posibilitatea stimulării imunității protectoare generale, la toate situsurile mucoase, folosind un vaccin oral.

În plăcile Peyer și în foliculii limfatici solitari ai mucoasei gastrointestinale se găsesc preponderent limfocite B cu izotip IgA, dar și limfocite B cu izotip IgG și IgM. Preponderența

lor numerică se explică prin aceea că se leagă mai ferm de venulele cu endoteliu înalt, comparativ cu limfocitele T. După contactul cu antigenul, ele se activează, proliferază și se diferențiază. Totuși, în plăcile Peyer, practic nu există celule producătoare de anticorpi. Acest fapt denotă că plăcile Peyer sunt structuri limfoide specializate în medierea contactului dintre limfocite și antigenele tractului digestiv, dar celulele B după stimulare migrează din plăcile Peyer înainte de a se diferenția în plasmocite. Blastele rezultate din celulele B stimulate, părăsesc plăcile Peyer pe cale limfatică și ajung în ganglionii limfatici mezenterici. De aici, blastele migrează selectiv în mucoasa digestivă și respiratorie și constituie țesutul limfoid difuz.

Limfocitele T au o modalitate mai puțin restrictivă de a migra în mucoase. În structurile limfoide ale mucoasei, celulele T sunt minoritare. Rolul lor pare a fi limitat la efecte reglatoare asupra limfocitelor B.

În concluzie, recircularea limfocitelor B la nivelul mucoaselor este restrictivă, în sensul că celulele stimulate de antigene, în structurile limfoide ale mucoasei digestive au o tendință marcată de a recircula în structuri limfoide asociate mucoaselor. S-a avansat ipoteza unei specificități de organ a recirculării limfocitelor B. Cele activate în BALT vor recircula în mucoasa respiratorie, iar cele activate în GALT vor recircula la nivelul mucoasei digestive, asigurând o eficiență protectoare maximă.

Recircularea limfocitelor în compartimentul terțiar nelimfoid

Dintre țesuturile nelimfoide, cele mai cunoscute în privința raporturilor lor cu limfocitele sunt suprafețele epiteliale: epiteliul tegumentar și mucoasele tractului gastrointestinal, urogenital și respirator. Aceste structuri se caracterizează prin prezența a două componente limfoide distincte. Prima, evidențiată la șoarece, populează epiteliile în cursul dezvoltării embrionare. Acestea sunt limfocite cu localizare intraepitelială (IEL) și pentru a se diferenția sau pentru a se menține în această localizare, nu necesită contactul cu antigenul exogen. Se pare că limfocitele intraepiteliale își au originea direct în organele limfoide primare sau chiar în măduva osoasă, fără să necesite un stadiu de tranzit prin organele limfoide secundare. Fig. 51. Rolul MALT în inducerea sintezei IgA în mucoase. Inglobarea antigenului de către celulele M, declanșează răspunsul imun local. Limfocitele B IgA⁺ și Th CD4⁺, pe calea limfaticelor eferente, migrează în ganglionii limfatici mezenterici și apoi în ductul toracic, pentru a ajunge în sânge. Aceste celule migrează în situsurile în care IgA este molecula efectoare, unde are loc diferențierea finală, sinteza și transportul sIgA. Stimularea limfocitelor în MALT și exodul celulelor spre situsurile efectoare justifică denumirea de “sistem imunitar comun al mucoaselor”.

A II-a categorie de limfocite din structurile nelimfoide sunt, în special, limfocite T de memorie și limfocite efectoare care s-au activat în organele limfoide secundare. Ele au localizare intraepitelială sau se găsesc în țesutul conjunctiv subepitelial.

Celulele epiteliale reglează direct activitatea celulelor limfoide, atât prin proximitatea lor directă, cât și prin capacitatea de a sintetiza citochine, ce activează și/sau recrutează celulele efectoare.

Limfocitele intraepiteliale sunt, în primul rând celule T, cu receptor α - β sau γ - δ . Suprafața foarte mare a epiteliilor, trebuie să fie corelată cu existența mai multor IEL, decât alte tipuri de celule T. Majoritatea sunt bogate în granule citotoxice, ceea ce a dus la presupunerea că IEL recunosc și lizează celulele epiteliale infectate, formând prima linie de apărare. Este greu de explicat modul în care celulele T, cu o diversitate foarte largă a specificității de legare a receptorilor de antigen, recunosc epitopii specifici expuși pe suprafața celulelor epiteliale fixe. De aceea, s-a presupus că IEL recunosc semnalele de stress imunitar, și nu epitopii specifici ai agenților infecțioși. Semnalele sunt transmise de proteinele înrudite (MICA, MICB), dar distincte de moleculele CMH I. Aceste molecule nu prezintă antigenul, după modelul clasic al moleculelor CMH, ci IEL recunosc diferențele nivelului de exprimare a moleculelor MICA și MICB, pe suprafața celulelor normale și a celor stressate. Stimulii activării MICA și MICB pot fi de natură infecțioasă sau evenimente de transformare care pun în pericol integritatea organismului.

IEL sunt pozitive numai pentru CD8 α (CD8 α +, β -) sau sunt negative pentru ambii coreceptori (CD4- CD8 α -, β -). Se pare că epiteliile favorizează dezvoltarea extratimică a IEL, care vin direct din măduva osoasă.

Limfocitele asociate epiteliilor recirculă cu o rată scăzută, care poate fi constitutivă, dar se amplifică mult după stimularea antigenică locală.

În țesuturile nelimfoide, limfocitele T realizează controlul de calitate a moleculelor expuse pe suprafața celulelor tisulare. Dacă este detectată prezența antigenelor nonself (virale, tumorale sau induse chimic), limfocitele T inițiază răspunsul imun citotoxic.

ANTIGENELE COMPLEXULUI MAJOR

DE HISTOCOMPATIBILITATE (C M H)

Existența antigenelor de histocompatibilitate a fost dedusă din faptul că alogrefele tegumentare sau de organe, nu sunt viabile în organismul receptor. După 7-10 zile, țesutul transplantat se inflamează și curând după aceea, grefa este respinsă.

Respingerea grefei este de natură imunitară: sistemul imunitar al receptorului de grefă recunoaște ca nonself, anumite molecule ale celulelor grefei și se activează. Moleculele de suprafață ale celulelor grefate, recunoscute ca nonself, sunt denumite antigene de histocompatibilitate. Ele conferă individualitate biochimică fiecărui individ.

Antigenele de histocompatibilitate se definesc ca molecule ale suprafeței celulare și care, datorită diferențelor biochimice individuale sunt recunoscute de sistemul imunitar al unui organism cu un alotip diferit (cu o altă combinație de gene alele la situsul codificator).

Diversitatea biochimică la nivel individual a acestor molecule, stă la baza unicității biochimice a fiecărui individ uman și este determinată de o diversitate genetică corespunzătoare.

Deoarece se comportă ca antigene majore în organismul receptor de grefă, antigenele CMH se numesc și antigene de transplantare.

În funcție de capacitatea lor de a stimula răspunsul imun de respingere a grefei, antigenele CMH sunt tari și slabe.

Antigenele CMH tari reprezintă principala barieră în calea transplantului de țesuturi și organe. La șoarece, moleculele CMH tari aparțin sistemului H-2. Grefele de țesuturi și organe între organisme care diferă prin antigenele complexului H-2 ale suprafeței celulare sunt invariabil respinse în 10-14 zile. Antigenele tari aparțin claselor I și II.

Antigenele slabe (ușoare) sunt codificate de sistemul minor de histo-compatibilitate și determină respingerea lentă a grefei de piele, în circa 200 de zile.

La om, corespondentul sistemului molecular antigenic H-2 de la șoarece este complexul antigenic al sistemului HLA (Human Leucocyte Antigen). Denumirea semnifică faptul că moleculele sistemului au fost detectate inițial

(J. Dausset, 1958), pe suprafața leucocitelor.

Antigenele complexelor H-2 și HLA au o varietate antigenică individuală și de aceea natura lor chimică se poate studia numai în populații genetic pure (inbred) de șoarece, obținute prin împerecheri multiple între indivizii aceleiași descendențe.

Structura moleculară a antigenelor CMH clasa I

Antigenele codificate de genele CMH clasa I sunt glicoproteine de membrană, a căror regiune C-terminală se găsește în citoplasmă, iar cea N-terminală este expusă extracelular.

O moleculă CMH clasa I este alcătuită dintr-un lanț H (Heavy) polipeptidic glicozilat (45 kD), în asociație strânsă, necovalentă, cu β -2 microglobulina (12 kD), un polipeptid care se găsește și în ser.

Catena H este alcătuită din 339 aminoacizi, distribuiți în următoarele 5 domenii:

- trei domenii extracelulare, în regiunea N-terminală, notate cu α -1, α -2, α -3, fiecare cu câte 90 de aminoacizi. Sub acțiunea papainei, pot fi clivate de restul moleculei. Domeniile α -2 și α -3 prezintă legături S-S intracatenare și formează bucle de 63 și respectiv 86 aminoacizi; Fig.52.

Reprezentare schematică a structurii moleculelor CMH clasa I, ancorate în membrana citoplasmatică. Catena codificată de gena CMH prezintă 3 domenii globulare (α -1, α -2, α -3). Domeniul α -3 este asociat cu un peptid β -2 microglobulina, un mic peptid globular de 12 kD cu o structură terțiară asemănătoare unui domeniu al Ig, stabilizat printr-o punte S-S.

- domeniul transmembranar conține 25 resturi de aminoacizi hidrofobi, care traversează membrana. Imediat deasupra acestui domeniu se găsesc 5 aminoacizi bazici (Arg, Leu), tipici pentru proteinele legate de membrană, cu rolul de a ancora lanțul polipeptidic în membrană;

- domeniul hidrofil cito-plasmatic (30 de aminoacizi la om, 40 la șoarece), conține în special serină, unele resturi

fiind fosforilate, este implicat în transmiterea semnalului de la domeniile extracelulare, la mediatorii citoplasmatici. Acest domeniu conține resturi de cisteină cu rol în legarea prin intermediul punților S-S, de alte catene H sau de proteine citoplasmatic.

Componenta glucidică este alcătuită din două grupări, fiecare fiind formată din 12-15 resturi de zaharuri, atașate de domeniile α -1 și α -2. Sunt oligozaharide care conțin manoză, de care se leagă catene laterale de glucozamină și acid sialic.

Catena H are o regiune variabilă în jumătatea N-terminală, cu două subzone hipervariabile, care diferă prin mai mult de 60% din aminoacizi, de la un organism la altul, localizate în domeniile α -1 și α -2. Studiile prin difracție cu raze X ale domeniilor extracelulare, cristalizate după clivarea cu papaină arată că domeniile α -1 și α -2 sunt foarte asemănătoare ca secvență de amino-acizi și prin pliere formează împreună o cavitate moleculară, presupusă a fi situsul de legare stabilă a epitopului antigenic. Cavitatea, susținută de secvențe β -pliate ale aceluiași domenii α -1 și α -2, este ocupată de o moleculă lineară, care este un peptid ce cristalizează concomitent cu catena H. Situsul cavității, după ce leagă antigenul, formează un complex recunoscut de limfocitele TCD8. Restul catenei H corespunde regiunii constante.

Fig.53.a. Reprezentarea schematică în “ochi de pasăre” a suprafeței superioare a moleculei CMH clasa I umane, bazată pe structura obținută în cristalografie cu raze x. Secvențele β -pliate care formează baza cavității sunt marcate prin săgeți groase, orientate în direcția amino-carboxil. Secvențele α -helicale sunt reprezentate prin liniile groase spiralate. Suprafețele interne ale celor două helice și fața superioară a secvențelor β -pliate formează o cavitate. Cele două sfere negre reprezintă o legătură S-S intracatenară.

b. Vedere laterală a aceleiași molecule, care arată anatomia cavității și plierea domeniilor α -3 și β -2 m (4 catene β -pliate antiparalele pe o față și 3 pe cealaltă) (după Roitt, 1997)

β -2 microglobulina (β -2 m) (o globulină mică, ce migrează la electroforeză în regiunea β -2) a fost descoperită în 1968, în urina pacienților cu disfuncție renală provocată de intoxicația cronică cu cadmiu. Este sintetizată de majoritatea celulelor din organism. Conține circa 100 aminoacizi, cu ușoare variații numerice. Nu prezintă variabilitate detectabilă pe cale chimică sau imunologică și nu este glicozilată.

Ca și domeniul α -3 al catenei H, β -2 m prezintă omologie a secvenței de aminoacizi cu domeniile constante ale moleculei de Ig. Secvența de aminoacizi a β -2 m formează un singur domeniu stabilizat printr-o punte S-S, între două resturi de cisteină.

β -2 m se asociază necovalent cu lanțul H al moleculei CMH clasa I, prin interacțiunea cu domeniul α -3, dar studiile recente de cristalografie cu raze X, sugerează un contact extins cu toate cele trei domenii. Moleculele de β -2 m legate, se află în echilibru cantitativ cu cele din plasmă.

Asocierea celor două catene se face după terminarea sintezei lor și este o condiție obligatorie pentru transportul moleculelor CMH I de la reticulul endoplasmic la membrana citoplasmatică și pentru ancorarea lor în membrană. Celulele liniei Daudi (derivată din limfomul Burkitt), deși sintetizează catena H, nu exprimă molecule CMH I, deoarece nu sintetizează β -2 m.

Moleculele CMH I au un turnover constant. Cele vechi se eliberează și trec în circulație sau sunt endocitate și se sintetizează altele noi. Stabilitatea lor este condiționată de rata disocierii peptidului și β -2 m. Catenele H libere se denaturează și sunt degradate.

Moleculele CMH clasa I sunt adevărate "certIFICATE de identitate biochimică și genetică, pentru fiecare organism, datorită polimorfismului lor biochimic foarte accentuat. Ele veghează la păstrarea homeostaziei biochimice a organismului și devin ținta sistemului imunitar în următoarele situații:

după grefarea țesuturilor și organelor care poartă molecule incompatibile;

după ce se asociază cu antigenele virale, tumorale sau cu cele induse de agenții chimici;

după modificarea biochimică printr-un proces mutațional.

Structura moleculară a antigenelor CMH clasa II

Antigenele CMH clasa II-a sunt glicoproteine heterodimere de membrană, formate din două catene diferite, notate cu α și β .

Prin solubilizare cu detergent, aceste molecule se eliberează întregi. Lanțul α are 30-34 kD, iar lanțul β are 26-29 kD.

Fiecare catenă este formată din 4 domenii:

- două extracelulare, alcătuite din circa 90 de aminoacizi fiecare, notate cu α -1, α -2, respectiv β -1, β -2;

un domeniu transmembranar (circa 30 de aminoacizi);

un domeniu citoplasmatic (10-15 aminoacizi). Fig. 54. Reprezentarea schematică a moleculelor CMH clasa II-a. Molecula este formată din 2 catene diferite (α și β), legate necovalent, a căror extremitate C-terminală se inseră în citoplasmă. Cele două catene au câte două domenii globulare, asemănătoare cu domeniile Ig. Cu excepția domeniului α -1, toate celelalte sunt stabilizate printr-o punte S-S intracatenară. Cele două catene sunt glicozilate (după Roitt, 1997).

Domeniile α -1 și β -1 au o variabilitate accentuată a secvenței de aminoacizi. Ele se asociază pentru a forma o structură ce delimitează o cavitate în care este legat peptidul antigenic.

Domeniile α -2 și β -2 prezintă omologie a secvenței de aminoacizi, cu domeniile moleculei de Ig.

Domeniile α -2, β -1 și β -2 sunt stabilizate prin legături S-S, iar domeniile α -1, α -2 și β -2 sunt glicozilate. Gruparea glucidică conține manoză, galactoză, fucoză, glucozamină. Diferențele greutateii moleculare a celor două catene se datorează nivelului diferit de glicozilare.

Determinismul genetic al moleculelor CMH

Moleculele CMH sunt codificate de genele complexului major de histocompatibilitate. Calificativul "complex" este justificat de numărul mare de gene componente, iar cel de "major" semnifică importanța deosebită a moleculelor codificate de aceste gene, în realizarea unor funcții imunitare importante:

-elaborarea răspunsului imun

-respingerea grefelor de țesuturi și organe.

În raport cu tipul de proteine pe care le codifică, genele CMH aparțin clasei I și clasei a II-a.

La șoarece, genele CMH codificatoare ale moleculelor complexului antigenic H-2 sunt localizate pe cromosomul 17, într-un fragment de 2000-4000 kb perechi, suficient de mare pentru a codifica circa 200 de proteine de dimensiuni medii. În acest complex se găsesc 3 tipuri de gene descoperite independent:

-primul grup de gene (descoperit în anii '40) codifică antigenele "tari" de transplantare, care induc respingerea rapidă a grefelor de tegument și de organe, între indivizi neidentici genetic (aparțin unor alotipuri diferite). Acestea sunt genele CMH clasa I, care codifică moleculele CMH clasa I;

-al II-lea grup, denumite genele răspunsului imun (IR) codifică sinteza unor molecule care condiționează intensitatea răspunsului imun al organismului, slab sau puternic, față de un antigen. Genele IR codifică proteinele clasei a II-a de molecule CMH, denumite și molecule Ia (I associated);

-al III-lea set de gene ale complexului CMH codifică sinteza unor componente ale complementului.

La șoarece, moleculele CMH I sunt codificate de gene situate la extremitățile complexului genic H-2, notate K și D. Gena K are circa 55 de variante alelice. Fiecare variantă codifică proteine distincte.

Fig. 55. Reprezentare diagramatică a localizării subregiunilor genice CMH la șoarece și om și poziția genelor majore în aceste subregiuni. La om, locusurile genice clasa II-a sunt localizate între centromer și locusurile clasei I, ca și la alte specii de mamifere.

Complexul H-2 la șoarece (pe cromosomul 17).

Regiunea cromosomală	K	I	S	D
Clasa	I	II	III	I
Locusuri genice	K	A, E	C4, C2, Bf, TNF	D, L

La om, moleculele CMH clasa I sunt codificate de genele HLA, iar moleculele CMH II, de regiunea cromosomală D, localizate pe cromosomul 6.

Moleculele CMH I sunt codificate de trei gene: HLA-A, HLA-B, HLA-C. S-au descris genele HLA-E, -F, -G, -H și -J, dar acestea sunt considerate gene neclasice pentru că produsele lor de sinteză se deosebesc structural și funcțional de ale genelor HLA-A, -B și -C.

Moleculele CMH II sunt codificate de regiunea cromosomală HLA-D, ce aparține genelor clasei a II-a.

Genele clasei a III-a codifică sinteza aceluiași proteine plasmatice (C4, C2, Bf).

Complexul HLA (pe cromosomul 6).

Regiunea cromosomală	D	C4, C2, Bf	B C A E, F, G, H, J
Clasa	II	III	I Gene neclasice
Locusuri genice	DP, DQ, DR	C4, C2, Bf	B C A E, F, G, H, J

Genele HLA clasa I și II au cel mai înalt grad de polimorfism genetic dintre toți determinanții genici cunoscuți ai organismului uman:

HLA-A are 83 de alele

HLA-B, 185 de alele

HLA-C, 42 de alele.

Numărul alelelor este în continuă creștere pe măsură ce se identifică noi variante. Polimorfismul genic este consecința existenței a cel puțin două alele pentru un locus. Pe fiecare din cei doi cromosomi pereche, un individ prezintă 3 gene CMH diferite (HLA-A, HLA-B, HLA-C). Celulele umane prezintă 6 variante diferite de gene clasa I, câte trei de la fiecare părinte. Genele CMH I sunt codominante, astfel că pe suprafața fiecărei celule se exprimă produsele de sinteză ale ambelor alele parentale. Se sintetizează astfel 6 variante biochimice de molecule CMH I.

Într-o populație umană, moleculele CMH I și CMH II sunt foarte diferite din punct de vedere biochimic, ca o expresie a polimorfismului genic al indivizilor umani.

Antigenele HLA-A, B și C sunt antigenele majore recunoscute de sistemul imunitar al gazdei, în reacția de respingere a grefei. Cantitativ, moleculele HLA-C sunt inferioare față de HLA-A și HLA-B. Toate sunt capabile să prezinte antigenul. Moleculele CMH neclasice (E, F, G) nu prezintă antigenul.

Polimorfismul biochimic al moleculelor CMH I este limitat la domeniile $\alpha 1$ și $\alpha 2$, la nivelul secvențelor ce formează cavitatea moleculară.

Genele CMH II sunt localizate în regiunea HLA-D. Regiunea genică HLA-D controlează răspunsul limfocitelor în amestec. Specificitățile alelice ale genelor CMH II au fost definite prin tipizare limfocitară și aparțin locusurilor Dw și HLA-DP sau prin tipizare serologică și aparțin locusurilor HLA-DP, DQ, DR.

Regiunea D este divizată în trei subregiuni funcționale majore, care codifică moleculele DR, DQ și DP. În subregiunile DQ și DP se găsește o pereche de gene funcționale DQA1 și DQB1, respectiv DPA1 și DPB1, care codifică cele două catene (α și β) ale moleculei CMH II.

Subregiunea DR este mai complexă. Ea conține o singură genă pentru sinteza catenei α , DRA1 și una sau două gene pentru sinteza catenei β (DRB1, DRB3, DRB4 sau DRB5). Nr. alelelor

DRA1 2

DRB1 184

DRB3 11

DRB4 8

DRB5 12

DQA1 18

DQB1 31

DPA1 10

DPB1 77

Ca și genele codificatoare ale moleculelor CMH I, genele codificatoare ale moleculelor CMH II sunt codominante. Se sintetizează astfel 8 variante biochimice de molecule CMH II (deoarece sunt două gene codificatoare ale genei β pentru molecula HLA-DR).

Combinarea aleatorie a numărului mare de alele explică polimorfismul extensiv al moleculelor CMH într-o populație umană. Numărul combinațiilor genice posibile între aceste alele este evaluat la circa 1090, un număr cu mult mai mare decât al indivizilor umani care coexistă la un moment dat. În contextul existenței unui număr mare de gene alele codificatoare, posibilitatea ca doi indivizi neînruși să aibă proteine identice ale moleculelor CMH clasele I și II este mică. Nu există doi indivizi identici pentru toate cele 6 variante de molecule CMH I și pentru cele 8 variante de molecule CMH II.

Moleculele CMH I și II au rolul de a lega peptidele antigenice. O variantă moleculară poate să lege un număr limitat de peptide antigenice (de ordinul milioane), dar probabilitatea unei potriviri spațiale crește mult prin existența a 6 variante de molecule CMH I și a 8 variante de molecule CMH II.

Peptidul antigenic este legat deosebit de stabil în situsul cavitărilor al moleculelor CMH I și II.

Evaluarea diferențelor antigenice ale moleculelor CMH

Fiecare organism are o specificitate antigenică proprie conferită de moleculele CMH clasa I. Diferențele antigenice dintre indivizii alotipici ai unei specii, dependente de moleculele CMH I se evaluează serologic. Serul imun specific anti-molecule CMH se obține prin injectarea unei suspensii de leucocite, la un organism al aceleiași specii, diferit din punct de vedere genetic, adică un organism cu o altă combinație de gene alele codificatoare ale moleculelor CMH I. Organismul receptor sintetizează anticorpi față de antigenele HLA ale leucocitelor donorului, care se deosebesc de propriile sale molecule.

Specificitatea antigenică a unui organism poate să conste în prezența unei molecule antigenice pe sau în celulele sale, care nu există pe sau în celulele altor organisme sau se datorează unor diferențe structurale fine ale moleculelor de histocompatibilitate, prezente la toate organismele speciei, în variante genetice distincte.

Anticorpii anti-HLA se găsesc în serul femeilor multipare și se sintetizează ca rezultat al stimulărilor antigenice HLA de origine paternă, exprimate pe celulele fătului, dar absente pe suprafața celulelor organismului matern. Leucocitele fătului care străbat bariera placentară trec în circulația maternă și induc sinteza IgG, cu persistență îndelungată în circulație.

O altă sursă de ser imun anti-HLA o constituie pacienții politransfuzăți. Astfel ei se imunizează față de antigenele HLA alotipice de pe suprafața leucocitelor donatorilor de sânge.

Antiserurile HLA se pot obține prin imunizarea voluntarilor.

Diferențele antigenice dintre doi indivizi, determinate de moleculele CMH clasa II-a se evaluează prin capacitatea lor de a iniția reacția limfocitară mixtă (RLM). Limfocitele de la doi indivizi ce poartă alele diferite la locusul HLA-D sunt co-cultivate in vitro. Condiția reactivității limfocitare este diferența unei singure alele la locusul ce codifică aceste molecule.

Indivizii care au molecule CMH I identice nu reacționează serologic, dar dacă celulele lor diferă prin moleculele CMH II, codificate de alele diferite ale locusului HLA-D produc un răspuns intens în RLM.

Într-un amestec de celule limfoide homozigote aa și bb se activează ambele populații de limfocite, deoarece limfocitele aa reacționează față de antigenul b, iar limfocitele bb se activează față de antigenul a. Într-un amestec de limfocite homozigote aa, cu populația de limfocite heterozigote ab, răspund numai limfocitele aa. Răspunsul bidirecțional apare și în amestecul limfocitelor ac și ab.

De obicei se evaluează capacitatea limfocitelor receptorului de greafă de a se activa față de antigenele donorului și pentru a induce un răspuns unidirecțional, populația de limfocite a donorului este tratată cu mitomicină C (un inhibitor al sintezei ADN) sau este iradiată. Tratamentul nu modifică imunogenitatea celulelor. Funcția stimulatorie a celulelor limfoide este restrânsă la celulele specializate prezentatoare de antigen, radiorezistente și care nu se divid in vitro. Răspunsul celulelor în RLM este orientat exclusiv față de moleculele CMH I și II. Moleculele CMH II constituie un stimul primar esențial pentru RLM.

Moleculele CMH clasa I și II au rol esențial în elaborarea răspunsului imun, iar din punct de vedere antigenic, determină respingerea alogrefelor (grefe între indivizi ai aceleiași specii, dar aparținând unor alotipuri diferite).

Distribuția tisulară a moleculelor CMH I și II și semnificația lor evolutivă

Moleculele CMH I se găsesc pe suprafața majorității țesuturilor, pe celulele endoteliale ale capilarelor, iar leucocitele exprimă cea mai înaltă densitate a moleculelor CMH I: 1% din moleculele de suprafață ale membranei leucocitare sunt molecule HLA.

Moleculele CMH I au o densitate mai mică pe suprafața celulelor hepatice, din plămân, rinichi și sunt foarte diluate pe suprafața celulelor musculare și a celor mai multe glande endocrine (cu excepția suprarenalelor).

Moleculele CMH II sunt exprimate predominant, pe suprafața limfocitelor B și pe celulele specializate pentru prelucrarea și prezentarea antigenelor: celulele seriei monocit-macrofag, celulele endoteliale ale capilarelor sanguine și limfatice, celulele Kupffer, celulele dendritice, eozinofile, microglia SNC.

Moleculele CMH lipsesc pe eritrocite, pe celulele endoteliului corneean, pe componenta exocrină a pancreasului, pe celulele acinare ale glandelor parotide, pe neuronii SNC, pe celulele endoteliale ale capilarelor SNC, pe țesutul placentar.

În condiții normale, o formă solubilă de molecule HLA se găsește în plasmă. Nivelul ei crește marcat în timpul infecției virale, probabil datorită creșterii ratei sintezei moleculelor HLA, stimulată de interferon și de alte citochine.

Intensitatea exprimării moleculelor CMH II este variabilă, fiind controlată de diferiți factori: interferonul γ și IL-2, sintetizați de limfocitele T, amplifică nivelul de exprimare a moleculelor CMH II, iar PGE2, glucocorticoizii, α -fetoproteina, LPS din bacteriile Gram negative, diminuează densitatea acestor molecule, având astfel rol imunosupresor.

Limfocitele B și celulele tumorale secretă molecule CMH II.

Privită în perspectiva evoluției, existența moleculelor CMH nu semnifică respingerea grefelor de țesuturi și organe, deoarece acestea nu se realizează în mod natural, ci au fost introduse în practica medicală a ultimelor decenii. În sens evolutiv, existența moleculelor CMH ar putea fi atribuită necesității organismelor de a semnaliza rapid, celulele care prezintă molecule antigenice pe suprafața lor: celulele infectate cu virusuri sau cele transformate malign. În acest context, moleculele CMH au o semnificație deosebită: pentru supraviețuirea organismului, liza celulelor purtătoare de molecule nonself trebuie să fie rapidă, înainte ca virusul să se multiplice și respectiv, înainte ca celula malignă să se dividă și să formeze o microtumoră.

Pentru ca intervenția limfocitelor Tc să fie eficientă, este necesar ca moleculele CMH să fie prezente pe oricare celulă ce poate fi infectată de un virus sau poate să fie transformată malign. Pe de altă parte, moleculele CMH, al căror rol esențial este acela de a prezenta epitopii nonself, trebuie să permită acțiunea eficientă și rapidă a limfocitelor Tc.

Moleculele CMH îndeplinesc și funcții neimune. Moleculele CMH I sunt componente ale receptorilor de hormoni. De exemplu, linia celulară stabilizată Daudi nu exprimă moleculele CMH I și nu are nici receptor pentru insulină, deoarece nu sintetizează β 2-microglobulina.

RĂSPUNSUL IMUN

Organismul, ca sistem funcțional este echilibrat atâta timp cât informația antigenică pe care o primește, este identică cu cea proprie. Față de moleculele străine, care se abat de la modelul informațional propriu, sistemul imunitar răspunde prin activarea mecanismelor de recunoaștere pentru a îndepărta moleculele nonself.

Ansamblul fenomenelor complexe în cascadă, declanșate de interacțiunea specifică a sistemului imunitar cu antigenul, în cursul căreia celulele imunocompetente se activează, proliferază și se diferențiază în celule efectoare și celule de memorie, constituie răspunsul imun.

Funcționalitatea sistemului imunitar se suprapune parțial, modelului general al arcului reflex, deoarece presupune existența unui flux informațional care corespunde unui excitant specific (Ag) față de un receptor (limfocitele), o cale aferentă (celulele care înglobează și prelucrează Ag), un organ central (celulele limfoide dintr-un organ limfoid secundar) și efectorii răspunsului imun (anticorpi, celule efectoare).

Asemănările dintre sistemul imunitar și sistemul nervos se extind și asupra altor particularități:

- sistemul imunitar este dotat, ca și sistemul nervos, cu “inteligență” (capacitatea de a recepționa un număr mare de stimuli (adică de a recunoaște un număr mare de determinanți antigenici diferiți) și de a prelucra informație chimică. Sistemul nervos prelucrează informație senzorială, iar sistemul imunitar recunoaște și prelucrează informație moleculară. “Inteligența” sistemului imunitar se manifestă discontinuu, în funcție de agresiunile antigenice asupra organismului;

- “educația” sistemului imunitar (adică stocarea informației antigenice primită prin stimulări repetate), ca și în cazul sistemului nervos, începe după naștere;

- ambele sisteme “învață” prin experiență, pentru că ambele sunt dotate cu memorie, care poate fi consolidată prin repetarea stimulului. Memoria ambelor sisteme este înscrisă în modificări moleculare persistente ale rețelei, dar nu poate fi transmisă la descendenți;

- ambele sisteme sunt organizate după modelul unei complexe rețele celulare și moleculare.

Între cele două sisteme există și deosebiri: sistemul nervos recepționează stimuli de orice natură, care acționează la nivelul întregului organism, iar sistemul imunitar recunoaște și reacționează numai la stimuli de natură moleculară, care tind să perturbe echilibrul chimic al organismului.

PARTICULARITĂȚILE GENERALE ALE RĂSPUNSULUI IMUN

Elaborarea răspunsului imun față de o substanță nonself este un proces fiziologic care se caracterizează printr-o mare eficiență și suplețe și are următoarele particularități generale:

- funcția imună are caracter adaptativ, care decurge din orientarea specifică a reacțiilor sale față de o substanță nonself. Caracterul adaptativ al răspunsului imun implică mobilizarea unor celule preprogramate care așteaptă să fie activate de un anumit antigen, corespunzător specificității lor;

- caracterul foarte economic al funcției imunitare derivă din specificitatea acțiunii sale. În timpul răspunsului imun se selecționează și se activează numai clonele de limfocite care au recunoscut specific epitopii antigenului, toate celelalte clone rămânând disponibile pentru alte interacțiuni;

- eficiența funcției imune derivă din caracterul foarte economic al mijloacelor celulare și moleculare pe care le mobilizează și din capacitatea de a amplifica efectorii săi, pe două căi;

- a) proliferarea masivă (circa 8 generații celulare) a celulelor selecționate sub acțiunea stimuloare a substanței nonself. După activare se produc modificări funcționale calitative ale acestor celule, de diferențiere proliferativă și maturare, rezultatul fiind generarea celulelor efectoare cu mare capacitate de acțiune și a celulelor de memorie;

- b) celulele efectoare produc cantități mari de molecule de recunoaștere, sub forma receptorilor specifici față de substanța nonself;

- caracterul de rețea a celulelor activate în răspunsul imun, conectate prin mediatori moleculari (interleuchine) și care condiționează eficiența răspunsului imun;

- celulele sistemului imunitar cooperează stimulator cu numeroase alte categorii de celule, capabile la rândul lor să confere rezistență organismului. Cooperarea are loc, inclusiv cu factorii nespecifici (înăscuți) ai rezistenței (fagocitele, proteinele sistemului complement, molecule bactericide sau bacteriolitice din plasmă);

- răspunsul imun adaptativ necesită o perioadă de timp pentru activarea și proliferarea limfocitelor care au recunoscut antigenul, în timp ce reacțiile neadaptative sunt prompte;

- răspunsul imun adaptativ asigură protecția organismului și a descendenților săi, prin transferul placentar al anticorpilor și prin secreția lactată;

- răspunsul imun adaptativ are o proprietate fundamentală unică - memoria imună - consecință a experienței antigenice individuale, netransmisibilă la descendenți.

Răspunsul imun este rezultatul cooperării unui număr restrâns de tipuri celulare și moleculare.

În funcție de predominanța componentei celulare sau moleculare în compartimentul efector al răspunsului imun, se disting două tipuri de reactivitate imunitară.

1. Răspunsul imun mediat humoral (RIMH), care se caracterizează în esență, prin sinteza anticorpilor ca molecule efectoare. Efectele RIMH sunt următoarele:

- neutralizarea toxinelor și a infecțiozității particulelor virale

- opsonizarea antigenelor celulare (bacterii, celule eucariote)

- legarea antigenelor moleculare în complexe Ag-Ac și eliminarea lor.

Imunitatea mediată humoral este transferabilă de la un organism la altul prin intermediul serului. RIMH este protector față de infecțiile bacteriene (în special piogene), față de reinfecțiile virale și față de antigenele moleculare pe care le neutralizează.

2. Răspunsul imun mediat celular (RIMC) se caracterizează prin aceea că, după pătrunderea antigenului, de regulă celular, sistemul imunitar mobilizează celule specializate, care atacă antigenul țintă. Atacul se realizează fie prin contact celular direct între limfocitele T efectoare și celula țintă, fie prin mediatori moleculari.

Răspunsul imun mediat celular este declanșat de antigene care se exprimă pe suprafața celulelor:

- antigene virale exprimate pe suprafața celulelor infectate, în special după infecția virală primară;

- antigene fungice;

- antigene exprimate pe suprafața celulelor infectate de bacteriile cu localizare intracelulară obligată (*Rickettsia*, *Coxiella*, *Chlamydia*) sau facultativ intracelulară (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *Brucella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*), în special în macrofage;

- antigenele tumorale;

- antigenele celulare din grefele de țesuturi și organe alogene.

Existența celor două compartimente ale răspunsului imun este argumentată de rezultatele experimentale, dar și de observațiile clinice, adevărate “experiențe ale naturii”, asupra unor indivizi cu afecțiuni determinate de incapacitatea RIMH sau RIMC.

Sindromul Di George se caracterizează prin aplazia congenitală a timusului și paratiroidelor. Bolnavilor le lipsește reactivitatea față de antigenele care mobilizează IMC și de aceea sunt sensibili la infecțiile virale, fungice și la cele produse de bacterii cu localizare intracelulară. Sinteza și titrul Ig serice sunt normale.

Hipo- și agamaglobulinemia congenitală de tip Bruton este o afecțiune congenitală determinată de gena tirozin-kinazei, situată pe cromosomul X, care afectează diferențierea celulelor limfoide B și produce imunodeficiența X lincată (Xid). Celulele B în sânge sunt rare, deși numărul limfocitelor pre-B în măduva osoasă nu este semnificativ redus, ceea ce sugerează o moarte celulară crescută la tranziția pre-B-B. Deficiența clinică constă în incapacitatea de a sintetiza anticorpi și din această cauză, copiii, după 3-6 luni de viață, fac infecții repetate și recurente cu bacterii Gram pozitive și prezintă manifestări ale maladiilor autoimune. Reactivitatea IMC rămâne nemodificată, pentru că organismul își păstrează rezistența față de infecțiile virale și față de bacteriile Gram negative. Separarea celor două compartimente ale răspunsului imun, humoral și celular, este artificială, deoarece între ele este o condiționare reciprocă și profundă: anticorpii au funcție opsonizantă, favorizând astfel IMC, iar pe de altă parte, IMC este mediata de numeroși factori solubili. Cele două compartimente interacționează sinergic pentru producerea unui răspuns imun eficient. Totuși, separarea este menținută deoarece reflectă diferențele fundamentale ale mecanismelor de acțiune ale celor două populații de limfocite: limfocitele B pentru RIMH și limfocitele T pentru RIMC.

Nici un antigen nu induce un răspuns imun pur, humoral sau celular. Totdeauna răspunsul imun este mixt, cu predominanța unuia sau a celuilalt dintre compartimente.

ETAPELE RĂSPUNSULUI IMUN

Răspunsul imun este rezultatul succesiunii următoarelor etape:

- pătrunderea antigenului în organism și înglobarea lui de către celulele accesorii;
- prelucrarea antigenului și prezentarea epitopilor pe suprafața celulelor accesorii;
- recunoașterea specifică a componentelor nonself și activarea celulelor efectoare;
- producerea efectorilor răspunsului imun.

Pătrunderea antigenului în organism se realizează pe diferite căi:

- pe cale cutanată
- pe calea circulației sanguine
- pe calea mucoaselor(respiratorie, gastro-intestinală și urogenitală).

Epiteliul tegumentar și mucoasele reprezintă o suprafață foarte mare, expusă la o mare diversitate de substanțe antigenice. Tegumentul este o barieră mecanică față de cele mai multe antigene, iar mucoasele sunt protejate, în primul rând, de IgA din secreții. Epiteliul tegumentar și

epiteliile mucoaselor au rol în fenomenul “excluderii antigenice”. Schimbul liber între mediul extern și cel intern are loc numai în situații patologice.

Elaborarea răspunsului imun este, în esență, rezultatul cooperării a două categorii de celule: celulele accesorii ale răspunsului imun și celulele limfoide.

Antigenul este recunoscut de celule specializate funcțional și înglobat, cel mai adesea prin acțiunea unor mecanisme nespecifice, de celulele accesorii, cu rolul de a prelucra și de a prezenta antigenul.

Celulele prezentatoare de antigen (CPA)

Celulele accesorii au rol esențial în elaborarea răspunsului imun, datorită capacității lor de a îngloba substanțele străine, de a le prelucra și de a le prezenta limfocitelor, de a fagocita celulele opsonizate și de a sintetiza substanțe imunomodulatoare. Prezentarea antigenului este treapta obligatorie care precede recunoașterea antigenelor proteice de către celulele T.

Orice celulă care poartă pe suprafața ei molecule CMH poate să participe la elaborarea răspunsului imun. Celulele prezentatoare de antigen au următoarele proprietăți: preiau antigenele, le internalizează și le prelucrează; exprimă moleculele CMH I și II; exprimă moleculele de aderență care favorizează interacțiunea cu limfocitele; produc molecule stimulatorie ale creșterii și diferențierii limfocitelor T; eliberează citochine.

Cele mai importante celule accesorii pentru elaborarea răspunsului imun sunt macrofagele. In vivo, macrofagul participă decisiv la procesul de imunogeneză. Indiferent de calea de pătrundere în organism, antigenele sunt captate de celule accesorii, cel mai adesea, de macrofag.

Cea mai mare parte a antigenelor circulante sunt eliminate înainte de a declanșa răspunsul imun, în primul rând de celulele Kupffer, localizate pe fața luminală a capilarelor sinusoidale din ficat. La nivelul ficatului se elimină circa 90% din totalul antigenelor circulante (bacteriile care străbat bariera mucoasei digestive, endotoxinele absorbite la nivelul colonului, antigenele de origine alimentară).

Alte celule specializate, cu rol major în prezentarea antigenului sunt celulele dendritice și limfocitele B.

Celulele dendritice fac parte dintr-o familie care cuprinde următoarele tipuri de celule:

- celulele Langerhans, localizate în epiderm, dar și în mucoase (orală, nazală, esofagiană, bronșică, în mucoasa traheii)

- celulele cu voal, din limfa aferentă

- celulele dendritice, din epiderm, din epiteliile mucoaselor, din organele limfoide și din sânge

- celulele interdigitate, din aria paracorticală a ganglionilor limfatici.

Originea acestor celule nu este certă, dar se admite următoarea filiație: monocitul sanguin, celula Langerhans din epiderm, celula cu voal din limfa aferentă ganglionului limfatic, celula dendritică din derm, din organele limfoide și din sânge.

Celulele dendritice s-au izolat din organele limfoide și din sânge, pe baza capacității lor de a adera de suport (ceea ce permite eliminarea limfocitelor din amestec) și de a-și pierde aderența după 24 de ore de cultivare. Rolul lor în prezentarea antigenului este argumentat de faptul că stimulează intens reacția limfocitară mixtă.

Celulele dendritice au rol foarte important pentru inițierea răspunsului imun. Sunt larg distribuite în țesuturile limfoide și nelimfoide la toate speciile de mamifere studiate. Precursorii celulelor dendritice și ai macrofagelor sunt localizați în măduva osoasă, iar monocitul este un stadiu comun, înainte de diferențierea pe cele două linii. Monocitul trece în sânge, de unde se diseminează în țesuturile nelimfoide (epiderm, epiteliul tractului respirator, gastrointestinal, urogenital) și se diferențiază în celulă dendritică. În tegument, celulele dendritice și celulele Langerhans formează o rețea ramificată în tot epidermul. Ele au capacități optime de captare și prelucrare a antigenelor, care pătrund pe cale tegumentară. După maturare, favorizată de citochinele produse local, migrează din țesuturile nelimfoide, în țesuturile limfoide secundare. Migrarea din epiteliu are loc pe cale limfatică, până în ganglionii limfatici regionali, iar cele din spațiile interstițiale migrează pe cale sanguină în splină. În timus, celulele dendritice prezintă

complexele CMH-peptide, timocitelor care își dobândesc competența imunitară, pentru inducerea toleranței imune.

Celulele acestei familii nu au receptori pentru Fc și nici pentru C3, dar exprimă la un nivel ridicat, moleculele CMH I și II.

Celulele Langerhans reprezintă 2-8% din totalul celulelor epidermice și formează o rețea printre cheratinocitele straturilor profunde. Ele reprezintă celulele dendritice imature și exprimă nivele mai mari de molecule CMH II. Sunt capabile să preia antigenul exogen prin intermediul moleculelor de suprafață, fiind celule prezentatoare de antigen foarte eficiente. Celulele Langerhans pot să prezinte antigenul local, în epiderm, sau pot să se mobilizeze, să părăsească stratul bazal și să migreze pe cale limfatică, până în ganglionii regionali. În timpul migrării, celulele au prelungiri membranare și se numesc celule cu voal. În ganglionul limfatic, ele se distribuie în aria paracorticală(cortexul profund) și devin celule dendritice și celule interdigitate (o variantă morfologică cu prelungiri mai scurte), având rol esențial în prezentarea antigenelor și activarea limfocitelor T. Celulele Langerhans, celulele cu voal și celulele interdigitate sunt stadii diferite ale liniei celulelor dendritice.

Celulele acestei familii nu au proprietăți fagocitare. Totuși, li se atribuie un rol important în procesul prelucrării antigenelor. Antigenele rămân legate la nivelul membranei celulare și sunt prelucrate prin intermediul ectoproteazelor pe care le secretă. Iradierea tegumentului cu raze UV duce la dispariția celulelor Langerhans.

Limfocitul B este celula efectoră a RIMH, dar are și rolul de captare și prezentare a antigenului specific. Eficiența sa în captarea antigenului este maximă, deoarece receptorul imunoglobulinic leagă specific epitopii corespunzători chiar la concentrații foarte mici, de 1000 de ori mai mici decât cele necesare prezentării sale de către macrofag sau de către celula dendritică.

Limfocitul B recunoaște și prezintă numai antigenele moleculare mici (peptide). Probabil că proteinele mari nu le sunt accesibile. Există dovezi că antigenul peptidic legat la suprafața limfocitului B, prin intermediul receptorului imunoglobulinic specific, este endocitat, prelucrat în compartimentul acid și prezentat în asociație cu moleculele CMH II, pentru a fi recunoscut de limfocitele T. Limfocitele B exprimă nivele relativ înalte ale moleculelor CMH II. Rolul lor de captare și eventual, prelucrare a antigenului este semnificativ la contactul secundar cu antigenul.

Cele mai importante celule, cu funcția de captare și prelucrare a antigenului sunt macrofagele și celulele dendritice.

Prima treaptă a interacțiunii antigenului exogen cu CPA (macrofag, celula dendritică) este legarea nespecifică, necovalentă, cu structuri nedeterminate ale suprafeței celulare. Antigenele din complexe imune sunt recunoscute de CPA prin intermediul receptorilor pentru Fc și C3.

După ce a pătruns în organism, antigenul este repede înglobat și depozitat în interiorul macrofagului. Scoaterea antigenului din circulație are o semnificație funcțională deosebită, deoarece constituie un depozit din care este eliberat treptat și stimulează imunogeneza. Antigenul liber în organism poate să inducă una din cele două stări defavorabile pentru reactivitatea imunitară:

- poate fi eliminat prea rapid din organism, înainte de stimularea răspunsului imun;
- dozele prea mari de antigen liber sunt defavorabile reactivității imunitare, prin blocarea răspunsului limfocitelor.

Starea caracterizată prin incapacitatea de răspuns imun a organismului se numește paralizie imunologică. Este o stare de blocare completă a reactivității imunitare prin “inundație antigenică”.

Antigenele moleculare sau particulate cu o bună imunogenitate sunt reținute parțial în macrofag sub o formă rezistentă la degradare, pentru perioade mai lungi de timp.

Macrofagele modifică imunogenitatea antigenelor: după legarea de macrofag, cele slab imunogene devin mai imunogene, iar cele cu imunogenitate ridicată, după legarea de macrofag își pierd parțial această calitate.

Prelucrarea antigenelor

Prelucrarea antigenelor exogene este o etapă obligatorie deoarece limfocitele T (Th și Tc) nu recunosc și nu preiau direct informația antigenică nativă. Limfocitele T recunosc numai informația antigenică prezentată pe suprafața CPA. Celulele accesorii ale răspunsului imun

prelucrează antigenele moleculare mari și pe cele particulare. Din punct de vedere biochimic, prelucrarea semnifică deplierea, clivarea proteinelor și generarea peptidelor, ca rezultat al unei proteolize parțiale. Prelucrarea antigenului exogen de către celulele prezentatoare, parcurge următoarele etape: internalizarea antigenului în veziculele membranare acide; proteoliza parțială; cuplarea cu moleculele CMH; transportul la nivelul membranei plasmatică.

Gradul prelucrării antigenului este dependent de natura sa. Intervalul de prelucrare este de 45-60 minute. Durata s-a determinat prin inactivarea metabolică a macrofagelor cu paraformaldehidă, la diferite intervale de timp după contactul cu antigenul.

Experiențele cu antigen marcat au evidențiat că în CPA, materialul imunogen are două destinații: o parte este expusă pe suprafața celulei și este recunoscută de celulele T, iar o altă parte este sechestrată în celulă, de unde este eliminată activ în mediul extracelular și este preluată de alte CPA.

Principalul mecanism degradativ care are loc în CPA este proteoliza lizosomală. Concluzia a fost dedusă experimental: amoniacul și cloroquina (substanțe lizosomotrope) se acumulează în lizosomi și blochează activitatea enzimelor prin creșterea pH lizosomal. Macrofagele astfel tratate sunt incapabile să prezinte antigenele proteice sau bacteriene. Cloroquina blochează numai etapa prelucrării antigenului, dar nu și recunoașterea sa de către limfocitele T, deoarece administrarea ei după o oră de la contactul macrofagelor cu antigenul, a rămas fără efect. Cloroquina a blocat prezentarea antigenului de către celulele dendritice, deși ele nu sunt fagocitare in vitro și au un echipament lizosomal puțin dezvoltat. S-a dedus că ele prelucrează antigenul la suprafață, prin intermediul ectoproteazelor membranare, deși nu există dovezi directe în acest sens.

Prezentarea antigenelor și asocierea cu moleculele CMH I nu este sensibilă la acțiunea substanțelor lizosomotrope alcalinizante.

Proteinazele cisteinice (funcționează prin intermediari covalenți enzimă-substrat) sunt importante pentru prelucrarea antigenelor proteice, așa cum s-a demonstrat cu antigene sintetice.

Proteoliza rapidă și extensivă este cauza slabei imunogenități a unor antigene (sau chiar a absenței imunogenității). Unele antigene sintetice (copolimerul L-acid glutamic-L-alanină) sunt mult mai imunogene după inhibarea acțiunii proteinazelor cisteinice.

Mecanismele moleculare ale prelucrării antigenelor sunt puțin cunoscute. În macrofage se produce o digestie selectivă a antigenului, în urma căreia o parte din epitopi se păstrează, dar cea mai mare parte a antigenului este complet degradată.

Complexitatea antigenului condiționează numărul de peptide cu rol de epitopi, care derivă prin procesul de prelucrare și care pot fi legate de moleculele CMH. Dacă antigenul este o bacterie, numărul de epitopi este nedeterminat și specificitatea lor antigenică este variabilă, în funcție de complexitatea aparatului enzimatic hidrolitic al celulei care prelucrează antigenul.

Nu toate antigenele necesită proteoliza (fragmentarea) prealabilă recunoașterii de către celulele T. Uneori este suficientă numai denaturarea (deplierea) proteinelor pentru ca antigenul să fie prezentat de CPA, chiar tratate cu cloroquină.

Forma sub care limfocitele T recunosc antigenele, depinde atât de natura CPA, dar în special de natura antigenului.

Majoritatea proteinelor sunt rapid endocitate și prelucrate, dar unele sunt legate de membrana celulei și prezentate în stare nativă, fără o prelucrare prealabilă. Antigenele peptidice mici (insulina, angiotensina) pot fi recunoscute în formă nativă, de unele subpopulații de limfocite T, în timp ce altele recunosc formele prelucrate ale acestorași antigene.

Dimensiunea și configurația spațială a moleculei de antigen sunt hotărâtoare în ceea ce privește gradul prelucrării sale, înainte de a fi prezentat. De regulă, moleculele mari necesită prelucrarea prealabilă, iar cele mici sunt prezentate în formă nativă.

Forma chimică a antigenului, după prelucrare, nu este cunoscută cu certitudine. Foarte probabil, este un polipeptid de dimensiuni mici (9-20 aminoacizi).

După alți autori, prelucrarea nu este necesară pentru ca antigenul să fie prezentat limfocitelor T, dar totdeauna este necesară conversia sa la o formă care să-i permită interacțiunea cu moleculele CMH II ale CPA și cu receptorii limfocitelor T. Dovada este adusă de faptul că liposomii cu molecule CMH II inserate în stratul lipidic, la care s-au atașat o varietate de antigene proteice native, stimulează clonele de limfocite T in vitro, în absența completă a CPA.

Epitopii antigenelor peptidice exogene sunt expuși la suprafața CPA, în asociație cu moleculele CMH clasa II, iar epitopii antigenelor de origine endogenă sunt prezentați în asociație cu moleculele CMH clasa I.

Rolul moleculelor CMH în prezentarea antigenelor

Răspunsul imun este rezultatul interacțiunilor complexe între celulele care prezintă antigenele și limfocitele T și B.

Prezentarea antigenelor este o etapă obligatorie a elaborării răspunsului imun, ce derivă din faptul că limfocitele nu interacționează direct cu antigenele în stare nativă, ci numai după ce acestea au fost prelucrate și prezentate pe suprafața unei celule.

Moleculele CMH îndeplinesc funcția de prezentare a antigenelor și au un rol esențial în declanșarea răspunsului imun.

Pentru a deveni disponibili interacțiunii cu receptorii de antigen ai limfocitelor, epitopii sunt asociați intracelular, cu moleculele CMH I sau II și sunt transportați la suprafața CPA ca fragmente peptidice sau ca proteine intacte, în funcție de natura și de mărimea antigenului. Fig. 56. Prelucrarea și prezentarea antigenului exogen, în asociație cu moleculele CMH II. Moleculele CMH II, cu catena invariantă, sunt asamblate în reticulul endoplasmic (RE) și transportate prin rețeaua Golgi, de unde sunt orientate spre vezicula endosomală, care conține proteină degradată parțial, derivată din antigenul exogen. Degradarea catenei invariante, face posibilă asocierea peptidului antigenic cu molecula dimerică (DM). Complexul este transportat la suprafața celulei și este recunoscut de limfocitele Th.

Moleculele CMH I și II au capacitatea funcțională de a lega și de a expune pe suprafața celulei, un număr nelimitat de peptide diferite. Complexul format de moleculele CMH I sau II și epitopul peptidic este recunoscut de limfocitele T.

Nu se cunoaște modalitatea interacțiunii dintre moleculele CMH și epitopii antigenici. Ar putea fi o interacțiune fermă sau moleculele CMH au numai rolul de suport pentru epitopii antigenici.

Se acceptă ideea unei ierarhii a epitopilor cu privire la ordinea legării competitive de moleculele CMH, datorită sensibilității diferențiate la proteaze. Rezultă peptide cu afinitate diferită față de situsul de legare a moleculelor CMH. Astfel, există epitopi dominanți, care se asociază cu mare probabilitate de moleculă CMH, epitopi subdominanți, cu mai puține șanse de asociere cu moleculele CMH și epitopi criptici, care se asociază rareori în complexe cu moleculele CMH și care nu devin accesibili limfocitelor T potențial reactive.

Antigenele exogene sunt prezentate în asociație cu moleculele CMH II

Moleculele CMH II leagă peptide derivate din proteinele exogene endocitate de celule: proteine solubile, proteine ale capsidului viral, proteine bacteriene sau proteine ale protozoarelor endocitate de celulă. In vitro, s-a demonstrat că moleculele CMH II purificate, leagă suficient de stabil o moleculă peptidică, pentru a fi izolate împreună prin gel-filtrare.

Antigenele exogene sunt înglobate și prelucrate în fagolizosomii celulelor prezentatoare de antigen (CPA). Moleculele CMH II se sintetizează în reticulul endoplasmic granular și sunt modificate post-traducere, în cisternele Golgi. Cele două catene ale moleculei sunt reunite prin catena invariantă. Asocierea este menținută până când moleculele CMH II ajung în sistemul endocitar al celulei. În drumul lor spre suprafața celulei, moleculele CMH II ajung prin fuziunea veziculei transportoare, în compartimentul fagolizosomului ce conține antigenul parțial degradat. La acest nivel este eliminată catena invariantă ce reunește catenele α și β și care ocupă situsul de legare a antigenului. Moleculele CMH II se asociază cu peptidul antigenic de 13-25 aminoacizi. Complexul format este expus la nivelul membranei, unde este recunoscut de limfocitele TCD4. Situsul de legare al moleculei CMH II este o cavitate formată prin β -plierea domeniilor α -1 și β -1, delimitată de secvențele α -helicale ale domeniilor α -1 și β -1. Complexul format este recunoscut de limfocitele TCD4. Fig. 57. Reprezentarea schematică a asocierii moleculelor CMH II cu peptidul antigenic (după Cresswell, 1994).

Moleculele CMH II au funcția fundamentală de a stimula elaborarea răspunsului imun specific față de antigenele exogene, prin intermediul limfocitelor TCD4. Limfocitele TCD4 secretă IL-2, IL-4, IL-5, IFN γ , cu efect stimulator față de limfocitele Tc și B.

Asocierea unui peptid nonselb cu moleculele CMH II semnifică “cererea de ajutorî pentru eliminarea antigenului, materializat în activarea limfocitelor TCD4 și secreția de limfochine stimulative ale rîspunsului imun.

Moleculele CMH II au rol esențial pentru stimularea rîspunsului imun, dar și pentru reglarea intensității sale. Interacțiunea moleculelor CMH II cu epitopii antigenici nu este specifică.

Deoarece moleculele CMH sunt polimorfe, există diferențe, uneori importante, între organismele outbred ale unei specii de a rîspunde la un antigen. Astfel se explică diferențele individuale de sensibilitate față de un agent infecțios. Un rîspuns imun mai amplu, este generat de un organism care expune mai mulți epitopi antigenici diferiți, asociați cu diferitele variante de molecule CMH II, comparativ cu un organism care expune mai puține fragmente antigenice asociate cu 1 sau 2 tipuri de molecule CMH II.

Antigenele endogene sunt prezentate în asociație cu moleculele CMH I

Rolul moleculelor CMH în procesul recunoașterii antigenelor care se sintetizează în interiorul celulei (proteine endogene), a fost demonstrat de Zinckernagel și Doherty (1974), pentru antigenele virale, în experiențe de genul următor:

- șoarecii liniei inbred D au fost inoculați cu virusul coriomeningitei limfocitare (cu specificitate antigenică A), pentru a stimula proliferarea limfocitelor Tc față de celulele infectate cu acest virus;
- culturile de fibroblaste de la embrionii liniei D se infectează cu varianta antigenică A și respectiv B, iar fibroblastele liniei K se infectează cu varianta antigenică A;
- limfocitele Tc ale organismelor liniei D, stimulate cu virusul A, recunosc și lizează, in vitro, fibroblastele liniei D, infectate cu varianta antigenică A, dar nu recunosc și nu lizează fibroblastele liniei D infectate cu varianta antigenică B și nici fibroblastele liniei K, infectate cu varianta antigenică A.

Concluzia a fost că nucleoproteinele citosolice virale, sintetizate în celulă, pot deveni ținta celulelor Tc, după ce sunt expuse ca un peptid prelucrat, în asociație cu moleculele CMH I ale celei infectate. Pe baza acestei concluzii s-a stabilit principiul general că proteinele intracelulare (care nu sunt destinate membranei citoplasmatică), pot să-și semnaleze prezența în raport cu celulele T, prin expunerea asociată cu moleculele CMH I. Rezultatele au fost extrapolate și pentru categoria largă a antigenelor exogene. Fig. 58. Acțiunea limfocitelor Tc este restrictivă în raport cu moleculele CMH I, deoarece celula Tc recunoaște atât antigenul specific, cât și molecula CMH I. Amănunte în text.

Recunoașterea asociată a antigenelor cu moleculele CMH I sau II are două semnificații majore:

- celulele sistemului imunitar interacționează cu proteinele proprii, numai dacă acestea sunt asociate cu un determinant antigenic nonspecific, de origine virală, tumorală sau indus de agenți chimici;

- recunoașterea antigenului este condiționată de existența fenomenului de histocompatibilitate, adică celulele care prezintă antigenul și cele care îl recunosc (limfocitele Tc și Th) trebuie să poarte molecule CMH identice, adică celulele care interacționează trebuie să aparțină aceluiași organism sau unor organisme genetic identice (ale aceleiași linii înbred). Acesta este fenomenul de restricție (limitare) a interacțiunilor celulare prin moleculele CMH.

Moleculele CMH I au rolul de a lega și de a prezenta proteine self, peptide derivate din catabolismul proteinelor citosolice, antigene bacteriene sau ale paraziților intracelulari, antigene virale sintetizate în celulă prin traducerea unui ARNm viral, antigene tumorale sau antigene a căror sinteză a fost indusă de agenți chimici. După asocierea cu epitopi antigenici, moleculele CMH I devin ținta atacului limfocitelor TCD8.

Limfocitele Tc sunt implicate, în primul rând, în recunoașterea și eliminarea celulelor infectate cu virusuri sau a celor transformate malign. Ambele tipuri de antigene sunt sintetizate în celulă și sunt considerate ca având origine endogenă.

Evenimentele celulare al căror rezultat este prezentarea peptidelor, se succed în următoarele trepte:

- catabolismul antigenului proteic (în citoplasmă)

- transportul peptidului din citosol, în cisternele reticulului endoplasmic

- asamblarea complexului format din peptid și molecule CMH I

- transportul complexului la suprafața celulei.

Antigenele endogene se asociază cu moleculele CMH I, chiar în cisternele reticulului endoplasmic granular. La acest nivel, moleculele CMH II sunt inaccesibile asocierii cu epitopii antigenici, deoarece catenele α și β sunt reunite prin catena invariantă.

Prezentarea antigenelor endogene, asociate cu moleculele CMH I nu este sensibilă la acțiunea agenților lizosomotropi alcalinizanți (amoniac, cloroquină), dar este sensibilă la derivații peptidici(di- sau tripeptide aldehydice) care inhibă proteasomul. Proteasomul este un complex proteic multicatalitic, compus din mai multe subunități inelare suprapuse, asamblate într-o structură cilindrică, în care se produce proteoliza moleculelor proteice citosolice conjugate cu ubicvitina. Proteasomul este o structură care controlează turn-overul proteinelor citosolice, inclusiv al factorilor de transcriere și al ciclinelor. Ubicvitina este un polipeptid mic, care este asociat pe cale enzimatică dependentă de ATP, de lizina proteinelor citosolice. Legarea ubicvitinei produce deplierea proteinei țintă și asigură recunoașterea de către elementele complexului proteasomic citosolic. Proteinele celulare modificate după cuplarea cu ubiquitina, devin sensibile la proteoliză. Proteoliza are loc în mediul apos al structurii cilindrice și este independentă de ATP. Astfel sunt protejați constituienții celulari de degradarea necontrolată. Peptidele rezultate în proteasom sunt foarte rapid degradate în citoplasmă. De aceea s-a presupus că ele se asociază cu proteinele chaperone, cu rol protector și de orientare a peptidelor în lumenul reticulului endoplasmic. Fig. 59. Prelucrarea și prezentarea antigenului endogen, de către moleculele CMH I. Proteinele citosolice sunt degradate de complexul proteosomic, în peptide care sunt transportate în reticulul endoplasmic (RE). La acest nivel, β -2 m induce disocierea catenei H de proteina chaperone (calnexina). Se assemblează molecula CMH I și se asociază cu peptidul antigenic. Complexul peptid-CMH I se eliberează din asocierea cu transportorul TAP, traversează cisternele Golgi și se exprimă pe suprafața celulei, gata să fie recunoscut de RCT. Celulele deficiente în TAP1/2 nu eliberează peptidele pentru a se asocia cu moleculele clasa I și nu pot exercita efectul citotoxic asupra țintei (după Roitt, 1997).

Fig. 60. Formarea complexului CMH I-peptid în cisternele RE.

Peptidele rezultate din prelucrarea antigenelor endogene sunt transportate în reticulul endoplasmic, de o categorie de proteine transportoare, denumite TAP (proteine transportoare asociate cu prezentarea antigenului) care folosesc energia rezultată din hidroliza ATP, pentru a transporta prin membrane diferite proteine, ioni, antibiotice. Molecula TAP este un heterodimer, format din două subunități (TAP1 și TAP2). Fiecare subunitate are o regiune hidrofobă N-terminală transmembranară și un domeniu C-terminal ce leagă ATP. Moleculile TAP au capacitatea de a transloca peptidele prin membrana RE.

Catenele moleculei CMH I se sintetizează separat pe cisternele RE și odată cu traducerea sunt transportate în RE. Catena H, β -2 m și peptidul se assemblează într-un complex, chiar în cisternele RE sau în compartimentul pregolgian. În cisternele Golgi, catena H este glicozilată, iar complexul CMH I-peptid este ancorat în membrană și expus la suprafața celulei. Moleculile CMH I leagă peptide mici, de 8-10 aminoacizi. Specificitatea de legare este largă. Molecule CMH I identice leagă peptide diferite.

Liniile celulare care nu sintetizează β -2 m, nu exprimă molecule CMH I pe suprafața lor. Acesta este un exemplu al funcției de "control de calitate" pe care îl are RE. Moleculile CMH I pliate incorect nu sunt transportate la nivelul membranei, ci rămân în cisternele RE și sunt degradate. Absența β -2 m determină plierea greșită și degradarea catenei mari. Controlul de calitate este mediat de un set de proteine chaperone, care se asociază reversibil cu proteinele pliate incorect și astfel permit "corectarea" greșelii de pliere.

La nivel membranar, complexul molecular este recunoscut de limfocitele Tc și rezultatul interacțiunii este liza celulei țintă.

Moleculile CMH I nu disting între peptidele self și nonself. Peptidele asociate cu moleculele CMH I au fost izolate, fracționate prin HPLC (high-performance liquid chromatography) și secvențiate. Fiecare celulă expune pe suprafață, sute de peptide, cele mai multe fiind proteine citosolice autologe.

Asocierea moleculei CMH I cu un peptid nonself pe suprafața celulei, semnifică necesitatea distrugerii celulei țintă. Dovada în favoarea acestei ipoteze este adusă de faptul că, in vivo, situsul de legare al moleculelor CMH I este ocupat de peptide self, adică fragmente ale proteinelor proprii, pe care celulele le captează din spațiul interstițial sau le produc în proteasom și le prezintă ca și pe cele nonself.

După disocierea peptidului, molecula CMH I "goală" expusă la suprafața celulei, este instabilă.

Faptul că situsul de legare al moleculelor CMH I este ocupat de peptide self, este în acord cu teoria supravegherii imune, conform căreia, celulele killer și limfocitele Tc controlează permanent suprafața celulelor organismului, pentru a detecta eventuala apariție a antigenelor tumorale sau virale. Celulele care exprimă pe suprafața lor molecule nonself, sunt eliminate prompt.

Deoarece celulele prelucrează și prezintă continutul moleculelor proprii, celulele sistemului imunitar sunt stimulate permanent. Limfocitele controlează calitatea moleculelor CMH I și detectează celulele ce prezintă molecule alterate sau molecule nonself.

Indivizii umani deficienți ai moleculelor CMH I, nu par a avea o incidență crescută a infecțiilor virale severe, ceea ce sugerează existența și a altor mecanisme de recunoaștere a moleculelor nonself, neasociate cu moleculele CMH I.

Fig. 61. Reprezentarea schematică a moleculelor CD4 și CD8.

Modelul recunoașterii antigenului de către limfocitele T

Recunoașterea antigenului de către limfocitele T este mediată în primul rând, de receptorul de antigen (RCT). Secvențele hipervariabile ale lanțurilor α și β formează regiunile determinate de complementaritate (RDC 1 și RDC 2). Buclele RDC 1 și RDC 2 ale regiunilor variabile (V) α și β ale RCT, interacționează cu regiunea α helicală a moleculei CMH, iar cele două secvențe RDC 3, interacționează cu peptidul antigenic.

Interacțiunea limfocitului cu celula prezentatoare de antigen este mediată și de alte molecule.

Limfocitele Tc prezintă pe suprafața lor, markerul CD8 și recunosc antigenele asociate cu moleculele CMH I, iar limfocitele Th prezintă markerul CD4 și recunosc antigenele asociate cu moleculele CMH II. Moleculele CD4 și CD8 sunt proteine membranare, monomorfe, participante la recunoașterea complexelor CMH-peptide, de pe suprafața celulelor țintă.

Domeniile lor extracelulare, prin secvența aminoacizilor, se aseamănă cu domeniile imunoglobulinelor.

Molecula CD4 este monomerică și este pliată în 4 domenii extracelulare, omologe cu ale moleculei de Ig, stabilizate prin punți S-S.

CD8 este o proteină dimerică, iar conformația sa spațială prezintă un domeniu asemănător domeniului variabil al moleculei de imunoglobulină.

În procesul recunoașterii antigenului, molecula CD8 se asociază cu domeniul constant α -3, al moleculei CMH clasa I, iar molecula CD4 se asociază cu domeniile constante α -2 sau β -2 ale moleculei CMH clasa II-a.

Moleculele CD8 și CD4 sunt importante nu numai pentru orientarea limfocitelor spre țintele adecvate, dar au și rol în transducerea semnalului, deoarece cozile lor citosolice leagă o tirozin-kinază, cu rol esențial în transmiterea semnalului activator al limfocitului T.

Receptorul de antigen al limfocitelor T recunoaște fragmentele peptidice complexate cu moleculele CMH I sau II. Pentru fiecare organism, diversitatea moleculelor CMH este limitată, dar ele leagă o largă varietate de peptide scurte (8-9 aminoacizi, pentru moleculele CMH I și circa 14 aminoacizi, pentru moleculele CMH II). Deși nu este o legare pe baza specificității, interacțiunea peptidului antigenic cu moleculele CMH este caracterizată de o afinitate înaltă, deoarece se stabilește cu grupările NH₂ și COOH de la extremitatea peptidului, restul secvenței de aminoacizi rămânând disponibili pentru interacțiunea cu RCT.

Fig. 62. Diagrama domeniilor extracelulare ale moleculelor CMH clasa I (sus) și clasa II (jos). Siturile de legare ale celor două clase de molecule au configurații tridimensionale asemănătoare și sunt ocupate de peptidul rezident self sau nonself (după Roitt, 1993).

Deoarece moleculele CMH I și II leagă peptide scurte, epitopii celulelor T sunt alcătuiți din secvențe peptidice lineare, adică configurația epitopilor nu este dependentă de conformația proteinei native. Deoarece epitopii recunoscuți de limfocitele T sunt peptide scurte, rezultă că prelucrarea proteolitică a antigenelor este o etapă obligatorie, care precede interacțiunea lor cu limfocitele T.

Prezentarea antigenelor asociate cu moleculele CD1

Antigenele nepeptidice sunt prezentate celulelor T, prin alte mecanisme. Moleculele CD1 se aseamănă structural cu moleculele CMH I. Ele prezintă antigenele în asociație cu domeniile hidrofobe, care formează cavități, capabile să lege antigenele lipidice și glico-peptidice. În această asociație, antigenele sunt recunoscute de limfocitele T. Se cunosc 4 izo-forme distincte de molecule CD1 (CD1a, -b, -c, -d), codificate de 5 gene situate pe cromosomul 1. Prezentarea antigenelor lipidice în asociație cu moleculele CD1 este sensibilă la agenții de acidificare a endosomului (cloroquină, concana-micină A). Probabil, asocierea antigenelor lipidice cu CD1 se produce în compartimentul endo-somal acid.

Moleculele CD1 sunt importante pentru reacțiile de apărare anti-infecțioasă, pentru că ele prezintă antigenele de micobacterii (acidul micolic, lipoarabinomananul), celulelor T.

Calea CD1 de prezentare a antigenelor se aseamănă cu căile de prezentare a antigenelor peptidice în asociație cu moleculele CMH I și II. CD1 este asemănătoare din punct de vedere structural, cu moleculele CMH I, dar asocierea cu antigenul are loc în endosomul lipidic. Prezentarea antigenelor în asociație cu moleculele CD1 este considerată ca o cale distinctă.

Activarea limfocitelor T

Fig. 63. Moleculele CMH reglează răspunsul imun. a. O celulă T citotoxică (CD8) recunoaște peptidul în asociație cu o moleculă CMH clasa I, pe suprafața unei celule infectate cu un virus.

b. O celulă T helper (CD4) recunoaște peptidul antigenic asociat cu o moleculă CMH clasa II, pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen (CPA). Epitopii antigenici sunt recunoscuți de RCT, dar la procesul recunoașterii participă și moleculele CD8 și respectiv CD4. CD8 recunoaște domeniul α -3 al moleculei CMH I, iar CD4 se leagă de domeniile α -2- β -2 ale moleculei CMH II.

Cel puțin trei molecule distincte sau complexe moleculare, fizic independente, ale membranei au rol în transducerea eficientă a semnalului activator al celulei T, fiecare fiind asociată cu o activitate enzimatică relevantă:

- RCT1 α - β și complexul CD3 (γ - δ - ϵ). Partea invariantă a RCT este asociată cu tirozin-chinaza p59fyn;

- coreceptorii CD4 sau CD8, asociați cu tirozin-chinaza p56lck;

- CD45, cu activitate fosfatazică tirozin-specifică.

Limfocitele T mature cu RCT α - β sunt CD4 sau CD8. Celulele TCD4 recunosc fragmentele peptidice legate de moleculele CMH II, iar celulele TCD8 recunosc fragmentele peptidice legate de moleculele CMH I. Această specificitate a condus la sugestia că molecula CD4 poate să lege molecula CMH II, iar molecula CD8 leagă molecula CMH I, ambele având rol de coreceptori de antigen.

Fig. 64. a. Suprafamilia genelor care codifică imunoglobulinele și diferite alte molecule cu rol în recunoașterea intercelulară. Toate aceste molecule au o structură asemănătoare. Familia moleculelor multigenice, cu rol în recunoașterea antigenului cuprinde imunoglobulinele, RCT, moleculele CMH I și II.

b. Familia moleculelor monogenice cuprinde molecula Thy (exprimată pe celulele T și pe neuroni), receptorii de poli-Ig (transportă IgA prin epiteliul mucoaselor), N-CAM (o moleculă de aderență a neuronilor), CD4, CD8, precum și alte proteine (o proteină plasmatică umană, o proteină neurocitoplasmatică) (după Roitt, 1997).

Coreceptorii CD4 și CD8 sunt glicoproteine trans-membranare. Fiecare este asociată cu o moleculă de tirozin-kinază specifică celulei T, p56lck. În procesul activării celulei T de către antigen, coreceptorul trebuie să se lege de aceeași moleculă CMH ca și RCT, pentru transducerea optimă a semnalului. Inter-acțiunea facilitează transmiterea semnalului activator cu o eficiență de până la 300 de ori mai mare.

CD4 și CD8 sunt membre ale suprafamiliei imuno-globulinelor. Deși ambele au rol de coreceptori și se asociază cu aceeași tirozin-kinază (p56lck), nu au omologie structurală.

Studiile de cristalografie cu raze X au arătat că domeniul extern al moleculei CD4 formează o protruție pe fața laterală a moleculei, implicată în legarea moleculei CMH II.

Molecula CD8 este formată din două catene diferite (α și β) și are un singur domeniu de omologie cu molecula de Ig, la capătul amino. Acesta este urmat de o secvență cu configurație nedefinită și cuprinde resturile de cisteină care permit legarea moleculelor în dimeri funcționali. Molecula CD8 are rol de coreceptor, participând la recunoașterea antigenului, prin asocierea cu domeniul α -3 al moleculei CMH I. Fig. 65. Diferite aranjamente ale RCT și ale co-receptorilor săi sunt determinate de izoformele lui CD45 exprimate pe celula T. Pe celulele neangajate, CD4, CD45 și RCT migrează independent pe suprafața celulei. Pe celulele T de memorie, cele trei molecule sunt asociate. Pe celulele Th2 clonate, o izoformă de CD45 cu gr. mol mică, se leagă de CD4, dar acest complex nu se asociază cu RCT. Activarea optimă a celulei are loc în cazul în care cele trei molecule sunt asociate strâns pe suprafața limfocitului (după Janeway, 1997).

Coreceptorii se asociază fizic cu RCT în timpul activării celulei T.

Molecula CD45 este o fosfatază transmembranară tirozin-specifică. Este un antigen leucocitar, prezent pe toate celulele de origine hematopoietică, alcătuit dintr-un domeniu extern variabil și un domeniu citoplasmatic constant ce constă din două subdomenii cu activitate fosfatazică tirozin-specifică.

CD45 prezintă mai multe izoforme, care variază cu tipul celular. Variabilitatea rezultă din clivarea alternativă a ARNm. Celulele T își schimbă izoforma de CD45 în timpul activării și după activare. Pe limfocitele T neangajate, izoformele de CD45 sunt toate cu greutate moleculară mare, iar celulele T activate sau de memorie exprimă o variantă a CD45 cu greutate moleculară mică.

Izoformele distincte se asociază în mod diferit cu celelalte componente ale complexului la celulele neangajate și la cele de memorie, modificând eficiența transmiterii semnalului de activare.

Limfocitele TCD4 recunosc complexul molecular CMH II-epitop, expus la suprafața celulei prezentatoare de antigen (CPA) și se activează. Limfocitul activat secretă IL-2, o interleuchină esențială pentru expansiunea clonală a limfocitelor TCD4 și amplificarea răspunsului imun. Amplificarea răspunsului imun parcurge mai multe etape: Fig. 66. Mecanismul activării celulei T.

- după legarea limfocitului TCD4 de CPA, acesta produce IL-2;

- stimulează limfocitul TCD4 să producă IL-2. IL-2 acționează stimulator asupra celulelor care o produc (buclă autocrină) și asupra limfocitelor învecinate, care au aceeași specificitate a receptorului de antigen (acțiune paracrină), efectul fiind exprimarea intensă a receptorilor pentru IL-2 pe suprafața limfocitelor stimulate;

- limfocitele TCD4 activate de IL-2 proliferază și generează o populație de celule imunoreactive, Th1 și Th2, care la rândul lor, prin intermediul interleuchinelor pe care le secretă, au efecte activatoare asupra compartimentului imunității celulare sau stimulează activarea și proliferarea limfocitelor B specifice, în funcție de natura antigenului. Fig. 67. Amplificarea răspunsului imun.

Pentru ca epitopii să fie recunoscuți, moleculele CMH trebuie să expună simultan pe suprafața celulei, un număr mare de peptide nonspecific, pentru un interval suficient, astfel încât să permită limfocitelor T să controleze calitatea moleculelor CMH ale fiecărei celule.

Timul de generație al unei celule T, după stimularea antigenică poate fi de 4,5 ore, adică într-o săptămână, dintr-o singură celulă T pot să rezulte 1012 celule, ceea ce ar însemna dublarea numărului de limfocite T în organism. O proteină de dimensiuni medii, cu 2-10 epitopi, poate fi recunoscută de 10-1000 celule neangajate, în funcție de capacitatea moleculelor CMH de a prezenta epitopii peptidici. Consecutiv unei infecții virale, numărul celulelor CD8 cu specificitate față de antigenele virale, la șoarece poate să crească de 10 ori.

Durata de viață a limfocitelor T este greu de evaluat, dar moartea lor prin apoptoză este declanșată de IL-2 și de antigen. După stimularea ciclului celular sub acțiunea antigenului, limfocitele T devin foarte sensibile la apoptoză. Proliferarea celulelor T este stimulată după ce IL-2 se fixează pe receptorul specific. După unul sau câteva cicluri, limfocitele T în faza G1 sau

S, devin foarte sensibile la apoptoză. Așa se explică moartea hibridoamelor T ca răspuns la legarea încrucișată a RCT.

Apoptoza celulelor T este declanșată în două situații: sub acțiunea stimuloare a antigenului și în absența limfochinelor.

Răspunsul celulelor T la antigen se desfășoară în două faze, cu evenimente moleculare distincte: faza de activare și cea de proliferare.

Faza de activare constă în inducerea genelor pentru sinteza IL-2 și a receptorului de mare afinitate pentru IL-2. În această fază, apoptoza este practic absentă. Faza de proliferare a limfocitelor T este inițiată de fixarea IL-2 pe receptorul său. După ce celulele T au parcurs unul sau câteva cicluri celulare și intră în faza G1 sau S, devin foarte sensibile la apoptoză. Factorul esențial al apoptozei este IL-2.

Conceptul controlului feed-back al intensității răspunsului imun prin fenomenul apoptozei (reglarea propriocidă) s-a născut din nevoia de a explica acest nou rol al IL-2, care contrastează cu proprietățile sale proliferative. Teoria afirmă că IL-2 conferă celulelor T, sensibilitate la apoptoză. Gradul stimulării antigenice determină inducerea apoptozei. După încetarea stimulării antigenice, sinteza IL-2 și a receptorului său scade. În absența IL-2, cu rol trofic pentru limfocitele T, se inițiază apoptoza pasivă. Invers, dacă celulele T intrate în ciclul diviziunii sunt intens stimulate de antigen, se produce apoptoza activă (indusă de antigen).

Apoptoza pasivă diminuează expansiunea populației celulelor T, și o adaptează la intensitatea unui răspuns fiziologic. Apoptoza activă este indusă numai de activarea RCT. Ca rezultat al acestor două forme de apoptoză, răspunsul feed-back elimină celulele T dacă antigenul și IL-2 sunt în exces sau în deficit.

O parte a celulelor T poate să scape morții apoptotice pasive sau active și să devină limfocite T de memorie, cu viață lungă.

1 Structura RCT a fost prezentată într-un capitol anterior.

Activarea limfocitelor B

Spre deosebire de limfocitele T care recunosc numai antigenul modificat, prelucrat și prezentat în asociație cu moleculele CMH, limfocitele B recunosc atât forma prelucrată cât și forma nativă, nemodificată a antigenului solubil.

Contactul limfocitelor B cu un antigen timo-dependent, declanșează diferențierea limfocitelor B pe două căi:

- calea extrafoliculară, rezultatul fiind sinteza timpurie a anticorpilor
- calea centrilor germinativi, care duce la memorie imunologică și generează plasmocite.

În splină, în absența cooperării cu limfocitele Th, consecința este lipsa de răspuns imun (anergia). Dacă are loc cooperarea T-B, se formează focare proliferative oligoclonale. Din focare, unele limfocite B migrează în centrul germinativ și dobândesc memoria imunitară.

Limfocitele B recunosc direct antigenele timo-independente și se activează fără să necesite cooperarea limfocitelor T.

După activare într-un centru germinativ, de către un antigen T-independent sau după interacțiuni cu celule Th, celulele B mici în repaus sunt convertite la limfoblaste mari și ulterior acestea evoluează fie spre plasmocite producătoare de anticorpi, fie se diferențiază în celule mici de memorie. Procesul de activare în centrul germinativ este însoțit de generarea mutațiilor în regiunea V și comutarea de la IgM, la IgG, IgA sau IgE. Mutațiile măresc diversitatea situsurilor de legare a antigenului. Dacă mutația produce un situs nefuncțional, celula activează programul morții genetice (apoptoza). Aceste modalități de diferențiere sunt influențate de semnale co-stimulatoare și de citochine (IL-2, 4, 6, 10, TGFB).

Limfocitul B leagă specific antigenul în configurația nativă, prin intermediul receptorului imunoglobulinic de membrană și probabil îl încorporează sub forma complexului antigen-anticorp. Așa se explică faptul că anticorpii specifici față de proteinele native recunosc epitopi conformaționali discontinui, alcătuiți din aminoacizi, care în secvența primară sunt localizați la distanță, dar în molecula pliată ajung în proximitate. De aceea, limfocitele B sunt foarte eficiente în procesul captării, prelucrării și prezentării unui antigen injectat în doză foarte mică (de 1 000

de ori mai mică decât doza necesară prezentării aceluiași antigen de către macrofage sau de către celulele dendritice). Antigenele care stimulează receptorii celulelor B sunt diverse: proteine, polizaharide, lipide, molecule mici(arsenat, trinitrofenol).

Importanța limfocitelor B ca prezentatoare de antigen este redusă în cursul răspunsului imun primar, dar devin foarte importante în cursul răspunsului imun secundar, în special în cazul în care doza stimulantă de antigen este foarte mică.

În cursul stimulării antigenice secundare, limfocitele B de memorie, a căror populație este numeroasă, înglobează specific antigenul prin intermediul receptorilor imunoglobulinici (endocitoză mediată de receptori sau prin pinocitoză nespecifică).

Soarta antigenului recunoscut specific de limfocitele B nu este cunoscută. Antigenul ar rămâne în compartimentul vezicular și nu ar fi amestecat cu proteinele citoplasmatică. Proteinele internalizate, probabil sunt prelucrate de proteazele lizosomale și se eliberează fragmentele peptidice care se asociază cu moleculele CMH II. Complexele peptid-molecule CMH II sunt transportate la suprafața celulelor B, unde interacționează cu RCT specific al celulelor Th. Interacțiunea peptid-RCT, determină eliberarea citochinelor din limfocitul Th, la rândul lor, cu rol stimulator asupra proliferării și maturării celulelor B. Pe de altă parte, antigenul nativ, fără să fie internalizat și prelucrat, ar putea declanșa stimularea limfocitelor B de memorie. Din această cauză, răspunsul imun va fi specific față de epitopii conformaționali ai moleculei native, în configurația sa spațială.

Limfocitele B recunosc și leagă specific, polipeptide mici și mijlocii. Moleculele proteice mari și antigenele corpusculare sunt înglobate și prelucrate de macrofage și de celulele dendritice, iar epitopii lor sunt expuși în asociație cu moleculele CMH II, fiind recunoscuți de limfocitele T și B.

Mecanismul molecular al activării limfocitelor B este greu de studiat, datorită faptului că proporția limfocitelor stimulate de antigenul specific este mică, chiar și după stimularea secundară. Din acest motiv, activarea limfocitelor s-a explicat prin extrapolarea rezultatelor obținute după activarea policlonală nespecifică, in vitro, consecutivă legării moleculelor de lectine, cu efect mitogen asupra limfocitelor B. Receptorii de lectine ai limfocitelor B nu s-au identificat.

A II-a metodă de studiu a mecanismului activării limfocitelor B a constat în utilizarea anticorpilor cu specificitate față de Ig de membrană, marcați cu fluorocromi. Astfel s-a evidențiat că moleculele imunoglobulinice ale suprafeței limfocitului B, cu rol de receptor de antigen,

prezintă un grad ridicat de mobilitate. După cuplarea cu anticorpul specific (sau cu antigenul bivalent specific), moleculele imunoglobulinice membranare se grupează în zone discontinuie ("petice") și ulterior confluează într-o zonă delimitată a membranei, denumită "bonetă". Acesta este fenomenul de "capping" (bonetare). Moleculele receptoare de antigen astfel grupate, sunt eliberate în mediul extracelular sau sunt endocitate. Legarea încrucișată a moleculelor de suprafață, declanșează activarea limfocitului B.

Receptorul limfocitelor B este evaluat la 10^8 - 10^9 specificități de legare. Datorită numărului foarte mare de specificități de legare antigenică a limfocitelor B, organismul prezintă o mare diversitate de imunoglobuline serice (10000000 tipuri diferite), adică un număr de 1000 de ori mai mare decât numărul proteinelor structurale, enzimatică și hormonale din organism.

Antigenele timo-independente par să activeze limfocitul B, prin același mecanism. Ele au epitopi repetitivi care leagă simultan mai mulți receptori de antigen ai membranei limfocitului B. Punctele moleculare între receptorii de antigen, declanșează semnalul activator al limfocitului, materializat în proliferarea și diferențierea sa. Fig. 68. Activarea limfocitului B, după legarea unui antigen cu epitopi repetitivi.

Stimularea nespecifică a limfocitelor B

Proliferarea limfocitelor B este indusă nu numai de antigenul specific și de superantigene, ci de orice ligand care leagă încrucișat receptorii de antigen și formează punți intermoleculare. Legarea încrucișată a imunoglobulinelor de suprafață (probabil nu numai a lor, ci și a altor molecule membranare) declanșează semnalul pentru proliferare, dar nu și pentru diferențierea lor în plasmocite.

Stimularea limfocitului B este, uneori, rezultatul activării receptorilor membranari neimunoglobulinici, sub acțiunea diferitelor mitogene. Mitogenele sunt antigene timo-independente. Cele mai cunoscute mitogene sunt lectinele² din semințele plantelor. Din punct de vedere chimic, mitogenele sunt glicoproteine cu specificitate de legare pentru glucidele de pe suprafața celulelor.

Lectinele sunt produse de toate organismele, dar unele tipuri de celule produc cantități mari de lectine.

Având o distribuție ubicvitară, lectinele îndeplinesc funcții biologice importante, fiind molecule de recunoaștere în diferite procese biologice:

- eliminarea glicoproteinelor din circulație
- aderența agenților infecțioși de celulele gazdă sensibile
- recrutarea leucocitelor la situsul inflamator
- medierea interacțiunilor celulelor imunitare.

Lectinele cele mai studiate sunt cele din plantele leguminoase: Con A, PHA, lectinele de soia (SBA) și din arahide (PNA). Ca model de structură, toate lectinele leguminoaselor sunt formate din 2 sau 4 subunități identice sau aproape identice de 25-30 kD fiecare, toate având aceeași specificitate de legare a glucidului.

Lectinele se clasifică într-un număr mic de grupe de specificitate, în funcție de monozaharidul pentru care ele manifestă cea mai înaltă

afinitate de legare (manoza, galactoza, N-acetilglucozamina, L-fucoza și acidul N-acetilneuraminic). Unele lectine leagă slab monozaharidul, dar interacționează cu oligozaharidele (di-, tri- și tetrazaharidele). De exemplu, selectinele leagă numai oligozaharidele.

Lectinele se combină cu glucidele printr-o rețea de legături de H și interacțiuni hidrofobe.

Lectinele au constituit instrumentul major pentru studiul mecanismelor stimulării mitogenice a limfocitelor.

În prezența unei lectine mitogene, in vitro, o largă varietate de

celule țintă neînrudite antigenic, sunt lizate de celulele T_c, fenomen cunoscut sub denumirea de citotoxicitate dependentă de lectină (prin analogie cu fenomenul ADCC).

Liza celulelor tumorale de către macrofage, dependentă de lectine, este o altă formă de citotoxicitate. Unele lectine sunt toxice pentru celulele mamiferelor, in vivo și in vitro.

Funcția majoră a lectinelor este cea de recunoaștere celulară. De exemplu, hemaglutinina peplosului viral este lectina specifică pentru acidul N-acetil neuraminic, iar lectinele suprafeței bacteriene mediază legarea celor patogene de celulele gazdă, o treaptă esențială pentru inițierea procesului infecțios. Haptenele inhibitoare ale lectinelor bacteriene protejează față de infecția experimentală cu bacteriile care exprimă lectina, furnizând baza dezvoltării terapiei anti-adezine a infecțiilor bacteriene.

Unele lectine ale suprafeței celulei bacteriene mediază legarea specifică de fagocitele (PMN, macrofage) umane și de șoarece, în absența opsoninelor, rezultatul fiind fagocitoza, ingestia și digestia bacteriilor. Procesul s-a denumit lectino-fagocitoză.

La nevertebrate, se crede că lectinele de pe suprafața hemocitelor sunt molecule de recunoaștere a moleculelor nonself.

Lectinele cu funcție endocitară sunt receptori legați de membrană cu diferite specificități și par a avea rol în clearance-ul glicoproteinelor și chiar al celulelor (eritrocite îmbătrânite, bacterii) din circulație.

Interacțiunile adezive mediate de glucidele de suprafață și de selectine, controlează traficul leucocitelor spre situsurile inflamatorii și migrarea (homing) a limfocitelor în organele limfoide specifice.

Răspunsul limfocitelor B la lectine este policlonal, deoarece sunt activate limfocitele cu specificități multiple de legare a antigenului. In vitro, la concentrații mari, unele mitogene activează toate clonele de limfocite B, inclusiv pe cele de memorie, independent de specificitatea lor antigenică. La concentrații mici, mitogenele pot produce chiar activarea specifică a limfocitelor B. Receptorii de mitogene nu se cunosc, dar sunt diferiți de receptorii imunoglobulinici pentru antigene.

Limfocitele T sunt stimulate policlonal de PHA, Con A, iar PWM (pokeweed mitogen) stimulează celulele T și B.

Alți activatori policlonali ai limfocitelor B și ai diferențierii lor la plasmocite sunt virusul Epstein-Barr, concentrațiile mari de endotoxine ale bacteriilor Gram negative, polizaharidul de *Str. pneumoniae*, ficolul, polimerii D-aminoacizilor, polivinil-pirolidona. Toate aceste antigene persistă îndelung în organism, pe suprafața macrofagelor din sinusul subcapsular al ganglionilor limfatici și în zona splenică marginală. Ele leagă încrucișat receptorii imunoglobulinici ai limfocitelor B.

Celulele B ale noilor născuți nu răspund bine la antigenele timo-independente, ceea ce are consecințe importante pentru eficiența vaccinurilor polizaharidice la copiii mici.

Semnificația fiziologică a activării policlonale nu este clară. După activarea nespecifică policlonală, se sintetizează anticorpi a căror specificitate nu este totdeauna complementară antigenului inductor. De exemplu, limfocitele B stimulate de virusul Epstein-Barr sintetizează anticorpi care se combină cu fosforil-colina, o moleculă absentă în structura virionilor, dar prezentă în peretele celular de *Str. pneumoniae*. Activarea policlonală a limfocitelor B este importantă în fazele timpurii ale infecției, dar are și posibile consecințe negative ce constau în inducerea variatelor fenomene autoimune.

Cooperări celulare în elaborarea răspunsului imun

De cele mai multe ori, sinteza anticorpilor după stimularea antigenică, este rezultatul interacțiunilor stimulative ale limfocitelor B convenționale (B2), cu limfocitele Th. Un antigen macromolecular poate fi considerat ca un complex format din carrier și determinanți haptenici (epitopi), recunoscuți de limfocitele Th și B.

Antigenele care pentru stimularea răspunsului imun necesită cooperarea celor două populații de limfocite, aparțin grupului larg al antigenelor timo-dependente. Ele sunt reprezentate de proteinele heterologe, de polipeptidele sintetice, de hematiile heterologe, de flagelina monomeră etc. Cele mai multe antigene moleculare, în special de natură proteică sunt timo-dependente.

Cooperări celulare T-B-macrofag. Pentru declanșarea răspunsului imun, antigenele timo-dependente necesită cooperarea limfocitelor Th, cooperare supusă restricției moleculelor CMH. Aceste antigene se comportă ca univalente, în raport cu specificitatea antigenică a fiecărui determinant și de aceea, în absența cooperării celulare, ele sunt ineficiente în stimularea răspunsului imun. Pe de altă parte, antigenele timo-dependente pot fi prea repede degradate de

celulele fagocitare. Nu au activitate mitogenică, iar dacă se leagă de receptorii limfocitelor B, aceste antigene se comportă ca haptene și nu declanșează diferențierea celulelor B.

De cele mai multe ori, limfocitele cooperante Th și B recunosc epitopi diferiți ai aceleiași molecule de antigen solubil nativ, neprelucrat, dar expus pe suprafața limfocitului B. Limfocitele B recunosc epitopi conformaționali ai antigenelor proteice mici, iar limfocitele Th recunosc epitopi secvențiali, de 10-20 aminoacizi. Cele două celule cooperante aderă una de alta. După ce recunoaște antigenul, celula Th activată secretă IL-2 în spațiul intercelular îngust, cu rol declanșator al stimulării limfocitului B. Clona de limfocite B, cu receptori specifici pentru epitopul antigenic, proliferază. Astfel, se produce fenomenul expansiunii clonale.

Limfocitele Th și B cooperează și în cazul în care recunosc epitopi diferiți ai unui antigen, asociați cu moleculele CMH II, pe suprafața unei CPA.

Majoritatea antigenelor solubile și toate antigenele corpusculare sunt captate și prelucrate de macrofage și de celulele dendritice și sunt prezentate în asociație cu moleculele CMH II. Epitopii acestor antigene, de cele mai multe ori cu specificitate diferită, sunt recunoscuți de limfocitele B și Th. Limfocitele Th se activează și eliberează IL-2 cu efect stimulator asupra limfocitului B, care proliferază și se diferențiază până la celula cap de serie în plasmocitul care sintetizează și secretă anticorpi specifici față de epitopul stimulator al limfocitului B.

Activarea limfocitelor B, indusă de antigenele timo-independente

Antigenele timo-independente se numesc astfel, deoarece declanșează răspunsul imun prin activarea directă a limfocitelor B, fără să necesite cooperarea limfocitelor Th. Antigenele timo-independente sunt molecule mari, neproteice: polizaharidul capsular de Streptococcus, ficolul (polimer de sucroză), dextran-sulfatul, LPS ale bacteriilor Gram negative, levanii (polimeri de fructoză), polivinil-pirolidona.

Antigenele timo-independente au trei proprietăți comune:

- au secvențe repetitive în structura lor chimică. Această condiție nu este suficientă și nici definitorie pentru calitatea de antigen timo-independent, deoarece polimerii sintetici ai L-aminoacizilor, au secvențe repetitive, dar sunt antigene timo-dependente;
- au o structură tridimensională care favorizează interacțiunea directă cu receptorii de antigen ai limfocitelor B;
- sunt molecule rezistente la acțiunea enzimelor degradative și persistă îndelung în organism.

Limfocitele T nu cooperează la elaborarea răspunsului imun indus de antigenele polizaharidice, deoarece acestea sunt rezistente la procesele degradative și nu furnizează oligozaharide care să se poată asocia cu moleculele CMH II. Fragmentele moleculare eventual rezultate din procese degradative, se leagă cu afinitate mică de proteine și nu se asociază cu moleculele CMH II.

Cele două categorii funcționale de antigene nu sunt strict delimitate în ceea ce privește mecanismul activării răspunsului imun. După degradarea structurilor repetitive, antigenele timo-independente devin timo-dependente. De exemplu, glucagonul (antigen timo-dependent), după clivare cu tripsină, eliberează doi determinanți antigenici: unul corespunzător capătului N-terminal, timo-independent și cel corespunzător capătului C-terminal, timo-dependent (stimulator al limfocitelor Th).

Activarea limfocitelor B1

Limfocitele B1 par să fie stimulate și să producă anticorpi după un mecanism independent de celulele T. Aceste celule au nivele înalte de IgM pe suprafața lor, apar timpuriu în ontogenie și migrează predominant în cavitățile peritoneală și pleurală, au capacitate de reînnoire și manifestă diferite specificități de legare a epitopilor antigenici. Celulele B1 recunosc antigenele bacteriene comune (fosforil-colina), Ig, ADN, proteinele membranare eritrocitare.

Spectrul reactivității nu este limitat la molecule nonself, ci se manifestă și față de molecule proprii: hormoni (insulină, tiroglobulină), constituenți celulari (ADN, miozină, tubulină, fosfolipide, fragmentul Fc al IgG autolog). Sinteza auto-anticorpilor de către celulele B1 este

argumentată de faptul că expansiunea neoplazică a acestor celule (ca în leucemia limfocitară cronică) este adeseori asociată cu simptomele autoimune.

Celulele B1 au un rol important în imunitatea înăscută, deoarece secretă cantități mari de anticorpi naturali (IgM) fără expunerea la antigenele din mediu și fără imunizare.

Celulele B1 au o contribuție foarte importantă la răspunsul imun al mucoaselor. Multe plasmocite din structurile limfoide ale intestinului, producătoare de IgA, derivă din celulele peritoneale B1, sugerând migrarea limfocitelor între cavitatea peritoneală și GALT. IgA sintetizat față de antigenele peretelui bacteriilor din lumenul intestinal, este secretat în special de celulele B1. sIgA produs de celulele B1 are rol important în protecția suprafeței mucoaselor, împiedicând penetrarea sistemică a bacteriilor microbiotei intestinale. Sinteza sIgA nu necesită celulele Th și nici structuri foliculare organizate (plăci Peyer și centri germinali).

Un alt situs strategic de apărare antimicrobiană este zona marginală a splinei, localizată la joncțiunea pulpei albe și roșii. Ea conține macrofage, celule dendritice, celule B și este prima linie de apărare față de agenții patogeni veniți pe cale sanguină. Celulele B din zona marginală se deosebesc fenotipic de alte limfocite splenice prin prezența mai bine exprimată, a receptorilor pentru complement și pentru IgM. Ca și celulele B1 peritoneale, celulele zonei marginale sunt foarte sensibile la stimularea cu LPS, care induce diferențierea lor rapidă în plasmocite. Stimularea lor este independentă de celulele Th.

Efectele stimulării antigenice asupra țesutului limfoid secundar

Antigenul injectat intravenos este captat preferențial de macrofagele din zona marginală a splinei. Antigenele care străbat mucoasa intestinală sunt captate de celulele M ale domului plăcii Peyer. Ele sunt transportate la limfocitele T și B din ariile plăcii. Evenimente asemănătoare au loc în țesutul limfoid asociat bronhiilor.

Antigenul injectat subcutan sau intradermic este transportat în ganglionii limfatici locali, fie în stare liberă cu fluxul limfatic, fie legat pe suprafața celulelor specializate (celulele Langerhans părăsesc epiderma prin vasele limfatice eferente, devin celule cu voal și după ce ajung în ganglionul limfatic migrează în aria celulelor T și devin celule interdigitate).

Limfocitele mature recirculante vin în contact cu CPA, se activează și formează centrul germinativ.

Într-un ganglion limfatic se disting 4 faze ale reactivității celulare.

1) În primele ore după stimularea antigenică se produce o reacție inflamatorie locală, cu o creștere a fluxului sanguin de circa 25 de ori. Se intensifică traficul limfocitar spre ganglionii regionali. Concomitent se produce obturarea căii de ieșire a limfocitelor din ganglion, dar rata curgerii limfei nu se modifică. Sub acțiunea unor factori locali (prostaglandine, factori de aderență) se mărește gradul de aderență limfocitelor și astfel în ganglioni se formează un “dop” limfocitar.

2) După 1-2 zile se intensifică ieșirea limfocitelor ganglionare în fluxul limfatic eferent. În ganglion sunt reținute limfocitele care au recunoscut specific antigenul.

3) În cea de a III-a și a IV-a zi după stimularea antigenică se intensifică proliferarea limfocitelor activate și în limfa eferentă apar limfoblaste. Acestea au proprietăți specifice de homing: vor migra în alți ganglioni și în noile sedii se diferențiază în celule care sintetizează anticorpi (plasmocite).

4) După cea de a IV-a zi diminuează generarea blastelor. Din celulele stimulate rezultă celule de memorie care trec în sânge și devin circulante.

Stimularea cu antigene timo-dependente este însoțită de formarea centrului germinativ. În centrul germinativ, limfocitele B proliferante se găsesc în asociație cu limfocitele Th.

DINAMICA RĂSPUNSULUI IMUN

MEDIAT HUMORAL

În serul normal, cantitatea totală de imunoglobuline este de 10 mg/ml (circa 5×10^{16} molecule).

Înainte de imunizare, anticorpilor serici specifici față de un antigen dat, sunt sub nivelul detectabil prin metodele clasice.

Răspusul imun generat după contactul primar al organismului cu antigenul constituie răspusul imun primar, în a cărui dinamică se disting trei faze:

- faza de latență

- faza de creștere a titrului anticorpilor

- faza de scădere a titrului anticorpilor serici.

Faza de latență este intervalul cuprins între momentul stimulării antigenice și începutul creșterii titrului anticorpilor serici. Durata sa este foarte variabilă în funcție de natura antigenului (de exemplu, 2-3 zile pentru hematiile de berbec și 20 de zile pentru toxina difterică), de doza de antigen administrată, de calea de administrare (subcutană, intramusculară, intravenoasă), de modul de administrare (cu sau fără adjuvant).

Latența este mai scurtă pentru antigenele corpusculare. Perioada de latență este necesară expansiunii clonale. La contactul primar al sistemului imunitar cu antigenul, în organism se găsește o populație numeric restrânsă de limfocite care recunosc specific antigenul. În perioada de latență, clona de limfocite activată specific, proliferază intens (cu o succesiune de circa 8 generații celulare) și va produce o populație de celule, corespunzătoare numeric reacției de apărare a organismului.

Faza de creștere a titrului anticorpilor serici începe la sfârșitul perioadei de latență. Titrul anticorpilor crește cu o rată exponențială. Durata sa este foarte variabilă: față de hematiile de berbec, titrul maxim al anticorpilor este atins la 4-5 zile, iar al anticorpilor anti-toxină difterică, la circa 90 de zile. Titrul rămâne maxim (în platou), câteva zile, după care începe să scadă.

Faza de scădere a titrului anticorpilor începe curând după atingerea valorii maxime. Rata scăderii depinde de rata sintezei, de rata degradării anticorpilor, dar și de cantitatea de antigen disponibil, care leagă anticorpii în complexe, determinând scăderea titrului lor. Titrul IgG scade cu 7%/ zi, IgA cu 25%/ zi, IgM cu 18%/zi. La 30-40 de zile, titrul anticorpilor poate deveni nedetectabil. În fazele de creștere și de scădere a titrului, anticorpii sunt detectabili prin reacții secundare in vitro, de aglutinare și de precipitare.

Fig. 69. Cele 4 faze caracteristice ale răspunsului: faza de lag, faza creșterii logaritmice a titrului anticorpilor, faza de platou și faza de declin, în timpul căreia anticorpii sunt catabolizați. Dinamica răspunsului imun depinde de natura antigenului și de specia gazdă.

În perioada de debut a răspunsului imun primar se sintetizează IgM. După câteva zile se detectează IgG, care atinge un titru maxim mai înalt decât IgM. Titrul IgM începe să scadă, înainte ca titrul IgG să atingă valoarea maximă. La nivelul maxim al titrului anticorpilor, IgG este de circa 10 ori mai concentrat decât IgM, ceea ce denotă că după activare, deși majoritatea limfocitelor B (circa 90%) au ca receptor de antigen molecula de IgM, după activare comută sinteza de la izotipul IgM la izotipul IgG.

Unele limfocite ale clonelor în expansiune, nu se diferențiază în plasmocite, ci sintetizează molecule de imunoglobulină care rămân asociate membranei citoplasmatică. În tehnica hemolizei localizate în gel, aceste celule nu produc plaje de liză. Ele constituie substratul celular al memoriei imunitare.

Răspunsul imun are caracter adaptativ și se caracterizează prin trei trăsături esențiale (care lipsesc reacțiilor de apărare nespecifice, înăscute):

- specificitatea (anticorpii se combină cu antigenul inductor)

- diversitatea izotipică și a situsului de combinare

- memoria (păstrarea memoriei experienței contactului cu antigenul).

Diversitatea. Moleculele de anticorpi sunt foarte heterogene în ceea ce privește izotipul (IgG, A, M, E). IgM dispare relativ repede, dar IgG și IgA persistă la titruri scăzute, nedetectabile prin

metodele obișnuite, pentru perioade variabile (săptămâni, ani). Anticorpul este heterogen din punctul de vedere al specificității de legare cu diferiți epitopi ai antigenului inductor.

Anticorpul răspunsului imun primar (IgM și IgG), în general, are afinitate scăzută, dar aviditatea lor este mare.

Afinitatea anticorpilor măsoară forța de legare dintre un epitop și situsul de combinare al anticorpului specific. Afinitatea este rezultatul forțelor de atracție (legături de H, forțe electrostatice, forțe van der Waals, legături hidrofobe), dintre cele două grupuri reactante.

Aviditatea măsoară forța rezultantă a afinității dintre epitopii multipli și paratopii complementari și este consecința faptului că cele mai multe antigene sunt mozaicuri de epitopi. Complexele antigen-anticorp cu IgM au aviditate mare, deoarece anticorpul este decavalent.

RĂSPUNSUL IMUN HUMORAL SECUNDAR

Răspunsul imun secundar este expresia memoriei imunitare. Memoria definește capacitatea unui organism de a elabora un răspuns imun mai eficient, adică mai rapid, dar în special mai intens, după contactul secundar cu antigenul.

Răspunsul imun secundar față de antigenele timo-independente este comparabil cu răspunsul imun primar:

- după stimularea secundară, titrul anticorpilor nu crește semnificativ

- se sintetizează predominant IgM

- nu se produce comutarea sintezei la IgG

- memoria imunitară este slab exprimată.

Răspunsul imun secundar este indus de antigenele timo-dependente și se caracterizează printr-o latență mai scurtă, creșterea rapidă a titrului anticorpilor, cu un maxim mult mai înalt decât în răspunsul imun primar.

Doza de antigen inductoare a răspunsului imun secundar este mult mai mică, iar timpul necesar dublării titrului este de ordinul orelor. Inițial se sintetizează IgM, fără o perioadă evidentă de latență. Sinteza IgG este de asemenea accelerată. Titrul maxim al IgG este de câteva ori mai mare decât în răspunsul imun primar și rămâne ridicat o perioadă mult mai lungă de timp.

Din punctul de vedere al evenimentelor celulare, la câteva zile după inițierea răspunsului imun secundar, limfocitele B de memorie, activate, migrează în măduva osoasă și se maturează în plasmocite. Măduva osoasă este un sediu major al răspunsului imun specific și o sursă majoră de imunoglobuline. În răspunsul imun secundar, cea mai mare parte a imunoglobulinelor se sintetizează în măduva osoasă. În timp ce țesutul limfoid periferic răspunde rapid după stimularea antigenică, dar numai pentru o perioadă scurtă, măduva osoasă răspunde lent, dar sinteza de anticorpi este masivă și de lungă durată, față de un antigen care stimulează repetat. Fig. 70. Răspunsul imun primar și secundar față de un antigen macromolecular. Este ilustrată corelarea titrului anticorpilor cu activitatea celulelor B. Citochinele reglează comutarea sintezei de la IgM la IgG.

Trăsăturile distinctive ale răspunsului imun secundar sunt:

a) maturarea afinității anticorpilor;

b) comutarea izotipului la sinteza IgG.

Maturarea afinității anticorpilor se explică prin aceea că pe parcursul diferențierii proliferative a limfocitelor B, se produc mutații somatice ale secvenței regiunii V, prin substituții de nucleotide și prin selecția mediată de antigen, a clonelor de limfocite cu afinitate mare de legare a epitopilor complementari. La om, hipermutația are loc în prezența antigenului, în centrul germinativ, singurul situs în care antigenul este reținut pentru luni sau ani, asociat cu celulele. Antigenul este sechestrat pe suprafața celulelor dendritice foliculare, care îl păstrează sub forma complexelor antigen-anticorp, în proximitatea limfocitelor B. Consecutiv mutației somatice, se sintetizează

anticorpi cu afinitate mai mare, deoarece, treptat, crește numărul limfocitelor B cu mutații care conferă afinitate mai mare de legare a anticorpilor cu antigenul. Celulele B care au suferit mutații nefuncționale, mor prin apoptoză.

Mutațiile sunt mai ales punctiforme, cu foarte rare deleții sau inserții a nucleotidelor unice.

Sinteza anticorpilor cu afinitate înaltă are două consecințe practice importante:

- complexe antigen-anticorp sunt greu dissociabile și se elimină mai rapid din mediul intern;
- anticorpii dau reacții încrucișate cu antigenele înrudite.

Reacțiile încrucișate ale anticorpilor cu afinitate crescută au o importanță practică deosebită, pentru că imunizările cu antigene înrudite, pot avea efecte neașteptate. De exemplu, indivizii adulți vaccinați cu virusul influenza, pot să producă, surprinzător, anticorpi cu un titru mai mic față de antigenul folosit în vaccinare, decât titrul anticorpilor față de o tulpină de virus care a produs o infecție la vârsta copilăriei. Acesta este fenomenul “amintirii păcatului originar” și stă la baza studiilor epidemiologice retrospective, pentru precizarea serotipului unui agent infecțios care a declanșat epidemii trecute. Explicația constă în faptul că imunizarea primară generează celule cu memorie față de mai multe antigene înrudite. La reîntâlnirea cu unul din antigenele înrudite, este stimulată o populație de celule care recunoaște determinanți antigenici comuni. Se sintetizează anticorpi care se combină cu ambele variante antigenice, deși, uneori, anticorpii specifici față de epitopii celui de al II-lea antigen pot să lipsească.

Comutarea izotipului constă în trecerea de la sinteza IgM în cursul răspunsului imun primar, la sinteza altor izotipuri, în special IgG, în răspunsul imun secundar.

La nivel molecular, comutarea izotipului este rezultatul deplasării complexului genic VDJ, de la poziția sa originală, adiacentă capătului 5' al genei C μ , într-o poziție nouă, adiacentă capătului 5' al altei gene C, de exemplu C γ . După această aranjare genică, toată secvența genică dintre poziția inițială a complexului VDJ și localizarea finală, este eliminată prin deleție. Procesul rearanjării genelor se numește recombinare prin comutare (switch recombination).

Excepția de la acest mecanism este sinteza simultană a receptorilor de membrană IgM și IgD (mIgM și mIgD), de către celulele B mature. Sinteza catenei δ nu implică recombinarea prin

comutare, ci este rezultatul înădirii alternative a exonilor unei copii de ARN premesager care conține genele VDJ, cu secvența genei C μ sau a genei C δ . Fig. 71. a. Mecanismul înădirii genice pentru comutarea de la IgM membranar, la IgM secretat. Pentru forma secretată, secvența hidrofobă codificată de exonii M-M care ancorează IgM receptor de membrană este eliminată.

b. IgM și IgD cu funcția de receptori de antigen, coexistă pe aceeași celulă, prin înădirea diferențiată a copiei primare de ARN.

Gena activă pentru sinteza imunoglobulinelor este transcrisă în ARN premesager, care conține secvențe codificatoare pentru regiunile V și C (exoni), dar și secvențe necodificatoare (introni). Intronii se găsesc între secvențele recombinante VJ sau VDJ și gena C. Pentru catena H, intronii se găsesc între exonii care codifică domeniile individuale. Intronii sunt eliminați prin înădirea ARN și rezultă ARNm unitar, care este tradus în polipeptidele moleculei de imunoglobulină.

Sinteza imunoglobulinei se face cu rate distincte în diferite celule B, în raport cu gradul ei de diferențiere. O celulă B nestimulată antigenic sintetizează circa 106 molecule de imunoglobulină pe zi, cu rol, în primul rând, de receptori membranari de antigen, iar un plasmocit produce până la 2000 molecule de imunoglobulină/secundă, toate având rolul de anticorpi plasmatici.

Nevertebratele nu au memorie imunitară.

Anticorpii îndeplinesc următoarele funcții esențiale:

- se combină specific cu antigenele solubile și formează complexe antigen-anticorp, care sunt epurate de macrofage

- neutralizează toxinele

- se leagă specific cu determinanții antigenici virali și neutralizează infecțiozitatea virionilor

- opsonizează microorganismele dintr-un focar infecțios

- fixează complementul pe suprafața unui antigen celular și efectul este liza (bacterioliza, citoliza, hemoliza).

Factorii care condiționează intensitatea răspunsului imun

Titrul anticorpilor sintetizați în cursul răspunsului imun este dependent de mai mulți factori: de calea de administrare a antigenului, de doză, de ritmul și modul de administrare (cu sau fără adjuvant) și de factorii genetici ai organismului imunizat.

Pentru producerea contactului rapid dintre antigen și celulele imunocompetente din ganglionii limfatici este avantajoasă calea parenterală de administrare: intradermică, subcutană sau intramusculară. Injectarea intravenoasă favorizează contactul antigenului cu limfocitele din splină, dar răspunsul imun are o intensitate mică, datorită eliminării rapide a antigenului.

Cea mai eficientă cale de administrare a antigenului este cea intradermică, pentru că persistența sa la locul injectării este de lungă durată și la situsul injectării se acumulează celule implicate în elaborarea răspunsului imun. Există chiar posibilitatea sintezei locale, in situ, a anticorpilor.

Doza de antigen influențează nivelul afinității anticorpilor. Dozele mari de antigen, induc o maturare insuficientă a afinității anticorpilor, în raport cu dozele mici, deoarece acestea stimulează numai clonele de limfocite cu receptori de înaltă afinitate față de antigenul stimulant, în timp ce dozele mari ale aceluiași antigen stimulează clonele de limfocite de înaltă și de mică afinitate și produc chiar stimularea nespecifică a limfocitelor.

Intensitatea răspunsului imun este dependentă de legea dozelor repetate și a intervalelor. Administrarea aceleiași doze de antigen, în mod fracționat și la intervale adecvate, este mai eficientă decât administrarea dozei unice, deoarece fiecare doză mică pregătește organismul, făcându-l mai reactiv față de doza următoare.

Uneori, a II-a injectare, foarte apropiată în timp de prima, poate fi inoperantă, deoarece antigenul este eliminat de anticorpii sintetizați după stimularea primară. Cel mai bun protocol de

administrare pentru a obține un răspuns imun secundar optim, constă în injectarea unei doze mici de antigen, urmată de doze progresiv crescânde.

O cantitate prea mare de antigen, produce “inundarea” organismului cu substanțe nonself și răspunsul este paradoxal. În loc de stimularea răspunsului imun se obține efectul invers, denumit paralizie imunologică.

Paralizia imunologică este o reacție de protecție a organismului, față de dozele mari de antigen. Organismul își blochează toate mecanismele de răspuns imun. Fenomenul areactivității imunitare poate surveni atât după injectarea unei cantități prea mari de antigen ușor metabolizabil, cât și după injectarea unei cantități moderate a unui antigen care se metabolizează greu. La fiecare specie de organisme, pentru fiecare antigen, pare să existe un echilibru controlat genetic, între doza stimuloare a răspunsului imun și cea care produce paralizia imunologică.

Antigenele “bune” sunt hidrolizate parțial și stimulează declanșarea răspunsului imun, iar antigenele “slabe”, fie sunt degradate rapid, fie sunt rezistente la degradare și induc starea de paralizie imunitară. De aceea, doza optimă necesară inducerii unui răspuns imun optim este diferită de la un antigen la altul și se determină experimental pentru fiecare caz. De asemenea, pentru fiecare antigen se stabilește numărul de fracții ale dozei, intervalul administrării fracțiilor, calea de administrare, adjuvantul.

Pentru antigenele corpusculare, injectările se fac, în general, la 7 zile, iar pentru cele macromoleculare, la 14-21 de zile.

Raportul dintre cantitatea de antigen intact și cel parțial degradat, care se găsește în organism la un moment dat după administrare, este o reflectare directă a ratei cu care antigenul este metabolizat.

Imunogenitatea unui antigen este influențată de modul de administrare. Asocierea cu adjuvanții mărește gradul de imunogenitate a multor antigene, iar pentru altele, asocierea cu un adjuvant este o condiție obligatorie a imunogenității. Administrarea în asociere cu un adjuvant este foarte importantă pentru imunogenitatea proteinelor ușor degradabile și a celor slab imunogene (de exemplu, hormonii). Cele ușor degradabile, după administrare în stare nativă, dispar repede din organism, dar în asociație cu un adjuvant sunt eliberate treptat, stimulând organismul o perioadă mai lungă de timp.

Injectarea intravenoasă anulează efectul favorabil al adjuvantului.

Maturitatea sistemului imunitar (imunocompetența) influențează intensitatea răspunsului imun. Administrarea unui antigen la un organism al cărui sistem imunitar este imatur, nu activează răspunsul imun, ci induce o stare de toleranță.

Răspunsul imun al indivizilor umani, la cei doi poli ai vârstelor, este slab. La copii, sistemul imunitar este imatur, iar la vârstnici, treptat, funcția imunitară diminuează, ceea ce se reflectă în reducerea activității limfocitelor T, creșterea proporției limfocitelor Ts, scăderea activității celulelor NK, toate având un efect imunodepresiv, asociat cu creșterea incidenței neoplaziilor și cu scăderea capacității de apărare față de agenții infecțioși.

Factorii genetici sunt esențiali pentru capacitatea de răspuns imun a organismului. O substanță nonself poate fi un bun antigen pentru unele specii, dar neantigenică pentru altele. De exemplu, albumina serică bovină este imunogenă pentru iepure, dar este slab imunogenă pentru om, iar polizaharidul capsular de *Str. pneumoniae* este imunogen pentru om și șoarece, dar neimunogen pentru iepure și cobai.

Antigenele naturale sunt mozaicuri de epitopi. Sistemul imunitar al unei specii, recunoaște unii epitopi, dar răspunde mai greu sau ignoră alții epitopi. Diferitele specii de organisme, pot sintetiza anticorpi cu specificități distincte față de același antigen, deoarece recunosc epitopi diferiți.

Uneori se înregistrează diferențe semnificative ale reactivității imunitare, chiar între organisme ale aceleiași specii, corelate cu starea fiziologică, cu starea nutritivă, cu sexul, cu vârsta. Din această cauză, serurile imune nu sunt reactivi standardizați și rezultatele obținute în reacțiile imune in vitro, nu sunt totdeauna reproductibile.

Anticorpi naturali

Imunoglobulinele serice sunt cele mai abundente proteine serice (10 mg/ml), care s-au sintetizat în afara oricărui proces de imunizare, dar au specificitate față de antigene cunoscute. De exemplu, în serul de șoarece se găsesc anticorpi anti-hematie de berbec. Denumirea de anticorpi “naturalii” sau “spontanii” s-a folosit pentru a-i distinge de anticorpii sintetizați după imunizare.

Anticorpul natural se sintetizează ca urmare a stimulării imunitare continue, sub acțiunea antigenelor microbiotei intestinale. Funcțiile anticorpilor naturali sunt controversate.

Anticorpul natural este polireactiv, adică dau numeroase reacții încrucișate, cu o diversitate de antigene (polizaharide, proteine, acizi nucleici), de diferite origini: virale, bacteriene, fungice sau ale paraziților multicelulari.

O importanță deosebită au anticorpul natural ce se leagă cu determinantul

α -gal, cu levanul, cu LPS sau cu fosfatidil-colina. Funcția anticorpilor naturali anti- α -gal pare a fi legată direct de apărarea față de agenții patogeni. Pierderea genei galactozil-transferază în evoluție, a conferit un avantaj, prin sinteza anticorpilor anti-gal, cu rol protector față de agenții patogeni.

Majoritatea anticorpilor naturali sunt sintetizați de un set special de limfocite B, denumite B1.

Sinteza anticorpilor naturali se datorează faptului că, postnatal, organismele sunt supuse stimulărilor antigenice multiple, cu antigene de diferite origini (virale, bacteriene, fungice, alimentare), care pătrund pe calea mucoaselor digestive și respiratorii. Antigenele stimulează policlonal, limfocitele B din formațiunile limfoide asociate mucoaselor. Deși se sintetizează după stimulări repetate cu doze mici de antigene, afinitatea anticorpilor naturali este inferioară celei a anticorpilor sintetizați după imunizare.

Anticorpul natural aparține izotipului IgM. Din aceeași categorie fac parte aglutininele sanguine α și β . Sinteza lor are loc înainte de naștere, în afara oricărei stimulări antigenice.

Anticorpul natural, datorită spectrului larg de legare cu antigene majore comune diferiților agenți patogeni, au rolul de molecule de recunoaștere ale imunității înăscute.

Sistemul imunitar înăscut cuprinde și molecule cu o structură diferită de aceea a anticorpilor, ca lectina care leagă manoză (MBL = manose binding lectin). Este o opsonină din sânge care fixează complementul și utilizează receptorul C1q al macrofagului.

Serul normal de bovine conține o proteină denumită conglutinină, care determină agregarea (conglutinarea) eritrocitelor tapetate cu componente ale complementului. La alte specii, sinteza conglutininei este indusă de imunizarea cu molecule tapetate cu componente ale complementului sau sinteza sa este declanșată după activarea complementului in vivo.

Imunoconglutininele sunt auto-anticorpi față de epitopi exprimați de componentele activate ale complementului, care în moleculele native sunt criptice. Conglutininele sunt anticorpi anti-complement, echivalenți factorilor reumatoizi, specifici față de IgG. Serul uman conține nivele scăzute de imunoconglutinine, dar nivelul lor crește după activarea complementului în infecțiile acute și cronice și în maladiile inflamatorii cronice, produse de virusuri, de microorganisme și de paraziți.

Biosinteza imunoglobulinelor

Sediul sintezei imunoglobulinelor este plasmocitul. Limfocitele sintetizează cantități minime de imunoglobuline, care rămân ancorate în membrana citoplasmatică și au rolul de receptor de antigen. După activarea limfocitului, celulele descendente rezultate printr-un proces de proliferare și diferențiere, sintetizează cantități crescânde de imunoglobuline.

Plasmocitul este celula cap de serie, diferențiată terminal, care nu se divide și trăiește câteva zile. Ea sintetizează molecule identice de imunoglobuline (monoclonale), cu o singură specificitate de legare față de un epitop antigenic, cu o rată de circa 2000 molecule/secundă.

Catenele polipeptidice L și H se sintetizează separat, pe polisomi de dimensiuni diferite, atașați pe cisternele reticulului endoplasmic. Mărimea polisomilor este proporțională cu lungimea catenei polipeptidice, pe care o sintetizează și este dependentă de lungimea moleculei de ARNm codificatoare. Catena L se sintetizează pe polisomi de 7-8 ribosomi, iar catena H, pe polisomi de 14-16 ribosomi. Polisomii lungi, purificați precipită in vitro, cu serul imun anti H.

Cele două catene se sintetizează ca precursori mai mari, cu o secvență N-terminală de circa 20 de aminoacizi (secvența leader), care este clivată în timpul transferului în lumenul cisternei de reticul endoplasmic. Cele două tipuri de catene se sintetizează ca unități de sine stătătoare și

ulterior se assemblează pentru a forma o structură tetracatenară. Moleculele de imunoglobulină sintetizate, se acumulează în cisternele reticulului endoplasmic granular și ulterior sunt transferate în cisternele Golgi. La acest nivel se formează legăturile S-S și se atașează grupările glucidice. Compoziția componentei glucidice este variabilă, dar ca structură de bază este reprezentată de N-acetil-glucozamină, manoză, galactoză, fucoză, acid sialic. Legarea primelor două monozaharide începe în momentul în care catena H este atașată de polisom. Catena polizaharidică se alungește progresiv, pe măsură ce proteina se deplasează în cisternele Golgi. Moleculele de anticorpi părăsesc aparatul Golgi, în vezicule secretorii, care fuzionează cu membrana citoplasmatică și eliberează conținutul la exterior.

Glicozilarea este o condiție obligatorie pentru secreția moleculelor de imunoglobulină.

Moleculele de IgA și IgM prezintă forme polimerizate. Asocierea polimerilor este catalizată de lanțul J. Polimerizarea are loc concomitent cu secreția. În citoplasma plasmocitului nu se găsesc molecule polimerizate.

În celulele care sintetizează imunoglobuline destinate secreției, catenele L se găsesc în mic exces față de catenele H. Pentru fiecare din cele două tipuri de catene, există un număr egal de molecule de ARN, dar catena L se sintetizează de două ori mai repede decât catena H, având dimensiuni de două ori mai mici.

Catabolismul imunoglobulinelor

Catabolismul imunoglobulinelor s-a studiat utilizând moleculele marcate cu I125 sau I131. Primul are timpul de înjumătățire de 57 de zile, iar al II-lea, de 8 zile. Iodul radioactiv se cuplează cu nucleul aromatic al tirozinei, sub acțiunea blândă a unor agenți oxidanți (H₂O₂, cloramina T), care măresc șansa ca molecula de imunoglobulină marcată să rămână nemodificată din punct de vedere structural și funcțional. Rata scăderii radioactivității, reflectă rata catabolizării proteinei native. Catabolizarea imunoglobulinei este o reacție de ordinul 1, adică din molecula nativă rezultă produși finali de catabolism.

Cantitatea de imunoglobulină catabolizată(dIg) într-un interval de timp (dt) este direct proporțională cu concentrația moleculelor în sânge și este constantă, conform relației: $d \text{ Ig}/dt = k$

Ig (k reprezintă rata catabolizării imunoglobulinelor, adică fracția de molecule din cantitatea totală, ce se catabolizează în unitatea de timp, de obicei în 24 de ore).

Rata de catabolizare este o reflectare directă a timpului de înjumătățire a imunoglobulinelor. Valorile celor doi parametri sunt cu atât mai mari, cu cât concentrația imunoglobulinelor este mai mare. Pentru calculul ratei de catabolizare a imunoglobulinelor este suficient să se determine timpul de înjumătățire a radioactivității, care la un individ normal este de 22 de zile.

Mecanismul catabolizării imunoglobulinelor. Prima ipoteză cu privire la mecanismul molecular al catabolizării afirmă că moleculele de imunoglobulină trec din spațiul vascular, într-un " compartiment de catabolizare", în care se găsesc celule capabile să le recunoască și să le capteze prin pinocitoză. Deoarece aceste celule au un număr limitat de receptori capabili să lege specific moleculele de imunoglobulină, în veziculele de micropinocitoză vor fi încorporate nu numai moleculele fixate pe receptori, ci și molecule libere. În accepțiunea ipotezei, moleculele fixate pe receptorii celulelor, sunt protejate de procesele degradative și părăsesc celula, revenind în circulație, în timp ce moleculele care au fost pinocitate nespecific (fără legarea prealabilă de receptori) sunt degradate. Ipoteza explică logic dependența ratei de catabolizare a imunoglobulinelor, de concentrația lor. La concentrație sanguină scăzută, majoritatea moleculelor de imunoglobuline sunt endocitate specific, prin intermediul receptorilor și astfel sunt protejate de degradare, întorcându-se intacte în circulație. Așa se explică faptul că în cazurile de hipogamaglobulinemie, timpul de înjumătățire este mare. La concentrații mari de imunoglobuline, timpul de înjumătățire se scurtează. În aceste cazuri, numai o proporție mică de molecule este protejată de degradare prin legarea de receptorii celulari, restul fiind endocitate nespecific și expuse degradării.

A II-a ipoteză consideră că procesul catabolic este inițiat numai după ce moleculele de imunoglobuline au suferit o modificare conformațională a regiunii Fc. Moleculele modificate (prin uzură metabolică) se fixează prin regiunea Fc, de membrana celulelor care au astfel de receptori: leucocitele, PMN, macrofagele (în special hepatice și splenice) și sunt înglobate prin micropinocitoză. În veziculele de pinocitoză, are loc reducerea legăturilor S-S intercatenare și hidroliza sub acțiunea enzimelor lizosomale. Această ipoteză, contrară celei de mai sus, consideră că moleculele de imunoglobulină, odată fixate pe receptorii celulari, sunt înglobate în celule și degradate parțial sau total. Pentru procesul catabolizării, în concepția ipotezei, hotărâtoare este tranziția moleculei de imunoglobulină de la conformația nativă, la cea modificată. Ipoteza este sprijinită de heterogenitatea receptorilor pentru Fc de pe suprafața macrofagelor. O categorie de receptori pentru Fc fixează numai moleculele care au suferit modificări ale regiunii Fc. Ei se deosebesc de receptorii clasici pentru Fc, care leagă moleculele native de imunoglobulină.

Utilizări ale serurilor imune

Cea mai largă utilizare (în perioada 1920-1940) a serurilor imune a constituit-o domeniul seroterapiei (terapia de urgență a unor infecții septicemice, a infecției difterice, scarlatinoase, tetanice, rabice). Dezavantajul major este că serurile imune conțin nu numai anticorpii specifici, ci și toate celelalte proteine serice, care sunt imunogene pentru organismul receptor și induc răspunsul imun, adeseori cu manifestări patologice (boala serului).

Anticorpii se folosesc în tehnici și metodologii de diagnostic imunologic. Utilizarea lor depinde de posibilitatea de a-i produce pe iepure, capră, berbec sau cal. Principalele direcții de utilizare a anticorpilor sunt următoarele:

- în determinările fine ale unor cantități mici de antigene (tehnicele ELISA, RIA);
- pentru purificarea proteinelor în cromatografia de afinitate;
- pentru identificarea unor medicamente în ser și urină;
- pentru detoxifierea organismului de droguri (eliminarea digoxinei după intoxicare prin administrarea îndelungată la pacienții cu insuficiență cardiacă);
- pentru identificarea unui agent infecțios, prin reacțiile serologice care utilizează seruri imune cu specificitate cunoscută (serotipizare).

2Lectinele sunt glicoproteine care se leagă nespecific cu glucidele sau cu grupările glucidice ale glicoproteinelor. Ele precipită polizaharidele și glicoproteinele sau aglutinează celulele.

Activitatea lor aglutinantă și precipitantă poate fi inhibată de haptene(monozaharide și oligozaharide).

IMUNITATEA MEDIATĂ CELULAR

Răspunsul imun mediat celular s-a evidențiat înainte de descoperirea diferențelor funcționale dintre limfocitele T și B, odată cu observația că unele antigene induc reacții inflamatorii a căror intensitate nu este corelată cu titrul anticorpilor serici. La indivizii la care anticorpii serici nu sunt detectabili, pot fi produse reacții de hipersensibilitate întârziată, ca manifestări directe ale răspunsului imun mediat celular.

În organism, imunitatea mediată celular îndeplinește următoarele funcții:

- protecția față de infecțiile bacteriene cu localizare intracelulară, față de infecțiile fungice, virale și cele produse de protozoare;
- rezistența față de multe tipuri de celule tumorale;
- mediator al proceselor inflamatorii asociate cu diferite procese infecțioase;
- respingerea alografelor.

În toate aceste cazuri, reacția imună mediată celular se declanșează înainte de sinteza anticorpilor.

Răspunsul imun mediat celular este consecutiv recunoașterii unei structuri antigenice pe suprafața unei celule țintă, de către limfocitul citotoxic TCD4 sau TCD8, ori de către celulele NK sau K, cu potențial litic natural. În general, limfocitele TCD4 recunosc antigenele prelucrate, sub

forma fragmentelor peptidice, pe suprafața celulelor specializate (macrofage), în asociație cu moleculele CMH II.

Fig. 72. Citotoxicitatea mediată celular. Celulele T (CD8 și unele celule CD4) recunosc antigenul asociat cu moleculele CMH. Celulele NK detectează absența moleculelor CMH I autologe pe celula țintă și a unor liganzi puțin cunoscuți pe celulele tumorale. Celulele K recunosc regiunea Fc a IgG legat pe antigenele de suprafață ale celulei țintă (după Roitt, 1993).

Limfocitele TCD8 recunosc antigenele prezentate pe suprafața celulelor țintă, în asociație cu moleculele CMH I. Ele au dimensiuni mici și recunosc celulele proprii infectate cu virusuri sau malignizate, dar și transplantele alogene sau xenogene. Limfocitele TCD8 produc efecte citotoxice asupra celulei țintă, atât in vivo cât și in vitro.

Procesul morții celulare sub acțiunea limfocitelor Tc specifice, in vitro, se desfășoară în trei stadii:

- stadiul de recunoaștere

- programarea pentru liză

- dezintegrarea celulei țintă.

Limfocitul Tc recunoaște antigenul de pe suprafața celulei țintă, prin intermediul receptorului de antigen. Fig. 73. Interacțiuni celulare în procesul litic al celulei țintă.

La contactul cu celula țintă, mobilitatea limfocitului Tc se accentuează și întreaga suprafață a celulei țintă este explorată în câteva minute. Stadiul de recunoaștere durează circa un minut și necesită obligatoriu prezența cationilor bivalenți (Ca^{2+}).

Programarea pentru liză constă în eliberarea moleculelor cu efect citotoxic. În spațiul îngust al joncțiunii cu celula țintă, limfocitul Tc eliberează o proteină citolitică (o limfotoxină) de 70 kD denumită perforină și granzimele (enzime asociate granulelor): serin-proteaza (denumită granzima B), o cistein-aspartic protează (caspază). Caspazele sunt proteaze din categoria cistein-

proteazelor, care necesită pentru acțiunea lor, intermediari covalenți cisteinil-aspartat. Ele clivează substraturi celulare specifice care produc modificări ale citoscheletului și cromatinei ce declanșează moartea apoptotică a celulei țintă. Specificitatea strictă a acțiunii lor este neobișnuită la proteaze.

Perforina și granzimele sunt principalele molecule ale granulelor celulelor TCD8 și NK. Acțiunea lor este sinergică.

Proteazele determină liza rapidă a celulei țintă, iar celelalte proteine cu efect citotoxic acționează lent. Perforina se polimerizează și formează pori transmembranari, cu diametrul de 10 nm. Din acest punct de vedere, modul său de acțiune se aseamănă cu C9 .

Fig.74. Ilustrarea schematică a celor două mecanisme ale citotoxicității: exocitoza granulelor de perforină/granzimă și citotoxicitatea mediată prin interacțiunea FasL/Fas, produsă de limfocitele Tc CD8+ și CD4+.

Dezintegrarea celulei țintă se caracterizează prin apariția leziunilor membranare și durează circa 100 minute. Este un proces dependent de temperatură și nu necesită prezența limfocitului Tc, deși în prezența sa procesul este accelerat.

După contactul cu o celulă țintă, limfocitul Tc se deplasează pentru a explora alte celule. Procesul de recunoaștere a antigenului este limitat (restrictiv) de identitatea moleculelor CMH I.

Limfocitul Tc este rezistent la acțiunea litică a proteinelor proprii, deoarece granzimele sunt sintetizate ca prepropeptide. După clivajul peptidelor leader, moleculele sunt transportate prin cisternele golgiene până la granulele omologe lizosomilor. Pentru liza unei celule țintă, limfocitul Tc eliberează 10% din conținutul său toxic.

Al II-lea mecanism al citolizei, independent de Ca²⁺ și de perforină (descriș în 1993) este mediat de interacțiunea receptorului Fas cu ligandul Fas (FasL). Receptorul Fas (CD95) este exprimat pe celula țintă, iar ligandul Fas (Fas L = CD95L) este exprimat pe limfocitele T citotoxice.

Fig.75. Reprezentare schematică a rolului perforinelor citolitice asupra celulei țintă (după Male și colab., 1987).

În concluzie, limfocitele T citotoxice pot media liza celulei țintă, fie prin exocitoza granulelor citolitice, care conțin complexul perforină-granzimă, fie prin interacțiuni între receptorul Fas și ligandul Fas.

Fig.76. După eliberarea conținutului enzimatic, celula efectoră rămâne viabilă și funcțională față de alte celule țintă.

Acțiunea limfocitelor Tc se evidențiază in vitro, în reacția limfocitară mixtă(RLM) uni- sau bidirecțională. În reacția unidirecțională, limfocitele organismului A se cultivă în amestec cu limfocitele organismului B, blocate metabolic prin tratament cu mitomicină C sau prin iradiere X. După tratament, proprietățile antigenice rămân nemodificate, dar limfocitele devin neproliferante. În 4-5 zile, limfocitele populației viabile sunt stimulate, pro-liferează și devin citotoxice.

În RLM bidirecțională, se produce activarea concomitentă a celor două populații de limfocite Tc cocultivate. Raportul numeric este decisiv pentru evoluția interacțiunilor. Limfocitul Tc este supus atacului concertat al câtorva limfocite Tc agresoare și este lizat. Îndepărtarea ionilor de Ca^{2+} din mediul de cultivare, cu EDTA, previne liza celulei țintă. Probabil, ionii de Ca au un rol esențial în exocitoza și în activarea perforinei.

Limfocitele granulare mari (LGL, Large granular lymphocytes) sunt celule non-T, non-B, efectoră ale citotoxicității mediate celular și au receptori pentru regiunea Fc a imunoglobulinelor. Ra-portul nucleo-citoplasmatic este mic, cu multe granule azurofile în citoplasmă. Datorită dimensiunilor mai mari și densității mai mici, LGL pot fi ușor separate de limfocitele mici, prin centrifugare. Efectul lor citotoxic s-a evidențiat in vitro, pentru celulele umane și de șoarece. Ele reprezintă 5-10% din totalul limfocitelor circulante și recunosc celulele purtătoare de antigene prin mecanisme distincte.

a) Celulele NK (Natural killer) se identifică, datorită capacității lor de a adera la suportul de plastic, după 24 de ore de incubare a limfocitelor izolate din sângele periferic, cu IL-2 recombinant. Astfel, celulele NK pot fi captate pe suportul de plastic și separate de limfocitele T, a căror activare și exprimare a moleculelor membranare de aderență, necesită o perioadă mai lungă de timp. In vitro, celulele NK lizează spontan o varietate de celule maligne, celule infectate cu virusuri sau celule alogene, într-o interacțiune nespecifică ce nu este restrictivă în raport cu identitatea moleculelor CMH. Imunizarea prealabilă a organismului cu celule sensibile, nu ridică nivelul citotoxicității nerestrictive în raport cu moleculele CMH și de aceea se numesc "ucigașe naturale".

Nu se cunoaște receptorul prin care celula NK interacționează cu celula țintă și nici structura membranelor a celulei țintă recunoscută de celula NK. Moleculile CMH I de pe suprafața celulei țintă, cel puțin uneori, inhibă liza mediată de celulele NK, așa cum arată studiile in vitro. Aceste observații au condus la ipoteza că celulele NK sunt specializate să recunoască și să lizeze celulele cu nivele scăzute ale moleculelor CMH I. Activitatea lor citotoxică este stimulată de interferon. Fig. 77. Celulele NK nu lizează celulele self normale (A), dar lizează celule alogene (B) sau celulele self care nu exprimă molecule CMH clasa I (C). Celula NK exprimă cel puțin un receptor specific cu rol inhibitor al interacțiunii cu moleculele autologe CMH clasa I. După infecția virală sau ca o consecință a transformării maligne, celulele autologe pierd o proporție importantă a moleculelor CMH I, fiind înlocuite de peptidele anormale. În ambele cazuri, aceste celule devin sensibile la liza mediată de celulele NK. Celulele alogene care exprimă molecule CMH I, neînrudite cu moleculele self, sunt lizate deoarece interacțiunile dintre receptorii NK și moleculele CMH I nu sunt inhibate eficient.

Efectul litic este rezultatul acțiunii unui factor pe care celula NK îl transferă în celula țintă, prin contact intercelular direct. Granulele secretorii conțin molecule citotoxice, ca și cele secretate de limfocitele Tc.

Celulele NK par a avea un rol foarte important în rezistența organismului față de celulele tumorale și în liza celulelor infectate cu virusuri. Acțiunea lor este detectabilă la 2-3 zile după infecția virală, precedând astfel acțiunea efectorilor limfocitelor Tc specifice și a anticorpilor.

b) Celulele K sunt limfocite granulare mari (LGL), dar se deosebesc de celulele NK, prin prezența receptorilor membranari de înaltă afinitate pentru Fc γ . Celulele K interacționează cu celulele țintă prin intermediul moleculelor de IgG. Celulele tumorale sau cele infectate cu virusuri leagă moleculele de IgG pe suprafața lor, la nivelul situsurilor antigenice și expun fragmentul Fc. Acesta funcționează ca adaptor, permițând celulei K, prin intermediul receptorului pentru Fc, să recunoască și să lizeze celulele țintă tapetate cu anticorpi. Liza celulei țintă, mediată de receptorii pentru regiunea Fc, este cunoscută sub denumirea de citotoxicitate mediată de anticorpi

(ADCC = antibody dependent cell cytotoxicity).

Fenomenul ADCC s-a demonstrat indirect, in vivo, la pacienții injectați cu AMC specifici față de antigenele unor celule tumorale (melanom, limfom al celulelor B): se produce liza extensivă a celulelor tumorale, atât prin fenomenul ADCC, cât și liza consecutivă fixării complementului.

Alte celule LGL sunt limfocitele NK activate in vitro, sub acțiunea IL-2, cunoscute sub denumirea de celule LAK (lymphokine activated killer). Fig. 78. Ilustrarea schematică a mecanismului citotoxicității mediate de anticorpi (ADCC).

După activarea cu stimuli exogeni (de exemplu, IL-2), unele limfocite T și celulele NK se activează: cresc ca dimensiuni, crește numărul granulelor și dobândesc capacitatea de a lega și de a liza un spectru larg de celule tumorale, celule infectate cu virusuri sau chiar celule tisulare normale. Astfel de celule efectoare, activate de IL-2, s-au denumit LAK (lymphokine activated killer). Celulele LAK se definesc ca limfocite care mediază citotoxicitatea nerestrictivă în raport cu moleculele CMH, față de o varietate de ținte, după activarea in vivo sau in vitro numai cu IL-2 sau în amestec cu alte citochine. Celulele LAK nu reprezintă o categorie specială de limfocite, ci derivă preponderent din celulele NK, dar și din limfocitele T. Mai puțin de 1% din totalul celulelor T, care mediază citotoxicitatea nerestrictivă în raport cu moleculele CMH, sunt precursorii celulelor LAK. Celulele LAK secretă citochine: TNF- α și interferon.

Celulele purtătoare de molecule nonsel (malignizate sau infectate cu virusuri) sunt recunoscute de monocite și chiar de PMN eozinofile, care au activitate litică asupra celulelor țintă.

Macrofagele și monocitele activate sunt mai mari decât celulele în repaus, exprimă mai intens moleculele CMH II și au conținut lizosomal

mai bogat.

Fig.79. Celulele Th au rol esențial în IMC. Celulele accesorii prelucrează antigenul și îl prezintă limfocitelor Th. Prin intermediul IL pe care le secretă, limfocitele Th selectează și activează mecanismele efectoare adecvate. Ele pot stimula celulele B să se diferențieze în celule producătoare de anticorpi, să stimuleze sau să inhibe alte categorii de celule efectoare: Tc, NK, macrofage, granulocite și celule K mediatore ale citotoxicității mediate de anticorpi (după Roitt, 1993).

Macrofagele se activează sub acțiunea IFN γ , a endotoxinelor bacteriene, după infecția cu bacterii intracelulare (Mycobacterium, Listeria). Activarea constă în amplificarea ratei metabolice. Macrofagul activat devine citotoxic pentru celula țintă. Interacțiunea macrofagului cu celula țintă nu este mediată de structuri specifice, dar macrofagul activat face discriminare între celulele modificate (malignizate sau infectate cu virusuri) și cele normale. Macrofagele activate fagocitează intens și realizează efectul ADCC. Ele produc IFN α cu efect activator asupra celulelor NK, secretă oxid nitric (NO), toxic pentru celula țintă, H₂O₂, produși de oxidare a glucozei cu efect toxic asupra țintei, secretă IL-1, TNF (tumour necrosis factor), colagenază.

TNF este o pro-teină citotoxică cu efect lent (48-72 de ore) asupra celulei sensibile, foarte asemănătoare limfotoxicinei produsă de limfocitele Tc activate. Ambele sunt proteine hidrofobe și se leagă cu mare afinitate de aceiași receptori ai celulei țintă.

Eozinofilele au rol important în apărarea față de viermii paraziți, prin efecte de citotoxicitate de tip ADCC. Focarele de parazitoză sunt asociate cu eozinofilie.

Oricare ar fi celulele efectoare ale citotoxicității mediate celular, limfocitele Th (subsetul Th1) au rol esențial în stimularea reactivității imunitare mediate celular, prin intermediul citochinelor, în special IL-2 și IFN.

MEDIATORII MOLECULARI AI REACTIVITĂȚII IMUNITARE

Răspunsul imun este controlat atât prin interacțiuni directe ale diferitelor tipuri de celule cooperante, cât și prin produsele de sinteză pe care acestea le secretă.

Factorii moleculari cu rol în reglarea răspunsului imun, inițial, au fost denumiți citochine. Citochinele cunoscute sunt împărțite în următoarele grupe funcționale: CSF (Colony Stimulating Factors), IL (Interleuchine), IFN (Interferoni) și TNF (Tumor necrosis factor), factori de creștere și chemochine.

Citochinele sunt proteine inductibile, care pot fi secretate de orice celulă din organism, cu posibila excepție a eritrocitelor.

Citochinele sunt molecule cu activitate biologică, în concentrații foarte mici (femto-molar = 10^{-15}), care induc un răspuns specific al celulelor sensibile. Acestea posedă receptori de mare afinitate pentru diferite citochine și răspund prin modificarea ratei sintezei ARN și a proteinelor. Citochinele sunt parte integrantă a conceptului lui C. Bernard, privind homeostazia mediului intern.

Activitatea citochinelor se manifestă in vivo și in vitro, la concentrații foarte scăzute și din această cauză au fost denumite imunohormoni sau hormoni reglatori ai răspunsului imun. Spre deosebire de hormoni, care acționează la distanță, citochinele acționează la nivel local, iar mecanismul acțiunii lor este similar cu acela al hormonilor peptidici.

Spectrul de acțiune al citochinelor este foarte larg, fiind implicate în toate aspectele patologice. Citochinele nu au activitate enzimatică, dar produc efectele numai după ce se leagă de receptori specifici de mare afinitate, ai celulelor sensibile. Cele mai multe celule au un număr mic de receptori (sute, până la câteva mii). Pentru a produce un răspuns maxim, numai un procent al receptorilor trebuie să lege citochina specifică. Se activează căile de semnalizare intracelulară și eventual se produce comutarea unui set de gene, care codifică diferite proteine: molecule de aderență intercelulară, proteaze, proteine de fază acută, enzime ale catabolismului lipidic, NO-sintaza și citochine, inclusiv cea care a produs stimularea inițială a celulei.

În funcție de efectele pe care le produc, IL se grupează astfel:

- IL care stimulează mobilitatea orientată a celulelor (chemochine)
- IL care modifică rata (stimulare sau inhibiție) diviziunii celulelor și diferențierea lor
- IL stimulative sau inhibitoare ale funcțiilor specifice ale unor celule
- IL care modifică viabilitatea celulelor (induc apoptoza).

Caracteristicile generale ale citochinelor sunt următoarele:

- majoritatea citochinelor sunt polipeptide sau glicoproteine cu gr. mol. între 5- 30 kD;
- multe formează homodimeri sau homotrimeri (IL-12 este un heterotrimer);
- sinteza lor constitutivă este minimă sau absentă;

- acțiunea lor este limitată, autocrină, paracrină sau chiar intracrină, dar nu endocrină, deși unele se găsesc în sânge în timpul infecțiilor generalizate. Acțiunea lor este mediată de receptori de mare afinitate. Unele citochine au spectru larg de acțiune, dar cel puțin unele efecte ale lor se manifestă asupra celulelor hematopoetice. Citochinele acționează adeseori prin stimularea sintezei sau inhibiției altei citochine (cascada de citochine) sau prin modularea exprimării receptorilor pentru alte citochine. Uneori, citochine cu structuri moleculare diferite au acțiuni asemănătoare (redundanță). O singură citochină acționează asupra mai multor tipuri de celule și produce acțiuni multiple (pleiotropism). De obicei, celulele în organism sunt supuse acțiunii concomitente a mai multor citochine cu efect sinergic sau antagonic.

Fig. 80.a. Acțiunea citochinelor este, în general, locală. Rareori, ele se găsesc în cantități semnificative în sânge. Acțiunea locală a citochinelor este intracrină (în interiorul celulei), autocrină (autostimularea celulei producătoare) și paracrină (acțiunea asupra celulelor din proximitatea situsului sintezei). Semnalele locale pe care le transmit diferitele citochine sunt esențiale pentru menținerea homeostaziei celulare, tisulare și a organismului.

b. Reprezentare diagramatică a spectrului de activități pe care le induc citochinele asupra celulei eucariote. Cele mai importante sunt activarea metabolismului și a sintezei diferitelor proteine (ciclooxigenază, enzime proteolitice, NO-sintază), diferiți receptori de aderență. Citochinele pot să modifice ciclul celulei sensibile, producând stimularea diviziunii, inhibiția ei sau apoptoza. Chemochinele sunt o clasă de citochine mici, care determină migrarea orientată a leucocitelor.

INTERLEUCHINE (IL)

Denumirea veche de limfocine sugerează că ele sunt sintetizate în primul rând de limfocite. Pentru citochinele produse de celulele seriei monocit-macrofag se folosește denumirea de monochine. Denumirea de interleuchine este mai adecvată, deoarece reflectă rolul lor esențial, acela de a media cooperarea celulelor sistemului imunitar.

Interleuchinele sunt peptide hidrosolubile, cu rol reglator, sintetizate în special de limfocite, dar și de alte celule. Efectul lor se exercită, în primul rând asupra celulelor limfoide, dar și asupra altor celule.

Producerea interleuchinelor, in vitro, s-a evidențiat în 1962, prin tehnica incubării celulelor din exudatul peritoneal de șoarece, în tuburi capilare plasate în ambianța materialului solubil eliberat de limfocitele sensibilizate după stimularea cu antigen, in vitro. Factorul solubil produs de limfocitele stimulate, inhibă migrarea macrofagelor din tubul capilar și s-a denumit factorul inhibitor al migrării macrofagelor (MIF).

Producerea interleuchinelor in vivo s-a recunoscut în 1967, după ce s-a remarcat că procesele inflamatorii sunt mult mai intense în raport cu titrul anticorpilor sintetizați și că ele sunt dependente de eliberarea unor factori din limfocitele T activate și din macrofage. Interleuchinele au rolul de a recruta alte celule, pe care le atrag în focarul inflamator.

Până la descoperirea interleuchinelor rămăseseră neexplicate modalitățile prin care, o multitudine de celule neconectate anatomic, își coordonează activitatea în sensul elaborării răspunsului imun, după stimularea antigenică.

Sinteza IL este dovedită de următoarele observații:

- existența liniilor limfoide, a căror creștere in vitro este dependentă de IL. Aceste linii celulare se folosesc pentru testarea prezenței IL într-un lichid biologic;

- unele clone de limfocite, după stimularea in vitro cu lectine, produc cantități mari de IL, utilizabile pentru analiza biochimică.

In vivo, IL sunt produse de limfocitele T (mai puțin de limfocitele B), de celulele seriei monocit-macrofag, de celulele endoteliului vascular, de fibroblastele țesutului conjunctiv, de cheratinocite etc.

IL-1

Sursa majoră de IL-1 o reprezintă fagocitele mononucleare (celulele seriei monocit-macrofag). Dar orice tip de celulă nucleată matură poate să sintetizeze IL-1: cheratinocitele, celulele dendritice, astrocitele, microglia, limfocitele B normale, unele clone de limfocite T in vitro, celulele NK, neutrofilele, fibroblastele, celulele endoteliale, celulele musculare netede.

Sinteza IL-1 este indusă de acțiunea unor stimuli biologici (endotoxinele bacteriilor Gram negative, exotoxinele, mureina bacteriilor Gram pozitive, zimosanul din peretele celular al levurilor, complexe imune, C3a, citochinele limfocitelor activate, lectinele mitogene) sau nebiologici (particule de Si, cristale de urați). Fig. 81. Agenții declanșatori ai sintezei IL-1.

Sunt două variante moleculare (IL-1 α și IL-1 β), codificate de gene distincte. S-a identificat a III-a variantă moleculară, IL-1ra (receptor antagonist), care se fixează pe receptorii pentru IL-1 α și IL-1 β , inhibând efectele lor. IL-1 α și IL-1 β se sintetizează ca precursori de 31kD (271 și respectiv 269 aminoacizi), care sunt clivați proteolitic și rezultă molecule de 17 kD. IL-1 este activă atât în varianta nativă, cât și forma rezultată după clivare. IL-1 β este clivată de o cistein-protează intracelulară (ICE = interleukin converting enzyme).

Efecte. După ce este produsă local de celulele stimulate, IL-1 acționează autocrin sau paracrin, stimulând răspunsul inflamator și răspunsul imun specific, fiind un mesager cu spectru larg de acțiune. IL-1 este un mediator pleiotropic (cu efecte multiple) al răspunsului gazdei la infecții sau la leziuni:

-stimulează producerea altor citochine (G-CSF, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-11, PDGF);Fig.82. IL-1 este produsă de multe tipuri celulare ca răspuns la leziuni, infecție sau după stimularea antigenică și influențează multe categorii de celule și procese; stimulează activitatea citocidă a celulelor NK; activează metabolismul PMN și chimiotaxia spre situsul producerii IL-1; induce expresia moleculelor de aderență în endoteliu și mărește permeabilitatea; stimulează chimiotaxia și funcția citocidă a macrofagelor; stimulează proliferarea celulelor Th, exprimarea receptorului pentru IL-2 și pro-ducerea de citochine; stimulează proliferarea și dife-rențierea limfocitelor B în celule producătoare de anticorpi.

- stimulează prolife-rarea celulelor T, crescând sinteza de IL-2 și exprimarea receptorilor pentru IL-2 pe celulele T;

- induce exprimarea moleculelor CMH II pe CPA;

- stimulează diferen-țierea limfocitelor pre-B și maturarea lor în celule B;

- stimulează monocitele să producă IL-1 (buclă autocrină);

- este chemoatractant pentru leucocite la situsul inflamației, prin inducerea sintezei moleculelor de aderență pe endoteliul vascular;

- induce sinteza pro-teinelor de fază acută (CRP) în ficat;
- este reglatoare a hemo-topoezei, contracarând efectele mielosupresoare ale radioterapiei și chimioterapiei prin inducerea sintezei SOD (enzimă cu Mn) în mitocondrii;
- stimulează producerea de CRH din hipotalamus, cu eliberarea ACTH din hipofiză. IL-1 poate stimula direct eliberarea ACTH. Stimularea axei hipotalamo-corticosuprarenale induce sinteza glucocorticoizilor. Aceștia au efect reglator prin feed-back, inhibând sinteza IL-1, dar stimulând exprimarea receptorilor pentru IL-1;
- pare a avea rol în distrugerea cartilajului articular, sub acțiunea unei metaloproteaze produsă de condrocite, care caracterizează artrita reumatoidă. În această maladie autoimună, IL-1 activează condroclastele și osteoclastele și de aici derivă denumirea ei de catabolină;
- stimulează proliferarea fibroblastelor;
- in vitro are efecte citostatice și citocide pentru unele linii de celule maligne;
- este factorul pirogen endogen, pentru că stimulează sinteza prostaglandinelor (PG₃), active asupra centrului hipotalamic al termogenezei, producând febră;

Fig.83. Căile producerii compușilor icozanoidici din fosfolipidele membranare. Liniile groase reprezintă conversia enzimatică, iar cele întrerupte, transformări neenzimatică. PG = prostaglandină; Tx = tromboxan; Lt = leucotrienă.

Fig.84. Reprezentare schematică a “cascadelor” enzimatice ce duc la formarea PG și LT, mediatori ai efectelor endotoxice și ai reacțiilor inflamatorii.

- stimulează proliferarea celulelor B după contactul lor cu Ag;

- este factor contrasupresor, deoarece inhibă activitatea celulelor Ts;
- stimulează activitatea metabolică a macrofagelor și secreția enzimelor (colagenază), ușurând mobilitatea lor în substanța fundamentală;
- activează limfocitele T și B;
- produce hipozincemie și hipoferemie și inhibă creșterea și diviziunea celulelor bacteriene;
- asupra cortexului cerebral, IL-1 produce inhibiție (somn), cu unde lente.

IL-2

IL-2 a fost descoperită în 1976 de Gallo, în mediul de creștere al limfocitelor normale, stimulate cu PHA. Denumirea veche a IL-2 este TCGF (T-cell growth factor). IL-2 este principalul hormon cu rol esențial în generarea unui răspuns eficient și este factorul esențial reglator al răspunsului imun. Este produsă de limfocitele TCD4 activate. Limfocitele TCD4 în repaus nu produc IL-2, dar limfocitele Th1 se activează după ce recunosc antigenul asociat cu moleculele CMH II și produc IL-2 și interferon γ , iar setul Th2 produce IL-4, IL-5 și IL-6. Unele clone de limfocite TCD8 pot produce cantități mici de IL-2. Limfocitele B infectate cu VEB produc IL-2. In vitro, IL-2 este produsă de linii celulare T, după stimulare cu PHA sau Con A. Alte linii celulare sintetizează IL-2 constitutiv, fără stimularea prealabilă cu lectine mitogene.

Conformația tridimensională a moleculei de IL-2 este un α -helix, alcătuit din 4 catene.

Activități biologice. IL-2 exercită efect stimulator asupra celulelor care au secretat-o (buclă autocrină), dar și asupra altor limfocite (buclă paracrină), deoarece receptorul de mare afinitate pentru IL-2 se găsește pe majoritatea celulelor limfoide.

Limfocitele stimulate proliferază și exprimă, la densitate înaltă, receptorii de IL-2 pe suprafața lor. Astfel se produce expansiunea clonală a limfocitelor care au recunoscut specific un antigen. Interacțiunea IL-2 cu receptorul său declanșează activarea și proliferarea celulară.

Rolul primar al IL-2 este expansiunea clonală a limfocitelor CD4 și CD8.

IL-2 stimulează diferențierea limfocitelor TCD4, în celule Th1 sau Th2. Asupra celulelor Th1, IL-2 acționează autocrin, iar asupra celulelor Th2 și CD8 acționează ca factor paracrin. Stimulează activitatea citotoxică a limfocitelor CD8.

Fig.85. IL-2 este sintetizată de limfocitele Th. Rolul său esențial este stimularea celulelor T și eliberarea mediatorilor (IFN γ), dar stimulează și creșterea limfocitelor B. Activarea monocitelor și a celulelor NK este importantă pentru amplificarea răspunsului imun. La pacienții cu carcinom renal, precursorii autologi ai celulelor NK pot fi activați in vitro, de doze mari de IL-2 (1000 UI/ml) și generează celule LAK (lymphokine-activated killer), utilizate experimental în terapia cancerului.

Limfocitele B, după stimularea sub acțiunea IL-2, se activează, exprimă receptori de mare afinitate pentru IL-2, proliferază intens și secretă IgG, IgA, IgM. IL-2 stimulează comutarea izotipică din răspunsul imun secundar.

Celulele NK răspund la efectul stimulator al IL-2 prin creșterea activității citotoxice, fără activarea proliferării.

IL-2 stimulează activitatea macrofagului, care devine citotoxic pentru celulele tumorale și pentru bacteriile parazite intracelular. Macrofagul stimulat produce H₂O₂, NO, PGE₂ și TNF- α . Activitatea antifungică a granulocitelor crește mult după stimularea cu IL-2. Probabil se intensifică producerea de lactoferină și TNF- α .

Sinteza IL-2 este stimulată de IL-1. La rândul ei, IL-2 stimulează sinteza IL-4, 5, 6. IL-2 rămâne principala citochină care controlează răspunsul proliferativ al limfocitelor CD4.

Sinteza IL-2 este indusă de orice stimul antigenic, dar acțiunea ei este specifică, deoarece determină numai expansiunea clonelor care au recunoscut determinanții antigenici.

Gena codificatoare a IL-2 a fost clonată, ceea ce a permis obținerea unei cantități suficiente de IL-2 în stare cristalizată. Este o glicoproteină de 15,4 kD și conține resturi de sialil și glicozil.

S-a clonat gena codificatoare pentru receptorul IL-2. Receptorul este format din 3 catene polipeptidice: IL-2R α (55kD), IL-2R β (75 kD) și catena γ , al cărei rol rămâne incert. Catena γ este componentă a receptorilor celulari pentru alte citochine: IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 și de aceea a fost notată cu γc (comună).

S-au identificat trei clase de receptori pentru IL-2:

- receptorul de mare afinitate, format din toate cele trei catene;

- receptorul de afinitate medie, format din catenele α și β ;

- receptorul de mică afinitate, format numai din catena α .

Limfocitele nestimulate antigenic au numai receptorul de mică afinitate. După stimularea antigenică primară, se exprimă receptorul de afinitate intermediară, iar după stimularea secundară se exprimă, cu o densitate mare, receptorul de afinitate înaltă. Aceasta sugerează că intensitatea răspunsului imun este condiționată de disponibilitatea receptorilor de IL-2.

Receptorul de IL-2 funcționează ca un întrerupător start-stop (on-off). IL-2 interacționează inițial, cu catena de 55 kD și ulterior, cu cea de 75 kD. Interacțiunea este fermă și de aceea, disocierea este lentă. După disocierea IL-2 de receptor, semnalul de activare a limfocitelor dispare.

IL-3 este un polipeptid de 140 aminoacizi la șoarece și 133 la om. Este produsă de limfocitele T și de celulele NK, iar mastocitele și eozinofilele stimulate produc cantități mici de IL-3. În reacțiile alergice, IL-3 modifică funcțiile mastocitelor, eozinofilelor și macrofagelor. Efectele ei se exercită asupra celulelor din imediata vecinătate a celor care au produs-o, dar când se produce o activare masivă a limfocitelor (de exemplu, în infecția gripală), IL-3 apare și în circulație și efectele ei sunt sistemice. IL-3 stimulează activarea celulelor accesorii (granulocite, fagocite, plachete), cu funcții de apărare și reparare într-un focar inflamator. Stimulează diferențierea celulelor stem în măduva hematopoetică, efectul fiind recuperarea funcțională a măduvei osoase consecutivă chimioterapiei citotoxice.

IL-4 este produsă de câteva seturi de limfocite și are efecte multiple asupra celulelor limfoide. Sursa majoră de IL-4 sunt limfocitele Th2, o subpopulație esențială pentru inițierea RIMH față de agenții patogeni extracelulari. IL-4 acționează autocrin și determină stimularea celulelor producătoare. Stimulează exprimarea moleculelor CMH II pe celulele B și secreția IgE și IgG1. De aceea s-a numit factorul stimulator al limfocitelor B. Induce diferențierea celulelor TCD4 spre celule Th2, care la rândul lor secretă IL (IL-5, IL-10) stimulative ale RIMH. Este o citochină anti-inflamatorie, producând inhibiția citochinelor inflamatorii (IL-1, TNF) și a PG.

IL-5 este secretată de limfocitele Th2 și stimulează proliferarea și diferențierea limfocitelor B în răspunsul imun. Stimulează diferențierea celulelor stem medulare, în monocite și eozinofile. Sinteza crescută a IL-5 determină eozinofilie.

IL-6 este o citochină multifuncțională, secretată de macrofage, de limfocitele T, de celulele endoteliale. Stimulează sinteza IgA în structurile limfoide asociate mucoaselor. Efectele IL-6 sunt sinergice cu ale IL-1. IL-6 este un mediator al răspunsului de fază acută. Răspunsul de fază acută este o reacție sistemică anti-inflamatorie, consecutivă infecției sau leziunii tisulare și se caracterizează prin febră, leucocitoză, creșterea permeabilității vasculare, scăderea nivelului metalelor (Zn, Fe) și a steroizilor plasmatici, dar crește nivelul proteinelor de fază acută. Proteinele de fază acută sunt sintetizate de hepatocite sub acțiunea stimulative a unui factor specific, iar IL-6 are acțiune similară cu aceea a factorului stimulator al hepatocitelor.

IL-7 este produsă de fibroblaste. La șoarece, rolul esențial al acestei citochine este de a stimula diferențierea celulelor limfoide imature, în limfocite T și B, în special intrarea și menținerea lor în faza S. Siturile acțiunii sale sunt măduva osoasă și timusul.

IL-8 este produsă de macrofage, fibroblaste, celule endoteliale. Face parte din categoria chemochinelor. Acțiunea sa principală este cea chemotactică față de neutrofile, eozinofile, limfocite T, în focarul inflamator. Sinteza ei rapidă este indusă de LPS, de infecția virală, în celulele mononucleare din sânge, în fibroblaste, în cheratinocite. IL-8 stimulează activarea neutrofilelor (migrare transendotelială, eliberarea enzimelor lizosomale, intensificarea metabolismului oxidativ, generarea anionului superoxid în focarul inflamator). Are efecte asupra celulelor nelimfoide: este haptotactică (induce migrarea celulelor epiteliale spre suprafață).

IL-9 este sintetizată de limfocitele T și determină efecte multiple asupra celulelor stem hematopoetice, limfopoetice și neuronale. Acțiunea sa este sinergică cu IL-4. În absența IL-4, IL-9 stimulează activarea limfocitelor B și sinteza IgE și IgG.

IL-10 are rol reglator important asupra sintezei diferitelor citochine. Este produsă de limfocitele T activate, de monocite, de celulele B, de cheratinocite (dar și de celulele carcinomului de colon, de melanoame). Celulele Th2 constituie sursa principală de IL-10, dar este produsă de clone Th1 după stimularea cu antigenul specific. Efectele sale multiple se exercită asupra limfocitelor, monocitelor, celulelor NK, celulelor dendritice. Inhibă activarea macrofagelor și exprimarea moleculelor CMH II pe suprafața lor. Inhibă sinteza citochinelor proinflamatorii.

Fig.86. IL-12 este produsă de macrofage și are rol central în răspunsul imun. IL-12 stimulează celulele NK și T să elibereze interferon γ , iar celulele T neangajate sunt stimulate să se diferențieze spre fenotipul Th1.

IL-11 are ase-mănări funcționale cu IL-6, dar are un spectru mai restrâns de acțiune. Efectele sale se exercită asupra sistemului hema-topoetic, limfopoetic, hepatic, adipos și neuronal. Este proinflamatorie și induce sinteza proteinelor de fază acută.

IL-12 s-a identificat în supernatantul liniilor celulare B transformate, însă celulele B normale (de om și șoarece) nu sintetizează cantități semnificative de IL-12. Sursele principale sunt macrofagele și celulele dendritice. Macrofagele - primele celule care recunosc antigenul, încep să producă IL-12. Celulele țintă ale IL-12 sunt limfocitele T (CD4, CD8) și NK. In vivo, IL-12 induce diferențierea limfocitelor TCD4, în celule Th1 care sintetizează interferon γ , inductor al anemiei, neutropeniei și limfopeniei. Este o citochină de inițiere a răspunsului imun, fiind puntea de unire între reacțiile de apărare nespecifică și răspunsul imun specific. Stimulează diferențierea celulelor Th neangajate, în celule Th1, mediatore ale RIMC.

IL-13 este produsă de celulele Th2, dar și de alte seturi de celule Th, de celulele TCD8, de alte celule activate (mastocite, eozinofile, bazofile). Induce proliferarea limfocitelor B care sintetizează IgE și IgG4, sugerând rolul său în patogeniza stărilor alergice. Inhibă activarea macrofagelor și sinteza citochinelor proinflamatorii, având astfel proprietăți anti-inflamatorii.

IL-15 are multe activități biologice comune cu ale IL-2. Catenele β și γ ale receptorului pentru IL-15 sunt comune și pentru receptorul de IL-2, iar catena α este specifică. IL-15 are o distribuție tisulară mai largă decât IL-2. Este factor de creștere pentru celulele T (umane și de șoarece), pentru celulele B și NK. Are acțiune sinergică cu IL-12. IL-15 se găsește în lichidul sinovial la pacienții cu artrită reumatoidă, unde recrutează limfocitele T și le stimulează pentru a produce IFN γ , TNF- α și GM-CSF. Rolul reglator al IL-2 nu este compensat de IL-15 și nici de alte citochine.

Alte citochine

Celulele limfoide și macrofagele sintetizează factori proteici, denumiți limfotoxine, cu efect litic asupra celulelor sensibile. Limfotoxina s-a evidențiat inițial, ca un factor citotoxic în supernatantul limfocitelor activate.

Limfotoxinele sunt produse de limfocitele TCD8, de celulele NK și de macrofagele stimulate. Denumirea de "limfotoxine" derivă de la efectul lor citotoxic sau citostatic, față de celulele malignizate sau față de cele infectate cu virusuri.

Limfotoxina produsă de limfocitele Tc se numește perforină și are rol major în liza celulei țintă.

Limfotoxina poate fi produsă ca proteină solubilă sau ca proteină asociată membranei citoplasmatică a unor celule. Forma solubilă a limfotoxinei este alcătuită din trei monomeri de limfotoxină α (LT α) și este produsă de celulele Tc (CD8) și de subsetul Th-1 al limfocitelor CD4.

Limfotoxina se exprimă și pe suprafața celulelor T, într-o altă variantă biochimică: o subunitate proteică a LT- α , asociată cu două molecule de LT- β .

Macrofagele stimulate cu endotoxine, sintetizează o monokină de 17 kD, denumită TNF- α sau cașectină.

TNF- α este o glicoproteină de 156 aminoacizi, trimerică, produsă în primul rând de macrofage dar și de alte celule: adipocite, limfocite B, cheratinocite, fibroblaste, granulocite, mastocite, monocite, celule NK, celule musculare netede, celule T.

Factorii inductori ai sintezei TNF- α sunt foarte numeroși: celulele alogene și bacteriene, peptidoglicanul, complexe imune, LPS, intermediarii reactivi ai reducerii O₂, celule malignizate, infecția virală, zimosanul din peretele levurilor, ionii de Zn etc.

Efecte. TNF- α inhibă ciclul de replicare virală și stimulează diferite activități biologice: diferențierea monocitelor în macrofage, activitatea ADCC, sinteza moleculelor CMH I și II, activitatea fagocitară, creșterea și proliferarea fibroblastelor, este un factor pirogen, hipotensiv, favorizează regenerarea ficatului, induce sinteza proteinelor de fază acută și apoptoza celulelor țintă, activează celulele endoteliale, stimulează distrugerea cartilajului, activează limfocitele T și B, stimulează sinteza Ig. Local, TNF- α mărește aderența limfocitelor TCD8 la endoteliul vascular și le stimulează citotoxicitatea. Este o citochină proinflamatorie.

TNF- α este implicat direct în distrugerea celulelor B insulare, în diabetus melitus insulino-dependent.

Denumirea de cașectină pentru TNF- α derivă de la efectul ei stimulator asupra catabolismului, ceea ce explică apariția și manifestarea sindromului de epuizare (cașexia), caracterizat prin pierderea în greutate, la pacienții neoplazici sau cu infecții cronice. Cașectina inhibă transcrierea genelor care codifică sinteza enzimelor lipogene.

Receptorii de cașectină se găsesc pe hepatocite, pe celulele musculare și adipoase și răspund prin intensificarea catabolismului. Ca urmare, trigliceridele sunt mobilizate din depozite și crește concentrația plasmatică a lipoproteinelor cu densitate foarte mică.

Factorul inhibitor al migrării macrofagelor (MIF) este prima limfochină ale cărei efecte au fost descrise. Inhibiția migrării macrofagelor este produsă de o varietate de factori: citochine, mitogene, toxine. Sub denumirea de MIF a fost caracterizată o proteină de 12,5 kD din umoarea apoasă a camerei anterioare a globului ocular, care produce supresia rapidă a citotoxicității mediată de celulele NK, față de endoteliul corneean. Camera anterioară a globului ocular este considerată ca situs privilegiat din punct de vedere imunologic. Țesuturile sale (endoteliul corneean și cristaloida) nu exprimă molecule CMH I și astfel devin ținta atacului litic al celulelelor NK infiltrate. Activitatea inhibitorie a MIF a fost anulată de anticorpii specifici anti-MIF.

INTERFERONII ȘI MECANISMELE ACȚIUNII LOR

Interferonii sunt o categorie specială de citochine, a căror sinteză este indusă de diferiți agenți chimici sau biologici. Funcțiile lor se caracterizează printr-un spectru larg de activități nespecifice, cea mai importantă fiind inducția stării antivirale.

Interferonul a fost descoperit de Isaacs și Lindenmann (1957). Ei au observat că injectarea membranei corioalantoice a embrionului de găină, cu virus influenza inactivat (denumit virus inductor sau interferent), blochează replicarea ulterioară a virusului influenza infecțios (virus revelator al interferenței). Autorii au arătat că inhibiția replicării virale (interferența) se datorează unui factor inhibitor, pe care l-au denumit interferon (IFN).

Elucidarea naturii chimice și a modului de acțiune a interferonilor a constituit o problemă de interes major a biologiei moleculare și a virologiei în ultimele decenii.

Inducerea stării antivirale este cea mai importantă funcție a interferonilor, dar ei au și alte activități biologice majore:

- inhibiția multiplicării celulelor normale și tumorale

- reglarea proceselor de diferențiere celulară

- reglarea funcției imunitare.

Natura interferonilor. Diferitele variante moleculare de interferoni au fost grupate în două tipuri: interferoni de tip I și de tip II. Interferonul de tip I cuprinde variantele α , β și τ . Interferonul de tip II include varianta moleculară γ . Interferonul α este produs de leucocite și este reprezentat de o varietate largă de molecule, codificate de un număr mare de gene. Interferonul β este sintetizat de variate celule nehematopoetice (de exemplu, fibroblaste), după infecția cu virus sau după ce sunt stimulate cu ARN dublu catenar. Sinteza sa este codificată de o singură genă. Interferonul τ , s-a identificat la bovine și la ovine și este sintetizat în cantități mari în epiteliul uterin, în perioada care precede implantarea embrionului și de aceea s-a denumit interferon trofoblastic. Interferonul γ este produs de limfocitele activate sub acțiunea antigenului specific sau a substanțelor mitogene și reprezintă interferonul de tip II. Deoarece, in vivo, este sintetizat de limfocitele T activate, de limfoblastele seriei B și de limfocitele granulare mari (celulele NK), interferonul γ este considerat a fi de tip imun.

Distribuția interferonilor în cele două tipuri și subtipuri se bazează pe proprietățile lor antigenice individuale. Antiserul specific față de moleculele de interferon ale unui tip nu precipită și nu neutralizează acțiunea interferonilor celuilalt tip.

În general, moleculele de interferoni sunt glicoproteine. Interferonii β și γ au resturi glucidice legate la asparagina 80 și respectiv 25 și 97. Majoritatea interferonilor α nu sunt glicozilați. Glicozilarea nu este esențială pentru exprimarea activităților biologice, ceea ce explică faptul că interferonii sintetizați în celulele bacteriene, de genele codificatoare clonate, au activitate biologică.

Interferonii α și β sunt stabili chiar la pH 2 și își păstrează activitatea în prezența SDS, ultima fiind o proprietate foarte importantă pentru purificare.

Sinteza interferonilor. În mod obișnuit, celulele normale nu sintetizează cantități detectabile de interferoni. Genele codificatoare ale sintezei lor nu sunt transcrise. Sinteza interferonilor este indusă de diferiți agenți: virusuri infecțioase sau inactivate, moleculele de ARN dublu catenare helicale, endotoxinele bacteriilor Gram negative (*Brucella* sp., *Listeria monocytogenes*), infecția cu micoplasme, cu rickettsii și chlamidii, polimerii sintetici, mananii (polizaharide), diferiți activatori metabolici etc. LPS este un bun inductor al IFN α și β .

Pentru virusurile cu genom ARN dublu catenar, inductorul sintezei de interferon este chiar genomul viral. Virusurile cu genom ADN, cu excepția celor din grupul pox, sunt slab inductoare, iar cele cu genom ARN monocatenar sunt inductoare ale sintezei interferonilor, deoarece ARN se replică printr-un intermediar dublu catenar.

ARN monocatenar, ADN mono- sau dublu catenar, ca și hibridii ADN-ARN nu sunt inductori ai sintezei interferonilor.

Virusurile inactivate (din vaccinuri), ca și cele ce infectează un substrat nepermisiv sunt inductoare ale sintezei interferonilor. În leucocitele mononucleare, sinteza IFN este indusă de glicoproteinele învelișului viral.

In vitro, la 37°C, sinteza începe la 4 ore după infecția virală și atinge rata maximă concomitent cu sinteza proteinelor virale.

Informația genetică codificatoare a sintezei interferonilor este distribuită în trei familii de gene. Sinteza interferonului α este codificată de 14 gene și 7 pseudogene, localizate pe brațul scurt al cromosomilor perechii a 9-a. Interferonul β este codificat de o genă (sau câteva), cu aceeași localizare, iar interferonul γ este codificat de o singură genă localizată pe perechea a 12-a de cromosomi. Ca o caracteristică, nici una din gene nu conține introni.

Cel mai bun inductor al sintezei de interferon este ARN dublu catenar natural sau sintetic. Mecanismul inducției nu este cunoscut. Probabil, ARN dublu catenar induce sinteza unui factor, care, la rândul său neutralizează represorul specific al transcrierii acestor gene. Factorul determinant al inducției este însăși natura bicatenară a moleculei de ARN și nu informația genetică înscrisă în ea. Nu se cunoaște nici mecanismul inducției sintezei interferonului γ (de tip imun), în limfocitele activate de antigenul specific sau stimulate de mitogene.

Inducția sintezei interferonilor necesită sinteza ARNm și traducerea sa în catena polipeptidică. Inhibitorii sintezei proteinelor (actinomocina D), administrați simultan cu inductorul, inhibă sinteza interferonilor.

Interferonii secretați de diferite specii de organisme sau de diferite categorii de celule ale unui organism, prezintă deosebiri legate de secvența aminoacizilor, de conținutul glucidic, care au stat la baza grupării lor în cele trei clase.

Toți interferonii se sintetizează ca precursori de 166 aminoacizi, cu secvențe semnal N-terminale de 20-23 aminoacizi, necesare secreției. Dimensiunile reale ale catenei polipeptidice sunt de 143, 145 și respectiv de 146 resturi de aminoacizi.

Molecula de interferon are două domenii cu secvențe de aminoacizi relativ constante: unul în jumătatea N-terminală, care formează situsul de legare pe receptorul celular, iar celălalt, în jumătatea C-terminală, pare să moduleze legarea de receptor și probabil mediază funcțiile biologice.

Studiul biochimic al moleculei de interferon a fost înlesnit de obținerea anticorpilor monoclonali specifici față de diferite tipuri de interferon.

Interferonii se sintetizează, probabil, la toate clasele de vertebrate.

Activități biologice efectoare ale interferonilor

Activitatea biologică principală a interferonilor este cea antivirală și a fost demonstrată experimental. Infecțiile virale sunt mult mai severe la animalele de experiență, cărora, odată cu virusul infecțios li s-a injectat ser imun specific anti-interferon.

Interferonii formează prima linie de apărare umorală față de infecțiile virale, înainte de mobilizarea răspunsului imun. Interferonii protejează celulele de efectele citopatice virale, dar nu elimină complet infecția. Starea de protecție antivirală, indusă de interferoni durează câteva zile și apoi dispare. După câteva zile de absență, starea de protecție poate fi indusă din nou.

Interferonii nu au acțiune antivirală directă, ci induc o stare antivirală.

Interferonii au specificitate de specie, adică activitățile biologice și în special efectul protector antiviral se manifestă față de orice virus, în raport cu celulele speciei care a produs interferonul. Baza specificității de acțiune, rezidă în interacțiunea dintre interferon și receptorul celular. Activitatea biologică a interferonilor este direct proporțională cu afinitatea lor de legare cu substratul celular. Interferonul de șoarece are, in vitro, efect protector față de celulele de șoarece, indiferent de virusul infectant. Același interferon are un efect protector minim (5%) pentru celulele de șobolan, iar pentru celulele umane, efectul protector este nul.

Protecția antivirală este dependentă de concentrația interferonilor. Dozele mari, administrate în sisteme experimentale, in vitro, sunt protectoare față de nivelul scăzut al multiplicității de infecție, asemănător celui natural. Multiplicitatea înaltă de infecție (cea experimentală), depășește efectul protector al interferonilor.

Descoperirea interferonilor a condus la revizuirea conceptului imunității celulare și a rolului său în limitarea infecțiilor virale. Sistemul interferonului este primul care își exercită efectul protector, dintre toate sistemele de apărare cunoscute. El este operativ în decurs de câteva ore de la infecție.

Cele mai multe virusuri sunt inductoare ale sintezei interferonului și sunt sensibile, în diferite grade, la acțiunea lui.

Interferonul este produs de celulele infectate, concomitent cu desfășurarea ciclului multiplicării virale. Este eliberat din celule imediat după sinteză și difuzează spre celulele învecinate, cărora le induce starea antivirală. Astfel, virusul, în ciclul său replicativ, întâlnește o barieră intracelulară. Nivelul activității antivirale, probabil, este dependent de concentrația extracelulară a interferonului, astfel că celulele învecinate celor producătoare de interferon devin cele mai rezistente la infecția cu virus. Celulele mai îndepărtate sunt mai puțin protejate.

Eficiența relativă a diferitelor mecanisme de apărare, inclusiv a celui mediat de interferon depinde de ruta pe care se răspândește virusul. De la poarta de intrare, virusul se diseminează spre organele țintă, pe calea fluidelor organismului (sânge, limfă), prin leucocitele infectate sau pe cale axonală. Diseminarea pe cale sanguină și limfatică este limitată de macrofagele asociate capilarelor sanguine și limfactice. Viremia diminuează și odată cu ea diminuează severitatea infecției. Experiențele cu administrare de interferon evidențiază că interferonul circulant reduce viremia și protejează organele țintă. Interferonul este mai puțin eficient față de virusurile care se diseminează pe cale axonală.

La pacienții hipogamaglobulinemici, limitarea și eliminarea infecției virale este rezultatul acțiunii interferonului, a reacției febrile a organismului, a răspunsului inflamator și a imunității mediate celular.

Bazele moleculare ale activității interferonilor

Interferonii nu au activitate biologică în celulele care îi sintetizează. Principala lor activitate în cea antivirală- nu este directă, deoarece interferonii nu sunt molecule efectoare, ci inductori ai stării antivirale. Interferonii acționează asupra celulelor neinfectate și le induc starea de rezistență față de infecție, influențând multiplicarea virusurilor în diferite etape ale ciclului (de exemplu, transcrierea ARNm, traducerea etc.), în funcție de sistemul celular.

După secreția din celulele în care a fost sintetizat, interferonul se leagă de receptorul membranal al altor celule, unde funcționează ca o citochină paracrină și activează un set de gene specifice. Corespunzător celor două tipuri de interferoni, se cunosc două tipuri de receptori. Ambele sunt glicoproteine de membrană.

Complexele interferon-receptor sunt endocitate. Internalizarea lor declanșează evenimentele nucleare, al căror rezultat este starea antivirală și apariția unor modificări ale metabolismului celular.

Interferonii induc sinteza unor proteine, care mediază efectele lor multiple. Starea antivirală este produsă pe mai multe căi. Pot fi inhibitate diferite etape ale ciclului de replicare virală: penetrarea și dezvelirea, transcrierea ARNm viral, traducerea ARNm viral, replicarea genomului, asamblarea și eliberarea virusului progen. Decisivă este natura virusului, dar tipul celular poate avea un rol important. Starea antivirală este, în primul rând, consecința sintezei în celulă, a unei proteine inhibitoare a transcrierii și/sau a traducerii mesajului genetic viral (PIT), care interferează fie cu sinteza ARNm viral, fie cu traducerea sa, fie cu ambele procese. O a II-a cale majoră a inducerii stării antivirale este degradarea ARNm viral prin acțiunea 2'-5' oligo-adenilat-sintetazei și a riboendonucleazei.

În cele mai multe sisteme virus-celulă, inhibiția multiplicării virale este rezultatul interferenței cu etapa traducerii ARNm viral. În celulele liniei sensibile L (originară din fibroblaste de embrion de șoarece), infectate cu virus vaccinal, se produce dezagregarea polisomilor celulari. ARNm viral se asociază cu ribosomii eliberați și formează polisomi ce sintetizează proteine specifice virale. În celulele tratate cu interferon, înainte de infecția virală, ARNm viral nu se asociază cu ribosomii și nu se sintetizează proteine specifice. În absența proteinelor virale, infecția este abortivă. Efectul este același după infecția cu reo-, picorna-, toga-, rhabdo-, paramixo-, herpes- sau cu papovavirusuri.

În celulele tratate cu actinomicina D (un inhibitor specific al sintezei proteice), efectul protector al interferonului nu se realizează.

Una din proteinele inhibitoare ale traducerii ARNm viral este protein-chinaza dependentă de ARN dublu catenar (PKR), denumită și chinaza factorului de inițiere a sintezei proteinelor la eucariote (eIF-2).

Fig.87. Acțiunile antivirale ale interferonilor (IFN). Interferonii se leagă specific de receptorii de IFN și produc numeroase efecte, două dintre ele fiind ilustrate în schemă. IFN induce sinteza proteinelor antivirale 2',5' adenzin-sintetaza și o protein-chinază. Ambele sunt activate de ARN dublu catenar, intermediarul replicării virale. Sintetaza induce formarea 2'5'ppp-oligo A, care activează o endonuclează capabilă să producă degradarea ARNm. Protein-chinaza fosforilează factorul de inițiere al traducerii proteinelor, eIF2, pe care îl inactivează (după Male, 1987).

PKR este o chinază serină/treonină, prezentă în celule și în mod normal se sintetizează cu o rată foarte scăzută. Enzima, în proporție de 20% se găsește în nucleu (mai ales în nucleol) și 80% are sediul citoplasmatic. În cea mai mare parte, protein-kinaza citoplasmatică este legată de ribosomi și este mai fosforilată decât cea nucleară. Protein-kinaza este inactivă (latentă), dar poate fi activată de ARN dublu catenar. În celulele tratate cu interferon, nivelul protein-kinazei (o proteină de 67 kD) crește de peste 20 de ori.

PKR se activează în prezența ARN dublu catenar, rezultatul fiind autofosforilarea câtorva resturi de serină și treonină. Autofosforilarea este cel mai probabil, intermoleculară și se produce între două molecule de PKR asociate cu aceeași moleculă de ARN dublu catenar. În consecință, concentrațiile mari de ARN-dublu catenar inhibă procesul autofosforilării. Heparina (un polianion) activează această enzimă. Substratul fiziologic unic al PKR fosforilate este subunitatea α a factorului de traducere eIF-2. eIF-2 fosforilat nu poate fi reciclat pentru inițierea traducerii și produce inhibiția sintezei proteinelor celulare.

În celula infectată cu un virus, protein-kinaza, se asociază cu ARN-dublu catenar, se activează și se fosforilează. Protein-kinaza activată, poate fosforila un număr de substraturi celulare, inclusiv factorul 2 α , de inițiere a sintezei proteinelor la eucariote (eIF-2 α), la restul de serină 51 (Kumar, 1998). eIF-2 α fosforilat, blochează inițierea sintezei catenei polipeptidice.

Altă cale activată de ARN dublu catenar și de interferon este calea 2',5'-oligo-adenilat-sintetazei/RN-aza. Interferonii induc sinteza unei familii de enzime denumite 2-5(A)sintetaze, care polimerizează ATP în oligo-adenilați de diferite lungimi, legați 2'-5'. Aceste enzime sunt inactice, dar se activează datorită unei schimbări conformaționale care se produce consecutiv legării sale cu ARN dublu catenar. 2',5'-AS activată este capabilă să polimerizeze ATP și alte nucleotide în legături 2'-5'. În molecula de 2',5'-oligoadenozină, resturile de riboză sunt legate prin punți fosfo-diesterice 2'-5'. Acestea sunt legături unice, deoarece toate polinucleotidele naturale conțin legături 3'-5'.

2',5'-oligoadenozina activează RN-aza L. RN-aza L este detectabilă în toate celulele animale. Majoritatea celulelor conțin o fosfodiesterază ce poate hidroliza 2-5(A). RN-aza L poate cliva ARN celular și viral monocatenar la secvențe specifice UpA, UpG și UpU. RN-aza L poate manifesta efecte antivirale prin inducția apoptozei. Această cale este activă în inhibiția replicării picornavirusurilor în celulele tratate cu IFN

Cei mai buni interferoni stimulează sinteza interferonilor, care la rândul lor activează ambele enzime (adenilat-sintetaza și protein-kinaza).

Interferonii au acțiune directă, prin inducerea modificărilor în membrana plasmatică a celulei, mărind rigiditatea stratului lipidic. Acesta poate fi mecanismul efectului inhibitor al interferonului asupra transformării maligne a celulelor, sub acțiunea virusurilor oncogene.

Dacă la nivel celular, efectele antivirale ale interferonilor sunt mediate în primul rând prin acțiunea proteinelor antivirale intracelulare, în organism interferonii acționează prin alte mecanisme. Interferonii stimulează funcția imunitară. Celulele infectate de virusuri sunt lizate de celulele imunitare. Recunoașterea lor este mediată de moleculele CMH I, a căror expresie este stimulată de interferoni. Interferonii sunt stimulatori ai enzimei nitric-oxid-sintetază, care prin oxidul nitric(NO) inhibă replicarea virusurilor în anumite celule.

Alte activități biologice ale interferonilor. Interferonii exercită o gamă largă de acțiuni, cu efecte inhibitoare sau stimulative asupra celulelor sensibile

Efectele inhibitorii se exercită nu numai asupra multiplicării virusurilor, ci și asupra creșterii și multiplicării microorganismelor parazite cu localizare intracelulară, asupra unor activități metabolice tisulare (de exemplu, prin inhibiția sintezei proteice, interferonul poate să inducă procese de necroză celulară), asupra multiplicării celulelor tumorale, asupra creșterii și diviziunii celulelor normale, asupra reacțiilor de hipersensibilitate întârziată.

Efectele stimulative ale interferonilor se exercită asupra nivelului de exprimare a unor molecule de suprafață a celulelor (de exemplu, moleculele CMH, receptorii de mare afinitate pentru regiunea Fc a IgG pe suprafața macrofagului, cu consecințe importante pentru rata eliminării complexelor imune prin fagocitoză și asupra ADCC).

Fig. 88. Funcțiile IFN γ sunt multiple: activitățile antivirală și antiproliferativă sunt mai puțin intense decât ale IFN α și β , dar este cel mai puternic inductor al activării macrofagelor și al exprimării moleculelor CMH clasa II pe celulele tisulare, fiind sinergic cu TNF α și TNF β .

Interferonii stimulează activitatea citotoxică a limfocitelor NK și activează metabolismul oxidativ al macrofagelor, precum și activitatea lor antitumorală. Pe suprafața limfocitelor T, interferonii intensifică exprimarea receptorilor pentru IL-2. Stimulează răspunsul imun, dacă este administrat concomitent cu antigenul. Efectul imunostimulator se poate atribui unei mai bune exprimări a moleculelor CMH, ceea ce condiționează o prezentare mai eficientă a antigenului.

Semnificația biologică a interferonilor. Interferonii sunt componente ale rețelei citochinelor. Citochinele sunt molecule active, produse de diferite categorii de celule, sub acțiunea unor stimuli, inclusiv sub acțiunea interferonilor.

Citochinele interacționează cu receptorii altor celule și reglează procesele lor de proliferare și diferențiere. Deoarece limfocitele stimulate produc interferon γ , această clasă de molecule face parte din categoria limfochinelor.

Adeseori, efectele biologice ale diferitelor categorii de citochine sunt antagonice. Homeostazia celulară este, probabil, rezultatul unui echilibru între efectele induse de o varietate de citochine.

Între interferoni și hormoni, există câteva asemănări, cu privire la mecanismul secreției și eliminării din celulele producătoare, al interacțiunii cu celulele sensibile, al mecanismului de acțiune asupra celulelor (ca și hormonii, interferonii activează ciclazele GMP și AMP), precum și în ceea ce privește efectele reglatoare și modulatorie ale celor două categorii de molecule asupra reacțiilor imunitare.

Având în vedere aceste asemănări, s-a propus ca interferonii să facă parte din grupul hormonilor “neclasiți”, alături de EGF (Epidermal Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor), NGF (Nerv Growth Factor) etc.

Perspectivile producerii și utilizării interferonilor

În unele celule, sinteza interferonilor este indusă spontan, în absența unui inductor detectabil. Interferonii α și γ sunt produși de liniile celulare limfoblastice originare în celulele T, în concentrații variabile, de la 1 la

1000 U/ml.

Interferonii sunt produși prin biotehnologii moderne, în celule manipulate genetic. Genele codificatoare ale sintezei interferonilor au fost izolate, secvențiate și inserate în vectori de clonare. Aceștia au fost transferați în celula procariotă (*E. coli*) sau eucariotă. Genele

codificatoare ale interferonilor sunt transcrise atât în celule bacteriene, cât și în celule eucariote. Pe această cale, in vitro sau obținut cantități mari de interferoni (utilizabili în clinică), fiind sintetizați de celulele bacteriene, de levuri și de celulele de mamifere.

Interferonii se utilizează pe scară largă în tratamentul infecțiilor cu virus rabic și cu virusuri encefalitogene. Efectul lor este ameliorarea sau chiar eliminarea infecțiilor persistente, cu virusul hepatitei B, C, cu herpes-zoster sau cu citomegalovirus.

Interferonii au proprietăți antiproliferative și se folosesc în tratamentul unor stări neoplazice umane. Tumorile originare în limfocitele B sau în celulele plasmocitare sunt cele mai sensibile. Cea mai eficientă activitate antiproliferativă o are interferonul α . Varietatea γ este activă în maladia Hodgkin (proliferarea malignă a macrofagelor ganglionare).

Utilizarea interferonilor în clinică este limitată de manifestarea unor efecte secundare: febră, hipotensiune, mialgie, bradicardie

3 Membranele biologice sunt depozite pentru precursorii mediatorilor derivați din lipide. Răspunsul celular este însoțit de remodelarea rapidă a lipidelor membranare sub acțiunea lipazelor activate. Lipazele includ fosfolipaza A₂, D și C. Se generează rapid lipide bioactive, cu funcție de mediator. PG formează o familie de acizi grași nesaturați cu catenă de 20 atomi de C. Precursorul PG este acidul arachidonic (nesaturat), legat esteric de C₂ al fosfolipidelor membranare de unde este eliberat sub acțiunea fosfolipazei A₂. Acidul arachidonic este precursorul sintezei compușilor icozanoidici (PG și leucotriene și LT) și este convertit la endoperoxizi ciclici (PG) sub acțiunea ciclooxigenazei. Sinteza acestei enzime este inhibată de aspirină și indometacină, substanțe cu efect antifebril. Efectul lor antifebril se exercită prin inhibiția sintezei PG. PG se sintetizează în monocite, macrofage, granulocite, dar și în majoritatea celorlalte țesuturi ale organismului uman și animal. După sinteză sunt eliberate în circulație și sunt inactivate în ficat, rinichi și plămâni. PG sunt inhibitori ai reactivității imunitare, deoarece diminuează reactivitatea limfocitelor și macrofagelor.

4 Zincul este un element esențial pentru funcția imunitară. Se găsește în situsul activ a peste 200 metaloenzime, fiind foarte important pentru metabolism. Sinteza acizilor nucleici este dependentă de metaloenzimele cu Zn (ARN- și ADN polimerazele). Deficiența Zn (datorată ingestiei scăzute sau malabsorbției) produce disfuncții ale limfocitelor T, atrofia timusului, diminuarea numărului de limfocite T în organele limfoide secundare. În răspunsul inflamator acut febril (consecutiv unei infecții), concentrația plasmatică a Zn scade la jumătate din valoarea normală, fiind sechestrat în hepatocite, timocite și în măduva osoasă. Mecanismul sechestrării nu se cunoaște. Deficiențele Zn sunt asociate cu malnutriția proteică sau cu malabsorbția. Unele

fibre dietetice împiedică absorbția Zn. În reacțiile de fază acută ale stărilor febrile, balanța metabolică a azotului este negativă și este însoțită de scăderea Zn, datorită sechestrării tisulare.

BAZELE CELULARE ȘI MOLECULARE

ALE MEMORIEI IMUNITARE

Răspunsul imun are trei particularități generale: 1) specificitatea; 2) diversitatea (heterogenitatea anticorpilor); 3) memoria.

Memoria imunitară este caracterizată printr-un răspuns imun mai rapid și mai extins în timp. Argumentul direct este chiar timpul de latență mai scurt al răspunsului imun secundar, explicabil prin faptul că după prima expunere la antigen, rezultă o populație mai numeroasă de celule cu receptori specifici față de epitopii imunostimulatori. Aceste celule au parcurs deja câteva trepte ale diferențierii spre celulele producătoare de anticorpi.

Anticorpul răspunsului imun secundar are o afinitate mai mare de legare cu antigenul specific. În răspunsul imun secundar (de memorie), inițial se secretă IgM, dar și alte izotipuri, în special IgG.

Memoria imunitară implică tipuri funcționale specializate de limfocite T și B, denumite celule de memorie.

Receptorii de antigen ai limfocitelor B de memorie sunt în special molecule de IgG, iar ai limfocitelor neangajate sunt molecule de IgM și IgD. Pe suprafața altor celule de memorie s-au identificat și alți receptori: IgM și IgG, IgM și IgA, IgM și IgE. Acești markeri asigură generarea izotipurilor corespunzătoare de imunoglobuline în răspunsul imun secundar. Limfocitele B de memorie au localizări specifice și receptorii lor de antigen prefigurează izotipul anticorpilor secretați: limfocitele care au ca receptor de antigen molecule de IgA și IgE sunt localizate în structurile limfoide asociate mucoaselor (digestivă, respiratorie). De aceea, calea de administrare a antigenului influențează profund izotipul anticorpilor care se sintetizează, fiecare izotip având o eficiență optimă ca mediator ai funcțiilor efectoare particulare: IgA inhibă aderența

microorganismelor la suprafața mucoaselor; IgG și IgM sunt efectorii răspunsului imun humoral, iar IgE activează mastocitele.

Receptorii de antigen ai limfocitelor B de memorie au afinitate mai mare de legare a antigenelor și de aceea sunt mai eficienți în captarea cantităților mici de antigene și în prezentarea mai rapidă a acestora.

Mecanismul generării limfocitelor B de memorie este ipotetic. Una din teorii consideră că atât plasmocitele (producătoare de anticorpi) cât și celulele B de memorie derivă din același limfocit B precursor. Celulele rezultate din diviziunile succesive declanșate de stimularea antigenică evoluează diferit: unele se diferențiază în plasmocite, iar altele rămân limfocite mici care se reîntorc la starea G0 și devin limfocite de memorie. Descendenții clonei stimulate evoluează spre plasmocit sau spre celula de memorie, în raport cu influențele pe care le primește de la diferite limfocine, de la celulele accesorii sau de la celulele Th.

După altă teorie, celulele de memorie și plasmocitele provin din celule B diferite. Limfocitele B par fi preprogramate să devină plasmocite sau limfocite de memorie, înainte de expunerea la antigen.

Răspunsul imun secundar se caracterizează prin creșterea afinității anticorpilor.

Afinitatea receptorilor și a anticorpilor față de antigene este conferită de regiunea variabilă a moleculei. Creșterea afinității este explicabilă prin două mecanisme:

- stimularea selectivă a limfocitelor care au receptor VH/VL de mare afinitate, exprimat pe suprafața limfocitelor B neangajate. Altfel spus, pe măsură ce cantitatea de antigen scade, continuă să se activeze numai celulele cu receptori de mare afinitate și să domine răspunsul imun;

- după stimularea antigenică, în centrul germinativ al organelor limfoide secundare are loc procesul hipermutației somatice, printr-un mecanism necunoscut ce introduce mutații punctiforme în regiunile V.

Mecanismul memoriei imunologice pentru perioade lungi de timp (luni, ani sau tot restul vieții) nu este cunoscut. Populația celulelor de memorie trebuie, prin definiție, să aibă viață lungă și

aceasta, teoretic, se poate realiza fie prin generarea celulelor care nu se divid și nu mor sau prin generarea unei populații care se reînnoiește prin diviziuni care înlocuiesc celulele moarte. Primul model are avantajul că nu necesită un component reglator, iar al II-lea impune acțiunea unui mecanism reglator al ratei de reînnoire.

Existența unor limfocite cu viață lungă, după unii autori, este cu totul improbabilă, dar rezultatele analizei limfocitelor la om, după expunerea severă la radiații, sugerează că celulele individuale pot să persiste fără să se dividă, un interval de ordinul câtorva decade. După alte opinii, supraviețuirea limfocitelor T și B este dependentă de prezența antigenului. Experiențele de transfer adoptiv al celulelor de memorie (T și B) au arătat o scădere a răspunsului de memorie, în 30-40 de zile, ceea ce sugerează că memoria imunitară nu este rezultatul diferențierii limfocitelor de memorie cu viață lungă. Păstrarea antigenului în organism pare să aibă rol esențial în menținerea tuturor categoriilor de celule de memorie.

Antigenul se depozitează și se păstrează în organism pentru perioade de ordinul lunilor sau chiar un an, în asociație cu celulele foliculare dendritice, sub forma complexelor imune. Ele realizează stimularea continuă a limfocitelor B, la un nivel scăzut. Celulele foliculare dendritice sunt esențiale pentru memoria imunitară a celulelor B, a căror stimulare de durată o realizează cu antigenele pe care le poartă pe suprafața lor. Celulele foliculare dendritice nu prelucrează și nu prezintă antigenele, dar depozitează complexe antigen-anticorp pe suprafața lor.

O altă modalitate a păstrării îndelungate a memoriei imunitare este consecința expunerii periodice a limfocitelor B la antigene cu reacție încrucișată, la superantigene sau la mitogene, care prin intermediul interleuchinelor determină o expansiune limitată la câteva cicluri de diviziune.

Rețeaua idiotipică a lui Jerne explică memoria imunitară: interacțiunile idiotipice dintre diferiții constituenți moleculari și celulari ai rețelei, inițiate de contactul cu antigenul, ar fi suficiente pentru păstrarea memoriei informației antigenice dobândită anterior.

Limfocitele B de memorie nu se activează sub acțiunea mitogenilor sau a activatorilor policlonali, ci răspund numai la antigenul specific.

Activarea lor necesită o cantitate mult mai mică de antigen și este mult mai puțin T-dependentă.

Celulele Th de memorie sunt probabil generate în cortexul ganglionilor limfatici, dar mecanismul nu este cunoscut. Mecanismul memoriei celulelor T a fost propus după modelul inducerii dermatitei de contact, o reacție de hipersensibilitate întârziată, mediată de celulele CD4.

Din punct de vedere funcțional, în contrast cu celulele Th neangajate, celulele Th de memorie primesc informație antigenică nu numai de la macrofag, ci și de la limfocitele B localizate la interfața dintre foliculi și cortexul ganglionilor limfatici. Cele neangajate stimulează slab celulele B, iar celulele CD4 de memorie mediază răspunsul viguros al limfocitelor B.

Receptorul de antigen al limfocitelor T (RCT) nu suferă fenomenul maturării de afinitate. Aceasta înseamnă că limfocitele T de memorie nu leagă epitopii antigenici cu afinitate mai mare, dar după stimularea secundară, ele se activează mai rapid. Coreceptorul CD45 este prezent într-o izoformă cu greutate moleculară mai mică decât al limfocitelor T CD4 neangajate.

Caracteristica funcțională definitorie a celulelor Th de memorie este răspunsul lor mult mai amplu la stimulul antigenic, prin proliferare intensă, comparativ cu celulele neangajate. După stimulare, celulele Th de memorie produc o gamă mult mai largă de limfocine: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN γ , spre deosebire de limfocitele Th neangajate, care la contactul cu antigenul sintetizează IL-2.

Mecanismul molecular al generării limfocitelor Tc (CTL) de memorie nu este cunoscut. Răspunsul imun mediat celular față de antigenele de transplantare și față de antigenele celulare în general, are la bază aceleași caracteristici ale reactivității imunitare: instalarea memoriei imunitare după stimulul primar și o reactivitate intensă și rapidă după reexpunerea la antigen. Reactivitatea imună secundară mediată celular se evidențiază în dinamica respingerii alo- și xenogrefelor: organismele liniei genetice A resping alogrefa primară de la linia inbred B după dinamica răspunsului imun primar (10-14 zile). A II-a greșă de țesut de aceeași proveniență este respinsă după dinamica răspunsului imun secundar (5-6 zile), iar a II-a greșă de la un organism al liniei inbred C este respinsă de organismele liniei A după dinamica răspunsului imun primar.

Celulele T CD8 de memorie produc o gamă largă de citochine, iar cele neangajate produc IFN γ .

Răspunsul imun secundar (de memorie) este rezultatul cooperării variatelor tipuri de celule de memorie. De exemplu, celulele Th de memorie produc IL-2, cu efect stimulator asupra celulelor Tc și B de memorie. Cooperarea celulară mărește eficiența răspunsului imun. O cooperare de tip special este aceea a limfocitelor B de memorie, care au capacitatea de a capta foarte eficient cantitățile foarte mici de antigene specifice și de a le prezenta limfocitelor Th. Captarea antigenului prin intermediul receptorului imunoglobulinic specific de antigen este de circa 1000 de ori mai eficientă decât prin pinocitoză nespecifică.

Pe suprafața limfocitelor T de memorie nu apar molecule noi, dar se exprimă la un nivel superior, cele implicate în aderența la epiteliul venulelor. Moleculele de suprafață sunt implicate în recircularea limfocitelor la situsuri preferențiale (homing). Celulele T de memorie recirculă în primul rând în țesuturile nelimfoide, ajung în țesuturile limfoide prin limfaticile aferente și se reîntorc în sânge prin limfa eferentă. Dovada este adusă de faptul că in vivo, celulele care intră cu limfa în ganglionii limfatici, sunt exclusiv celule de memorie. Nu se știe dacă aceste celule recirculă sau răspund la o stimulare antigenică.

În concluzie, cele mai ample diferențe între celulele neangajate și cele de memorie sunt de ordin funcțional și constau în primul rând în capacitatea celulelor de memorie de a secreta o gamă foarte largă de citochine. Populația celulelor de memorie are viață lungă, dar se pot divide cu o rată controlată de mecanisme homeostatice. Condițiile pentru generarea și menținerea memoriei nu sunt clare. Reexpunerea la antigenul specific nu pare a fi necesară pentru păstrarea memoriei.

REGLAREA RĂSPUNSULUI IMUN

Pentru eficiența acțiunii nu este suficient să posezi efectori foarte buni, ci performanțele efectorilor trebuie monitorizate...(N. Wiener, 1961).

Teoria selecției clonale consideră că organismul animal sau uman, în mod obișnuit răspunde la stimularea cu orice substanță antigenică naturală

sau artificială, deoarece sistemul imunitar este alcătuit dintr-un număr imens

de populații de celule limfoide, fiecare având receptori specifici pentru un epitop antigenic.

Sistemul imunitar manifestă o stare de toleranță perfectă față de constituenții proprii organismului, dar există situații de excepție, în care anumite molecule self pot deveni imunogene.

Interacțiunile reciproce ale rețelei idiotipice, ca mecanism esențial al reglării răspunsului imun, se bazează pe raționamentul că după stimularea antigenică, răspunsul imun evoluează pe două direcții esențiale:

- sinteza anticorpilor complementari față de antigenul inductor, efectul fiind legarea și neutralizarea antigenului;

- sinteza unor molecule care se combină specific cu moleculele de imunoglobuline libere, dar și cu receptorii limfocitelor T și B și îi blochează, inhibând funcția lor și stopând răspunsul imun. Aceste molecule au rol esențial în reglarea răspunsului imun.

Sinteza moleculelor cu acțiune specifică față de receptorii limfocitari se datorează faptului că moleculele de imunoglobuline, libere sau legate de celule, au determinanți antigenici proprii care se comportă ca imunogene chiar pentru organismul în care s-au sintetizat.

Determinanți antigenici izotipici. Molecula de imunoglobulină poartă în structura sa mai multe categorii de determinanți antigenici, evidențiați prin injectarea imunoglobulinei asociată cu adjuvantul Freund, la animalele de laborator. Anticorpilor se comportă ca antigene față de organisme ale altor specii și se sintetizează anticorpi față de determinanții antigenici care definesc variantele izotipice, caracteristici diferitelor clase de imunoglobuline. Determinanții antigenici izotipici se găsesc pe catena H (γ , μ , α , δ , ϵ) sau pe catena L (κ sau λ) și sunt invariante pe toate moleculele de imunoglobuline ale unei clase, la toți indivizii unei specii.

Determinanții alotipici se găsesc pe moleculele de imunoglobuline ale organismelor unei specii, care au același alotip, adică aceeași combinație de gene alele codificatoare ale anticorpilor. Determinanții alotipici sunt localizați în regiunile constante ale catenelor H și L și semnificația lor este analogă celei a antigenelor de grup sanguin.

Determinanții idiotipici sunt localizați în regiunile variabile ale moleculei de imunoglobulină și reflectă particularitățile biochimice ale acestei regiuni. Aici se găsesc determinanții antigenici cu caracter individual ai moleculei de imunoglobulină, denumiți idiotopi, consecință a hipervariabilității aminoacizilor.

Fiecare determinant antigenic se numește idiotop, iar ansamblul lor formează idiotipul. Idiotopii sunt asociați cu secvențele hipervariabile ale moleculei: trei secvențe ale catenei L și trei din cele patru secvențe hipervariabile ale catenei H (secvența a 3-a nu intră în alcătuirea paratopului).

Fenomenul idiotipiei semnifică existența unor determinanți proprii fiecărui organism, localizați pe moleculele de anticorpi. Prezența idiotopilor nu este limitată la moleculele libere de imunoglobuline, ci se găsesc și în structura receptorilor limfocitari de antigen, în special în

structura moleculelor de imunoglobuline cu rol de receptor de antigen de pe suprafața limfocitelor B.

Teoria rețelei idiotipice consideră că idiotopii sunt imunogeni chiar pentru organismul în care s-au sintetizat și induc sinteza anticorpilor specifici cu care se combină. Aceștia se numesc anticorpi anti-idiotipici. La rândul lor, anticorpii anti-idiotipici induc sinteza anticorpilor anti-anti-idiotipici. Astfel, rețeaua idiotipică nu este numai o rețea de interacțiuni moleculare între imunoglobulinele libere, ci este o rețea mixtă de interacțiuni celulare și moleculare.

În contextul teoriei, distincția dintre idiotip și anti-idiotip este numai operațională. Orice idiotip de pe suprafața unui receptor de antigen (moleculă liberă sau ancorată în membrana limfocitelor T și B) poate funcționa simultan, ca imunogen (epitop) stimulator al răspunsului imun, dar funcționează și ca paratop, capabil să se lege cu idiotipul complementar.

Repertoriul idiotipurilor este egal cu acela al specificităților de legare.

Teoria rețelei idiotipice a lui Jerne se bazează pe faptul că într-un organism, fiecare moleculă de anticorp este recunoscută de situsurile de combinare ale altor molecule de anticorpi cu configurație spațială complementară. Astfel, idiotopii proprii anticorpilor sintetizați în faza inițială a răspunsului imun, se comportă ca determinanți antigenici și declanșează un răspuns imun de faza II-a, în care se sintetizează anticorpi anti-anticorpi din faza I-a a răspunsului imun. Anticorpii din faza a II-a se numesc anticorpi anti-idiotip. La rândul lor, aceștia au un set propriu de idiotopi, care se comportă ca epitopi antigenici și induc sinteza anticorpilor de faza a III-a ș.a.m.d. Ca într-o sală a oglinzilor, acest proces se poate repeta continuu. Anticorpii sintetizați într-o astfel de cascadă a răspunsului imun, sunt legați într-o rețea de interacțiuni specifice, care poate să implice întregul sistem imunitar. Fig. 89. Elementele rețelei idiotipice, în care receptorii de antigen ai unui limfocit recunosc reciproc un idiotip pe receptorii altui limfocit. Limfocitele Th, Ts și B interacționează prin reacții idiotip-antiidiotip, producând stimularea sau supresia. Interacțiunile T-T pot avea loc prin recunoașterea directă a unui RCT de către altul sau mai frecvent, prin recunoașterea unui peptid RCT prelucrat și asociat cu moleculele CMH. Unul din seturile de anticorpi antiidiotipici, Ab2 α poate purta un idiotip asemănător cu antigenul (adică este imaginea internă a acestuia). Același idiotip (O) poate fi prezent pe receptorii cu specificități distincte, astfel că anti-(anti-Id1) nu se leagă în mod necesar de antigenul original (α = anti; Id = Idiotip; Ab1 = Id; Ab2 α = anti-Idiotip ce nu implică paratopul; Ab2 α = anticorpi anti-Idiotip imaginea internă care implică paratopul; Ab3 = anti(anti-Id)).

Anticorpilor anti-idiotipici constituie forța reglatoare a sistemului imunitar.

În mod asemănător, rețeaua de interacțiuni specifice se creează între idiotopii moleculelor receptoare de antigen din membrana limfocitelor T. Ei sunt recunoscuți de situsurile de combinare ale receptorilor de pe un alt set de limfocite.

Teoria rețelei idiotipice se bazează pe existența unei rețele imense de interacțiuni idiotip-antiidiotip, atât între anticorpi cât și între receptorii celulari, ce asigură controlul răspunsului imun.

După Jerne, interacțiunile rețelei se produc nu numai ca răspuns la un stimul antigenic, ci și în starea de echilibru a sistemului imunitar.

Caracterul de rețea a sistemului imunitar decurge din faptul că fiecare moleculă de anticorp sau de receptor, funcționează mai întâi ca moleculă efectoră a răspunsului imun, dar și ca moleculă inductoare a sintezei altor efectori. Prin intermediul interacțiunilor idiotip-antiidiotip, sistemul imunitar interacționează cu el însuși.

În absența stimulilor antigenici, sistemul imunitar este în stare de echilibru (steady state) și rețeaua idiotipică funcționează unitar. Interacțiunile rețelei activează limfocitele B și ele sintetizează mici cantități de anticorpi. Astfel, sistemul imunitar este concentrat asupra componentelor proprii și produce anticorpi-antiidiotipici față de propriul său repertoriu de receptori. Toate componentele rețelei imunitare (celule, molecule) sunt într-o stare de comunicare permanentă și în stare de echilibru reciproc. Consecința interacțiunilor reciproce inductoare idiotip-antiidiotip este starea normală (echilibrată), represată, a sistemului imunitar.

Pătrunderea unui antigen exogen în organism, stimulează câteva clone de limfocite și astfel sistemul imunitar iese din starea de represie obișnuită. Se sintetizează Ac1, care au idiotipul 1(I1).

Ca răspuns la determinanții idiotipici ai idiotipului 1, limfocitele B sintetizează anticorpi de fază a II-a (anticorpi anti-idiotip I1). Efectele declanșate de un antigen se propagă în tot sistemul imunitar, așa cum pe suprafața unei ape, sub impactul unui șoc mecanic se induc unde succesive tot mai mici, până se ajunge la starea de echilibru.

Teoria rețelei idiotipice introduce un concept nou în al imaginii interne a antigenului, foarte important din punct de vedere teoretic și practic. În acord cu această concepție, anticorpul (Ac1) față de un epitop poartă imaginea sa negativă. Idiotopii acestor molecule, asociați situsului de combinare, induc sinteza anticorpilor anti-idiotipici (Ac2). Aceștia poartă imaginea negativă a anticorpilor 1 și vor reproduce imaginea internă a epitopului inițial. Anticorpul 2, care sunt imaginea internă a antigenului, pot fi stimulatori ai răspunsului imun față de antigenul inițial.

Numărul imaginilor interne crește odată cu sinteza unui nou idiotip, pe măsura ce influența antigenului se propagă în rețeaua sistemului imunitar. Fig. 90. Ilustrarea grafică a rețelei idiotipice. Anticorpul generat ca răspuns față de un antigen constituie primul val al răspunsului. Al II-lea val este inițiat de idiotipul anticorpilor din primul val și se numesc anticorpi anti-idiotipici. Ei exprimă idiotipul care generează al III-lea val al răspunsului anticorpilor (anticorpi anti-anti-idiotipici). Teoria consideră că răspunsul idiotip-anti-idiotip continuă indefinit, însă circuitul se încheie când unul din idiotipurile anticorpilor se aseamănă cu unul din idiotipurile sintetizate într-un val anterior.

Concepția actuală a funcționalității sistemului imunitar presupune că acesta este format dintr-un număr mare de clone de limfocite, care poartă receptori preformați față de antigene. În acord cu rețeaua idiotipică, imaginile interne ale diferiților epitopi ai clonelor de limfocite, sunt prezente în rețea, așa încât nici un epitop din mediul extern nu este cu adevărat străin pentru sistemul imunitar, deoarece toți epitopii capabili să inducă un răspuns imun, sunt reprezentați în sistemul imunitar de receptori limfocitari, prin imaginea lor internă.

Unii idiotopi ai rețelei sunt chiar imaginea internă a moleculelor antigenice din propriul organism. În acord cu această concepție, maladiile autoimune sunt consecința perturbării rețelei idiotipice.

Rețeaua idiotipică se stimulează și sintetizează anticorpi anti-idiotipici, numai când idiotopii ating o concentrație limită.

Jerne compară cascada activării idiotip-antiidiotip a sistemului imunitar, cu o sală a oglinzilor, în care inițial se formează imaginea negativă a structurii nonself (anti-nonself), apoi anti-anti-nonself, care la rândul lor reflectă universul antigenelor exogene.

Teoria rețelei idiotipice permite înțelegerea sistemului imunitar ca un sistem global de interacțiuni reciproce, în contradicție cu teoria clasică a clonelor de limfocite care așteaptă pasiv întâlnirea cu antigenul.

Elementul fundamental al teoriei este că sistemul imunitar formează o rețea funcțională de interacțiuni între molecule de anticorpi și receptorii limfocitari, continuu echilibrată înainte de pătrunderea antigenului exogen.

Interacțiunile idiotipice sugerează o legătură funcțională permanentă între limfocite, precum și între limfocite și alte categorii de celule din organism, stimulând pe unele, represând pe altele, printr-un ansamblu de semnale interne.

TOLERANȚA IMUNITARĂ

Toleranța este o stare fiziologică, caracterizată prin absența răspunsului imun față de un antigen și prin păstrarea capacității de răspuns imun față de alte antigene.

Sistemul imunitar este tolerant, în primul rând față de componentele self, pe care a învățat să le recunoască în timpul dezvoltării embrionare.

Starea de toleranță este specifică pentru un antigen dat și pentru

cele înrudite din punct de vedere chimic, dar este asociată cu păstrarea reactivității imunitare față de toate antigenele care nu dau reacție încrucișată cu antigenul tolerat.

Toleranța imunitară și reactivitatea imunitară prezintă următoarele caracteristici comune:

- sunt specifice față de un antigen dat

- se manifestă după contactul cu antigenul inductor

- sunt mediate de limfocite.

Toleranța se deosebește de starea de imunosupresie, ultima fiind consecința unei incapacități congenitale sau dobândite de a răspunde la o varietate de antigene.

Importanța fenomenului de toleranță față de componentele proprii organismului a fost recunoscută de Ehrlich și Morgenroth (1900), care au formulat conceptul "horror autotoxicus", o consecință esențială a funcției normale a sistemului imunitar, ce semnifică faptul că în mod normal, organismul își asigură protecția propriilor sale componente față de autodistrugerea prin reactivitatea imunitară.

Starea de toleranță poate fi indusă natural sau experimental.

După 1920 s-a evidențiat că toleranța poate fi indusă experimental, față de unele antigene administrate în doze mari: toxina difterică, polizaharidul de streptococ (la șoarece), γ globulina de cal (la iepure). Aceleași antigene, în doze mici sunt stimulatoare ale răspunsului imun.

În 1938, Traub a indus toleranța specifică, prin inocularea șoarecilor in utero, cu virusul coriomeningitei limfocitare (LCMV).

În 1945, Owen a evidențiat că gemenii dizigoți de bovine (aparținând unor alotipuri diferite) își tolerează reciproc antigenele tisulare, dacă în cursul vieții embrionare, un proces de fuziune placentară a permis un schimb reciproc de elemente figurate. Cei doi gemeni resping greșelile de țesut de origine parentală sau de la organisme cu aceeași ascendență. Acești gemeni au elemente figurate sanguine proprii, dar și celule sanguine ale gemenului cu un alotip diferit și se numesc himere hematopoetice.

Concluzia a fost că, prin contactul timpuriu, în cursul vieții embrionare, al limfocitelor cu antigenele, se creează o stare de toleranță specifică față de nonself și ulterior, antigenele inductoare ale toleranței vor fi recunoscute ca self și tolerate.

Himerele hematopoetice pot fi obținute artificial, la organisme adulte, prin iradiere sau prin imunosupresie severă medicamentoasă, urmată de injectarea celulelor de măduvă osoasă străină. În clinică, pentru tratamentul unor malignități ale sângelui se realizează eliminarea totală a măduvei hematopoetice prin iradiere și imunosupresie, urmată de transplantul de măduvă osoasă umană.

În sens mai larg, himera biologică este un organism dotat în mod artificial cu componente celulare, cu țesuturi sau organe, care provin de la alt organism.

În 1953, Billingham, Brent și Medawar au descoperit faptul că maturarea limfocitelor parcurge un stadiu, în cursul căruia contactul cu antigenul, perturbă acest proces, consecința fiind pierderea funcției imunitare, adică limfocitele devin tolerante față de antigenul respectiv.

Starea de toleranță se induce experimental, la șoarecii nou-născuți, față de toate tipurile de antigene. Revelatoare în acest sens sunt stările de toleranță, induse la animalele nou-născute, față de celulele provenite de la organisme genetic diferite. Animalele injectate la naștere cu celule alogene, la vârsta adultă vor accepta grefele tisulare de la organismele donoare de celule.

Inducerea stării de toleranță, prin contactul timpuriu cu antigenul, înainte de naștere sau imediat după aceea, se datorează faptului că, în stadiul embrionar și o perioadă postnatală de durată variabilă în funcție de specie, sistemul imunitar este imatur și în consecință, foarte sensibil la inducerea stării de toleranță imunitară.

Starea de toleranță este specifică față de determinantul antigenic. Toleranța poate fi încrucișată, adică se manifestă concomitent față de mai

multe antigene diferite, înrudite chimic, dacă au cel puțin un determinant antigenic comun.

Limfocitele B imature sunt foarte sensibile la inducerea stării de toleranță, datorită faptului că uneori, ele preiau informația antigenică prin contactul direct cu epitopii specifici ai antigenului, dar după maturare devin rezistente la acest proces. Sensibilitatea limfocitelor T față de inducerea toleranței variază în limite mai restrânse în cursul ontogeniei lor.

Mecanismele celulare și moleculare ale toleranței sunt ipotetice, dar probabil sunt dependente de momentul inducerii toleranței, în cursul ontogeniei lor.

Toleranța indusă în cursul vieții fetale este rezultatul contactului limfocitelor antigen-reactive, cu antigenul. Capacitatea de răspuns imun la stimulul antigenic specific este pierdută definitiv și ireversibil (de exemplu, toleranța șoarecelui față de LCMV după inocularea in utero).

În cursul vieții fetale, toleranța se instalează după același mecanism al toleranței față de componentele self, care este puțin cunoscut.

Starea de toleranță a limfocitelor B mature este mai greu inductibilă. Mecanismul toleranței este ipotetic.

În cursul vieții adulte, după stimularea repetată cu un Ag timo-dependent, toleranța se instalează ca rezultat al epuizării limfocitelor B antigen-reactive. Toate limfocitele B mature, capabile să reacționeze specific față de un antigen, sunt stimulate și se diferențiază în celule producătoare de Ac, astfel încât o stimulare ulterioară cu același antigen rămâne fără răspuns.

Toleranța imunitară poate fi mediată de celulele Ts. Acest mecanism a fost demonstrat experimental la șoarece, după injectarea unei cantități mari de hematii de berbec. Starea de toleranță este transferabilă la organisme izogenice, prin intermediul limfocitelor splenice Ts.

Toleranța poate fi indusă de factori blocați din plasmă, a căror natură nu este totdeauna cunoscută, dar uneori s-au identificat a fi anticorpi, care îndeplinesc funcția de specificitate, dar nu și funcțiile biologice efectoare.

Uneori, starea de toleranță indusă de antigenele greu degradabile este aparentă, deoarece se sintetizează anticorpi specifici față de antigenul injectat. Se formează complexe imune cu antigenul care persistă în organism și de aceea, în ser nu se detectează anticorpi liberi prin metodele obișnuite.

Factorii care condiționează inducerea stării de toleranță

Inducerea stării de toleranță este dependentă de doza de antigen, de modul de administrare, de starea fizică a antigenului, de calea de administrare, de rata de catabolizare a antigenului, de vârstă, de factori genetici.

Dozele inductoare ale răspunsului imun și ale toleranței variază mult de la un organism la altul, dar adeseori, dozele foarte mici și foarte mari induc starea de toleranță, iar dozele medii sunt inductoare ale răspunsului imun. De exemplu, albumina serică bovină, în doze mici (1 mg/kg corp, de 3 ori pe săptămână, timp de câteva săptămâni) sau în doză mare (100 mg/kg corp) induce starea de toleranță.

Administrarea antigenelor fără adjuvant favorizează instalarea toleranței imunitare.

Administrarea intravenoasă și chiar orală favorizează inducerea toleranței, iar injectarea subcutană, intradermică sau intramusculară stimulează răspusul imun.

Starea fizică a antigenului influențează reactivitatea imunitară. Antigenele proteice în stare agregată sunt imunogene, iar forma monomerică (solubilă) a acelorași antigene este, în funcție de doză, imunogenă sau tolerogenă. Dozele mari de antigene solubile favorizează toleranța, dar în asociație cu adjuvanții sunt imunogene.

Pentru inducerea și menținerea stării de toleranță este necesară persistența antigenului în organism. Antigenele care se catabolizează greu induc starea de toleranță.

Cea mai cunoscută stare de toleranță experimentală este cea indusă de dozele mari de polizaharide (antigene timo-independente, greu degradabile). Ele produc paralizia limfocitelor B, după legarea în exces de receptorii lor. Corespondentul clinic al acestei situații experimentale este starea de toleranță indusă de microorganismele capsulate, care produc infecții pulmonare la persoanele vârstnice. Pe fondul reactivității imunitare scăzute, țesutul pulmonar este inundat cu polizaharide capsulare și sfârșitul este letal.

Durata stării de toleranță este variabilă, în funcție de mecanismul celular care a mediat instalarea ei.

Toleranța indusă în timpul vieții embrionare, probabil ca rezultat al anulării reactivității clonei de limfocite specifice, este ireversibilă. Toleranța indusă după maturarea limfocitelor este o stare

reversibilă și revenirea la starea imunoreactivă normală este dependentă de timpul necesar regenerării limfocitelor mature imunoreactive.

Durata toleranței induse prin fenomenul “inundației antigenice este dependentă de rata catabolizării Ag.

Toleranța fătului

Pentru organismul matern, fătul este o alogrefă, deoarece jumătate din zestrea sa genetică este de origine paternă.

Din punct de vedere imunologic, organismul matern nu este tolerant față de antigenele fetale. Ca dovadă, grefa de țesut fetal este respinsă.

Pe toată durata sarcinii, organismul matern își păstrează reactivitatea imunitară normală, dar prin intermediul placentei, fătul dispune de un sistem eficient de protecție.

Placenta, anexă de origine embrionară, este o barieră care neutralizează efectorii imunitari ai organismului matern. Trofoblastul este învelișul celular al placentei și al membranelor extraembrionare ce acoperă fătul și reprezintă țesutul fetal de interfață cu sângele matern și cu țesutul endometrului. La om, stratul trofoblastic extern al vilozităților corionului placentar este sincițiotrofoblastul, un strat celular continuu fără joncțiuni intercelulare. Prin sincițiotrofoblast, fătul se hrănește, respiră și supraviețuiește.

Pe fața internă (spre embrion), placenta nu exprimă antigenele majore de histompatibilitate, iar pe fața externă predomină antigenele minore. Moleculele CMH de origine fetală au o densitate mică. Organismul matern recunoaște antigenele fetale ale placentei și reacționează prin mecanisme imunitare. Așa se explică faptul că în circulația maternă se detectează anticorpi antifetali la circa 15% dintre gravide. Diferențele antigenice dintre mamă și făt par a fi chiar benefice pentru dezvoltarea fătului. Așa se explică vigoarea hibrizilor, în contrast cu dificultățile de propagare a liniilor înbred. Greutatea placentei și a embrionului este mai mare la femelele alogenice, față de cele singenice în raport cu fătul lor.

Pe fondul unei reactivități imunitare normale a organismului matern față de stimulii antigenici, la nivelul placentei, ca zonă de interfață feto-maternă, se produce o modelare a reactivității imunitare, care favorizează toleranța față de antigenele fetale.

Toleranța față de antigenele fetale se realizează prin următoarele mecanisme:

- În placentă se secretă și se concentrează substanțe cu acțiune imunosupresoare strict localizată, care inhibă activarea limfocitelor Tc și NK;

- placentă secretă factori care neutralizează local Ac antiplacentă și îi transformă în anticorpi blocanți, care la rândul lor au efect protector;

- În placentă s-au detectat limfocite cu efect imunosupresor (Ts), iar numărul lor crește semnificativ în a II-a jumătate a sarcinii;

- placentă are o rezistență deosebită. Celulele sale rezistă efectului litic al celulelor Tc și NK;

- placentă are o capacitate proprie de regenerare. Eventualele sale leziuni provocate de efectorii IMC și IMH sunt compensate prin proliferarea celulelor rezistente. Placentă supusă atacului efectorilor imunitari este mai groasă decât în mod obișnuit;

- placentă are rolul de a minimaliza recunoașterea antigenelor fetale de către efectorii imunitari de origine maternă, având rolul unui îfbureț imunitar. Sincitiotrofoblastul uman, dar și al altor specii, prezintă receptori pentru regiunea Fc γ , prin intermediul cărora IgG matern este transportat selectiv în circulația fetală și conferă imunitate pasivă tranzitorie postnatală într-un mediu ostil din punct de vedere antigenic. Transferul maxim are loc în săptămânile 20-22 de sarcină. Concomitent pot fi transferați anticorpi materni specifici față de antigenele fetale (în special anticorpi anti-HLA, care s-au sintetizat într-o sarcină anterioară) și care ar avea efect defavorabil asupra dezvoltării fetale, dacă ar penetra bariera placentară. Există mecanisme care protejează fătul de IgG matern. Alo-anticorpii materni specifici anti-HLA fetale sunt legați pe celulele netrofoblastice (fibroblaste, endoteliale etc.) din mezenchimul intravilar al țesutului placentar și nu ajung în circulația fetală. IgG matern cu potențial lezional (IgG anti D sau anti-plachetari), care scapă efectului neutralizant al placentei întâlnesc ținte antigenice foarte extinse (pe eritrocite, pe plachete);

- sub aspect imunitar, placenta este "o zonă neutră", datorită nivelului scăzut al moleculelor CMH;

Dacă toate aceste bariere de apărare sunt depășite, se produce avortul imunitar.

SURSE DE GAMAGLOBULINE OMOGENE

Moleculele de anticorpi ale unui ser imun sunt foarte heterogene din punctul de vedere al specificității lor de combinare cu epitopii antigenici inductori, deoarece, atât antigenele moleculare, dar în special cele corpusculare (virusuri, celule), prezintă o mare diversitate de epitopi. Chiar și antigenele moleculare cele mai simple sunt mozaicuri de epitopi. Specificitatea de combinare a moleculelor de anticorpi corespunde epitopilor față de care s-au sintetizat.

Diversitatea uriașă a specificității de combinare a anticorpilor (evaluată la 10⁸-10⁹) generează o heterogenitate biochimică de același nivel, materializată în variația secvenței de aminoacizi, ceea ce a constituit un obstacol major în calea studiului lor prin metode analitice, deși anticorpii se găsesc totdeauna în sânge, cu excepția cazurilor patologice de agamaglobulinemie.

Analiza biochimică a imunoglobulinelor a fost condiționată de existența unei surse omogene de molecule de anticorpi, cu o secvență identică a aminoacizilor. Condiția identității secvenței de aminoacizi este îndeplinită de anticorpii care au aceeași specificitate de legare, nu față de un antigen, ci față de un singur epitop.

Proteine de mielom

Sursa naturală de molecule de imunoglobulină, omogene, identice din punct de vedere biochimic (monoclonale), este mielomul multiplu (plasmocitomul), o afecțiune tumorală malignă, inițiată în măduva osoasă și rezultată prin proliferarea unui plasmablast.

Plasmocitomul produce molecule de imunoglobuline identice din punct de vedere biochimic și al sarcinii electrice, denumite proteine de mielom, deoarece toate celulele tumorii sunt descendente ale unei singure celule producătoare de anticorpi. Moleculele secretate de o tumoră de mielom se numesc proteine M (Mielom) sau paraproteine și pot să reprezinte până la 95% din totalul gamaglobulinelor plasmaticice.

Tumorile de mielom apar spontan cu o frecvență mică la om, câine, cal, șobolan, șoarece sau se induc experimental la șoarecii liniilor inbred NZB și BALB/c. Tumora este transplantabilă în serie.

Uneori, proteinele M au aceeași secvență de aminoacizi ca și imunoglobulinele normale, dar adeseori, sinteza catenelor patologice este incompletă: lipsesc diferite secvențe de aminoacizi, de diferite lungimi.

Rareori, proteinele de mielom își păstrează chiar proprietatea de a lega specific determinanți antigenici cunoscuți: de exemplu, 5% din proteinele M ale unei linii inbred de șoarece, leagă determinanți antigenici ai suprafeței celulelor bacteriene enterice, ceea ce sugerează că tumora își are originea în descendenții limfocitelor B, care proliferază ca răspuns la stimularea specifică cu antigene ale microbiotei enterice.

Tumorile de mielom, de cele mai multe ori, secretă molecule incomplete sau fragmente de molecule imunoglobulinice.

În celulele tumorilor de mielom, rata sintezei catenelor H și L este dezechilibrată. De exemplu, mielomul Bence-Jones, sintetizează catenele L în mare exces. Proteinele Bence-Jones sunt dimeri de lanțuri L (κ sau λ). Una din cele două catene L are rolul catenei H și participă la formarea situsului de legare. Molecula patologică are activitate de anticorp față de unele componente tisulare sau față de antigene mici.

Mielomul lanțurilor grele sintetizează numai catenele H ale izotipurilor $\alpha\gamma$ sau μ , iar mielomul macroglobulinemiei Waldenstrom sintetizează molecule de IgM. Majoritatea mieloamelor produc proteine Bence-Jones.

În laboratorul clinic, diagnosticul de mielom se pune după detectarea în ser, prin electroforeză, a unei cantități mari de molecule ale unui izotip de imunoglobulină (circa 50 mg/ml).

Proteinele de mielom precipită la 50-60o, la pH 4-6, se redizolvă prin încălzire la 80-90o și reprecipită prin răcire.

La pacienții cu mielom, în special la cei cu macroglobulinemie Waldenstrom, vâscozitatea sângelui crește mult, datorită cantității excesive de proteine produse de mielom. Eliminarea proteinelor patologice se face prin procedeul plasmaferezei. Plasmafereza este tehnica de recoltare a unor volume mari de sânge, urmată de reintroducerea în organism, a celulelor sanguine suspendate într-un înlocuitor de plasmă.

Surse artificiale de anticorpi monoclonali. Tehnologia hibridomului

Metoda clasică de obținere a anticorpilor necesari studiilor clinice și de diagnostic, constă în stimularea repetată, prin injectarea antigenului într-un organism cu reactivitate imunitară optimă. Când titrul anticorpilor specifici este maxim, animalul este sângerat și se obține serul imun (antiserul), care este folosit în stare nativă sau este utilizat pentru purificarea anticorpilor. Metoda are câteva dezavantaje:

- cantitatea și calitatea anticorpilor față de un antigen variază de la un organism la altul și chiar între sângerările succesive ale aceluiași animal;

- serul imun este un amestec foarte heterogen de molecule de anticorpi, chiar și în cazul în care imunizarea se face cu un antigen cu grad

înalt de puritate;

- oricât de simplu ca structură moleculară, un antigen are mai mulți epitopi care stimulează mai multe clone de limfocite, ce produc anticorpi cu specificități și afinități diferite;

- antigenele înalt purificate conțin impurități antigenice care induc sinteza anticorpilor specifici în cantități disproporționat de mari;

- chiar după purificare în proces costisitor în antiserurile conțin anticorpi cu afinități diferite și cu reactivitate încrucișată.

Din aceste cauze, toate serurile imune sunt amestecuri de anticorpi policlonali, în cantități variabile de la un organism la altul. Obținerea unor cantități mari de anticorpi cu specificitate de legare față de un epitop unic, prin metoda clasică este imposibilă.

Tehnologia modernă de obținere a anticorpilor omogeni, denumită hibridoma (hibrid + mieloma) a fost propusă de Köhler și Milstein (1975), se bazează pe următoarele principii metodologice și teoretice:

1) Antigenul purificat se injectează animalelor de experiență.

2) La momentul adecvat, din splină sau din ganglionii limfatici, se separă limfocitele. Fiecare limfocit și plasmocitele derivate sintetizează molecule omogene de anticorpi, cu specificitate unică de combinare pentru un singur epitop, denumiți anticorpi monoclonali (AMC).

3) Limfocitele B trăiesc puțin în afara organismului, iar plasmocitele care sintetizează cea mai mare cantitate de anticorpi, nu supraviețuiesc in vitro și de aceea cultivarea sau clonarea lor nu este posibilă.

4) Celulele de mielom sunt nemuritoare, datorită capacității lor de a se menține un timp nelimitat în cultură. Fuziunea lor cu limfocitele B in vitro, le conferă celor din urmă proprietatea de “nemurire”, rezultând o celulă hibridă (hibridom), care sintetizează și secretă anticorpi monoclonali (AMC). AMC sunt considerați ca varianta in vitro a proteinelor de mielom, pentru că în ambele cazuri, o clonă de limfocite proliferază și secretă anticorpi cu o anumită specificitate

5) Hibridomul producător de anticorpi moștenește caracteristici atât de la limfocit în care secretă anticorpi cu specificitate față de un antigen, cât și de la celula de mielom, adică este nemuritor.

6) Celulele hibridoma pot fi clonate individual și fiecare clonă produce anticorpi specifici față de un singur determinant antigenic. Ele pot fi menținute indefinit prin pasaje in vivo sau prin cultivare in vitro. Fig.91. Biotehnologia hibridomului de producere a anticorpilor monoclonali se bazează pe fuziunea limfocitului, cu celula tumorală de mielom de șoarece. Antigenele membranare specifice ale celor două celule, se distribuie în mozaic pe suprafața celulei fuzionate heterocarion.

Etapele obținerii hibridomului

Metodologia obținerii unei linii celulare hibride, nemuritoare, producătoare de AMC, parcurge mai multe etape.

1. Obținerea celulelor de mielom. Baza tehnologiei hibridomului a fost obținerea unei linii celulare mutante de mielom, care nu secretă anticorpi și este deficicientă pentru hipoxantin-guanozin-fosfo-ribozil-transferază (HGPRT).

Mielomul (plasmocitomul) este rezultatul diviziunilor necontrolate ale unui singur plasmablast sau ale unui precursor al său din linia limfocitară B. Proliferarea necontrolată este însoțită de sinteza unor cantități mari de molecule omogene de imunoglobulină, cu proprietăți biochimice uniforme. Moleculele sintetizate de tumorile de mielom se deosebesc de imunoglobulinele normale, prin aceea că nu prezintă specificitate de legare cu antigenul.

Tumorile de mielom apar spontan la multe mamifere, iar la om, 1% din tumori sunt mieloame. Tumorile de mielom se induc experimental la mai multe linii de șoarece (BALB/c și NZB), după injectarea intraperitoneală a uleiurilor minerale, sau după implantarea materialelor plastice, care produc o reacție inflamatorie cronică. Tumorile apar după 120-130 de zile și se pot menține prin pasaje seriate la șoareci din aceeași linie înbred sau prin cultivare in vitro și produc cantități suficiente de imunoglobuline pentru analiza biochimică. Nu s-au obținut mieloame care să sintetizeze anticorpi cu specificitate de legare față de un antigen.

Hibridoamele se obțin din linii speciale de mielom, care au două particularități mutaționale:

- nu sintetizează propria moleculă de imunoglobulină, astfel că celula hibridă va produce exclusiv molecule de imunoglobulină caracteristice limfocitului B normal;

- sunt deficiente pentru sinteza enzimei HGPRT, necesară sintezei acizilor nucleici.

- Pentru hibridare sunt disponibile linii celulare de mielom de șoarece, de șobolan, de om, dar cea mai folosită este linia P3-X63-Ag8, izolată de la linia BALB/c, cu următoarele caracteristici:

• nu este HGPRT-;

- este tumorigenă pentru șoarece;

- are o frecvență relativ înaltă (1/105-106) de fuziune cu limfocitele de șoarece;

- nu sintetizează imunoglobulina proprie și nu reprezintă genele pentru sinteza imunoglobulinei în hibridom;

- are o eficiență înaltă de clonare in vitro.

Deoarece sunt deficiente pentru sinteza enzimei HGPRT, celulele sale nu detoxifică efectul aminopterinei, care se adaugă în mediul de creștere. Aminopterina, un antagonist al reductazei acidului folic, blochează calea sintezei ADN prin inhibiția sintezei purinelor (A, G) și a timidinei. În mediul cu aminopterină, celulele cu HGPRT- nu supraviețuiesc.

2. Imunizarea. Obținerea unei populații mari de limfocite B, prin fenomenul expansiunii clonale, angajate în sinteza anticorpilor specifici față de un anumit epitop, se realizează prin imunizare. Antigenul stimulează mai multe clone de limfocite. Fiecare clonă de limfocite activate, sintetizează anticorpi specifici față de unul din epitopii antigenului. Procedura de imunizare (cantitatea de antigen, tipul de adjuvant, calea de administrare) este selectată empiric.

Cea mai bună sursă de limfocite rămâne splina de șoarece și de șobolan, dar în special șoarecele BALB/c, pentru că mielomul are aceeași origine și prin hibridare se evită incompatibilitatea

CMH. Hibridoamele de șobolan, obținute prin fuziunea limfocitelor splenice cu celule de mielom, sunt mai stabile și anticorpii pe care îi sintetizează fixează complementul.

Cantitatea de antigen necesară pentru imunizare depinde de imunogenitatea acestuia. Antigenele celulare bacteriene sau ale celulei eucariote sunt foarte imunogene. Antigenele solubile (polipeptide, glucide, hormoni) sunt slab antigenice. Imunogenitatea lor crește după cuplarea cu hemocianină de Limulus (KLH) sau cu albumina. Cea mai bună imunizare se obține prin injectare intravenoasă sau intraperitoneală repetată, timp de câteva săptămâni sau luni, a antigenului slab imunogen.

Splina se recoltează înainte de atingerea titrului maxim al anticorpilor serici. Blastele fuzionează mai ușor decât celulele în repaus.

O alternativă a imunizării este stimularea limfocitelor in vitro, prin incubarea în prezența antigenului.

3. Fuziunea se realizează în scopul "imortalizării" celulelor producătoare de anticorpi și este esența biotehnologiei hibridomului. Scopul "imortalizării" este păstrarea capacității limfocitelor individuale de a secreta un singur tip de AMC, prin creșterea nelimitată în timp, fără senescență, in vivo sau in vitro, ca o consecință a transformării, indusă cu celule de mielom.

Limfocitele sau imortalizat pe trei căi:

- prin fuziune cu celule tumorale de mielom

- prin infecție cu un virus transformant ADN

- prin transfecție cu ADN transformant din celulele maligne sau cu ADN al unui oncovirus.

Cea mai utilizată metodă de "imortalizare" este aceea a fuziunii cu o celulă de mielom. Fuziunea limfocitelor viabile din splină, obținute prin dezagregare mecanică, cu celulele de mielom HGPRT- se realizează prin amestecul lor în proporție de 2-5 celule splenice/o celulă de mielom.

Procesul fuziunii este stimulat pe mai multe căi, dar cel mai adesea se folosește PEG cu gr. mol. de 4000 D. Amestecul de celule se menține 3 minute în 0,20-0,50 ml PEG 40%, la 370, pH 7,5-8,0. Frecvența fuziunii crește sub acțiunea impulsurilor electrice scurte, de mare intensitate.

Numărul și varietatea hibridoamelor obținute este mare, ceea ce impune selecția celor producătoare de anticorpi cu specificitatea dorită.

4. Selecția celulelor de hibridom. Amestecul de fuziune conține celule splenice și celule de mielom nefuzionate, celule splenice fuzionate între ele, celule de mielom fuzionate între ele și celule hibridom, rezultate prin fuziunea splenocitelor cu celule de mielom.

Selecția are ca scop, separarea celulelor de hibridom și eliminarea din amestec, a celorlalte tipuri celulare, nefuzionate sau fuzionate neutilizabile. În acest scop, amestecul de celule se cultivă pe mediul selectiv HAT (hipoxantină-aminopterină-timidină), în care splenocitele nefuzionate și fuzionații splenocit x splenocit mor în 1-2 săptămâni, copleșite fiind numeric de celulele de hibridom, care se divid la fiecare 17-24 de ore.

Mediul selectiv HAT permite supraviețuirea numai a fuzionaților mielom x splenocit și este inhibitor pentru celulele de mielom, ca și pentru fuzionații mielom x mielom. Acțiunea sa selectivă se bazează pe următoarele condiții experimentale:

a) Aminopterina din mediul HAT blochează sinteza purinelor (A, G) pe calea inozin-monofosfatului și astfel blochează sinteza acizilor nucleici. În acest mediu, celulele HGPRT- devin dependente de surse externe de purine

(A, G) și de timidină. Hipoxantina din mediul HAT poate fi convertită la inozin-monofosfat, de către enzima HGPRT și se formează adenzin-monofosfat și guanozin-monofosfat. Timidina poate fi fosforilată la timidin-monofosfat și timidin-trifosfat, de către enzima TK. Ambele enzime (HGPRT și TK) se găsesc în splenocitele normale.

b) Celulele de mielom sunt HGPRT- și pe mediul selectiv HAT nu supraviețuiesc nici celulele ca atare, nici fuzionații mielom-mielom. Pe acest mediu supraviețuiesc și se divid indefinit, celulele de hibridom, deoarece sunt HGPRT+ (codificată de genomul splenocitelor) și sunt "nemuritoare", calitate conferită de celulele de mielom.

5. Clonarea. Clona este o populație de celule identice, genetic stabile, derivate din diviziunea unei singure celule. Clonarea se face prin diseminarea suspensiei celulare diluate, pe medii

nutritive agarizate. Fiecare celulă de hibridom, prin diviziuni succesive, produce o colonie, adică o clonă celulară. Operația de clonare se repetă pentru a garanta o descendență omogenă. Dintre sutele de hibridoame clonate, este necesară selectarea celor cu capacitate de sinteză a anticorpilor specifici față de antigenul cu care s-a făcut imunizarea. Fig.92. Ilustrarea schematică a etapelor producerii anticorpilor monoclonali (AMC). Animalele, de obicei șoareci, sunt imunizate cu un antigen (de exemplu, un microorganism care conține 4 antigene de suprafață - a, b, c, d). Fiecare antigen conține un număr de epitopi, de exemplu molecula b conține epitopii b, b₁, b₂. Serul animalelor imunizate este policlonal și conține anticorpi A, B, B₁, B₂, C, D. Prima treaptă în producerea AMC este obținerea suspensiilor de celule B și celule de mielom. În etapa următoare, cele două populații de celule (m și s) sunt puse în amestec, în prezența PEG, ca agent de fuziune. Suspensia se repartizează în godeurile unei plăci pentru cultivarea celulelor, la o diluție adecvată astfel încât, fiecare godeu să nu conțină mai mult decât o celulă hibridă. Celulele se cultivă în mediu HAT pentru a inhiba creșterea celulelor de mieloma nefuzionate. Celulele splenice nefuzionate nu se divid și mor după câteva zile. În procesul de selecție mor și fuzionații s - s și m - m. Supraviețuiesc și proliferază fuzionații am, bm, b₁m, dm și xm. Clonarea se repetă. Hibridoamele se cultivă și se determină specificitatea anticorpilor sintetizați. Cele care sintetizează anticorpi cu specificitatea necesară se propagă în recipiente mai mari în care se obțin 1-10 μl/ml. Celulele pot fi injectate în cavitatea peritoneală de șoarece, unde se multiplică sub forma ascitei și produc 1 mg/ml anticorpi specifici.

Hibridoamele producătoare de anticorpi cu specificitatea dorită, se cultivă *in vitro*, în culturi cu perfuzie continuă cu mediu proaspăt sau în bioreactoare cu capacitate mare.

Cea mai simplă tehnică este a cultivării *in vivo* și constă în inocularea intraperitoneală a circa 2×10^6 celule hibridoma, la organisme ale aceleași linii genetice (pentru evitarea fenomenului de incompatibilitate CMH). Hibridomul se dezvoltă intraabdominal și lichidul de ascită care o însoțește, conține anticorpi în proporție de 50% din totalul proteinelor sale.

Randamentul producerii AMC *in vivo* este de 100-1000 de ori mai mare decât *in vitro*. Anticorpul din lichidul ascitic se purifică prin fracționare cu sulfat de amoniu sau prin metoda cromatografiei cu schimb de ioni.

Avantajele biotehnologiei hibridomului

Producerea AMC prin tehnologia hibridomului are un avantaj net față de metoda convențională a obținerii serului imun, deoarece se pot obține anticorpi specifici produși de câte un hibridom, pentru fiecare epitop al unui antigen natural. Clonarea individuală a fiecărui hibridom, creează condiții ca fiecare clonă celulară să secrete anticorpi cu specificitate unică față de un singur epitop al unui antigen.

Celulele de hibridom proliferază rapid, ceea ce scurtează timpul necesar obținerii AMC.

Hibridoamele produc cantități foarte mari de anticorpi, ce depășesc de câteva ori concentrația anticorpilor din serul animalelor imunizate.

Clonele de hibridom se mențin indefinit prin cultivare in vitro sau in vivo.

Hibridomul oferă posibilitatea obținerii AMC marcați, prin adăugarea precursorilor marcați radioactiv (marcare internă). Anticorpii marcați in situ (în timpul sintezei) oferă un avantaj net în raport cu anticorpii marcați după purificare (marcare externă). Marcarea externă cu I125 implică purificarea imunoglobulinelor din antiserul convențional, dar presupune modificarea chimică și denaturarea parțială, cu pierderea proporțională a specificității de legare.

Pentru marcarea internă se folosesc elemente radioactive cu perioada de înjumătățire mai lungă decât a I125 : C14, S35, H3. Marcajul radioactiv intern este net superior celui cu peroxidază și feritină, utilizat în tehnicile convenționale.

Tehnologia hibridomului este un model experimental care poate fi extins și la alte categorii de celule care sintetizează substanțe utile (interferon, insulină). Obținerea unor hibridi dintre celula de mielom de șoarece și un limfocit normal, de la aceeași specie, în scopul producerii AMC, a introdus un concept nou în biologia moleculară - conceptul imortalizării funcțiilor specifice diferențiate.

Aplicații practice ale AMC

AMC reprezintă un reactiv imunochimic bine definit și de aceea, rezultatele obținute prin utilizarea lor sunt reproductibile.

AMC se folosesc ca reactivi de mare specificitate în cercetare, în diagnosticul clinic, în farmacologie pentru profilaxia și terapia unor infecții la om și animale, în tehnicile de biochimie analitică pentru purificarea unor molecule.

În domeniul cercetării imunocitochimice*, AMC sunt reactivi cu înaltă specificitate, utilizați pentru identificarea unor proteine care se găsesc în cantități foarte mici. De exemplu, AMC marcați cu fluoresceină permit evidențierea moleculelor membranare, inaccesibile investigației cu metodele clasice. AMC au fost markeri eficienți pentru identificarea diferitelor subpopulații de limfocite T și B, a antigenelor membranare ale celulelor seriei mieloide și monocitare. Sistemul CD (cluster differentiation) este definit în întregime pe baza utilizării AMC și cuprinde acum peste 200 de markeri de suprafață. AMC cu specificitate CD se folosesc pentru a detecta apariția sau absența populațiilor celulare în timpul stimulării antigenice. Fig. 93 Structura fluoresceinei.

Datorită specificității lor de legare, AMC se folosesc pentru a evidenția diferențele antigenice minore între diferite variante moleculare. Astfel s-au identificat variațiile compoziției în aminoacizi ale spiculelor glicoproteice, consecutive driftului antigenic la virusul influenza A.

AMC se folosesc pentru identificarea moleculelor neurotransmițătoare, a receptorilor sinaptici și a enzimelor de biosinteză. S-au obținut AMC față de receptorul de acetilcolină, dar dificultățile sunt mari pentru că neurotransmițătorii sunt antigene slabe.

În diagnosticul serologic, serurile imune obținute prin metoda clasică au avut adeseori inconvenientul major al lipsei reproductibilității rezultatelor. AMC se folosesc ca reactivi de mare specificitate pentru diagnosticul rabiei pe secțiunile de țesut nervos al animalelor infectate,

Anticorpul este marcat cu o moleculă generatoare de semnal (de exemplu, un fluorocrom, o enzimă producătoare de culoare prin acțiunea sa asupra substratului specific, ori o particulă metalică). Sensibilitatea metodei, adică puterea semnalului poate fi mărită prin creșterea raportului dintre molecula indicator (anticorpul marcat) și antigen. Imunocitochimia necesită producerea anticorpilor specifici și tratamentul adecvat al țesuturilor, adică fixarea și histoprepararea pentru a favoriza interacțiunea optimă între reactiv și molecula țintă a hepatitelor virale B, C, D, a infecției cu HIV (prin determinarea prezenței antigenelor în ser) și a unor

infecții bacteriene. Pentru diagnostic se folosesc anticorpi marcați cu fluoresceină sau metodele ELISA sau RIA.

AMC se folosesc pentru diagnosticul neoplaziilor, pe baza evidențierii antigenelor specific-tumorale. În acest scop se utilizează AMC marcați cu izotopi radioactivi, cu specificitate față de CEA, AFP etc.

AMC se folosesc pentru detectarea hormonilor polipeptidici: TSH, FSH, HCG. Hormonii sunt molecule cu un număr mic de epitopi. Subunitățile α ale diferiților hormoni sunt foarte asemănătoare, dar diferă în special prin catenele β . Există AMC specifici pentru ambele subunități și AMC care recunosc epitopii conformaționali ai moleculei native.

AMC se folosesc în farmacologie. În scop profilactic se fac imunizări pasive față de infecțiile bacteriene care nu beneficiază de preparate vaccinale și sunt rezistente la antibiotice: Pseudomonas, Clostridium.

În scop terapeutic, AMC se folosesc pentru tratamentul rabiei, pentru neutralizarea endotoxinelor (LPS) produse de infecțiile cu bacterii Gram negative, consecutive arsurilor. Septicemiile sunt cauzate de o largă varietate de bacterii Gram negative, toate având în comun lipidul A în structura chimică a LPS. Pentru tratamentul majorității infecțiilor bacteriene se utilizează antibiotice, la un preț de cost inferior în raport cu AMC.

AMC se folosesc în controlul fertilității: AMC anti-HCG și anti-zona pelucida sunt folosiți pentru imunizarea pasivă a femeilor fertile.

Speranța utilizării AMC în tratamentul tumorilor s-a năruit. Una din cauze este că majoritatea tumorilor umane își au originea în celulele epiteliale ale colonului, sânului, plămânului și prostatei, iar oncogenele activate codifică proteine intracelulare, inaccesibile terapiei cu AMC. Frecvența acestor tumori nu crește la persoanele imunosupresate, ceea ce este un argument în favoarea codificării antigenelor intracelulare, inaccesibile sistemului imunitar. Chimioterapia oferă mult mai multe șanse de succes, la un preț de cost inferior.

În sistemul hematopoietic și imunitar, AMC se folosesc pentru a distruge toate populațiile celulare, cu excepția celulelor stem, cu scopul eliminării celulelor malignizate și a precursorilor ei care poartă oncogena activată.

AMC se folosesc pentru neutralizarea nivelelor toxice ale unor medicamente (digoxina).

AMC se folosesc ca agenți imunosupresori. Receptorilor de greță li se administrează AMC specifici față de complexul antigenic membranar CD3, în cazurile în care imunosupresia chimică (cu ciclosporină) nu reușește.

În maladiile autoimune, AMC se administrează pentru a realiza o imunosupresie parțială, care să permită apărarea față de infecțiile cu agenți oportuniști.

AMC se folosesc pentru producerea imunotoxinelor (conjugate AMC-medicamente). Medicamentele utilizate sunt agenți citotoxici, care, prin intermediul situsului de legare a AMC, sunt destinate să se lege specific de celulele țintă (de exemplu, celulele maligne). În acest scop sunt necesari AMC cu o afinitate înaltă a specificității de legare față de antigenele specifice tumorale. AMC se cuplează cu toxine (difterică, ricină, abrină), cu medicamente citostatice sau cu radionuclizi.

AMC se folosesc în tehnicile de biochimie analitică, în scopul purificării proteinelor, sub forma coloanelor de afinitate imunoabsorbante. AMC sunt imobilizați pe suporturi în coloane solide (imunosorbenti), prin care este trecut amestecul de proteine. În coloană sunt reținute specific, moleculele care se leagă cu AMC. Astfel se purifică proteine care se găsesc în amestec, în concentrații foarte mici (IFN).

*Imunocitochimia este o tehnică de laborator care permite identificarea vizuală a moleculelor țintă în țesuturi și celule, prin interacțiunea specifică a anticorpilor marcați, cu antigenul.

MECANISME DE APĂRARE ANTIINFECȚIOASĂ

Sistemul imunitar a evoluat și s-a complexat structural și funcțional, în condițiile presiunii selective permanente pe care o exercită agenții infecțioși, ce tind să invadeze, să colonizeze și să se multiplice în țesuturi. Structura sistemului imunitar este o reflectare directă a interacțiunilor

sale cu diversitatea agenților infecțioși care-l stimulează. Cele două forțe opozante s-au modelat reciproc, într-un conflict constant. Gazdele care nu neutralizează agentul infecțios sunt sortite morții, iar cele care supraviețuiesc sunt mai bine adaptate să reziste infecțiilor ulterioare.

Problema heterogenității antigenice a virusurilor și bacteriilor patogene este importantă nu numai din punct de vedere teoretic, ci este esențială pentru aspectul practic al vaccinării, deoarece există riscul stimulării răspunsului imun fără eficiență protectoare. Consecința stimulării unui răspuns imun ineficient poate fi agravarea maladiei infecțioase sau chiar activarea mecanismelor patogenității autoimune.

Evaluarea imunogenității moleculelor structurilor suprafeței virusurilor și bacteriilor este dificilă, deoarece o moleculă în soluție poate avea o altă configurație a epitopilor decât în ansamblul structural nativ. Diferența derivă din raporturile sale spațiale cu moleculele vecine, pe suprafața agentului infecțios. Din această cauză, răspunsul imun al organismului, la stimularea cu un agent patogen, rămâne un domeniu de studiu practic nelimitat. O altă complicație este consecința faptului că specificitatea antigenică a unor molecule este, uneori, variabilă de la o tulpină la alta, atât la virusuri cât și la bacterii. Răspunsul imun trebuie să contracareze nu numai diversitatea antigenelor la care este expus, ci trebuie să găsească soluția de răspuns, pentru variația biochimică a unei structuri, la diferite tulpini de microorganisme.

RĂSPUNSUL IMUN SPECIFIC ANTIINFECȚIOS

Răspunsul imun antibacterian și antiviral are atât o componentă humorală cât și una celulară. Prevalența unuia sau altuia dintre cele două compartimente este diferită în funcție de natura agentului infecțios. De cele mai multe ori, predomină răspunsul imun mediat humoral, iar în cazuri mai rare (de exemplu, infecția cu *M. tuberculosis* sau cu *M. leprae*) este preponderent răspunsul imun mediat celular.

Răspunsul imun față de diferite antigene ale agenților patogeni are grade variate de protecție antiinfecțioasă, în funcție de natura agentului, de gradul său de virulență și de natura răspunsului imun pe care-l inițiază. Uneori, răspunsul imun antiinfecțios este puțin benefic pentru gazdă sau este chiar detrimental, din diferite cauze:

- răspunsul imun este orientat față de componente moleculare neesențiale ale agentului infecțios. Stimularea antigenică activează un răspuns imun inefficient. Anticorpilor nu au efect neutralizant al infecțiozității, pentru că structurile de care se leagă specific nu constituie situsuri critice ale agentului patogen (de exemplu, anticorpilor antiflagelari, care in vitro determină aglutinarea, in vivo au o eficiență mai scăzută, limitată la imobilizarea celulelor bacteriene);

- răspunsul imun poate produce leziuni mai puternice și mai extinse decât însuși agentul infecțios. Infecția propriu-zisă produce leziuni minime, dar activarea imunității mediate celular amplifică leziunile tisulare și grăbește evoluția procesului infecțios (de exemplu, leziunile consecutive infecției cu virusul corio-meningitei limfocitare la șoarece și liza hepatocitelor infectate cu virusul hepatitei B umane).

Componentele structurale antigenice ale unui agent infecțios, care stimulează un răspuns imun protector se numesc situsuri critice sau structuri imunodominante.

Un răspuns imun eficient (protector) trebuie să aibă ca rezultat final, lezarea structurii peretelui bacterian, fungic sau a învelișului viral, prin acțiunea combinată a anticorpilor și a proteinelor complementului.

Structura antigenică a celulei bacteriene

Multe molecule bacteriene modulează activitatea sistemului imunitar, având ori un efect stimulator (adjuvant), ori diminuează reactivitatea imunitară. Ele modifică răspunsul celulelor imunitare competente, prin mecanisme de semnalizare. De aceea se numesc molecule imunomodulatoare. Efectele lor realizează un echilibru complex între mecanismele de recunoaștere și neutralizare a antigenelor și virulența bacteriană. Imunomodulatorii pot avea efecte asupra limfocitelor T, B și asupra macrofagelor, similare cu cele produse de citochine.

Imunomodulatorii cu activitate mitogenică, induc activarea policlonală a limfocitelor T și B, care se deosebește de activarea specifică. Rezultatul este sinteza anticorpilor cu specificități multiple, dintre care, o fracție sunt specifici față de agentul infecțios. Deși fără specificitate, sinteza rapidă a anticorpilor poate fi suficientă pentru stoparea infecției.

Moleculele imunomodulatoare modifică nu numai reactivitatea imunitară, ci și mobilitatea celulelor, în special a fagocitelor (de exemplu, pot inhiba migrarea macrofagelor din focarul inflamator). Dacă moleculele imunomodulatoare persistă în țesuturi, stimulează cronic sistemul imunitar, cu efecte patologice autoimune, cea mai cunoscută fiind artrita de adjuvant.

Multe molecule imunomodulatoare de origine bacteriană au efecte mai generale, care se extind asupra altor sisteme: ele produc febră, influențează sistemul de coagulare sanguină, concentrația ionilor, a Fe etc.

Moleculele bacteriene cu rol imunomodulator sunt localizate pe suprafața celulei. Ele sunt polimeri ai învelișului, dar și molecule excretate, cu efect toxic. Pe de altă parte, eficiența răspunsului imun antibacterian, depinde de raportul dintre reactivitatea sistemului imunitar și mecanismele de autoprotecție ale bacteriei, menite să devieze răspunsul imun.

Din punct de vedere antigenic, bacteriile interacționează cu gazda prin modalități diverse. La o extremitate sunt cele lipsite de atributul invazivității, care produc cantități mici de toxine, iar la cealaltă, sunt bacteriile care cresc cu o rată înaltă în țesuturi sau în sânge și produc septicemii. Unele bacterii prezintă determinanți antigenici asemănători ca structură chimică, moleculelor self ale organismului gazdă. Răspunsul imun specific va fi absent ori ne semnificativ, sau efectorii imunitari dau reacții încrucișate cu moleculele self. Alteori, suprafața bacteriană posedă determinanți antigenici de natură proteică sau polizaharidică, inductori ai răspunsului imun.

Cele mai semnificative structuri bacteriene din punct de vedere antigenic sunt cele parietale: peptidoglicanul din peretele Gram pozitiv și Gram negativ, peptidoglicolipidele din peretele complex al micobacteriilor și structurile parietale ale spirochetelor. Toate tipurile structurale de perete conțin mureină (peptidoglican), dar se deosebesc prin alte numeroase componente chimice cu semnificație antigenică.

Unitatea minimă a peptidoglicanului care păstrează activitatea imunostimulatoare este N-acetil-muramil-L-alanina-D-izoglutamina (muramil dipeptid- MDP). Atât componenta glucidică cât și aminoacizii MDP au funcție imunomodulatoare.

A II-a clasă de polimeri imunomodulatori sunt acizii teichoici și lipoteichoici ai bacteriilor Gram pozitive.

Proteinele de suprafață asociate peretelui celular au, uneori, semnificație antigenică. Cea mai cunoscută este proteina M de la *Str. pyogenes* (grup A), care conferă specificitate de tip. S-au identificat peste 80 de variante antigenice, cu rol de factor de virulență.

Componentele antigenice esențiale ale membranei externe a bacteriilor Gram negative sunt lipopolizaharidele (LPS), a căror specificitate este conferită de polizaharidul O, o structură imunodominantă care cuprinde până la 40 de unități glucidice. Numeroasele variații structurale ale catenei glucidice determină existența unui număr corespunzător de variante antigenice bacteriene. LPS este componentul principal al bacteriilor Gram negative, activator al răspunsului imun înăscut, prin componentul său lipidic. Termenii “LPS” și “endotoxină” sunt frecvent utilizați cu același sens. LPS trebuie să desemneze moleculele purificate, iar termenul de “endotoxină” semnifică LPS și proteinele asociate din membrana externă, eliberate din suprafața celulei.

LPS sunt molecule amfifile, ceea ce condiționează interacțiunea lor cu celulele organismului. Ele au o regiune hidrofobă, capabilă să stabilească legături cu lipidele membranare și o parte hidrofilă, care poate rămâne în faza apoasă. O primă modalitate de interacțiune este cea directă, dintre molecula amfifilă și suprafața celulei. Molecula LPS poate fi inserată în membrana celulei, prin jumătatea hidrofobă sau se leagă de receptorii membranari prin jumătatea hidrofilă.

A II-a modalitate de interacțiune a moleculei LPS cu celulele este indirectă, mediată de proteina care leagă (binding) LPS (LBP). Molecula de LPS este recunoscută și legată de o glicoproteină plasmatică de 60 kD, din categoria proteinelor de fază acută. Este sintetizată de hepatocite și are un situs de legare pentru lipidul A.

Polizaharidele capsulare ale unor bacterii patogene Gram pozitive și negative, libere în supernatant sau legate de perete, sunt foarte imunogene dacă conțin lipide sau proteine terminale. Variația lor biochimică derivă nu numai din schimbarea ordinii unităților glucidice componente, ci, în primul rând, din posibilitatea legării monozaharidelor de oricare din cei 6 atomi ai hexozei adiacente. Diferențele de secvență a monozaharidelor generează determinanți antigenici care nu reacționează încrucișat cu anticorpii specifici față de un alt determinant cu aceiași compoziție.

Toxinele de natură proteică sunt imunogene și stimulează răspunsul imun cu efect protector.

Peretele celular al micobacteriilor este foarte rezistent la acțiunea factorilor litici. În alcătuirea sa intră glicolipide, formate din resturi de acid micolic, legați covalent de resturile de arabino-galactan (lipoarabinogalactan) și arabinomanan (lipoarabinomanan). Complexul glicolipidic se leagă de peptidoglican, prin punți fosfat.

Membrana externă a spirochetelor este bogată în lipide și lipopeptide, stimulatoare ale răspunsului imun și ale reacțiilor de hipersensibilitate.

Bacteriile toxigene, lipsite de invazivitate (*C. diphtheriae*, *C. tetani*, clostridiile enterice) stimulează răspunsul imun humoral antitoxic.

Bacteriile invazive determină infecții regionale sau generalizate (sistemice). Majoritatea se multiplică în spațiile extracelulare, unele au localizare facultativ intracelulară, iar altele sunt obligat intracelulare.

Bacterii cu localizare extracelulară Bacterii facultativ intracelulare, Bacterii obligat intracelulare
Streptococcus sp Mycobacterium tuberculosis Rickettsia

Staphylococcus sp M. leprae Chlamydia

Neisseria sp Brucella sp.

Escherichia coli Listeria monocytogenes

Klebsiella sp. Yersinia sp.

Proteus sp. Salmonella typhi

Pseudomonas sp. S. paratyphi

Bacteroides fragilis Treponema pallidum

Haemophilus influenzae

Actinomyces sp.

Bacteriile cu localizare extracelulară induc un răspuns imun mediat humoral. Activarea limfocitelor B este rezultatul cooperărilor celulare macrofag-limfocit B-limfocit Th. În focarul de inflamație, bacteriile cu localizare extracelulară determină formarea abcesului, în care predomină polimorfonuclearele

Bacteriile cu localizare intracelulară induc, preponderent, un răspuns imun mediat celular. Persistența lor în celulele fagocitare are ca rezultat final, formarea granulomului. Cele mai tipice pentru natura lor imunitară sunt granuloamele care se formează în infecțiile cu *M. tuberculosis* și cu *M. leprae*.

Mecanisme prin care microorganismele evită apărarea gazdei

Infecțiozitatea microorganismelor patogene este dependentă de capacitatea lor de a coloniza țesuturile gazdei și de a contracara mecanismele de apărare ale gazdei. Capacitatea de variație rapidă a moleculelor de suprafață este o trăsătură evolutivă comună în tot spectrul patogenilor. Se cunosc exemple de bacterii patogene care au elaborat mecanisme ce permit variația antigenică rapidă și eficientă. Moleculele de suprafață prezintă regiuni bine conservate, ancorate în membrană, dar nu sunt niciodată expuse contactului cu sistemul imunitar al gazdei. Rata înaltă de mutație produce un număr mare de variante antigenice. Astfel, în patogeneza gonoreii și meningitei, cauzate de *Neisseria* sp, rolul fimbriilor este esențial pentru atașarea de celulele epiteliale. Moleculele de fimbriină evidențiază secvențe constante, semivariabile și hipervariabile. Regiunile hipervariabile determină antigenitatea acestor structuri și tropismul față de celulele epiteliale ale tractului urogenital uman. *N. meningitidis* este capsulată și numai fimbriile proemină dincolo de limitele stratului polizaharidic. De aceea, pierderea fimbriilor inhibă proprietatea de aderență.

Polizaharidul capsular este repelent pentru fagocite, deoarece celulele fagocitare nu au receptori pentru polizaharidele capsulare. Uneori, acestea sunt asemănătoare oligozaharidelor din moleculele glicoproteice proprii organismului, ceea ce explică slaba lor imunogenitate. Tulpinile variabile, necapsulate sunt mai puțin virulente, dar au avantajul că nu sunt recunoscute de anticorpii specifici față de antigenele capsulare. Absența capsulei, la *Haemophilus influenzae*, conferă celulei o capacitate sporită de a se atașa și de a invada celulele epiteliale ale gazdei.

La *Str. pyogenes* s-au identificat peste 80 de serotipuri diferite, ce rezultă din mutațiile punctiforme ale genei ce codifică proteina M, componentă a peretelui celular.

LPS protejează fizic celula bacteriană de acțiunea complementului și a fagocitelor, constituind un strat protector, iar diversitatea glucidelor din oligozaharidul terminal, conferă o variație antigenică extrem de largă. La *S. typhimurium* s-au identificat peste 2000 de variante antigenice, cu tot atâtea specificități serologice.

La spirocheta *Borrelia hermsii* (agentul febrei recurente, caracterizată prin crize febrile, separate de intervale asimptomatice), episoadele febrile semnifică apariția și multiplicarea unei noi variante antigenice. Antigenul variant este o proteină abundentă a membranei externe (VMP = variable

major protein).

Unul dintre cele mai bine studiate exemple de variație antigenică și rolul ei în infecție, este al tripanosomelor africane care produc boala somnului.

T. brucei produce o parazitemie, care crește și descrește, deoarece generează subpopulații care sunt variante antigenice ale unei glicoproteine specifice (VSG - variant-specific glycoprotein) a suprafeței celulei. Undele de parazitemie constituie trăsătura principală a infecției cronice, care persistă până când individul tratat se vindecă, ori netratat, moare. În stadiile terminale, agentul patogen invadează alte țesuturi și capacitatea de apărare este depășită.

În cursul infecției, numărul mare de paraziți, dă naștere la o subpopulație care poartă o VSG modificată biochimic și antigenic, ce scapă controlului imediat al răspunsului imun. Ulterior, această variantă nouă este recunoscută de sistemul imunitar, dar generarea rapidă a noilor VSG împiedică eliminarea infecției. Capacitatea parazitului de a se comuta la diferite VSG duce la epuizarea forțelor de apărare ale gazdei în fazele terminale ale bolii.

Infecția cu *Plasmodium falciparum* este persistentă, recurentă și se caracterizează printr-un tablou foarte variabil al manifestărilor clinice. Imunitatea specifică se dezvoltă lent și numai după infecții ample și repetate, se consolidează un răspuns imun protector față de infecția severă, dar este o imunitate incompletă și incapabilă să sterilizeze organismul. În ariile geografice cu o rată înaltă de transmitere a parazitului, apar complicații severe, cu mortalitate crescută, la copiii sub 5 ani. Copiii care depășesc 5 ani, au imunitate adecvată pentru a controla infecția. Starea de protecție persistă tot restul vieții, în condițiile inoculării continue a sporozoiților de la țânțarii infectați. Răspunsul imun față de antigenele parazitului este mediat de anticorpi (IgG). La pacienții cu SIDA (care exacerbează dramatic evoluția tuberculozei sau infecțiile oportuniste), malaria nu are o evoluție mai severă, ceea ce înseamnă că sinteza IgG este independentă de celulele T. Eritrocitele infectate sunt ingerate de macrofage, independent de IFN.

Diversitatea antigenică a tulpinilor de *Plasmodium* este argumentată de miniepidemiile de malarie severă, care apar în zonele endemice mari. Tulpinile mai virulente au proprietăți antigenice și de citoaderență modificate. Diferențele proprietăților de aderență produc manifestări severe, inclusiv malarie cerebrală, iar modificările de antigenitate permit parazitului să persiste și să producă infecții repetate.

Moleculele de suprafață ale eritrocitelor infectate cu *P. falciparum* prezintă variație antigenică, ceea ce condiționează citoaderența. Aderența eritrocitelor infectate, de țesutul cerebral, renal sau hepatic, este cauza malariei severe. Generarea continuă a diferitelor populații variante antigenice de paraziți, cu diferite specificități de aderență, este cauza infecțiilor persistente caracterizate prin unde de parazitemie și manifestări clinice specifice malariei.

Diversitatea fenotipică corespunzătoare variației antigenice este o strategie foarte eficientă pentru adaptarea la presiunea selectivă pe care o exercită efectorii răspunsului imun și la diversitatea de particularități structurale și funcționale ale țesuturilor gazdei. Mecanismele de variație sunt deosebit de importante pentru succesul diseminării unei infecții în populația gazdă.

RĂSPUNSUL IMUN ÎN INFECȚIILE VIRALE

Infecțiile virale constituie, încă, o cauză majoră a morbidității și mortalității, deși vaccinarea a redus incidența infecțiilor severe (polio, oreion, rujeolă, rubeolă) și a eradicat variola. Cunoașterea mecanismelor răspunsului imun antiviral este importantă pentru evaluarea problemelor clinice de fond (de exemplu, dinamica răspunsului imun) și pentru căutarea unor noi metode de obținere a vaccinurilor.

Interacțiunea virusurilor cu organismele, este modulată de sistemele de apărare înăscute și dobândite. Pentru a se perpetua într-o populație, virusul trebuie să fie virulent, dar suficient de flexibil în modularea virulenței, pentru a se păstra în populația sensibilă. În perspectivă evolutivă, interacțiunea virusului cu organismul sensibil trebuie să confere superioritate virusului. Dacă este prea virulent și nu poate fi controlat de imunitatea gazdei, rezultatul poate fi moartea și în final dispariția gazdei. Dacă este lipsit de virulență, virusul va fi eliminat prea rapid de sistemul imunitar al gazdei și poate să dispară prin incapacitatea de a se perpetua.

Adeseori, virulența virală este diminuată prin mutație și în același timp se selectează gazde mai bine adaptate imunitar, rezultând un echilibru fluctuant, în care coexistă atât gazda cât și virusul.

Proteinele virale, componente ale capsidei și peplosului, sunt imunogene și induc un răspuns imun intens în organismul infectat. Răspunsul imun antiviral este orientat atât față de antigenele exprimate pe suprafața virionilor, cât și față de antigenele prezentate pe suprafața celulei infectate.

Antigenele expuse pe suprafața celulei infectate, diferă în funcție de natura virusului (nud sau acoperit) și de mecanismul maturării virionilor. Celulele infectate cu virusuri nude (adeno-, reo-,

enterovirusuri) expun pe suprafața lor proteine virale asociate cu moleculele CMH I, iar cele infectate cu virusuri învelite, în special cu virusuri care se maturează prin înmugurire la nivelul membranei, expun glicoproteinele peplousului, inserate în arii limitate ale membranei. În ambele cazuri, celula infectată devine ținta mecanismelor de recunoaștere imunitară.

Antigenele expuse pe suprafața virionului sau a celulei infectate, stimulatoare ale răspunsului imun, se numesc antigene protectoare. Antigenele intrinseci ale virionului, au rol protector nesemnificativ, deoarece nu vin în contact cu sistemul imunitar, decât în cazul în care se sintetizează în exces și se elimină din celula infectată.

Antigenele virale libere sau asociate virionului, stimulează răspunsul imun humoral, iar cele prezentate pe suprafața celulelor infectate, stimulează răspunsul imun celular.

Activarea unuia sau altuia dintre compartimentele imunității, depinde de mai mulți factori: de tipul de infecție (primară sau secundară), de rezultatul interacțiunii virus-celulă (liză sau infecție persistentă) etc.

Virusurile care produc infecții acute, determină o competiție între replicarea virală și efectorii răspunsului imun. Rezultatul este însănătoșirea sau moartea gazdei.

Pentru virusurile care produc infecții cronice, scara de timp este mai lungă. Virionii sau antigenele virale din sânge sau din alte fluide, determină formarea complexelor Ag-Ac, cu manifestări patologice secundare. Alteori, anticorpii antivirali și celulele T activate, pot produce leziuni ale celulelor infectate. Majoritatea manifestărilor clinice care însoțesc infecțiile virale cronice, sunt consecința răspunsului imun al gazdei, stimulat de antigenele virale.

Răspunsul imun primar

Mecanismele de apărare nespecifică (interferonul, acțiunea celulelor NK, răspunsul mucociliar) pot influența rezultatul infecției.

După infecția virală primară sau după administrarea vaccinului inactivat, se stimulează răspunsul imun mediat celular(citotoxic) și humoral. Răspunsul humoral, cu sinteza anticorpilor, are o dinamică lentă. În stadiul acut al infecției, titrul anticorpilor specifici este abia detectabil, dar atinge valoarea maximă la 2-4 săptămâni și persistă săptămâni sau luni, în funcție de gazdă, virus etc. Pentru virusul febrei galbene și cel rujeolic, nivelul detectabil al anticorpilor persistă tot restul vieții.

După infecția primară sau după vaccinarea cu preparatul viral atenuat sau inactivat, se sintetizează anticorpi din clasele IgM, IgA și IgG. Sinteza anticorpilor este indusă de marea majoritate a virusurilor, dar rolul protector al imunoglobulinelor este variabil de la un virus la altul, în funcție de sediul multiplicării, care la rândul său condiționează manifestările patologice ale infecției.

În funcție de mecanismul patogenezei, se disting trei tipuri de virusuri:

- virusurile care infectează mucoasele tractului respirator și digestiv și rămân la poarta de intrare: rinovirusuri, gripa, parainfluenza, virusul respirator sincițial, enterovirusuri;

- virusuri care infectează și se multiplică la nivelul mucoaselor, iar ulterior se diseminează pe cale sanguină, limfatică sau axonală, pentru a infecta viscerele sau sistemul nervos central: virusul poliomielitei, rujeolic, al oreionului, herpes simplex, pox, virusul hepatitei A;

- virusuri inoculate direct în sânge, prin mușcătură, înțepătură, prin traume, iar de aici se răspândesc la organele țintă: HIV, virusul hepatitei B, virusul rabic, virusurile encefalitogene(alfa- și flavivirusuri).

Rolul anticorpilor în imunitatea antivirală

Cei mai importanți anticorpi cu rol protector antiviral sunt cei care au specificitate de combinare față de epitopii critici ai suprafeței virionilor. Legarea anticorpilor cu virionul se face după modelul complementarității spațiale între epitopii antigenelor suprafeței virale și situsul de combinare al anticorpilor. Efectul principal al interacțiunii anticorpilor cu particulele virale, în

faza fluidă, este neutralizarea, adică pierderea infecțiozității virionilor. Pentru producerea efectului neutralizant, este necesară legarea mai multor molecule de anticorpi, care trebuie să recunoască o structură esențială a virionului, denumită situs critic. De exemplu, fagii din seria T-par au un singur situs critic și infecțiozitatea lor este anulată de legarea anticorpilor specifici la nivelul fibrelor cozii. Virionul gripal are situsuri critice multiple: anticorpilor anti-HA sunt neutralizanți, cei specifici anti-NA au efect neutralizant minim, iar anticorpilor anti-proteină M sunt total ineficienți.

La adenovirusuri, situsurile critice sunt capsomerele hexonice și fibra pentonică. Anticorpilor specifici față de aceste structuri sunt neutralizanți, iar anticorpilor anti-penton nu diminuează infecțiozitatea. Pentru HIV, situsul critic este zona prin care virionul se atașează de moleculele CD4 ale limfocitului Th. Anticorpilor specifici față de situsul de legare al virusului Epstein-Barr de receptorul pentru C3b al limfocitului B, au efect neutralizant.

Moleculele de anticorpi legate pe suprafața virionului învelit formează complexe, care, in vivo sau in vitro, inițiază fixarea complementului. Rezultatul final este liza virionilor înveliți.

Un alt efect al interacțiunii anticorpilor cu virionii, in vitro, este agregarea. Fenomenul este dependent de un prag limită a densității virionilor/unitate de volum. Agregarea virionilor este însoțită de diminuarea infecțiozității, deoarece chiar în cazul unui mare exces al moleculelor de anticorpi, unele particule virale din interiorul agregatului, rămân în afara contactului cu anticorpilor neutralizanți și își păstrează infecțiozitatea, denumită infecțiozitate reziduală sau persistentă. Agregarea virală fiind dependentă de un prag al densității virionilor, este un fenomen care se manifestă numai in vitro. In vivo nu se realizează niciodată o densitate limită a virionilor care să producă acest efect.

Anticorpilor antivirali ce se sintetizează în cursul răspunsului imun primar, au energie mică (afinitate) de legare cu situsurile antigenice ale virionilor și se disociază ușor, lăsând o infecțiozitate reziduală. Alteori, moleculele de anticorpi nu acoperă situsurile critice ale virionilor, care condiționează inițierea procesului infecțios.

Efectul protector al anticorpilor circulanți este demonstrat pentru infecțiile cu fază viremică, având o contribuție esențială la încheierea procesului infecțios.

Anticorpilor reduc încărcătura de virus și diminuează infecțiozitatea virală, consecința fiind scăderea numărului de celule infectate, ușurând astfel sarcina celulelor Tc de a elimina celulele infectate.

În cursul infecției secundare, anticorpilor se sintetizează rapid, la titru înalt.

Anticorpilor se folosesc pentru profilaxia și terapia infecțiilor virale. Imunizarea pasivă cu ser imun, diminuează riscul infecției virale și se folosește în tratamentul infecțiilor stabilizate.

Protecția mucoaselor. La nivelul mucoaselor, imunitatea antivirală este dependentă, în primul rând de IgA. Sinteza locală de anticorpi (în special IgA) după stimularea virală este relativ independentă de răspunsul imun sistemic. Anticorpilor sintetizați la nivelul mucoaselor au efect protector, în absența anticorpilor sistemici. Anticorpilor din secrețiile mucoaselor îndeplinesc două funcții majore față de agenții patogeni virali: excluderea imună și neutralizarea infecțiozității virale.

Excluderea imună este un mecanism protector foarte important la nivelul mucoasei respiratorii și pare a fi dependent nu numai de imunoglobuline, ci și de stratul de mucus care acoperă epiteliul. Absența activității ciliare este asociată cu infecții severe ale tractului superior, sugerând importanța barierei mucoase. sIgA neutralizează infecțiozitatea virionilor, iar secreția mucoasă este în primul rând o barieră mecanică ce blochează adsorbția virionilor pe membrana celulelor epiteliale.

IgA din secreții are rol esențial în rezistența la reinfecția cu virusurile care se multiplică exclusiv în celulele epiteliale ale mucoaselor digestive și respiratorii. Vaccinarea orală cu virus polio inactivat are ca scop stimularea imunității mucoasei. Dacă au titru crescut, anticorpilor serici (IgM) difuzează în mucoase. Nu se știe în ce măsură anticorpilor din secreții sau din sânge protejează epiteliul tractului respirator inferior.

Fig. 94. Mecanismele protectoare ale mucoasei tractului respirator, față de infecția virală. După inoculare, particulele virale sunt neutralizate (1) de anticorpi, care ajung la suprafața mucoasei prin transport transepitelial (IgA polimeric), prin difuzie (IgG) sau prin administrare artificială (picătură spray, aerosol). Alt mecanism este "excluderea imună" (2) și se produce când particulele virale sunt legate de anticorpi, incluse în mucus și îndepărtate prin activitate mucociliară. Anticorpilor pot difuza prin mucus pentru a neutraliza virusul progen și particulele care trec prin stratul de mucus. Neutralizarea virală poate să se producă intracelular (3), în timpul transportului intracelular al IgA polimeric. La suprafața bazolaterală a celulelor epiteliale infectate, IgG se poate fixa specific de proteinele membranare codificate de virus și mediază liza celulei (4) după fixarea complementului sau prin fenomenul ADCC. Celulele infectate de virus pot fi lizate sub acțiunea limfocitelor Tc specifice. Liza celulelor epiteliale ușurează trecerea efectorilor imunitari în ambele direcții (după Weltzin, 1999).

În tractul respirator inferior, în secreția mucoasă, se găsesc concentrații mari de IgA și IgG. Anticorpul ajunge în secreții, în mare parte, prin difuzia printre celule sau prin ruperi ale epitelului.

Deși vaccinurile gripale se administrează parenteral, este clar că anticorpul din secreții (sIgA) are rol major în protecția antiinfecțioasă. sIgA conferă o mai bună protecție încrucișată față de variante antigenice rezultate prin drift antigenic, comparativ cu IgG circulant.

Pentru antigenele virale expuse pe suprafața celulelor infectate, studiile in vitro au evidențiat că anticorpul antiviral și complementul se leagă specific și pot să producă citoliza.

Complementul poate acoperi complexul Ag-Ac, blocând eventualii receptori disponibili. Complexele sunt fagocitate de celule care au receptori pentru C3.

Complementul poate liza virionii înveliți. Retravirusurile sunt lizate de complement, chiar în absența anticorpilor. Complementul pare să aibă rol în faza timpurie a infecției, când titrul anticorpilor este foarte scăzut și are afinitate mică.

Proteinele complementului sunt importante ca mecanism efector humoral față de infecțiile bacteriene, dar rezistența celor cu deficit al complementului, față de infecțiile virale este normală.

Imunizarea pasivă a mucoasei respiratorii poate fi folosită în scop profilactic sau terapeutic. Are avantajul că efectul protector este imediat, iar efectele colaterale sunt rare. Anticorpul este mai eficient față de infecțiile virale, când se administrează profilactic. Anticorpul administrat prin imunizare pasivă, în secrețiile tractului respirator, poate să prevină, să diminueze sau să vindece infecțiile virale. Imunizările s-au făcut în special cu IgG pentru că este mai ușor de obținut. IgA are avantajul de a fi polimeric și teoretic, are activitate aglutinantă superioară față de IgG și pentru că nu fixează complementul, probabil nu stimulează reacțiile inflamatorii. Are o perioadă de activitate mai lungă, deoarece componenta secretoare (CS) îl protejează de acțiunea proteazelor.

În concluzie, imunitatea mediată humoral reprezintă modalitatea tactică, de neutralizare a virusurilor în faza extracelulară.

Anticorpilor se sintetizează în răspunsul imun primar și secundar antiviral, dar activitatea lor protectoare este neesențială pentru controlul multor infecții primare sau secundare. Copiii cu agamaglobulinemie înăscută de tip Bruton, nu au sensibilitate crescută față de infecțiile virale, cu excepția meningitei enterovirale, produsă de echovirusurile 9 sau 11. Anticorpilor sunt activi față de antigenele virale din umorile organismului, dar nu penetrează în celulele infectate.

Imunitatea antivirală mediată celular

În ciclul infecțios al multor virusuri, antigenele sunt expuse târziu pe suprafața celulei. În aceste cazuri, rolul protector al anticorpilor este secundar.

Imunitatea mediată celular (IMC) constituie mecanismul major al apărării specifice antivirale. După infecția primară sau după administrarea vaccinului viral atenuat, se activează răspunsul celulelor T_c, care are activitate maximă la 7-10 zile și scade la 2-3 săptămâni după infecție.

Pentru controlul infecției virale, celulele T_c sunt esențiale. La pacienții cu sindrom Di George (cu aplazie timică congenitală), la pacienții SIDA, la cei leucemici sau la cei supuși terapiei imunosupresoare prelungite, frecvența și severitatea infecțiilor virale cresc semnificativ.

Rolul IMC în protecția antivirală este elocvent în cazul infecției cu virusul rujeolic. La copiii normali, infecția produce erupția tegumentară caracteristică și ulterior virusul este eliminat. La copiii cu deficiență a celulelor T, boala este adeseori fatală. Manifestările eruptive sunt mediate de celulele T și la copiii imunosupresați nu se produc. Apariția erupției este indicatorul evoluției favorabile. La copiii agamaglobulinemici, erupția se produce și evoluția infecției este nealterată de absența anticorpilor. Se instalează imunitatea de memorie.

IMC precede sinteza anticorpilor în toate infecțiile virale, dar în special în cazul infecțiilor citolitice în care virusul se multiplică rapid. IMC are rol important în apărarea față de infecțiile virale primare, deoarece se activează într-un timp scurt și răspunde nevoilor de apărare rapidă față de infecțiile virale, înainte de edificarea răspunsului imun mediat humoral. În focarul inflamator indus de infecția virală se acumulează celule efectoare ale IMC, care ating valoarea maximă la două zile de la începutul replicării virale. IMC se activează după ce virusul a pătruns în celulă și aceasta expune pe suprafața ei, antigene virale. Efectul său este liza celulelor infectate și are rolul de a limita diseminarea virusului în mediul extracelular. Liza celulelor infectate cu virusuri citocide este protectoare numai dacă se produce rapid, înainte de asamblarea

virionilor progeneri. Liza tardivă are efect opus, deoarece favorizează diseminarea virusului. Pentru virusurile care produc infecții persistente, citoliza timpurie sau tardivă are efect protector.

Fig. 95. Controlul infecțiilor virale citocide și necitocide de către celulele Tc. Liza celulei infectate poate să se producă în faza de eclipsă, înainte de asamblarea virionilor maturi sau în faza de mijloc, când numai o parte a virionilor s-a asamblat. În ambele cazuri, liza este protectoare față de infecția cu virusuri citocide și necitocide. În contrast, liza relativ târzie în timpul ciclului de replicare virală este protectoare numai față de virusurile necitocide. Dacă celulele Tc nu produc liza, celulele infectate pot să supraviețuiască și să elibereze virioni infecțioși perioade lungi de timp. În cazul infecției citocide, liza tardivă nu diminuează diseminarea virusului, deoarece asamblarea s-a încheiat și virionii vor fi eliberați prin citoliza produsă de efectori imunitari (după Kagi, 1996).

IMC constituie modalitatea strategică de protecție antivirală, al cărei efect este liza celulei înainte de încheierea ciclului de replicare virală.

Efectorii imunității mediate celular detectează celulele a căror suprafață este modificată din punct de vedere antigenic (celule infectate cu virus, celule transformate malign, celule îmbătrânite sau celule nonself).

Orice proteină structurală a virionului sau existentă numai în celula infectată (proteină nestructurală) poate fi prelucrată de celulele infectate sau de celulele accesorii ale răspunsului imun. Moleculele nonself prelucrate sunt asociate cu moleculele CMH I (sau CMH II) și sunt expuse pe suprafața celulei. Complexele moleculare devin ținte pentru acțiunea limfocitelor Tc. Celula infectată este lizată sub acțiunea factorilor litici eliberați de limfocitul Tc. Celulele Tc recunosc orice proteină virală, structurală sau nestructurală, asociată cu moleculele CMH.

Limfocitele Tc activate sunt specifice față de virusul infectant. De exemplu, limfocitele Tc sensibilizate față de virusul variolei, lizează numai celulele infectate cu acest virus. Nu lizează celulele normale și nici celule alogene infectate cu virusul variolei.

Zinckernagel și Doherty (1974) au demonstrat experimental specificitatea acțiunii limfocitelor față de antigenele virale, dar și fenomenul de limitare (restricție) a interacțiunilor celulei efectoare cu celula țintă, de identitatea moleculelor CMH. Celulele care prezintă antigenul și cele care îl recunosc trebuie să fie histocompatibile, adică să poarte pe suprafața lor, molecule CMH I și II identice.

În infecția secundară, răspunsul celulelor Tc este rapid, mediat de celulele Tc de memorie. Celulele de memorie pot să persiste în absența antigenului specific, probabil datorită stimulării sporadice nespecifice, de citochinele eliberate local în timpul reacțiilor față de antigenele neînrudite.

Celulele NK nu au specificitate față de antigen și nu produc memorie imunitară. Celulele NK se activează rapid și la 2-3 zile după infecție ating activitatea maximă, după care diminuează rapid. Deficiențele pentru celulele NK sunt rare, dar sunt însoțite de infecții severe cu virusul varicela zoster, cu virusul citomegalic, herpes simplex virus 1.

Mecanismul interacțiunii celulei NK cu celula infectată nu se cunoaște. Celulele NK lizează celulele care au pierdut moleculele CMH și astfel au devenit anormale. Activitatea celulelor NK este stimulată de interferon.

Celulele infectate cu virusuri pot fi lizate prin fenomenul ADCC (antibody dependent cell cytotoxicity), prin acțiunea limfocitelor Tc sau NK. Ele lizează celulele tapetate cu anticorpi.

Fagocitele mononucleare (monocitul sanguin, macrofagul tisular, celula dendritică) au rol important pentru eliminarea virusului dintr-un proces infecțios. Fagocitele mononucleare fagocitează virionii inoculați prin înțepătură. Macrofagele au și activitate ADCC.

Mecanisme prin care celulele infectate evită efortorii răspunsului imun

În mediul extern, virusurile sunt instabile, datorită sensibilității la factorii de mediu. De aceea, pentru a se perpetua într-o populație de organisme sensibile, virusul trebuie să rămână cât mai mult în gazda infectată, ori să se transmită cât mai eficient de la o gazdă la alta. Pe de altă parte, efortorii răspunsului imun humoral și celular nu sunt totdeauna eficienți în recunoașterea și eliminarea celulelor infectate cu virus, iar virusul eliberat din celulă, trebuie să evite contactul cu efortorii răspunsului imun.

În majoritatea infecțiilor persistente, virusurile infectează celulele sistemului imunitar: virusul hepatitei B, papovavirus, herpes, virusul Epstein-Barr, virusul citomegalic, rubela, rujeola, oreion, influenza, parainfluenza, HTLV I, II, HIV, diminuând potențialul reactiv al imunității.

O celulă infectată care expune pe suprafața ei un număr mic de situsuri antigenice poate să scape lizei, deoarece situsurile antigenice distanțate nu permit legarea celor două situsuri de combinare ale moleculei de anticorp, necesară activării complementului. Celulele infectate persistent exprimă o cantitate limitată de antigene virale pe suprafața lor, comparativ cu celulele în care ciclul de replicare virală este litic. Acesta pare a fi mecanismul de supraviețuire a celulelor infectate cu virusul coriomeningitei limfocitare (LCM), cu virusul rujeolei sau cu virusul hepatitei B.

Antigenele virusului hepatitei B se sintetizează în mare exces și se elimină din hepatocite, sub forma unor particule fără genom. Se consideră că excesul cantitativ de antigene virale determină fenomenul de toleranță imunitară.

Celulele infectate persistent manifestă fenomenul de fluctuație cantitativă a antigenului viral, expus pe suprafața lor. Celulele infectate cu virusul rujeolic trec succesiv prin cicluri de dispariție și reapariție a antigenelor virale, asociate membranei citoplasmatică, în timp ce moleculele normale ale celulei nu au variații cantitative semnificative. Fenomenul se numește modulație antigenică.

Anticorpicii necitolitici pot masca antigenele virale expuse la suprafața celulei, devenind astfel inaccesibile celulelor efectoare litice (limfocite Tc, NK).

Uneori, virusurile infectează celule care nu exprimă molecule CMH I. Neuronii exprimă puțin sau de loc moleculele CMH I și reprezintă un situs preferențial al persistenței virale. Herpesvirusurile infectează latent neuronii, iar virusul rujeolic, virusul LCM și alfavirusurile pot infecta aceste celule.

Adenovirusurile codifică o proteină de 19 kD, care se asociază cu moleculele CMH I și blochează transportul lor spre suprafața celulei și astfel celula infectată care nu exprimă molecule CMH I nu este recunoscută de limfocitele T.

Virusul influenza evită efectul neutralizant al anticorpilor specifici, prin rata înaltă de mutație a ARN-polimerazei, generând noi variante biochimice ale hemaglutininei (HA) și într-o măsură limitată, ale neuraminidazei (NA). Noile variante antigenice ale HA și NA trebuie să-și păstreze funcția, adică virionul trebuie să fie infecțios, dar scapă detectării de anticorpicii preexistenți. Fenomenul variației antigenice limitate se numește drift antigenic.

Shiftul antigenic corespunde unei noi variante genetice a virusului influenza și este rezultatul unei reasortări a genomului, care are loc cel mai probabil la păsări, unde se produce co-infecția cu un virus uman (ce infectează rareori păsările) și cu o linie de virus aviar.

Virusurile contracarează acțiunea citochinelor. Virusurile sunt atât inductori ai sintezei interferonilor (IFN), cât și ținta principală a acțiunii lor. Un virus care induce sinteza IFN și este foarte sensibil la acțiunea sa inhibitorie nu se poate propaga. Evoluția a favorizat virusurile care contracarează efectele inhibitorii ale IFN asupra ciclului de replicare virală. Virusurile cu virulență înaltă, inhibă sinteza ARN celular și sinteza proteinelor (efect de întrerupere), ceea ce interferează cu capacitatea celulei de a produce IFN și de a răspunde la acțiunea lui.

Multe virusuri sunt rezistente la acțiunea IFN. Unele deoxiribovirusuri codifică proteine ce inhibă căile majore de transducere a semnalelor induse de IFN. De exemplu, proteina E1 a adenovirusurilor inhibă semnalul indus de IFN $\alpha\beta$ sau γ . Poxvirusurile codifică sinteza unor receptori solubili pentru citochine (pentru TNF și IL-1), denumiți virochine.

TIPURILE DE IMUNITATE DOBÂNDITĂ

(ADAPTATIVĂ)

Homeostazia organismului uman și animal este asigurată de sisteme complexe de apărare, ale căror particularități funcționale au fost definite în primul rând, în raport cu modul de acțiune față de agenții infecțioși. Organismele dispun de două categorii de mecanisme de apărare:

- mecanisme de apărare specifică, reprezentate de sistemul imunitar;
- mecanisme de apărare nespecifică sau înăscută, adică cele care asigură rezistența sau imunitatea naturală.

Prin imunitate “naturală” sau înăscută se înțelege rezistența unui organism față de un agent infecțios sau față de un parazit, în absența unui răspuns imun evident.

Cele două sisteme de apărare, specifică și nespecifică, se condiționează reciproc. Nu se poate evalua gradul în care mecanismele de rezistență naturală sunt influențate după expunerea la contactul cu agenții infecțioși, dar răspunsul imun detectabil sau chiar subliminal produce modificări ale stării de activitate a sistemului fagocitar mononuclear și a celulelor killer.

Mecanismele de apărare antiinfecțioasă sunt atât specifice (adaptative, dobândite) cât și nespecifice (înăscute).

Imunitatea dobândită are un caracter specific și se definește ca o stare de rezistență antiinfecțioasă, cu caracter individual, condiționată de contactul anterior al organismului, într-un proces infecțios natural, cu agentul infecțios virulent, cu toxinele sale native sau cu agentul atenuat și anatoxinele sale administrate ca vaccin. Imunitatea dobândită, denumită și inductibilă, este relativă, în sensul că, deși în general este foarte solidă, poate fi învinsă prin agresiunea exercitată de o cantitate mare de agenți infecțioși sau de infecția cu o tulpină deosebit de virulentă.

În funcție de originea și modul de instalare, imunitatea dobândită este de două tipuri: dobândită pe cale naturală și pe cale artificială. În ambele cazuri, imunitatea poate fi dobândită atât activ, prin răspunsul imun la stimulul antigenic, cât și pasiv, prin transferul de anticorpi exogeni.

Imunitatea dobândită natural activ se instalează după trecerea organismului printr-o stare de infecție aparentă (decelabilă clinic) sau inaparentă. Durata stării de imunitate este variabilă. Trecerea prin unele infecții asigură o protecție specifică pentru tot restul vieții (rujeola, variola, varicela, oreionul). Alte infecții (difteria, scarlatina, tusea convulsivă etc.) conferă o protecție mai puțin solidă, astfel încât la o nouă expunere (după câțiva ani), organismul poate face din nou boala într-o formă mai ușoară decât prima îmbolnăvire.

Imunitatea dobândită natural pasiv este rezultatul transferului transplacentar și prin secreția lactată, al anticorpilor de la mamă la făt. Această formă de imunitate este variabilă din punct de vedere cantitativ și calitativ, în funcție de complexitatea structurală a barierei placentare și diversitatea antigenelor la care a fost expus organismul matern. Trecerea imunoglobulinelor prin filtrul placentar depinde de structura placentei, adică de numărul de straturi celulare ce se interpun între circulația maternă și cea fetală. Tranzitul anticorpilor este restrictiv la speciile de bovine, cabaline, porcine, canine, care au placentă de tip epiteliocorial, cu 4 straturi tisulare: endoteliul capilar matern, epiteliul corionic, țesutul conjunctiv fetal, endoteliul capilar fetal. Nou-născutul este protejat de imunoglobulinele din colostru. În primele 24 de ore, aparatul gastrointestinal este imatur din punct de vedere funcțional și digestia proteică nu are loc. Imunoglobulinele din colostru rămân intacte și sunt transportate în mediul intern prin celulele epiteliului intestinal. Transferul placentar al imunoglobulinelor este foarte intens la speciile cu

placentă hemocorială (om, maimuțe, rozătoare), la care stratul endoteliului capilar matern lipsește și sângele matern scaldă țesutul placentar fetal. Nou-născutul uman primește anticorpi materni și după naștere, prin colostrul bogat în imunoglobuline, provenite din circulația maternă.

Imunitatea dobândită natural și pasiv asigură noului născut o stare de nereceptivitate față de agenții infecțioși pentru care organismul matern este imun. Această imunitate scade treptat după naștere, pe măsura catabolismului anticorpilor de origine maternă, astfel încât, după o perioadă de 3-6 luni copilul devine sensibil față de agenții infecțioși. Imunitatea transplacentară explică raritatea maladiilor infecțioase la copii, în primele luni de viață.

Imunitatea dobândită artificial activ

Imunitatea dobândită artificial activ este consecutivă administrării vaccinurilor. Denumirea de vaccin vine de la cuvântul latin vaca și semnifică originea primului preparat pe care E. Jenner (1798) l-a utilizat pentru controlul variolei.

VACCINURI

Vaccinurile sunt produse biologice care conțin bacterii vii cu virulență atenuată, bacterii omorâte, toxine modificate (anatoxine), virusuri infecțioase dar cu virulență atenuată, respectiv virusuri inactivate și care, introduse pe o cale adecvată în organismul uman sau animal, stimulează reactivitatea imunitară, generând o stare de protecție temporară față de agentul infecțios din care au fost preparate.

Preparatul vaccinal trebuie să fie eficient, adică să inducă un răspuns imun protector, a cărui memorie să se păstreze în timp și, pe de altă parte, să prezinte un grad înalt de siguranță, adică să nu determine efecte secundare defavorabile.

Administrarea unui vaccin se face pe baza unei strategii bine definite. Scopul vaccinării poate fi eradicarea, eliminarea sau limitarea unui proces infecțios.

Eradicarea semnifică dispariția agentului patogen, consecutiv acțiunii de vaccinare.

Eliminarea corespunde dispariției manifestărilor patologice, deși agentul patogen se păstrează în populația umană sau animală.

Limitarea semnifică posibilitatea controlului unei maladii infecțioase până la un nivel la care nu mai reprezintă o problemă de sănătate publică.

În general, vaccinurile se administrează înainte de a se produce infecția cu tulpina sălbatică a agentului patogen. Face excepție vaccinul rabic, care se administrează după ce s-a produs o presupusă infecție. Faptul este posibil, deoarece infecția rabică are o perioadă lungă de incubație și permite ca preparatul vaccinal să inducă un răspuns imun eficient, care modifică evoluția infecției cu o tulpină de virus "de stradă".

După conținutul lor, vaccinurile pot fi monovalente, adică includ antigenele unei singure tulpini bacteriene sau virale (de exemplu, vaccinul stafilococic), bi-, tri- sau polivalente, care conțin antigene provenind de la două, trei sau mai multe specii de microorganisme sau tulpini virale (de exemplu, vaccinul diftero-tetano-pertusis).

După proveniența agenților patogeni utilizați la prepararea unui vaccin, se disting autovaccinuri și stocvaccinuri. Autovaccinul este vaccinul preparat cu o tulpină a unui microorganism sau a unui virus, izolată de la un bolnav și destinat a fi folosit numai pentru vaccinarea pacientului de la care s-a făcut izolarea. Stocvaccinurile se obțin din amestecul mai multor tulpini de agenți infecțioși și sunt destinate imunizării întregii populații susceptibile.

Vaccinuri de origine bacteriană

Vaccinurile vii constau din suspensii de bacterii vii, dar cu virulență atenuată, astfel încât să nu determine o infecție aparentă, dar să rămână capabile să inițieze un proces infecțios inaparent, cu efect imunizant. Vaccinurile vii conțin celule viabile, slab virulente și care, după administrare,

induc o imunitate solidă, comparabilă celei consecutive trecerii prin boală, dar produc cel mult semne minime de îmbolnăvire. Indiferent de locul inoculării, agentul infecțios din vaccinul viu nu rămâne localizat, ci se răspândește în organism, pătrunzând și multiplicându-se în aceleași țesuturi în care se localizează și în cazul infecției naturale, dar infectând un număr mic de celule sensibile și multiplicându-se lent, agentul infecțios din vaccin nu declanșează o boală clinică, ci numai o infecție de formă atenuată, care este însoțită de modificări umorale și de reactivitate imunitară.

Pentru prepararea vaccinurilor vii se utilizează mutante bacteriene cu virulență atenuată, selecționate prin cultivarea unor tulpini sălbatice în condiții speciale: de exemplu, cultivarea la o temperatură superioară celei optime în cazul bacilului cărbunos *Bacillus anthracis*, sau prin acțiunea unor substanțe chimice și utilizarea unor medii de cultivare care oferă condiții nefavorabile (vaccinul BCG).

Vaccinurile omorâte constau din suspensii bacteriene omorâte prin încălzire la temperaturi ridicate (60°C), ori sub acțiunea formolului sau a fenolului și care conțin una din aceste substanțe ca prezervant. Din această categorie fac parte vaccinul tifo-paratific A și B (TAB), vaccinul pertusis (din *Bordetella pertusis*), vaccinul stafilococic. Proprietățile imunogene ale vaccinurilor bacteriene omorâte se mențin intacte.

Anatoxinele (toxozii) sunt preparate biologice cu proprietăți imunogene, derivate din toxine. Uneori, toxinele se transformă spontan în derivați lipsiți de toxicitate, dar păstrează proprietățile de imunogenitate și specificitate ale toxinei native. Mecanismul molecular al inactivării toxinelor nu este cunoscut. Inactivarea este un proces lent și progresiv, dependent de pH, temperatură, prezența ionilor sau a proteinelor contaminante, de procesul învechirii preparatului. Un factor major al inactivării pare a fi proteoliza parțială a moleculelor de toxină sub acțiunea proteazelor contaminante, dar și schimbarea conformației moleculei, polimerizarea sau clivarea unui fragment molecular pot acționa în același sens.

Inactivarea toxinelor și transformarea lor în produse atoxice are loc în condiții dirijate, sub acțiunea formolului 4%, la 37°C și rezultă anatoxine. Fenomenul a fost descoperit de Ramon (1925). Beta-propiolactona, 2,4-dinitrofluorbenzenul și glutaraldehida au aceleași efecte asupra toxinelor.

Pentru a fi utilizată ca vaccin, o anatoxină trebuie să îndeplinească următoarele condiții: a) să fie imunogenă și să inducă sinteza anticorpilor la un titru suficient pentru a neutraliza in vivo, toxina nativă; b) să fie complet lipsită de toxicitate; c) să nu aibă proprietăți alergizante. Anatoxina ideală ar putea fi produsă de microorganisme manipulate genetic sau prin mutații ale genei

codificatoare a toxinei. Ea ar fi o proteină netoxică, dar cu aceleași proprietăți de imunogenitate ca ale toxinei native, capabilă să inducă sinteza anticorpilor neutralizanți.

Condițiile optime pentru obținerea anatoxinelor sunt proprii fiecărei toxine și au fost optimizate empiric, dar mecanismele moleculare ale inactivării nu se cunosc. În general, condițiile optime pentru obținerea anatoxinelor sunt următoarele:

- concentrația proteică trebuie să fie de 1 mg/ml, iar cea de formol, de 1,3 mg/ml;
- temperatura de detoxifiere este de 37-40o;
- pH-ul optim este de 7,8-8,2 pentru toxinele difterică și tetanică și 5,5 pentru cea botulinică;
- durata contactului cu formolul este de 3-5 săptămâni.

Detoxifierea începe simultan cu adăugarea formolului. Procesul de detoxifiere este evident după un minut și crește exponențial timp de 24 de ore, când toxicitatea are valoare foarte scăzută și tinde spre 0, la 5 zile. Forma netoxică poate reveni total sau parțial la forma toxică. De aceea este necesară prelungirea contactului cu formolul, o perioadă mai lungă de timp. Molecula de anatoxină are o structură stabilizată, prin formarea legăturilor noi între formol și resturile de aminoacil, dar în același timp, prin acțiune prelungită, formolul are rolul unui agent de reticulare pentru că favorizează formarea legăturilor între moleculele proteice identice, ceea ce explică polimerizarea unor anatoxine.

Anatoxinele bacteriene, ca și exotoxinele sunt foarte imunogene pentru om, cal, capră, iepure, cobai, în special după asocierea cu adjuvanți (fosfat de Ca). Ele se pot administra ca vaccinuri pentru imunizarea activă sau se folosesc pentru imunizarea animalelor în vederea obținerii serurilor imune utilizabile în seroterapie.

Vaccinuri virale

Vaccinurile virale sunt de trei categorii:

1) Vaccinuri cu virus activ (infecțios) atenuat;

2) Vaccinuri cu virus inactivat (neinfecțios).

Ambele categorii sunt vaccinuri unitare.

3) Vaccinuri subunitare.

Vaccinuri unitare

Vaccinurile cu virus atenuat se obțin din tulpinile virale atenuate, lipsite complet sau aproape complet de patogenitate, dar își păstrează capacitatea de a induce un răspuns imun protector. Fiind infecțioase, ele se multiplică în organismul vaccinat și produc o stimulare antigenică continuă, într-un interval de timp.

Vaccinarea cu virusuri atenuate conferă o imunitate de durată, după administrarea unei singure doze.

Atenuarea virusurilor se obține pe mai multe căi.

1) Utilizarea pentru vaccinare, a unui virus înrudit, de la o altă gazdă. Cel mai vechi vaccin viral (Jenner, 1798), utilizat în controlul variolei, este virusul vaccinal, recoltat din leziunile pustulare de pe ugerul vacii. Virusul vaccinal imunizează încrucișat cu virusul variolei (smallpox) și este protector față de infecția variolică.

Virusul rujeolei imunizează câinele față de virusul bolii Carré. Anticorpii față de virusul rujeolei neutralizează virusul bolii Carré, dar nu și invers.

Calea de abordare a lui Jenner pentru obținerea preparatelor virale utilizabile ca vaccinuri umane este folosită și astăzi. Ea implică izolarea unor virusuri de la mamifere sau de la păsări, înrudite

antigenic cu diferite virusuri umane. Pasajul lor în celulele diploide umane (CDU) in vitro, echivalează cu procesul atenuării. Celulele diploide umane reprezintă un substrat semipermissiv pentru virusurile umane și mamaliene și adeseori, multiplicarea lor este lipsită de eficiență.

Genele virusurilor mamaliene și aviare, care determină spectrul de gazdă au o mare diversitate a secvențelor de nucleotide, față de genele corespunzătoare ale virusurilor umane. Efortul de a realiza noi vaccinuri, pe calea clasică a lui Jenner, trebuie să se sprijine pe tehnicile de genetică virală, biologie moleculară și imunologie.

2) Inocularea virusului patogen sau parțial atenuat, pe o cale “nenaturală”, adică alta decât cea prin care virusul pătrunde în mod obișnuit în organism. Metoda este folosită pentru vaccinarea animalelor (de exemplu, virusul laringotraheitei păsărilor, se administrează prin instilare în ochi). Pentru om, metoda nu se folosește, deoarece riscul infecției este mare.

3) Pasajul virusului de origine umană într-un substrat “nenatural”, in vivo sau in vitro. Cele mai importante vaccinuri pentru om și animale s-au obținut pe această cale. Virusul se cultivă în mod repetat, prin inoculare la organisme sănătoase sau în culturi primare de celule: virusul febrei galbene s-a inoculat la șoarece și apoi în embrionul de găină; poliovirusul s-a inoculat în celulele de rinichi de maimuță; virusul rujeolei în fibroblaste de embrion de găină. Pasajul într-un substrat celular “nenatural”, selecționează mutante printr-un cumul de evenimente mutaționale întâmplătoare. În practica vaccinării, se utilizează cele cu proprietăți adecvate de atenuare și imunogenitate. Mutantele care după administrare rămân localizate la poarta de intrare, sunt cele mai utile. Unul din marile succese ale acestei metode de atenuare este vaccinul polio. Prin pasaje succesive în culturile celulare de rinichi de maimuță, s-a selectat o linie lipsită de neurovirulență, după inocularea intracerebrală sau intraspinală la maimuță. Vaccinul rubeolic s-a obținut prin cultivarea virusului pe același substrat, iar liniile folosite ca vaccin rujeolic și al febrei galbene s-au cultivat pe fibroblaste de embrion de găină.

Vaccinarea cu un preparat viral atenuat echivalează cu o infecție ușoară, asimptomatică.

Vaccinurile virale atenuate au avantajul important al stimulării ambelor compartimente ale răspunsului imun: celular și humoral, atât sistemic cât și local. Acest fapt este deosebit de important pentru infecțiile virale în care imunitatea mediată celular are un rol esențial în eliminarea virusului, cât și pentru infecțiile mucoaselor, în care atât imunitatea locală cât și cea sistemică, sunt necesare pentru rezistența optimă.

Vaccinurile virale atenuate stimulează răspunsul imun față de fiecare din antigenele protectoare ale unui virus. Imunitatea indusă de aceste vaccinuri este mai durabilă, mai eficientă și are un

spectru mai larg de reactivitate încrucișată, decât cea indusă de virusurile inactivate. Reactivitatea încrucișată este foarte importantă pentru virusurile care suferă variație antigenică progresivă.

Virusurile atenuate din vaccinuri, păstrându-și capacitatea de multiplicare în organismul vaccinat, se răspândesc în populație și imunizează chiar indivizi nevaccinați.

Vaccinurile atenuate se produc cu un preț de cost mai scăzut și se administrează mai ușor. În cazul vaccinului polio, o singură doză administrată oral este suficientă pentru a crea o bună stare de protecție.

Dezavantajele vaccinurilor virale atenuate sunt legate de riscul ridicat al contaminării cu agenți infecțioși supraadăugați. De exemplu, loturile inițiale de vaccin polio, au fost contaminate cu SV40, din celulele de rinichi de maimuță, dar nu s-a constatat creșterea incidenței tumorilor la copiii vaccinați. Vaccinul atenuat al virusului febrei galbene, multiplicat în fibroblastele de embrion de găină, a fost contaminat inițial cu virusul leucozei aviare.

Unele virusuri atenuate (rujeolic, rubeolic, al febrei galbene) păstrează un nivel scăzut de virulență reziduală, care determină infecții la copiii cu imunodeficiențe.

O problemă importantă, legată de infecțiozitatea vaccinurilor atenuate, este aceea a restaurării unui grad variabil de virulență după vaccinare, care determină infecții cu manifestări clinice la copiii imunodeficienți. Procesul infecțios nu este consecința alterării genetice a virusului din vaccin. Din această cauză, vaccinul nu se administrează gravidelor.

Vaccinurile atenuate ridică problema instabilității genetice. Virusul rujeolic atenuat este labil, în special la variațiile termice și de aceea necesită un regim termic constant (+4°C), pe toată durata depozitării.

Un alt dezavantaj constă în faptul că virusul atenuat poate să producă o infecție persistentă. De asemenea, administrarea vaccinului atenuat poate să interfere cu virusul de tip sălbatic care infectează natural și să domine până la anulare eficiența vaccinării. De exemplu, virusul polio atenuat, se administrează pe cale orală, dar poate să interfere cu o largă varietate de enterovirusuri.

Vaccinurile inactivate conțin virioni care, după tratamentul cu agentul chimic inactivant nu pot să inițieze ciclul de multiplicare în substratul permisiv.

Preparatul viral brut se obține prin cultivarea virusului într-un substrat permisiv: în oul embrionat de găină (virusul influenza), în culturi celulare de rinichi de maimuță (virusul polio), sau în fibroblastele umane de embrion de găină (polio, rujeolic, rabic). Preparatul brut se inactivează cu formol, acetyl-etilenimina sau cu beta-propiolactona.

Preparatele virale inactivate, utilizabile ca vaccin au avantajul riscului minim al infecției. Rareori, preparatele inactivate conțin virus infecțios rezidual, care a rezistat tratamentului de inactivare, sau care provine din contaminarea cu un alt virus.

Vaccinurile virale inactivate au câteva dezavantaje. Uneori, tratamentul cu un agent chimic anulează imunogenitatea unor proteine virale, astfel încât răspunsul imun față de virusul inactivat nu este protector. De exemplu, inactivarea cu formol a virusului rujeolic anulează imunogenitatea proteinei de fuziune (F), iar vaccinul își pierde proprietatea protectoare.

Vaccinurile inactivate nu stimulează imunitatea mediată celular (mediată de limfocitele Tc), care au rol decisiv în eliminarea celulelor infectate cu virus și în rezistența la infecțiile cu o gamă largă de virusuri.

Prețul de cost al vaccinurilor inactivate este mai mare.

Preparatele virale inactivate, folosite ca vaccinuri, se obțin din virusul rabic cultivat în CDU și în embrionul de rață, din virusul oreionului și din virusul influenza, cultivate în embrionul de găină, din virusul polio, cultivat în celulele de rinichi de maimuță. Toate sunt inactivate cu beta-propiolactonă sau cu formol.

Preparatul inactivat al virusului hepatitei B este o realizare recentă, dar este foarte costisitor pentru că virusul nu se cultivă în sisteme celulare in vitro, iar tehnicile de purificare a virusului din serul pacienților infectați cronic sunt foarte laborioase.

Vaccinuri subunitare

Inițial, vaccinurile s-au obținut din preparatele brute de virus, după multiplicarea lor într-un țesut (in vivo) sau în culturi celulare. Pe măsură ce a fost posibilă obținerea unor titruri înalte de virus, în scopul diminuării toxicității vaccinului, s-a trecut la purificarea virusului și a unor componente virale.

Vaccinurile subunitare conțin proteine virale în care se găsesc localizate situsuri antigenice majore și care se pot substitui virionilor în practica vaccinării. De exemplu, pentru virusul influenza, vaccinul subunitar conține antigenele de suprafață HA și NA. Preparatul este mai puțin toxic decât virusul integral inactivat, dar este mai puțin eficient în stimularea răspunsului imun.

Celulele mamaliene reprezintă un sistem optim pentru producerea proteinelor virale, utilizabile ca vaccinuri subunitare. Celulele în cultură se infectează cu virus și din lizatele celulare se purifică antigene proteice. În lizate se găsește o cantitate mare de proteine virale în exces, neîncorporate în virioni.

Obținerea vaccinurilor subunitare proteice, în culturile de celule animale ridică probleme dificile de purificare a proteinelor virale, din amestecul cu proteinele celulare. Dacă se folosesc linii celulare continue, trebuie îndepărtat ADN celular, potențial oncogen.

Tehnici moderne de obținere a vaccinurilor subunitare

Dezvoltarea biologiei moleculare și cunoașterea mecanismelor răspunsului imun, a stimulat preocupările privind obținerea unor vaccinuri noi. Utilizarea anticorpilor monoclonali a făcut posibilă identificarea epitopilor cu rol esențial în stimularea răspunsului imun, iar genele codificatoare ale antigenelor, au fost clonate prin tehnicile de inginerie genică.

Genele codificatoare ale antigenelor protectoare, se pot izola după fragmentarea genomului sub acțiunea catalitică a enzimelor de restricție. Prin tehnologia ADN recombinant, genele se inseră în celula procariotă (*E. coli*,

B. subtilis), sau în celulele eucariote (levuri, celule mamaliene).

Fragmentarea genomului cu endonucleaze de restricție este posibilă numai pentru dezoxiribovirusuri. Genomul ARN trebuie mai întâi transcris în ADNc și ulterior poate fi utilizat

în tehnicile de ADN recombinant. Genomul ARN de polaritate pozitivă este adecvat scopului clonării, dar nu a fost clonat ADNc al unei catene de ARN de polaritate negativă.

Celulele de mamifere reprezintă substratul optim pentru clonarea genelor și pentru producerea proteinelor virale, deoarece plierea, transportul celular și prelucrarea proteinelor sunt asemănătoare celor ce au loc în celula infectată de virusul natural. Celulele produc cantități mari de antigen viral, codificate de gena clonată.

Tehnicile de clonare genică se folosesc pentru sinteza proteinelor unor virusuri, care nu se multiplică in vitro, în sistemele celulare uzuale. De exemplu, gena pentru sinteza antigenului HBs a fost inserată într-o plasmidă și clonată de levuri. Proteina virală este neglicozilată, dar este imunogenă pentru om și induce sinteza anticorpilor protectori față infecția naturală. S-au clonat genele codificatoare ale glicoproteinelor de HSV, VEB, HIV, VRS (virusul respirator sincițial).

Pentru purificarea glicoproteinelor virale din celulele infectate în care a fost clonată gena, s-a folosit tehnica cromatografiei de afinitate cu anticorpi monoclonali sau alte tehnici de separare (cromatografia cu lectine, tehnici de separare fizică).

ADN viral este funcțional chiar în celula procariotă, după transferul prin intermediul unui vector (plasmidă sau fag). Astfel s-au sintetizat antigene de poliovirus, antigenul HBs, antigenul virusului hepatitei A, HA și NA ale virusului gripal.

O variantă a tehnicilor de ADN recombinant este aceea de obținere a vaccinurilor cu virusul vaccinal hibrid. Genomul poxvirusurilor codifică circa 200 de proteine. Unele sunt esențiale pentru multiplicarea virală, dar un interes deosebit prezintă genele neesențiale pentru ciclul de multiplicare. Ele reprezintă circa 30% din genom și sunt grupate la extremitățile genomului ADN dublu catenar linear. În plus, genomul este împachetat lax în virion. Aceste particularități au permis obținerea, prin tehnicile de inginerie genică, a poxvirusurilor recombinante, infecțioase, capabile să exprime genele străine inserate în genomul lor.

ADN viral este inserat în genomul virusului vaccinal prin recombinare la situsuri omologe. Virusul vaccinal hibrid se multiplică în celulele permissive și genele inserate în genomul său codifică antigenul HBs, antigenul rabic, antigenul HSV etc.

Vaccinurile virale hibride sunt stabile și stimulează ambele compartimente ale răspunsului imun.

O altă cale de producere a vaccinurilor virale atenuate, genetic stabile, implică obținerea mutantelor de deleție. Acestea au o capacitate diminuată de multiplicare, ceea ce echivalează cu atenuarea. Mutantele prin deleție trebuie să-și păstreze infecțiozitatea și imunogenitatea și să fie stabile genetic.

Antigene peptidice sintetice. Producerea și utilizarea antigenelor sintetice s-au impus după demonstrarea bazelor moleculare ale imunogenității și după studiile privind proprietățile imunogene ale antigenelor artificiale. Pe de altă parte, s-a demonstrat ca macromoleculele proteice sau glicoproteice din structura virusurilor și a microorganismelor infecțioase, au un număr mare de determinanți antigenici, dar numai un număr limitat dintre aceștia au semnificație imunogenă și un număr foarte mic sunt inductori ai răspunsului imun protector.

Sinteza artificială a peptidelor a devenit posibilă după introducerea metodelor de secvențiere a ADN. Cunoașterea secvenței bazelor a permis dirijarea secvenței de aminoacizi a proteinelor cu activitate biologică.

Vaccinurile sintetice conțin secvențe polipeptidice sintetizate pe cale chimică. Ele includ determinanți antigenici esențiali pentru inducerea unui răspuns imun protector față de agenți patogeni corespunzători.

Condiția esențială pentru obținerea vaccinurilor sintetice este cunoașterea structurii chimice a determinanților antigenici nativi ai virusului (sau ai microorganismelor patogene) și identificarea regiunilor imuno-dominante ale moleculei.

Tehnicile de cristalografie cu raze X, cromatografia în faza lichidă, au permis identificarea situsurilor antigenice majore ale unor virusuri foarte importante pentru clinică. De exemplu, s-a determinat structura tridimensională a hemaglutininei virusului gripal și s-au identificat regiunile calde ale moleculei, care, cu mare probabilitate, corespund determinanților antigenici. S-a stabilit secvența aminoacizilor, care a fost reprodusă în proteinele sintetizate artificial.

Marea majoritate a peptidelor sintetice sunt secvențe scurte, lineare de aminoacizi, care reproduc un fragment din structura primară a moleculei proteice. Dezavantajul major este că secvențele sintetice nu reproduc configurația spațială a determinanților antigenici naturali, în special a celor discontinui. Aceștia sunt alcătuiți din resturi de aminoacizi neadiacenți în structura primară a moleculei, dar pot fi juxtațuși în structura tridimensională a proteinei pliate. Astfel se explică slaba imunogenitate a peptidelor sintetice. Ameliorarea calităților de imunogenitate ale peptidelor sintetice, utilizabile ca vaccinuri, depinde de gradul de asemănare a conformației lor, cu determinantul antigenic nativ.

Dimensiunile mici ale peptidelor sintetice impun cuplarea lor cu o moleculă purtător, pentru creșterea gradului de imunogenitate. S-a folosit hemocianina de Megathura (KHL), cuplată prin intermediul glutaraldehidei sau a unei grupări tiol a unui rest de cisteină, adăugat la o extremitate a secvenței sintetice.

S-au sintetizat peptide care reproduc secvențe de aminoacizi ale unor polipeptide ale virusului hepatitei B, cu diferite eficiențe imunoprotectoare, precum și peptide care reproduc unele secvențe ale hemaglutininei virusului gripal.

Polipeptidele sintetice utilizate ca vaccinuri, au avantajul că nu conțin alte componente care ar putea produce efecte secundare și stimulează răspunsul imun strict specific față de epitopii antigenici critici ai agentului infecțios. Sunt stabile indefinit și se produc la un preț de cost scăzut. Au însă dezavantajul major de a nu stimula răspunsul imun mediat celular.

Vaccinurile care conțin virioni inactivați și anatoxinele se administrează, în general, pe cale parenterală (subcutan, intradermic, intramuscular), în mod obișnuit în trei injecții separate la intervale de 5, 7 și respectiv 21 de zile.

Vaccinurile bacteriene vii și cele virale atenuate se administrează într-o singură doză, în general, pe cale parenterală. Vaccinul BCG, ca și vaccinul polio infecțios atenuat, la nou născuți se administrează pe cale orală.

Imunitatea consecutivă vaccinării se instalează relativ lent, la circa 15-20 de zile de la ultima injecție și are o durată variabilă de la un vaccin la altul (în general, între 1 și 7 ani), scăzând treptat până la dispariția completă. Vaccinarea primară, ca și infecția, conferă organismului o stare specială de reactivitate imunitară - memoria imunitară - grație căreia, orice contact ulterior cu agentul patogen respectiv, realizat pe cale naturală (infecție și boală) sau pe cale artificială (prin vaccinare) declanșează o "redeșteptare" rapidă a imunității, care se manifestă cu o intensitate mai mare decât aceea a răspunsului imun postvaccinal. Cea de a II-a administrare a vaccinului declanșează o reacție anamnestică (de memorie), cu o creștere bruscă și masivă a titrului anticorpilor.

Deși în general este solidă, imunitatea postvaccinală este relativă, în sensul că unele persoane vaccinate pot totuși să facă boala într-o formă mai ușoară, mai ales consecutiv unei infecții masive cu un agent patogen deosebit de virulent.

Datorită faptului că se instalează lent, imunizarea prin vaccinare se folosește în scop profilactic pentru a evita riscul infecției cu un agent patogen.

Imunitatea dobândită artificial pasiv

Serurile imune sau terapeutice sunt produse biologice obținute din serul sanguin al unui animal imunizat prin vaccinare sau din serul unui convalescent imunizat prin infecție naturală sau prin vaccinare. Serul imun conține anticorpi specifici, capabili să neutralizeze acțiunea antigenului corespunzător. Primele încercări de folosire a serurilor în terapeutică datează din 1888, când Richet și Héricourt au demonstrat că inocularea organismelor animale cu agenți patogeni, determină apariția în ser a anticorpilor, cu efect protector nu numai pentru organismul care i-a sintetizat, dar și pentru organismele cărora li se injectează serul imun.

În general, serurile imune se prepară pe animale mari (cal), care sunt hiperimunizate, după principiile imunizării active, cu doze repetate crescânde de celule, virioni, anatoxine sau toxine. Serul sanguin obținut prin sângerarea animalelor imunizate este inactivat și tratat cu fenol (ca prezervant), controlat pentru sterilitate, inocuitate (lipsa de nocivitate) și pentru eficacitate (titrul de anticorpi). Serul imun se administrează sub formă de injecții intravenoase, intramusculare sau subcutane, în special în scop terapeutic.

După cum specia organismului donor este sau nu aceeași cu a organismului receptor, serurile imune pot fi omologe (serurile recoltate de la convalescenți sau de la voluntarii imunizați prin vaccinare) sau heterologe (serurile obținute prin imunizarea animalelor).

După natura antigenelor folosite, se disting trei categorii de seruri imune: a) seruri imune antimicrobiene, obținute prin administrarea antigenelor celulare (de exemplu, serurile antistreptococice și antimeningococice); b) seruri antitoxice, obținute prin imunizarea organismelor cu toxine și anatoxine (de exemplu, serurile antidifteric și antitetanic); c) seruri imune mixte (antimicrobiene și antitoxice), obținute prin imunizarea cu antigene celulare și cu toxine (de exemplu, serul antigangrenos).

Imunitatea pasivă, consecutivă administrării serurilor imune se instalează imediat după injectarea intravenoasă sau după câteva ore, pe măsura resorbției anticorpilor, în cazul administrării pe alte

căi. Imunitatea pasivă asigură o protecție de scurtă durată (circa 30 de zile), datorită faptului că anticorpii primiți în mod pasiv au un “timp de înjumătățire” de 14 zile. Persistența lor este mai îndelungată dacă serul este homolog. După catabolizarea anticorpilor exogeni, organismul redevine receptiv la infecție. Datorită acestei particularități, serurile imune sunt folosite în special pentru tratamentul unei maladii infecțioase în evoluție (seroterapie).

Serurile imune (antitoxice, antivirale, antibacteriene) acționează prin opsonizarea moleculelor de toxină, a virionilor și a celulelor bacteriene. Efectul este de neutralizare a toxinei și a infecțiozității virale, iar celulele bacteriene tapetate cu anticorpi devin sensibile la acțiunea fagocitelor și a complementului.

Serurile imune pot fi folosite și în scop profilactic (seroprofilaxie), la persoane care au fost sigur în pericol de a se infecta și la care se urmărește prevenirea declanșării maladii în forma clinică. Pentru a evita riscurile de infecție, care pot surveni după epuizarea imunității pasive, se recomandă ca seroterapiei și seroprofilaxiei să li se asocieze vaccinarea, pentru păstrarea stării de imunitate după catabolizarea anticorpilor exogeni.

Datorită riscului crescut al producerii reacțiilor imune secundare (alergie, șoc anafilactic), OMS recomandă înlocuirea serurilor hiperimune obținute pe animale (heterologe), cu cele umane obținute de la donori hiperimunizați voluntar sau de la convalescenți (homologe).

În prezent se folosesc seruri imune concentrate și purificate, din care s-au eliminat circa 3/4 din proteinele serului sanguin, păstrându-se numai fracția globulinică specifică. Prin acest procedeu s-a redus foarte mult volumul serului injectat și se evită accidentele care ar putea rezulta din sensibilizarea organismului uman față de proteinele nespecifice din serul heterolog.

REZISTENȚA ANTIINFECȚIOASĂ

ÎNNĂNASCUTĂ NESPECIFICĂ

Prin imunitate sau rezistență naturală, înăscută sau congenitală se înțelege capacitatea unui organism de a fi rezistent față de un agent infecțios, în absența unui răspuns imun detectabil. Această proprietate este înăscută pentru organismele unei specii și în mod obișnuit este absolută, adică toți indivizii speciei respective sunt rezistenți față de un anumit patogen, chiar în cazul inoculării cu doze mari ale agentului infecțios. De exemplu, omul este rezistent la agenții patogeni care produc zoonoze (agentul pestei bovine, al pestei porcine, al holerei găinilor etc.), iar animalele sunt rezistente la gonoree, rujeolă, oreion, dizenterie, gripă etc.

Starea de rezistență naturală nu este condiționată de contactul anterior cu agentul patogen respectiv, ci este consecința unei modalități prompte de reacție a organismului. Starea diametral opusă este aceea de receptivitate sau de sensibilitate (susceptibilitate), caracteristică organismelor care, ca rezultat al agresiunii unui agent patogen, reacționează prin apariția unui proces infecțios. Starea de nereceptivitate este, uneori, relativă, în sensul că există deosebiri individuale de reactivitate în cadrul speciei, unii indivizi fiind total rezistenți, iar alții prezintă diferite grade de receptivitate. Răspunsul diferit al organismelor unei specii, la contactul cu un agent patogen, este rezultatul eficienței variabile a forțelor de apărare a organismului, care, izolate sau în asociație, opun agentului patogen o barieră de nepătruns, determină inhibarea multiplicării sau distrugerea lui în țesuturi sau umori, precum și neutralizarea și eliminarea substanțelor toxice eliberate. Diferențele sunt, probabil, rezultatul acțiunii unor factori genetici. De exemplu, oile din Alger sunt mult mai rezistente la infecția cărbunoasă (produsă de *B. anthracis*), decât cele din Europa. La primele, macrofagele conțin un număr mai mare de lizosomi și enzimele componente au activitate hidrolitică mult mai intensă. S-au evidențiat diferențe de sensibilitate a raselor umane la tuberculoză: populațiile africane sunt mai sensibile. Influențele de ordin genetic asupra rezistenței naturale au condus la concluzii de ordin practic. Pe acest criteriu se face selecția populațiilor (liniilor) genetic pure ale animalelor de laborator, care au o rezistență foarte mare față de un agent patogen sau o sensibilitate deosebită.

Ori de câte ori un agent patogen vine în contact cu un organism neimunizat, inițierea procesului infecțios este stopată, în primul rând prin intrarea în acțiune a mecanismelor rezistenței constitutive, nespecifice, reprezentate de barierele mecanice (tegumentul și mucoasele), de componentele moleculare antiinfecțioase a căror sinteză este amplificată în reacția inflamatorie, de componentele celulare care au capacitatea de fagocitoză. Ulterior, dacă barierele rezistenței nespecifice au fost depășite, intră în acțiune sistemul imunitar. Mecanismele de apărare antiinfecțioasă, specifice și nespecifice, sunt strâns integrate funcțional, astfel încât, acțiunea lor este totdeauna combinată. De exemplu, epiteliul tubului digestiv secretă lizozim, ca factor al rezistenței înăscute, iar în stratul de mucus care îl tapetează se găsește IgA, ca factor al imunității dobândite.

Barierele mecanice de apărare a organismului sunt reprezentate de tegument și de mucoase. Epiteliul tegumentar și mucoasele sunt structurile care limitează accesul agenților infecțioși, constituind în primul rând bariere fizice, dar la acest nivel funcționează mecanisme moleculare și celulare cu rol neutralizant sau litic față de microorganisme și virusuri. Deși contactul lor cu

microbiota normală sau potențial patogenă este permanent, aceste structuri sunt deosebit de eficiente ca bariere mecanice protectoare față de infecții. Particularitățile lor funcționale sunt conferite de integritatea anatomică, de secrețiile proprii, de reînnoirea prin descumare, de impermeabilitatea sau de permeabilitatea lor selectivă. Astfel, tegumentul intact este impermeabil pentru virusuri și microorganisme, dar alterarea structurii sale, în special după arsuri, este urmată de infecții. Fig. 96. Mecanismele apărării nespecifice a organismului.

Suprafața tegumentului este acoperită cu o peliculă fină, formată din produsele de secreție ale glandelor sudoripare și sebacee, cu pH acid ($\text{pH} = 3,0-5,0$), care au efect bacteriostatic. După îndepărtarea (prin spălare) peliculei de secreție, funcția protectoare antiinfecțioasă a tegumentului diminuează.

Conjunctiva este protejată prin acțiunea mecanică și chimică a secreției lacrimale, în care se găsește lizozim. Lizozimul este o proteină cationică mică, prezentă în toate fluidele organismului, cu efect enzimatic, hidrolizând legăturile glicozidice ale peptidoglicanului parietal bacterian.

Mucoasele sunt acoperite de secreții. Lactoferina este o glicoproteină care leagă Fe^{2+} . La nivelul tractului respirator, rolul protector față de agenții infecțioși este îndeplinit de mucinele cu efect neutralizant, iar expulzarea lor este asigurată prin mișcarea cililor celulelor epiteliale și prin reflexele de strănut și de tuse. Mucinele formează un strat mucos vâscos, ce tapetează mucoasele digestive și respirator. Ele captează microorganismele și antigenele, limitând penetrarea lor în țesuturi.

Histatinele (peptide bogate în histidină) formează o familie mică de peptide bazice de 3-5 kD, produse de celulele acinare salivare și pancreatice. Ele inhibă dezvoltarea celulelor de *C. albicans*, în forma infecțioasă sau neinfecțioasă.

Cistatinele sunt fosfoproteine ce conțin cisteină, secretate de celulele acinare. Au efect inhibitor asupra creșterii microorganismelor.

Mucoasa gastrică este protejată de gelul mucos care o tapetează, ce formează un adevărat glicocalix și de aciditatea conferită de HCl, component al sucului gastric. Bacteriile Gram negative sunt foarte sensibile la acțiunea mediului acid gastric. După neutralizarea acidității gastrice cu substanțe alcaline, capacitatea sa protectoare diminuează până la dispariție și infecțiile se instalează rapid. Totuși, pe cale digestivă pătrund agenții patogeni a numeroase maladii

infecțioase, evitând bariera acidității gastrice. Bolul alimentar este protector față de aciditate și în interiorul său există condiții favorabile supraviețuirii agenților patogeni ingerați odată cu alimentele.

Secrețiile mucoase, în compoziția cărora intră mucinele (glicoproteine), au rol important în apărarea antiinfecțioasă. Mucinele aderă la suprafața agenților patogeni și a paraziților, formând un strat molecular care împiedică interacțiunea lor cu celulele epiteliale. Lor li se atribuie de asemenea, un rol neutralizant asupra toxinelor. În același timp, secrețiile formează o peliculă (film) protectoare, continuă pe suprafața mucoasei, constituind o barieră greu de trecut pentru microorganisme în calea lor spre situsurile epiteliale de aderență. Pelicula elimină bacteriile care nu se pot adapta condițiilor de sub peliculă, la granița mucus-epiteliu.

Un alt mecanism nespecific care controlează creșterea microorganismelor la zona de contact cu mucoasa digestivă, este peristaltismul intestinal. Microorganismele aderă la mucoasa epitelială, prin intermediul unor molecule din categoria lectinelor, care realizează adevărate punți de legătură între suprafața bacteriei și a celulei epiteliale. Peristaltismul intestinal împiedică realizarea acestor interacțiuni stabile, creind un flux care deplasează microorganismele patogene, înainte ca ele să colonizeze suprafața epiteliului. Numeroase infecții intestinale accelerează peristaltismul. Anomaliile mișcărilor peristaltice sunt factori favorizanți ai creșterii excesive a populațiilor bacteriene ale microbiotei normale a tractului intestinal. În absența unui clearance mecanic normal al tractului digestiv, microbiota normală poate dobândi un rol patologic.

Rolul factorilor humorali în apărarea antiinfecțioasă nespecifică. Hormonii au un rol esențial în reglarea unor mecanisme homeostatice. Ei nu modifică specificitatea de reacție a celulelor limfoide. Concentrațiile optime de hormoni determină o funcționalitate optimă a sistemului imunitar, iar modificările lor cantitative induc perturbări ale metabolismului limfocitelor. Pubertatea și sarcina se caracterizează prin creșterea steroizilor plasmatici. Cunoașterea multiplelor interacțiuni dintre funcția imunitară și sistemul endocrin, precum și perfecționarea tehnicii de radioimunodozare (RIA) a hormonilor, au condus la delimitarea unei noi discipline intermediare în imunoendocrinologia.

Afecțiunile de natură endocrină au un răsunet major în raport cu rezistența nespecifică față de agenții patogeni. Un exemplu în acest sens este patologia infecțioasă asociată cu diabetul. Bolnavii de diabet fac în mod frecvent infecții de tip tuberculos, infecții urinare și tegumentare de tipul furunculozelor. Ele se datorează fie unor dezechilibre locale provocate de lipsa insulinei, fie glicemiei crescute.

Hormonii tiroidieni influențează rezistența față de infecții. Hipotiroidismul mărește incidența infecțiilor.

Cortizolul are influență directă asupra limfocitelor. Hipofuncția cortexului glandelor suprarenale mărește rezistența față de agenții infecțioși.

Capacitatea autosterilizantă a umorilor este un factor decisiv al rezistenței nespecifice. În țesuturi și în umori se găsesc substanțe cu rol antibacterian: lizozimul, lactoferina etc. Astfel se explică rezistența organismului față de numeroasele agresiuni ale microorganismelor, care pătrund permanent în țesuturi, pe diferite căi. Microorganismele (în special bacterii) trec din lumenul intestinal în sânge, la toate animalele, inclusiv la om, datorită condițiilor speciale de permeabilitate a epitelului, create în timpul absorbției intestinale. Permeabilitatea mucoasei este mai accentuată la rumegătoare. La om s-a evidențiat că, postprandial, se produce o bacteriemie temporară, originară în cavitatea bucală, ca rezultat al masticăției sau al periajului dentar. După extracția dentară, există chiar o perioadă septicemică (cu multiplicare bacteriană). Datorită stării de bacteriemie temporară, animalele nu trebuie hrănite o perioadă de 10-20 de ore înainte de sacrificare.

În mod obișnuit, stările de bacteriemie fiziologică nu sunt urmate de infecții clinice, datorită capacității autosterilizante (clearance) a țesuturilor și umorilor, care se manifestă prin mecanisme variate:

- condițiile tisulare improprii multiplicării microorganismelor și în primul rând concentrația O₂: microorganismele strict anaerobe nu se multiplică în țesuturile bine oxigenate, ci numai în cele traumatizate sau devitalizate. De exemplu, *C. perfringens*, agentul gangrenei gazoase crește în plăgile musculare provocate de explozii, iar *M. tuberculosis* (strict aerob) se localizează preferențial la nivelul țesutului pulmonar. După distrugerea litică a granulomului, se formează un țesut cazeos în care O₂ nu difuzează. Se creează condiții de anaerobie, improprii multiplicării celulelor de *M. tuberculosis* și astfel evoluția infecției este limitată;

- substanțe din categoria lizinelor

- properdina

- sistemul complement

- interferonii

- proteina C reactivă

Rolul acestor componente humorale în apărarea antiinfecțioasă și mecanismele acțiunii lor vor fi prezentate în acest capitol.

SISTEME CELULARE CU ROL ÎN REZISTENȚA ANTIINFECȚIOASĂ NESPECIFICĂ

Rezistența antiinfecțioasă a organismului uman și animal este rezultatul acțiunii unor sisteme celulare cu acțiune nespecifică, independentă de caracterul nonself al unei substanțe sau al unui agent infecțios. Funcția principală a sistemelor celulare cu acțiune nespecifică este fagocitoza. Ele intră în acțiune după ce agentul infecțios a depășit barierele mecanice protectoare ale organismului.

Sistemul fagocitar include celule de origine mezodermică, cu distribuție difuză în organism, care au capacitatea de a îngloba molecule nonself, virusurile și celulele străine și de a le distruge prin procese enzimatice de digestie intracelulară.

Fenomenul fagocitozei (phagein = a mânca) a fost descoperit de Iliia Metchnikoff (1882). El a dat denumirea generică de “fagocitei, celulelor libere sau fixe din țesuturi care au capacitatea de a ingera particule străine.

Fagocitoza este cel mai prompt mecanism de apărare și, în filogenie, derivă din funcția de nutriție a protozoarelor și metazoarelor inferioare. La organismele superioare, fagocitele îndeplinesc activități fiziologice importante:

- elimină moleculele organice proprii care au devenit nefuncționale și reintroduc în economia organismului, constituienții lor chimici;

- la vertebratele superioare, fagocitele îndepărtează celulele îmbătrânite, au rol în remodelarea tisulară în embriogeneză, în remanierea osoasă etc.

I. Metchnikoff a clasificat fagocitele în două categorii:

- microfage (PMN) ă celule care fagocitează particule mici
- macrofage ă celule care înglobează particule mari, chiar celule întregi.

În 1924, Aschoff a creat conceptul de sistem reticulo-endotelial (SRE), în care a inclus:

- fagocitele propriu-zise
- celulele reticulare ale sinusurilor venoase din splină și ganglioni
- celulele endoteliale ale vaselor sanguine și limfatice
- fibroblastele din țesutul conjunctiv.

În 1927, Voltera a propus denumirea de sistem reticulohistiocitar (SRH).

În 1970, fagocitele au fost împărțite în două categorii funcționale:

- fagocite “profesioniste”, capabile să ingere particule străine tapetate cu Ig sau cu componente ale complementului (C3). Ele au receptori pentru regiunea Fc a Ig și pentru C3. Grupul include fagocitele mononucleare și polimorfonucleare;
- fagocite “neprofesioniste”, cele care nu au astfel de receptori, funcția fagocitară fiind facultativă. Această categorie include fibroblastele, celulele reticulare și celulele epiteliale.

Celulele înglobează materialele nonspecific particulate și solubile prin următoarele mecanisme: pinocitoză, endocitoză mediată de receptori (EMR) și fagocitoză.

Pinocitoza este procesul prin care o celulă înglobează fluidele și soluțiile și este foarte asemănătoare cu EMR, proces prin care celulele înglobează macromoleculele, virusurile și particulele mici. Pinocitoza și EMR au în comun mecanismul bazat pe clatrină și se produc independent de polimerizarea actinei.

Fagocitoza semnifică înglobarea particulelor mari (mai mari de $0,5 \mu\text{m}$) și se produce printr-un mecanism activ, dependent de actină, dar independent de clatrină. Protozoarele fagocitează pentru obținerea nutrienților, iar la Metazoa, fagocitoza este funcția, în primul rând, a unor celule specializate (macrofagele, neutrofilele) și a evoluat ca un proces care susține o varietate de procese biologice: înglobarea și distrugerea agenților infecțioși și a celulelor senescente, remodelarea tisulară în cursul dezvoltării embrionare, răspunsul imun, procesul inflamator.

Sistemul fagocitar mononuclear (S F M)

Fagocitele mononucleare se găsesc în toate țesuturile, dar în condiții obișnuite, proliferarea lor are loc numai în măduva osoasă.

S F M reunește toate tipurile de celule cu capacitate fagocitară bine exprimată, precum și precursorii lor. Conceptul S F M a fost elaborat de van Furth (1972), sub egida OMS.

Celulele S F M își au originea în celula stem din măduva osoasă. Celula stem nu s-a identificat, dar este nediferențiată, cu activitate mitotică înaltă, este pluripotentă. Ea generează nu numai precursorul macrofagului, ci și precursorul eritrocitului, al polimorfonuclearelor și megacariocitului. Pe măsură ce se diferențiază, descendenții celulei stem își pierd potențialitatea și devin precursori separați ai liniilor monocitară, polimorfonucleară, eritrocitară și plachetară .

Monoblastul este prima celulă identificată, pe linia de diferențiere a fagocitelor mononucleare. Are receptori pentru regiunea Fc a Ig, fagocitează și, in vitro, aderă de suport. Monoblastul se divide o singură dată în două promonocite.

Promonocitul, localizat ca și monoblastul în măduva osoasă, este o celulă mai mare (15 μm), citoplasma este acidofilă, bogată în poliribosomi. Granulațiile azurofile conțin mieloperoxidază. Cele două celule rezultate din diviziunea unică a promonocitului sunt monocite.

Monocitul rămâne în măduva osoasă timp de 24 de ore de la diferențiere, trece în sânge și devine celulă circulantă pentru alte 24-72 de ore. În condiții normale, celulele care circulă la contactul cu endoteliul capilar, migrează spre diferite țesuturi și cavități, unde devin macrofage rezidente sau migrează spre un focar de inflamație:

- în plămân, monocitul se diferențiază direct în macrofagul alveolar, fără maturare în țesutul interstițial;

- în sinusoidalele ficatului, monocitul devine celulă Kupffer;

- în cavitatea peritoneală, monocitul vine direct din capilare și devine macrofag al seroasei.

În condiții normale, puține macrofage rezidente se divid și rămân viabile 1-3 luni. Nu există dovada că ele recirculă prin limfă spre vasele sanguine. Probabil că mor în țesuturi sau migrează spre ganglionii limfatici. În cazul unei infecții locale sau unui proces inflamator, factorii chimiotactici și alți mediatori ai inflamației și citochine și molecule icozanoidice îi stimulează monocitele să migreze spre situsul lezat, unde se diferențiază în macrofagele exudatului.

După migrarea în țesuturile și cavitățile organismului, macrofagele variază în privința caracteristicilor morfologice și funcționale și au denumiri diferite: celule Kupffer în ficat, macrofage pulmonare și alveolare în plămân, celule microgliale în SNC.

Distribuția celulelor S F M în cele trei compartimente este următoarea:

Tipul de celulă

Localizare

- Celula stem

- Monoblastul În măduva osoasă

- Promonocitul

- Monocitul

- Monocitul circulant În sânge

Macrofagul tisular (rezident)

- Histiocit

În țesutul conjunctiv din tegument

În țesutul limfoid secundar(ganglioni, MALT)

În măduva osoasă

În plămân (macrofage alveolare și tisulare)

În membrana sinovială a cavităților articulare

În membranele seroase ale cavităților peritoneală, pleurală, cardiacă În glande

-Osteoclastul (rezultat prin fuziunea monocitelor) În țesutul osos

-Microglia (pare a fi de origine monocitară deoarece nu se evidențiază înainte de formarea vaselor sanguine)

În S N C

- Macrofagul intravascular

Celulele Kupffer

- Macrofagul juxtavascular Histiocitul din pulpa roșie a splinei, din măduva osoasă, din sinusurile ganglionare.

- Macrofagul din exudat

- Celulele epitelioidede În focarul inflamator

- Celulele gigante multinucleate (se

formează prin fuziunea macrofagelor

exudatului).

În SFM nu sunt cuprinse:

- celulele reticulare, de origine a limfocitelor, din măduva osoasă

- celulele reticulare ale sinusurilor venoase din splină și ganglioni

- celulele endoteliale ale vaselor sanguine și limfatice

- fibroblastele

- celulele Langerhans

- celulele interdigitate

-celulele dendritice din ganglionii limfatici.

Originea celulelor dendritice nu se cunoaște cu certitudine, dar pare a fi comună cu a monocitului. Glucocorticoizii induc o scădere rapidă a monuclearelor circulante, inclusiv a monocitelor, dar și o dispariție rapidă a celulelor dendritice din țesuturi. Acesta este un argument care sprijină ipoteza că celulele dendritice derivă din precursori din măduva osoasă. Deși ele endocitează, prelucrează antigenul și îl prezintă, nu pot fi considerate ca fagocite mononucleare, deoarece nu s-a stabilit cu fermitate originea lor monocitară.

Celulele Langerhans derivă din celule mononucleare circulante care migrează în tegument. În tegument, celulele Langerhans rămân un interval scurt, înainte de a migra pe cale limfatică, sub forma celulelor cu voal, spre ganglionii limfatici unde devin celule dendritice și interdigitate.

Fagocitele mononucleare intravasculare și juxtavasculare sunt celule care vin în contact direct cu sângele (celule Kupffer, histiocitele din cordoanele pulpei roșii splenice) sau cu limfa (macrofagele intra- sau extrasinusoidale din ganglionii limfatici). Ele supraveghează aceste fluide pentru a capta materialele nonself, pe care le prelucrează și le prezintă limfocitelor. Celulele Kupffer sunt așezate în întregime în lumenul sinusoidelor hepatice și nu au nici o conexiune evidentă cu endoteliul sinusoidal. Datorită poziției, macrofagele splenice juxtavasculare, ca și cele din măduva osoasă, trebuie să străbată endoteliul, înainte de a fagocita materialul nonself.

Macrofagele intra și juxtavasculare sunt fixe. Fig. 97. Celulele sistemului fagocitar mononuclear.

Macrofagele tisulare și cele asociate vaselor formează o populație de 17-20 miliarde, într-un organism de 70 de kg. Ele își au originea în monocitul sanguin sau rezultă prin proliferarea tisulară a monocitelor imigrate. Se pare că predomină cele de origine monocitară.

Datorită localizării lor diverse și a condițiilor fiziologice locale foarte diferite (condiții cvasi-anaerobe pentru cele peritoneale și o bună aerare pentru cele pulmonare), macrofagele sunt heterogene din punct de vedere morfologic, dar au caracteristici structurale și funcționale comune:

- sunt bogate în lizosomi (pentru digestia enzimatică a substanțelor nonself);
- membrana citoplasmatică formează prelungiri fine denumite voaluri hialoplasmice, cu dimensiuni de până la jumătate din diametrul macrofagului. În microscopia scanning, suprafața macrofagului se aseamănă cu petalele unui trandafir.

Datorită mobilității membranei, macrofagul are două proprietăți importante:

- aderă de suportul solid
- endocitează (pinocitează și fagocitează).

Fagocitele sanguine au proprietatea de a migra din patul vascular, în țesuturi, unde devin macrofage rezidente, dar mobile în interiorul țesutului.

Deplasarea tisulară a macrofagului este întâmplătoare (neorientată de stimuli chimiotactici), și se numește chimiochinează sau este orientată și se numește chimiotaxie. Deplasarea orientată este ușurată de enzimele pe care macrofagul le secretă, active la pH-ul tisular.

Receptorii membranari ai macrofagului

Sistemul fagocitar mononuclear are capacitatea de a discrimina un număr mare de agenți patogeni, în raport cu selful, utilizând un număr relativ restrâns de receptori, deși agenții infecțioși au tendința de a suferi mutații. Această tendință este contracarată de existența unor receptori care recunosc componente antigenice bine conservate, care nu se găsesc la eucariotele superioare, dar îndeplinesc roluri esențiale în biologia agenților patogeni și sunt supuse proceselor mutaționale cu o rată scăzută (mananii din peretele levurilor, peptidele formilate ale bacteriilor, LPS, acizii lipoteichoici).

Macrofagul este o celulă multifuncțională, care primește o multitudine de semnale din mediul extracelular, prin intermediul receptorilor membranari, capabili să recunoască liganzi ai altor celule sau liganzi moleculari solubili.

Receptori pentru regiunea Fc a tuturor izotipurilor de lanț greu al Ig. Cei mai numeroși sunt receptorii pentru regiunea Fc a IgG monomeră (IgG citofilă), IgG agregată și IgG din complexe imune (Fc γ R I, Fc γ R II, Fc γ R III). Acești receptori constituie legătura crucială dintre celulele fagocitare efectoare și limfocitele care secretă imunoglobuline.

Fc γ R I (CD64) este receptorul de mare afinitate, leagă IgG monomeră, iar exprimarea sa este stimulată de IFN. Acești receptori mediază ADCC.

Fc γ R II (CD32) este receptorul de mică afinitate, leagă slab IgG monomeră și are afinitate de 10 ori mai mică decât Fc γ R I, dar leagă ușor complexe imune.

Fc γ R III (CD16) au afinitate scăzută pentru IgG monomeră și se găsește pe macrofagele tisulare, neutrofile și celulele NK.

Anticorpilor citofili se cuplează la suprafața celulei, prin intermediul receptorilor pentru Fc, iar ulterior leagă antigenul specific. Receptorii pentru Fc al IgE au o densitate semnificativă.

Legarea încrucișată a receptorilor de Fc γ , de către complexe imune care conțin mai mult de o moleculă de IgG, stimulează activitatea macrofagului. Macrofagele alveolare au un număr mare de receptori pentru Fc al IgE.

Receptorii pentru complement (CR1, CR3, CR4) leagă fragmentele C3b, C4b, primul fiind foarte eficient ca opsonină, dar mai puțin eficient ca mediator al ingestiei.

Receptorii pentru limfocine leagă mediatorii moleculari secretați de limfocitele activate: MIF, MAF, IFN. Sub influența acestor mediatori, macrofagele devin foarte active în prezența celulelor nonself.

Receptorii pentru glicoproteinele (lectine) care au glucide terminale resturi de fucozil, manozil, glucozil, acetil-glucozamină, sunt foarte importanți pentru recunoașterea celulelor străine, a hematiilor îmbătrânite, a fungilor, a bacteriilor.

Receptorul de manoză (MR) este o lectină a membranei macrofagelor tisulare, dar lipsește pe monocitul circulant. Acest receptor pare a fi important pentru ingestia agenților patogeni de către macrofagele tisulare. Receptorul de manoză recunoaște și leagă cu mare afinitate microorganismele care au pe suprafața lor molecule cu resturi de manoză și fucoză, având rol important în fagocitoza levurilor și protozoarelor parazite.

Monocitele sanguine nu exprimă MR, ceea ce sugerează că acești receptori sunt esențiali pentru evenimentele inflamatorii.

Receptorii pentru fibronectină sunt implicați în aderența monocitelor la zonele de discontinuitate ale endoteliului vascular și în ingestia particulelor opsonizate cu fibronectină.

Receptori pentru proteinele care conțin Fe, ceea ce explică rolul macrofagului în metabolismul Fe.

Receptori pentru hormoni(de exemplu, receptorul pentru insulină).

Receptorii pentru LPS. Celulele SFM sunt esențiale pentru mecanismul imunității antibacteriene înăscute.

Macrofagul posedă un mecanism fin de recunoaștere a LPS. De multe ori, 1 pg/ml (circa 100 fM) stimulează un răspuns detectabil. În soluție apoasă, LPS formează complexe macromoleculare, analoge miceliilor fosfolipidice. Aceste complexe se pot insera direct în

membrana plasmatică și alterează fluiditatea ei, iar la concentrații mari, produc dezagregarea membranei celulare. De aceea, s-a considerat că miceliile LPS se pot insera direct în membrana plasmatică. Dar în condiții fiziologice, LPS diferă de varianta purificată, în soluții apoase.

LPS în plasmă, în fluidul interstițial sau LPS asociat suprafeței bacteriilor Gram negative, este legat de diferite proteine plasmatică, care ușurează clearance-ul lor. LPS este opsonizat de o proteină (LBP) care leagă LPS (LPS binding protein), iar complexul este recunoscut de receptorul opsonic al suprafeței macrofagului CD14. CD14 se asociază cu suprafața celulei printr-o legătură glicolipidică. Complexul ternar format din LPS-LBP-CD14 nu transmite semnalul activator, dar activează o catenă proteică transmembranară.

Caracterizarea complexelor LPS-proteine plasmatică a fost esențială pentru înțelegerea interacțiunii LPS-macrogag. Concluzia este că macrofagul leagă LPS nativ cu o eficiență foarte scăzută, dar leagă foarte eficient complexele LPS-proteine plasmatică, pe calea receptorilor specifici. Fig. 98. LPS sunt recunoscute de un receptor (CD14), după cuplarea lor cu o proteină plasmatică (LBP = LPS binding protein) și formarea complexului LBP-LPS.

Proteinele plasmatică care leagă LPS sunt anticorpii specifici față de antigenul somatic (O), complementul, lipoproteinele cu densitate înaltă (HDL), albumina, proteina care leagă LPS (LBP) și septina. LBP este produsă de hepatocite și are valori normale medii de 7 μg/ml, iar în faza acută, la om, de 220 μg/ml. Chiar dacă este un reactant de fază acută, LBP se găsește în concentrații suficiente în plasma normală, pentru a avea rol de apărare în timpul infecției.

Diferenții receptori fagocitari trimit semnale spre citoscheletul de actină și inițiază mecanismele de internalizare.

Activarea macrofagului

Activarea macrofagului are loc în condițiile stimulării antigenice și este un proces care decurge stadial:

- recrutarea monocitului imatur din sânge și diferențierea în celulă capabilă să reacționeze în prezența limfochinelor;

- dobândirea proprietății de citotoxicitate sub acțiunea unor semnale secundare (cantități mari de limfochine, LPS etc.).

Limfocitele Th1 sunt principalele celulele activatoare ale macrofagului, prin intermediul interferonului γ . Interacțiunea dintre limfocitul T și macrofag stă la baza imunității mediate celular și a hipersensibilității întârziate. Un alt factor, foarte potent, activator al macrofagului este lipopolizaharidul bacteriilor Gram negative (LPS).

Macrofagul activat prezintă următoarele particularități:

- are dimensiuni mai mari, este mai mobil, voalurile membranare sunt mai evidente;

- metabolismul oxidativ al glucozei este mult mai activ;

- conținutul enzimatic lizosomal este crescut și crește secreția de proteaze;

- crește rata procesului de endocitoză;

- crește activitatea antibacteriană și antitumorală

- crește sinteza de monocine: IL-1 și TNF.

Activarea este nespecifică, ceea ce explică faptul că macrofagul activat de componente antigenice ale celulelor de M. tuberculosis, este mult mai eficient în activitatea de clearance a oricăror celule nonself, bacteriene, fungice sau tumorale.

Principala monocină mediatoare a acțiunii locale sau sistemice a macrofagului activat este TNF α , iar intermediarii reactivi ai O₂ și N₂ au rol major în liza bacteriilor parazite intracelular.

TNF poate avea rol determinant al efectului letal al LPS. Animalele care au primit o doză letală de E. coli, supraviețuiesc dacă li se administrează AMC ce neutralizează TNF. Aceasta denotă că efectul letal al LPS se datorează hiperreactivității gazdei față de agentul infecțios și infecției sau efectului toxic direct al LPS.

Dacă macrofagul este activat prin stimulare antigenică de durată sau nu reușește să elimine agenții patogeni intracelulari, poate deveni refractar la stimularea ulterioară.

Fig. 99. Macrofagele sunt celule esențiale pentru funcția de apărare. Ele constituie o linie de apărare, înainte de activarea specifică a limfocitelor T și B. Participă la elaborarea răspunsului, în calitate lor de celule care prelucrează și prezintă antigenul. Macrofagele sunt activate de limfochinele eliberate de celulele T și eliberează limfochine cu funcții stimulatorie ale funcției imunitare (după Roitt, 1993).

Endocitoza

Endocitoza este activitatea biologică a macrofagului, cea mai bine exprimată. Ingestia macromoleculelor dispersate în fază lichidă se numește pinocitoză (pinos, grec = a bea). Pinocitoza are loc prin invaginarea membranei, rezultatul fiind formarea unor vezicule mici (0,2 μm) și se numește micropinocitoză sau a veziculelor mai mari (până la 1-2 μm) și poartă denumirea de macropinocitoză.

Micropinocitoza este constitutivă (adică are loc în absența unui stimul declanșator din mediu) și are o rată foarte intensă. În 30 de minute se internalizează echivalentul întregii suprafețe celulare.

Macropinocitoza are o rată minimă în condiții de repaus, in vitro, dar este stimulată de serul adăugat în mediu, de complexe imune, de mucopolizaharide etc.

Endocitoza mediată de receptori este un proces specific prin care macromoleculele și antigenele particulare sunt înglobate după asocierea lor cu un receptor membranar.

Capacitatea de ingestie a macrofagului se materializează în următoarele funcții:

- funcția citocateretică, adică de epurare sau de sechestrare a celulelor senescente (de exemplu, hematii). Prin îmbătrânire, hematiile își pierd acidul sialic din glicoproteinele membranare și expun componente care sunt recunoscute de macrofag. În focarul inflamator, macrofagele curăță terenul de celulele moarte și asigură vindecarea leziunilor inflamatorii;
- funcția antixenică (clearance), adică de îndepărtare a materialelor străine, prin fagocitoză;
- funcția imună, constă în participarea macrofagului la elaborarea răspunsului imun, prin prelucrarea Ag și cooperarea cu limfocitele.

Fagocitoza

Fagocitoza este procesul de ingestie a materialelor particulate, mai mari de $0,5 \mu\text{m}$, printr-un mecanism dependent de actină și de obicei, independent de clatrină. Fagocitoza presupune aderența particulei la suprafața macrofagului și ingestia ei. La protozoare, funcția fagocitară are semnificația ingestiei nutrienților, dar la metazoare este un proces complex realizat de celule specializate: macrofage și polimorfonucleare. Funcția fagocitară a macrofagului este esențială pentru înglobarea și degradarea moleculelor nonspecific, a agenților infecțioși și a celulelor senescente. Macrofagul este o celulă esențială pentru elaborarea răspunsului imun și pentru răspunsul inflamator. Fagocitoza este foarte importantă în embriogeneză, pentru remodelarea tisulară.

Aderența semnificativă realizarea contactului fizic dintre particula străină și membrana fagocitului și este mediată de moleculele de suprafață ale particulei, de sarcinile sale electrice sau de opsoninele din umori. În funcție de mecanismul aderenței particulei străine la suprafața celulei fagocitare se disting două tipuri de fagocitoză:

- fagocitoza nemediată de receptori, condiționată în principal de forțe ionice. Astfel sunt ingerate particulele inerte (de latex, de cărbune, siliciu, azbest etc.), moleculele agregate de albumină;
- fagocitoza mediată de receptori este un proces prin care antigenele particulate sunt înglobate prin intermediul unui receptor membranar și este activă în ingestia bacteriilor.

Receptorii membranari pentru lectine, leagă nespecific componentele glucidice ale celulei nonsell. Unele lectine ale suprafeței bacteriene pot să medieze legarea specifică a bacteriilor de PMN și macrofage, în absența opsoninelor, rezultatul fiind activarea fagocitului, ingestia și digestia bacteriei. Procesul a fost denumit lectino-fagocitoză. Lectino-fagocitoza este definită ca o fagocitoză non-opsonică, bazată pe recunoașterea dintre receptorii suprafeței fagocitului și glucidele suprafeței celulei fagocitate. La nevertebrate, se crede că lectinele suprafeței fagocitelor au rol de recunoaștere a moleculelor nonsell.

Pe suprafața macrofagului se găsesc nu numai receptori de lectine, ci și lectine cu funcție endocitară, cu rol în clearance-ul glicoproteinelor plasmatică și chiar al eritrocitelor îmbătrânite sau al bacteriilor ajunse în mediul intern. De exemplu, lectina cu specificitate de manoză de pe suprafața macrofagului, are rol în apărarea antimicrobiană nespecifică. Această lectină leagă celulele infecțioase ce expun pe suprafața lor grupări cu manoză, ușurând fagocitoza și digestia lor intracelulară.

De cele mai multe ori, interacțiunea dintre fagocit și celula străină este mediată de receptori specifici pentru diferite opsonine: Ig, C, fibronectină etc. Cei mai importanți sunt receptorii pentru Fc. Receptorii pentru regiunea Fc a imunoglobulinelor aparțin la două clase: cei implicați în funcțiile efectoare și sunt activatori ai funcțiilor macrofagului și cei care transportă imunoglobulinele prin barierele epiteliale.

Fagocitele recunosc și leagă celulele opsonizate. Toate opsoninele mediază legarea celulei străine de suprafața fagocitului și stimulează ingestia sa. Fig. 100. Stadiile înglobării unui patogen ipotetic de către macrofage. Receptorii cu rol în recunoașterea fagocitară sunt FcR, CR, MFR (manoză), CHO (glucidic). FA-11 (macrosialina) este o glicoproteină pan-macrofagică, exprimată abundant în fagosomi (după Gordon, 1998).

Opsoninele. Denumirea (opsein, grec = a aduce de mâncare) semnifică o categorie diversă de molecule care au rolul de a ușura ingestia particulelor străine, funcționând ca punți de legătură între fagocit și particula nonsell. Opsonina majoră termostabilă este IgG, iar cea termolabilă este reprezentată de proteinele complementului. Cele mai importante opsonine sunt anticorpii specifici ai subclaselor IgG1 și IgG3, deoarece se leagă cu cea mai mare afinitate de receptori pentru Fc γ . Legarea anticorpului pe particula nonsell este mediată de fragmentul Fab al moleculei IgG, iar regiunea Fc interacționează cu receptorii Fc γ ai membranei fagocitului. Fagocitele umane pot exprima 3 clase de receptori Fc γ : FcRI, FcRII și FcRIII. Pentru interacțiunea dintre IgG și receptorul său este esențial ca IgG să fie localizat pe suprafața externă a particulei, pentru ca Fc să fie accesibil receptorului pentru Fc.

IgM ca atare nu are rol opsonizant, deoarece fagocitele umane nu au receptori pentru Fc al IgM. IgM fixează complementul pe calea clasică, cu mare afinitate și particulele tapetate cu IgM pot fi opsonizate cu peptidele derivate din fixarea C. Moleculele de C3b tapetează celula bacteriană, formând în jurul ei o pătură moleculară. Pentru inițierea ingestiei este necesar al II-lea semnal, transmis prin receptorii membranari ai macrofagului.

IgA favorizează fagocitoza microorganismelor și eritrocitelor. IgA activează calea alternativă a complementului și astfel capacitatea sa opsonizantă crește prin legarea proteinelor complementului la suprafața particulei.

IgE nu are proprietăți opsonizante.

Componentele opsonizante ale complementului sunt C1q, C4b, C3b, iC3b (produsul de degradare al lui C3b). Fragmentele derivate din C3 sunt cele mai importante opsonine, generate prin activarea complementului pe calea clasică sau alternativă. Produsul major al clivării lui C3 (C3b) se leagă covalent pe suprafața particulelor. *M. tuberculosis* leagă fragmentele de C3b și C3bi, care ușurează înglobarea lor în celula fagocitară. Înglobarea pe această cale reduce expunerea celulei bacteriene la compușii toxici ai O₂.

C3b este opsonizant pentru bacteriile Gram negative ce cresc în forme coloniale R, deoarece lipsesc catenele polizaharidice terminale ale LPS. LPS este activator al căii alterne. Formele coloniale S sintetizează LPS complete și după opsonizare nu sunt fagocitate. C3b este opsonizant pentru celulele eucariote și mediază interacțiunea citotoxică a macrofagului cu celula țintă.

În focarul de inflamație se sintetizează o diversitate de proteine, multe dintre ele având rol opsonizant.

Colectinele formează o familie de lectine plasmatică, cu activitate opsonizantă. Activează complementul și au rol în apărarea antiinfecțioasă. Domeniul lor lectinic mediază legarea de structurile glucidice ale suprafeței microorganismelor, iar secvențele de tip colagenic sunt implicate în legarea de receptorul de colectină al suprafeței fagocitelor.

Medicamentele induc modificări ale suprafeței bacteriilor și schimbă specificitățile opsonice ale microorganismelor. Antibioticele inhibitoare ale sintezei proteinelor sunt foarte eficiente în acest sens. Proteina M pe suprafața celulelor de *Streptococcus pyogenes* inhibă activarea

complementului. Diminuarea cantitativă a proteinei M (după tratamentul cu clindamicină și lincomicină) determină o opsonizare crescută cu C3 și o creștere a activității fagocitelor. Același efect, atribuit sintezei scăzute de proteină A, s-a constatat față de celulele de *S. aureus*.

M. leprae posedă capacitatea de a lega fibronectina, care apoi are rolul unei punți între bacterie și receptorul de fibronectină al celulei gazdă.

Faza de ingestie este condiționată de mobilitatea receptorilor membranari ai fagocitului. Vacuola formată prin invaginarea membranei, se închide asemenea unui fermoar. Dacă receptorii membranari nu sunt suficient de mobili, sau dacă particula străină nu are un număr suficient de grupări care să interacționeze cu receptorii fagocitului, ingestia nu are loc.

Ingestia este un proces activ, dependent de energie. Capacitatea unui fagocit de a ingera complexe imune (ingestie mediată de receptorii pentru Fc și C3b) se numește imunofagocitoză.

După ce s-a format, vacuola de fagocitoză este orientată spre aria perinucleară, unde fuzionează cu lizosomii și devine fagolizosom.

După ingestia unei bacterii sau a unei particule inerte există următoarele posibilități de evoluție:

- digestia
- persistența bacteriei în fagocit
- multiplicarea în celula fagocitară
- liza fagocitului și păstrarea viabilității celulei bacteriene.

Digestia corespunde situației în care celulele bacteriene, inclusiv cele patogene, sunt degradate de enzimele lizosomale, active la pH acid. Simultan sunt digerate și unele proteine membranare ale vacuolei de fagocitoză, iar receptorii membranari sunt recirculați spre suprafața celulei pentru a-și relua ciclul.

Persistența particulei ingerate are loc în două situații:

- unele fiind inerte, nu pot fi digerate (de exemplu, pulberile)

- unele bacterii patogene (*Mycobacterium*) posedă strategii de succes, care le permit să se multiplice în interiorul celulei fagocitare.

Particulele inerte (azbest, siliciu, cărbune) nu sunt atacate de echipamentul enzimatic al macrofagului și sunt păstrate mult timp. Dacă acumularea lor depășește o limită critică (în special în plămâni) se produc procese inflamatorii locale cu consecințe patologice. La mineri se cunosc afecțiuni pulmonare profesionale: antracoza, silicoza, azbestoza (stocarea pulberilor în macrofagele pulmonare). Ne fiind degradabile, acumularea excesivă a pulberilor în macrofage produce moartea celulei și eliberarea materialelor depozitate. Ciclul înglobării este reluat de alte macrofage. Macrofagul activat eliberează enzime hidrolitice. Rezultatul este reducerea progresivă a suprafeței respiratorii, ca o consecință a înlocuirii epitelului alveolar, cu țesut conjunctiv (stare patologică denumită emfizem).

Rolul macrofagului în apărarea față de bacteriile cu localizare celulară

Practic, orice celulă poate fi infectată, dar fagocitele mononucleare sunt infectate mult mai adesea, deoarece ele fagocitează bacteriile, au viață lungă și capacitate sterilizantă antibacteriană limitată. Din această cauză, fagocitele mononucleare sunt colonizate de bacterii ca *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *L. monocytogenes*.

Pe de altă parte, monocitele fagocitare sunt efectori ai apărării antibacteriene. Pentru a contracara acțiunea fagocitelor, bacteriile cu localizare intracelulară au elaborat modalități strategice care le permit supraviețuirea în mediul citoplasmatic ostil. Multiplicarea agentului infecțios este esențială pentru producerea infecției și a manifestărilor patologice. Multe bacterii patogene, cu localizare intracelulară, nu numai că se multiplică, dar unele au mecanisme specifice de a scăpa din celula gazdă și de a se disemina spre celulele vecine, chiar fără să părăsească nișa intracelulară.

Bacteriile cu localizare intracelulară au elaborat diferite strategii pentru supraviețuire:

- invazia fagocitelor neprofesioniste
- localizarea în compartimente citoplasmatiche bine delimitate
- interferența cu reactivii intermediari ai reducerii O₂
- inhibiția fuziunii fagosom-lizosom
- rezistența la enzimele lizosomale
- interferența cu maturarea fagosomilor prin inhibiția acidificării.

Fagocitele mononucleare reprezintă habitatul major pentru *M. tuberculosis* și *M. bovis*.

La interacțiunea dintre fagosom și lizosomi se descriu trei răspunsuri potențiale:

- fuziunea fagosom-lizosom, proces în care microorganismele nepatogene și patogene sunt omorâte, iar patogenii cu localizare intracelulară, supraviețuiesc și se multiplică în interiorul fagosomului (*L. monocytogenes*, *Leishmania*, *S. typhimurium*);
- absența fuziunii și agenții patogeni se multiplică în fagosomii nefuzionați (*T. gondii*, *M. tuberculosis*);
- ieșirea agentului patogen din fagosom, în citoplasmă (*T. cruzi* și posibil *M. leprae*).

Majoritatea patogenilor internalizați sau fagocitați în vezicule de origine membranară, rămân localizați în aceste structuri, dar au elaborat diferite strategii pentru a preveni acțiunea mecanismelor celulare litice și le favorizează supraviețuirea;

- unii agenți patogeni au învelișuri protectoare (capsula polizaharidică și LPS);

- enzimele bacteriene neutralizează radicalii O₂, iar enzimele proteolitice secretate, degradează proteinele lizosomale ale gazdei;

- unele bacterii patogene sunt dependente de factori ai fagolizosomului, ca semnale declanșatoare ale multiplicării intracelulare. De exemplu, *C. burnetii*, *S. typhimurium* necesită pH acid pentru a persista în mediul intracelular și pentru a iniția replicarea;

- micobacteriile patogene și *L. pneumophila* modifică fagosomul primar ori împiedică acidifierea. Ele pot fi incluse de la început în vacuola celulară, la pH neutru; *M. tuberculosis* rămâne localizat într-o vacuolă delimitată de membrană, care rezistă fuziunii cu lizosomii și de aceea se acidifică foarte puțin. Dacă fuziunea are loc, membrana vacuolară nu are ATP-ază care să pompeze protonii în vacuolă (deoarece proteinele membranei sunt înlocuite cu proteine bacteriene) și vezicula ce înconjură celulele de *Mycobacterium* nu se acidifică. Chlamidiile sunt bacterii parazite, obligat-intracelulare, care rămân într-o vacuolă neacidă, pentru că evită fuziunea cu lizosomii, în tot ciclul intracelular. Chlamidiile se diferențiază în două forme: una ce crește activ în interiorul celulei gazdă (corpul reticulat) și forma infecțioasă - corpul elementar extracelular - ce nu se divide;

- *S. typhimurium* intră în macrofag prin ondularea membranei și formarea fagosomilor spațioși, în care se diluează enzimele lizosomale ale gazdei, ceea ce favorizează supraviețuirea sa în macrofage. Alteori este posibilă inhibiția fuziunii dintre fagosom și lizosomi;

- *L. pneumophila* este înglobată printr-un mecanism special, al fagocitozei "spiralate". Bacteria rămâne în fagocitul pulmonar, în interiorul veziculei membranare multistratificate și pH-ul nu scade. Același mecanism protejează celula bacteriană și în gazda sa naturală, amoeba.

Sursa nutrienților utilizați de bacterii în interiorul vacuolei nu este cunoscută. Este posibil ca bacteriile internalizate să altereze vacuola gazdei într-o măsură suficientă, pentru ca nutrienții să difuzeze din citoplasmă, spre lumenul vacuolei. Altă posibilitate (probabil la *Chlamydia*) este ca proteine de origine bacteriană să se insere în membrana vacuolei și să aibă rol de pori, prin care difuzează nutrienții.

Câțiva patogeni intracelulari au capacitatea de a sparge vezicula de fagocitoză și rămân în citoplasmă, unde se multiplică (*L. monocytogenes*, *Shigella*). Unele specii de *Rickettsia* degradează enzimatic vezicula înconjurătoare și deplasarea lor intracelulară este orientată de componentele citoscheletului. Ieșirea în citoplasmă evită atacul mecanismelor antibacteriene și furnizează nutrienții necesari, dar este folosită de puțini patogeni. Supraviețuirea și multiplicarea lor este rezultatul unei interacțiuni echilibrate între celula gazdă și bacterie (Brett, 1997).

L. monocytogenes invadează celule fagocitare și nefagocitare. După internalizare, vacuolele sunt acidificate și circa 14% dintre celulele de *Listeria* scapă din vacuola fagocitară, prin mecanismul lizei, mediată de listeriolizina O (o hemolizină), activată la pH-ul acid al vacuolei. Bacteriile care rămân în vacuola acidă, sunt omorâte.

Adeseori, patogeneza acestor infecții nu este consecința virulenței bacteriilor, ci se datorează răspunsului imunitar al gazdei. Rolul limfocitelor T este esențial pentru reactivitatea imunitară față de acești agenți patogeni și pentru generarea manifestărilor patologice. Reacția tisulară de răspuns la infecția cu aceste bacterii este formarea granulomului. Bacteriile nu sunt eliminate complet din granuloame și din acest motiv infecția devine cronică.

Toate aceste condiții sunt îndeplinite de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, iar *L. monocytogenes* se deosebește numai prin aceea că produce infecții acute.

Salmonella, *Shigella* au doar o fază intracelulară, la tranzitul din lumenul intestinal prin celulele epiteliale (M) ale plăcii Peyer, dar răspunsul imun este predominant humoral.

Funcțiile efectoare ale macrofagului se realizează prin următoarele mecanisme:

- producerea intermediarilor reactivi ai oxigenului și ai azotului
- limitarea disponibilității Fe
- acidifierea fagosomului prin fuziunea fagosom-lizosom
- producerea defensinelor.

După ingestia particulei străine are loc o creștere bruscă a intensității respirației macrofagului. Crește consumul de glucoză și O_2 , se activează oxidaza membranală dependentă de NADP. NADP-oxidaza reduce O_2 la $O_2^{\cdot-}$ (radicalul superoxid), care este dismutat de SOD, după reacția:

O parte din H_2O_2 este descompusă sub acțiunea glutatation-peroxidazei, reacție în care glutatationul este oxidat, iar glutatation-reductaza regenerează glutatationul redus.

Fierul este un element esențial pentru supraviețuirea bacteriilor. Transferina saturată cu Fe este preluată de macrofag pe calea receptorilor specifici. Diminuarea receptorilor macrofagului pentru transferină determină scăderea intracelulară a Fe. Fe este necesar macrofagului pentru activarea mecanismelor care generează intermediarii reducerii O_2 și ai azotului, dar este și un nutrient esențial al celulei bacteriene. Competiția pentru Fe pare a fi decisivă, în raport cu care fagocitul este un efector al apărării antibacteriene sau este un mediu protector pentru celula bacteriană.

Aceste bacterii nu produc invazine. Ele sunt fagocitate de macrofage cu mare ușurință, deoarece secretă și expun la suprafață cantități mari de molecule care leagă fibronectina, ceea ce favorizează fagocitoza prin intermediul receptorilor de fibronectină. *M. tuberculosis* activează C și se tapetează cu C3, produce enzime care detoxifică intermediarii reducerii O_2 , iar NH_4^+ neutralizează pH-ul acid al vacuolei de endocitoză.

În concluzie, prin funcția fagocitară, macrofagul reprezintă ultima barieră protectoare față de infecție. Dacă această barieră este depășită, infecția se extinde și evoluează spre septicemie și generalizare.

Alte funcții ale macrofagului

Macrofagul este o celulă care exercită efecte citotoxice asupra celulelor care poartă pe suprafața lor molecule nonself (celule tumorale). Citotoxicitatea față de celulele maligne se produce prin câteva mecanisme distincte:

- citotoxicitatea mediată de limfochinele (MAF) secretate de limfocitele stimulate. MAF se leagă atât pe celulele țintă (tumorale) cât și pe macrofag;

- citotoxicitatea naturală, nespecifică, se exprimă la un nivel mai scăzut. Efectul s-a demonstrat in vitro, prin contactul macrofagelor cu celule alogene și se intensifică după stimularea nespecifică a macrofagelor cu diferiți factori chimici sau biologici;

- citotoxicitatea dependentă de anticorpi (ADCC), mediată de moleculele de imunoglobulină fixate pe celula țintă. Regiunea Fc a moleculei de Ig este recunoscută de macrofag prin intermediul receptorilor specifici. Punțile moleculare între macrofag și celula țintă favorizează un contact spațial strâns și transferul factorilor litici.

Funcția secretorie a macrofagului este la fel de importantă ca și cea fagocitară. S-au identificat circa 75 de produși de secreție, in vitro, în mediul de creștere al macrofagelor sanguine și peritoneale, cu o mare diversitate structurală și cu efecte biologice foarte diverse.

Unii produși de secreție sunt constitutivi: lizozimul, componente ale complementului. Alte produse de secreție sunt inductibile, adică se sintetizează sub acțiunea semnalelor primite de la receptorii suprafeței, activați în procesul de endocitoză, sub acțiunea endotoxinelor, a limfochinelor, a modificărilor de pH, a hidrolazelor acide, a metaboliților acidului arachidonic.

După natura și funcțiile produselor de secreție ale macrofagului, se disting următoarele categorii:

- produși enzimatici. Sunt enzime lizosomale active la pH acid, din categoria hidrolazelor: colagenaza și elastaza hidrolizează colagenul și elastina, dar și imunoglobulinele, fibronectina, fibrinogenul. Aceste enzime au rol important în patogeneza bolilor pulmonare distructive (emfizem), deoarece secreția lor crește după activarea macrofagelor. Macrofagele secretă proteina activatoare a plasminogenului la plasmină. Plasmina lizează fibrina din cheagul sanguin

care se formează la periferia focarului de inflamație. În focarul inflamator, macrofagul activat secretă arginaza. Epuizarea argininei produce inhibiția creșterii tumorale;

- produși de secreție cu rol în reacțiile de apărare. Macrofagul sintetizează și secretă lizozim (spre deosebire de granulocite care conțin lizozim dar nu-l sintetizează, iar limfocitele nici nu conțin și nici nu-l sintetizează). Nivelul seric al lizozimului este o reflectare a activității fagocitelor mononucleare. Concentrația serică și urinară a lizozimului crește în stările infecțioase. Lizozimul are efect antineoplazic prin acțiunea sa directă asupra membranei celulelor tumorale. Macrofagul sintetizează și secretă aproape toate componentele căii clasice și alterne a activării C;

- în procesul infecțios viral, macrofagul sintetizează interferon;

- proteine plasmatică. α 2-macroglobulina inhibă activitatea enzimelor proteolitice și astfel modulează efectele litice ale enzimelor lizosomale;

- proteine ale cascadei de coagulare sanguină (tromboplastina);

- proteine structurale (fibronectina, intră în alcătuirea membranei bazale);

- compuși cu efect reglator asupra altor celule: lipide bioactive (prostaglandine), factori reglatori ai răspunsului imun (IL-1);

- factorul stimulator al angiogenezei, în focarul inflamator;

Funcții metabolice ale macrofagului. Macrofagul intervine în metabolismul următoarelor categorii de substanțe:

- metabolismul Fe. Hematiile sunt distruse de macrofagele splenice, în momentul în care rezerva lor de ATP s-a epuizat. Macrofagul preia Fe din hemoglobină și îl cedează transferinei, care îl transportă la măduva osoasă. Transferina este sintetizată de macrofag:

- metabolismul lipidelor. Macrofagul captează lipidele plasmatică și le degradează sub acțiunea lipazelor proprii;

- sintetizează colesterolul, unele substanțe carotenoide;

- sintetizează un factor stimulator al diviziunii fibroblastelor și al biosintezei de colagen de către fibroblaste. Activitățile mitotică și de biosinteză ale fibroblastelor sunt foarte importante în procesul reparator tisular (vindecarea leziunii), într-un proces inflamator. Macrofagul participă în mod direct la vindecarea leziunii, prin înglobarea și distrugerea resturilor tisulare moarte, a bacteriilor, a leucocitelor nefuncționale.

Sistemul fagocitar polimorfonuclear

Polimorfonuclearele (PMN) sau granulocitele sunt celule fagocitare “profesioniste” de tip microfag, din sângele circulant. Ele se găsesc la toate organismele cu sistem circulator și au rol în eliminarea microorganismelor patogene cu localizare extracelulară. Funcția lor se suprapune parțial cu a sistemului fagocitar mononuclear. Acesta controlează microorganismele parazite cu localizare intracelulară, față de care PMN sunt ineficiente.

După caracterele tinctoriale ale granulațiilor se disting: PMN neutrofile (PMNN), eozinofile (PMNE) și bazofile (PMNB).

PMN sunt adevărate sisteme celulare de “asalt” în procesele de apărare antiinfecțioasă. Durata vieții este scurtă (câteva zeci de ore), dar numărul lor în sângele circulant este relativ constant, ceea ce denotă că producerea este reglată de necesitățile organismului. La om se distrug 5 miliarde de leucocite și 10 miliarde hematii într-o oră.

Numărul PMN în sânge este un indicator al stării de sănătate. Creșterea numărului de PMN semnifică existența unui proces infecțios în organism, dar este indiciul unei evoluții favorabile, deoarece organismul se apără prin mobilizarea rezervei de PMN medulare, care trec în circulație.

Scăderea numărului de PMN în cursul unui proces infecțios semnifică, de cele mai multe ori, incapacitatea organismului de a se apăra.

Numărul absolut al diferitelor categorii de celule în sângele circulant: Tip de celulă Număr absolut/mm³ Raportul procentual Nou născut

Hematii 5 milioane la bărbat 5-8 milioane
4,5 milioane la femeie

Leucocite

PMNN nesegmentate

PMNN segmentate

PMNE

PMNB

Limfocite

Monocite

Trombocite

5000 ñ 8000

150 ñ 400

3000 ñ 6000

50 ñ 200

15 ñ 50

1500 ñ 3000

285 ñ 300

200 000 ñ 400 000

100%

3 ñ 5%

54 ñ 62%

1 ñ 3%

0 ñ 0,75%

25 ñ 33%

3 ñ 7 %

15000 ñ 50000

7000 ñ 30000

2000 ñ 8000

Numărul total al leucocitelor este de circa $5 \times 10^3/\text{mm}^3$ sânge.

La adult, se remarcă o tendință de scădere a numărului de leucocite circulante: o scădere mai accentuată a numărului de PMNN și o diminuare ușoară a numărului de limfocite.

Creșterea numărului de leucocite se numește leucocitoză. Ea se realizează prin descărcarea în sângele circulant, a leucocitelor din măduva osoasă. Cel mai adesea, leucocitoza este însoțită de polinucleoză (creșterea numărului de PMNN), care pot ajunge la 50 000/mm³ în cursul infecției cu agenți piogeni. Numărul leucocitelor crește în cazurile de septicemie, pneumonie, flegmoane, abcese, apendicite (10-15 000 în formele ușoare, până la 50 000 în formele grave), în reumatism, în cazul tuturor distrugerilor tisulare (în infarctul miocardic). Creșterea este moderată în infecțiile dentare, amigdaliene, urinare. Numărul leucocitelor crește în neoplazii. Necroza țesutului tumoral reprezintă un stimul pentru afluxul de leucocite.

Creșterea numărului de PMNN este frecventă în infecțiile cu localizare periferică. Creșterea este rezultatul, atât al unei descărcări din depozite, cât și al hiperfuncției medulare. Hiperfuncția medulară se manifestă prin creșterea numărului de celule tinere (nsegmentate) în sânge. Pentru fiecare neutrofil circulant, în măduva osoasă se găsesc 50 ñ 100 neutrofile mature.

Arneth a stabilit proporția procentuală a neutrofilelor în funcție de numărul segmentelor nucleare. După numărul segmentelor nucleare, PMNN se împart în 5 categorii:

1(nesegm) 2 (2 segm) 3(3 segm) 4(4 segm) 5(5 segm)

5% 35% 41% 17% 2% (distribuție normală)

21% 65% 14% 0% 0% (apendicită)

Formula deviază spre stânga, cu predominanța celulelor tinere, ca semn al unei descărcări mai rapide și al hiperfuncției medulare.

În bolile parazitare (cu protozoare și viermi intestinali), în boli de piele, afecțiuni alergice, leucocitoza este însoțită de acidofilie. Leucocitoza poate fi rezultatul unor malignități hematologice (leucemii), cazuri în care predomină elementele tinere ale seriei afectate de transformarea malignă.

Scăderea numărului de leucocite (leucopenie) caracterizează infecția gripală, febra tifoidă, infecțiile grave, în care forțele de apărare ale organismului au fost paralizate. În cazurile extreme de leucopenie (agranulocitoză), numărul PMNN scade până la 200/ml, datorită epuizării potențialului producător al măduvei osoase. Sensibilitatea la infecții este foarte mare.

Diferențierea neutrofilelor

Circa 3/4 din celulele nucleate ale măduvei osoase sunt destinate producerii de leucocite, iar dintre acestea, 2/3 sunt PMNN.

Mieloblastul este primul precursor recunoscut al seriei neutrofilului. Este de două ori mai mare decât neutrofilul matur.

Promielocitul este de 2,5 ori mai mare decât neutrofilul matur. Este cea mai mare celulă din seria de maturare a neutrofilului. Din suprafața concavă a cisternelor Golgi se maturează granulațiile primare azurofile. Se numesc azurofile deoarece se colorează albastru cu colorantul Wright și primare, deoarece sunt primele care apar în timpul maturării neutrofilelor. Odată cu diviziunea promielocitului, producerea granulelor încetează și granulele se distribuie în citoplasma celulelor fiice.

Mielocitul rezultă din diviziunea promielocitului. Are aceleași dimensiuni ca și mieloblastul. În mielocit apar granulațiile specifice sau secundare. Cisternele aparatului Golgi își schimbă polaritatea și pe fața convexă se maturează aceste granulații. Se numesc granulații specifice, deoarece se găsesc numai în neutrofile și sunt secundare deoarece apar după cele primare.

Granulațiile primare (azurofile, descrise de Bainton) conțin mieloperoxidază, hidrolaze acide degradative (proteaze, fosfataze, nucleotidaze) și substanțe cu acțiune bactericidă (lizozim, lactoferină).

Granulațiile secundare (specifice ale lui Bainton) sunt mai mici, mai puțin electrono-dense și conțin fosfatază alcalină și lizozim. Nu conțin peroxidază.

Mielocitul se maturează și rezultă neutrofilul, fără diviziune celulară. În neutrofilul matur, adiacente membranei plasmatică se găsesc microfilamente (actina și miozina), ce generează forțele contractile necesare locomoției. Neutrofilul segmentat nu se divide. Cromatina este condensată, iar nucleolul lipsește. Lobulațiile caracteristice ale nucleului nu se corelează cu vârsta celulei.

La sfârșitul perioadei de maturare a neutrofilului, scade sarcina negativă de suprafață și crește gradul de deformabilitate a membranei. După maturarea celulară, un mare număr de neutrofile se depozitează în măduva osoasă. Aici se găsesc circa 90% din neutrofile. De aici neutrofilul migrează în lumenul capilar, printre celulele endoteliale.

Granulațiile specifice fuzionează foarte repede cu vacuola de fagocitoză, în timp ce aceasta este încă deschisă în spațiul extracelular. Din această cauză, peste 90% din conținutul lor se varsă în mediul extracelular. Granulațiile primare fuzionează mai târziu cu fagolizosomul. De aceea, circa 1/2 din conținutul lor se pierde, iar restul rămâne în fagolizosom.

Sisteme bactericide active în PMNN

După ingestia unui microorganism, în neutrofil se activează sistemele moleculare care omoară celula ingerată. În PMNN funcționează două sisteme bactericide: unul independent de O₂ și altul dependent de O₂. Fig. 101. Activarea neutrofilului. Contactul microorganismelor opsonizate cu receptorii de suprafață ai neutrofilului (receptori pentru Fc și C) declanșează fagocitoza, activarea NADPH-oxidazei și degranularea. În interiorul fagosomului, produsele oxidative pot interacționa cu proteinele din granule, pentru a omorî microorganismele ingerate. MPO = mieloperoxidaza (după Roos, 1998).

Sistemul bactericid independent de O₂ cuprinde o gamă largă de activități enzimatiche: hidrolaze acide, proteaze neutre, lizozim. Lor li se adaugă condiții fiziologice incompatibile cu supraviețuirea bacteriilor ingerate: mediul acid al vacuolei de fagocitoză, lipsa substanțelor nutritive.

Granulațiile neutrofilelor conțin proteine bazice (cationice), bogate în lizină, cu activitate bactericidă, denumite generic "fagocitine".

Proteazele neutre se găsesc în granulațiile azurofile și au pH optim al activității lor, în jurul valorii 7. Cea mai cunoscută este elastaza și are proprietatea de a cliva proteine foarte diverse: fibrinogen, collagen, elastină. Catepsina G face parte din aceeași categorie. Ambele au activitate bactericidă.

Hidrolazele acide, localizate în primul rând în granulațiile azurofile sunt reprezentate de catepsinele B, D, E și realizează digestia finală a proteinelor. Efectul lor se produce, în primul rând în mediul extracelular, deoarece în PMNN, digestia celulei bacteriene nu atinge etapele finale.

Lizozimul este o enzimă bactericidă din granulațiile primare și secundare ale neutrofilelor. Este o muramidază cationică mică (14,5 kD): atacă mureina din peretele bacterian, prin scindarea legăturilor glicozidice β 1-4 din catenele polizaharidice ale mureinei, dintre resturile de N-acetilglucozamină și acidul

N-acetilmuramic și rezultă dizaharide alcătuite din N-acetilglucozamină și acid N-acetilmuramic, la care se păstrează atașate catenele peptidice. După distrugerea structurii de rezistență a peretelui celular, celula bacteriană aflată într-un mediu neprotejat osmotic, se lizează. Macrofagele secretă cantități mari de lizozim și îl depozitează în granulațiile citoplasmatiche, spre deosebire de celelalte tipuri care îl secretă pe măsură ce îl sintetizează.

Lizozimul se găsește în granulațiile neutrofilelor, macrofagelor, în celulele epiteliale ale glandelor exocrine (celulele Paneth). Macrofagele secretă constitutiv lizozimul, dar rata sintezei crește în macrofagele activate. Neutrofilele și celulele Paneth depozitează lizozimul în granulațiile citoplasmatiche.

Efectul litic al lizozimului s-a evidențiat asupra peretelui celular de *Micrococcus lysodeikticus*, la care mureina reprezintă circa 80% din conținutul structurii parietale. Acțiunea lizozimului este mai puțin eficientă asupra peretelui bacteriilor Gram negative și devine posibilă după tratamentul celulelor cu un amestec generator de radicali activi (acid ascorbic, H₂O₂).

Lizozimul are efect bacteriostatic. Perturbă fenomenele de oxido-reducere bacteriană și blochează procesele de creștere și diviziune.

Mediul acid din vacuola de fagocitoză are efect bactericid. Valoarea pH scade în câteva minute, datorită producerii acidului lactic prin metabolizarea anaerobă a glucozei. La pH acid se activează hidrolazele acide din granulații.

Lactoferina este o proteină ușor bazică ($pI = 8,7$) din granulele secundare ale PMNN, sechestrează Fe^{3+} și astfel inhibă activitățile vitale bacteriene dependente de Fe, având efect bacteriostatic. Lactoferina se găsește în serul uman, în lacrimi, este abundentă în lapte și în alte secreții. S-au descris

trei variante de lactoferină: $\alpha\beta\gamma$, primele două având activitate

RN-azică. Celulele intestinale și fagocitele mononucleare au receptori pentru lactoferină, dar n-o sintetizează. Lactoferina leagă Fe, făcându-l indisponibil metabolismului bacterian. Bacteriile Gram negative, în prezența lactoferinei, eliberează LPS și devin sensibile la lizozim, ceea ce denotă că acțiunea ei se exercită asupra membranei externe a peretelui celular. Lactoferina are proprietăți microbiostatice asupra microorganismelor cu necesități mari de Fe (coliformi, levuri).

În focarul infecțios, lactoferina nesaturată este eliberată din granulațiile specifice, în mediul extracelular. Ea leagă Fe în condițiile unui pH acid, iar transferina îl leagă la un pH mai mare. Complexul lactoferină-Fe este endocitat de macrofage, pe calea receptorilor pentru lactoferină. Astfel, lactoferina produce hipoferemie localizată la focarul infecțios.

Defensinele sunt peptide mici de 3,5 kD (29-34 aminoacizi), bogate în cisteină, moderat cationice (cu 3-10 sarcini pozitive nete), cu acțiune antimicrobiană. Sunt asemănătoare unele cu altele, până la identitate, cu excepția aminoacizilor N-terminali. În PMN umane, ele formează 30-50% din totalul proteic al granulațiilor primare (azurofile). În vitro, au spectru larg de activitate față de bacteriile Gram pozitive și Gram negative, fungi (*Candida*, *Cryptococcus neoformans*), celulele maligne și față de virusurile învelite. Ele acționează formând canale în membranele artificiale și probabil în cele naturale.

Oxidul nitric (NO) rezultă prin acțiunea nitric-oxid sintazei, dependentă de dezaminarea L-argininei. NO are efecte citotoxice semnificative asupra

unui spectru larg de agenți patogeni facultativi și obligat intracelulari:

M. tuberculosis, Plasmodium, Leishmania, C. neoformans, T. gondii, M. leprae, Chlamydia trachomatis etc.

Sistemul bactericid dependent de O₂ este complex și esențial pentru funcția neutrofilelor și a macrofagelor.

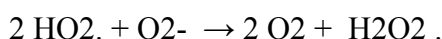
Imediat după ingestia unei bacterii, în neutrofil se produce o intensificare bruscă a respirației, o adevărată explozie a metabolismului oxidativ. O mare parte a O₂ este convertită la intermediarii reactivi ai reducerii sale, care sunt toxici pentru organismul ingerat, dar și pentru țintele extracelulare. Stimularea poate fi fizică (aderența la substrat) sau chimică, cu agenți solubili (esterii de forbol, formil-metionil-leucil-fenilalanina produsă de bacterii, C5a, Con A, LPS, LTB₄, TNF-α) sau particulați.

Sursa reducătoare pentru producerea intermediarilor reducerii O₂, pare a fi o oxidază complexă cu FAD, legată de membrana PMNN. Oxidaza se reduce preluând electronii de la o piridin-nucleotidă redusă (NADPH sau NADH) și se oxidează prin transferul electronilor la molecula de O₂: $NADPH + 2O_2 \rightarrow 2O_2^- + NADP^+ + 2H^+$

Prin reducerea parțială a O₂, rezultă intermediarii reactivi. După ce molecula de O₂ acceptă un singur electron se formează anionul superoxid (O₂⁻) (forma ionizată) sau radicalul perhidroxi (HO₂[·]).

O₂⁻ acționează fie ca reducător, fie ca oxidant. Când acționează ca reducător al unui substrat, pierde electronul suplimentar și este convertit la O₂. Când acționează ca oxidant al unui substrat, formează H₂O₂.

Cei doi radicali ai O₂, HO₂[·] și O₂⁻ interacționează într-o reacție de dismutație, în care unul se reduce iar celălalt se oxidează și rezultă O₂ și H₂O₂, după reacția: Fig. 102. În fagocite, intermediarii reactivi ai reducerii oxigenului sunt eliminați de superoxid dismutază, de glu-tation oxidază, de catalază, de taurină. HMS = șuntul hexozo-monofosfatului.



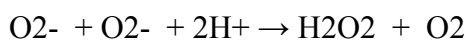
La pH alcalin predomină O₂⁻. Dismutația este catalizată de SOD.

H₂O₂ este redusă de anionul superoxid (O₂⁻), după reacția:

O₂⁻ și H₂O₂ sunt bactericide. H₂O₂ este și substrat al mieloperoxidazei (MPO), eliberată din fagolizosom. Efectul bactericid oxidativ este atribuit O₂⁻, oxigenului singlet (1O₂), H₂O₂, OH. și acidului hipocloros generat de mieloperoxidază.

1O₂ se formează după ce molecula de O₂ absoarbe energie. În molecule, în general, electronii apar în perechi stabilizate cu spini de direcție opusă. O₂ este o moleculă neobișnuită prin aceea că spinii electronilor au aceeași direcție. Absorbția energiei schimbă unul din electroni pe un orbital cu energie mai înaltă și concomitent se produce inversia spinului.

H₂O₂ este principalul produs al reducerii O₂ (dependentă de electronii rezultați din oxidarea glucozei), sau prin dismutarea HO₂. și a O₂⁻



Activitatea antibacteriană a H₂O₂ crește cu multe ordine de mărime în combinație cu mieloperoxidaza și cu un halogen. Peroxidazele se disting prin structura primară, prin grupul prostetic hem și prin halogenul necesar pentru activitatea microbicidă. Peroxidaza neutrofilelor și a monocitelor (mieloperoxidaza) se găsește în granulațiile azurofile (primare) și este descărcată în fagosom printr-un proces de degranulare, consecutiv fagocitozei.

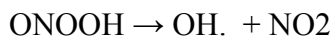
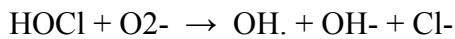
Mieloperoxidaza (neutrofil-peroxidaza = verdoperoxidaza, datorită culorii sale verzi) este o proteină bazică de 150 kD și catalizează oxidarea substraturilor donoare de H⁺ sau de electroni, de către H₂O₂.

Mieloperoxidaza, alături de H₂O₂ (agent oxidant) și de un halogen (Cl sau I) formează un sistem toxic pentru bacterii, fungi protozoare, viermi, dar și pentru eritrocite, leucocite, plachete, celule tumorale.

MPO și H₂O₂ formează un complex cu substratul, cu efect oxidant asupra halogenului și rezultă un compus oxidant (acidul hipocloros):

HOCl este oxidantul puternic, foarte toxic pentru microorganisme. HOCl poate reacționa cu diferiți compuși azotați pentru a forma monocloramine și dicloramine.

Fagocitele produc OH \cdot prin reacția O $_2^-$ cu HOCl sau cu NO:

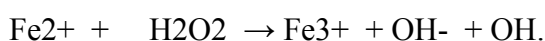


Sistemul MPO poate fi eliberat la exteriorul celulei și să devină toxic pentru microorganismele adiacente (bacterii, fungi, protozoare), pentru virusuri, pentru helminți, pentru celulele normale și maligne.

Peroxidaza eozinofilelor poate utiliza Cl, dar este mai puțin eficientă decât MPO.

Complexul MPO \bar{n} H $_2$ O $_2$ \bar{n} Iod formează un sistem de iodurare a bacteriei ingerate.

Ionul (OH $^-$) și radicalul hidroxil (OH \cdot) au efecte citotoxice puternice. Ei se formează prin interacția H $_2$ O $_2$, cu sărurile de Fe:



Când concentrația Fe este limitantă, este necesară reducerea Fe $^{3+}$ pentru formarea OH \cdot .

Fe^{3+} se reduce prin reacția $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$.

Oxigenul singlet revine la starea obișnuită cu emisiune de lumină (chemiluminiscență).

1O_2 pare să se formeze în sistemul MPO- H_2O_2 -halogen. Acest sistem emite lumină, ceea ce sugerează formarea 1O_2 în fagocite.

Leucocitul PMN este supradotat cu o gamă largă de mijloace bactericide. PMN combină mai mulți factori antibacterieni, în sisteme complexe cu o putere bactericidă superioară fiecăruia izolat. Cel mai eficace sistem bactericid este MPO + H_2O_2 + halogen. Diferitele sisteme bactericide nu au o distribuție egală la toate speciile de mamifere. La om, MPO are activitate maximă. Acțiunea predominantă a unuia sau altuia dintre sistemele bactericide depinde și de natura celulei fagocitate.

Deficiențe funcționale ale sistemului PMNN

Sistemul PMNN este esențial pentru apărarea organismului față de microorganismele infecțioase. Deficiențele sale numerice sau funcționale se răsfrâng asupra rezistenței antiinfecțioase a organismului.

Cele mai cunoscute anomalii ale sistemului PMNN sunt neutropeniile, de diferite grade. Când numărul PMNN scade sub 1000 celule/ mm^3 , riscul infecțiilor crește mult, iar în cazul unei scăderi accentuate (200 PMNN/ mm^3) nu mai există posibilitatea unui răspuns protector eficient. Neutropenia se datorează fie unei producții medulare sub nivelul normal, fie unei distrugerii periferice extensive a neutrofilelor.

Deficiențele funcționale ale neutrofilelor sunt foarte numeroase și diverse: deficiențe de aderență, de chimiotaxie, de fagocitoză, de activitate bactericidă.

Deficiențele de aderență se datorează absenței unor glicoproteine membranare (de 110 și 180 kD), ceea ce împiedică migrarea lor extravasculară. Pacienții suferă infecții bacteriene și fungice recurente.

Maladia cronică granulomatoasă este datorată mutației unei gene lincată pe cromosomul X, fiind cea mai cunoscută deficiență a activității bactericide a neutrofilelor. Capacitatea de ingestie este normală, dar omorârea bacteriilor care nu eliberează H_2O_2 (*S. aureus*, *Serratia marcescens*) este foarte mult diminuată, datorită unei defect al oxidazei respiratorii, care nu determină explozia oxidativă a fagocitului după fagocitoză.

Efectul bactericid se menține față de bacteriile care produc H_2O_2 (streptococi, lactobacili). Fagocitele acestor pacienți au un metabolism oxidativ deficitar. Ingestia nu este urmată de intensificarea metabolismului oxidativ și din această cauză nu se generează intermediarii reactivi ai reducerii O_2 . Crește incidența infecțiilor cu bacterii aerobe catalazo-pozitive, care inactivează H_2O_2 rezultată din propria lor activitate metabolică. Infecțiile cu bacterii, levuri (*Candida*), fungi filamentoși (*Aspergillus*) sunt tenace și însoțite de reacții inflamatorii ample, care evoluează în granuloame, ca o reflectare a incapacității de a inactiva chemoatracții și de a degrada antigenul. Deficiența enzimatică esențială este oxidaza care transferă electronii de la NADPH la O_2 , pentru a forma anionul O_2^- .

Maladia congenitală Chediak-Higashi se caracterizează printr-o activitate fagocitară mult diminuată a macrofagelor și a PMN, deoarece lizosomii lor nu fuzionează cu fagosomii. Din această cauză, bolnavii suferă infecții repetate cu microorganisme oportuniste.

Aceste maladii pun în evidență importanța mecanismelor de fagocitoză pentru apărarea organismului, față de infecțiile cu microorganisme oportuniste.

În concluzie, fagocitoza contribuie decisiv la rezistența organismului uman și animal față de agenții infecțioși. Aproape 80% din materialele nonself (bacterii, molecule) sunt epurate la primul pasaj al sângelui prin ficat, plămâni și splină. După ce trece de câteva ori prin aceste organe, sângele se sterilizează.

Ațiunea opsoninelor este foarte importantă pentru stimularea fagocitozei. IgM este cea mai eficientă opsonină față de bacteriile Gram negative, iar IgG are o eficiență opsonizantă de 500 până la 1000 de ori mai mică. Creșterea ratei fagocitozei complexelor imune și a particulelor tapetate cu componente ale C (C3b) este consecința prezenței receptorilor pentru Fc și pentru C3b, pe membrana fagocitelor "profesioniștilor", ceea ce le permite intensificarea specifică a activității de endocitoză. Ele se deosebesc de fagocitele "amatoare" (celulele reticulare), lipsite de astfel de receptori.

REAȚII IMUNITARE IN VIVO

De cele mai multe ori, în special în procesele infecțioase, reacțiile imunitare au o finalitate benefică, având un rol determinant în eliminarea agenților patogeni. Uneori, după contactul cu antigenele (în special moleculare), activarea funcției imunitare are rol prejudiciant, defavorabil asupra organismului, deoarece răspunsul imun se instituie drept cauză și mecanism pentru producerea diferitelor maladii (alergii, boli autoimune).

Reacțiile Ag-Ac in vivo, cu consecințe defavorabile pentru organism, fac obiectul de studiu al unui domeniu bine conturat, denumit Imunopatologie.

Activarea neadecvată a funcției imunitare determină două categorii de manifestări clinice:

a) stările de hipersensibilitate

b) maladiile autoimune

Diminuarea activității sistemului imunitar, generează o categorie specială de manifestări clinice, cunoscute sub denumirea generică de imunodeficiențe. Ele pot fi înăscute (primare) sau dobândite (secundare).

Imunopatologia studiază reactivitatea funcției imunitare în stările neoplazice, reactivitatea consecutivă transplantului de țesuturi și organe, în maladiile infecțioase virale, bacteriene, fungice și în maladiile parazitare.

1. STĂRILE (REAȚIILE) DE HIPERSENSIBILITATE

Stările de hipersensibilitate sunt reacții terțiare, consecutive reacțiilor Ag-Ac in vivo. Ele sunt o consecință a faptului că procesul de imunizare după contactul primar cu antigenul și generarea

efectorilor imunitari (anticorpi și limfocite efectoare) nu conferă totdeauna o stare favorabilă, de rezistență a organismului. Contactul primar cu antigenul creează, uneori, o stare de sensibilizare față de antigenul respectiv. Sensibilizarea este o stare fiziologică dăunătoare organismului și se manifestă, în special după contactul organismului cu antigene proteice (din ou, din ser), cu antigenele din polen și mai rar după contactul cu antigenele corpusculare (hematii de berbec). La contactul secundar cu antigenul sensibilizant, organismul răspunde prin stările patologice de hipersensibilitate.

Stările de hipersensibilitate sunt consecința unui răspuns de intensitate prea mare sau a unui răspuns imun neadecvat, care stă la originea leziunilor tisulare. Echivalentul termenului de hipersensibilitate, folosit în mod curent, este cel de alergie (allos, ergon = altă energie).

Termenul de alergie a fost introdus de von Pirquet (1906) și semnifică o reacție imunitară care se exprimă cu energie diferită de cea normală, după expunerea secundară la un antigen. Ambele denumiri se referă la o reactivitate imunitară de intensitate anormal crescută, față de un antigen. În sens științific, noțiunea de alergie include toate manifestările care decurg din reactivitatea imunitară, cu o altă energie decât cea fiziologică: reacțiile hiperergice, hipoergice și anergice.

În mod curent, alergiile se definesc ca o stare de hipersensibilitate, ce rezultă din expunerea la un alergen și se distinge prin supraproducția componentelor imunitare.

Clasificarea stărilor de hipersensibilitate

Stările de hipersensibilitate au fost clasificate în raport cu promptitudinea cu care se manifestă:

- reacțiile de hipersensibilitate imediată au o dinamică rapidă. Se declanșează în câteva secunde sau minute de la contactul secundar cu alergenul și diminuează rapid, în câteva ore, fără semne vizibile, cu excepția celor foarte grave. Țesutul suport al reacției este diferit de la o specie la alta. Aproape totdeauna va rezulta distrugerea celulei țintă. Reacțiile imediate se desfășoară în țesuturi vascularizate și, de obicei, se manifestă local, dar pot produce și efecte sistemice.

Hipersensibilitatea imediată este cea mai răspândită dezordine imunitară la om. Este cea mai frecventă maladie cronică, ce afectează circa 25% din populație în țările dezvoltate, cu severitate variabilă, de la o simplă iritare, până la periclitarea vieții;

- reacțiile de hipersensibilitate subacută sunt acelea care încep să se manifeste după 1-3 ore de la contactul secundar cu antigenul și încetează după 10-15 ore. Sunt mediate de IgG sau IgM;

- reacțiile de hipersensibilitate întârziată se evidențiază la 1-2 zile după contactul secundar cu alergenul. Persistă un interval de câteva zile, până la câteva săptămâni. Aceste reacții sunt mediate de limfocitele T și de macrofage. Nu sunt dependente de factori humorali circulanți și de aceea se pot produce și într-un țesut nevascularizat. Singura condiție este ca țesutul să fie situat în apropiere de sistemul vascular, pentru ca limfocitele și macrofagele să poată migra spre locul unde a fost injectat antigenul.

Reacțiile de hipersensibilitate imediată și întârziată se deosebesc prin următoarele trăsături:

- mecanismul inducerii (humoral sau celular)
- dinamica desfășurării în timp
- particularitățile manifestărilor patologice
- posibilitatea combaterii.

Gell și Coombs au definit 4 tipuri de reacții de hipersensibilitate:

- reacții de tip I: reacțiile de anafilaxie (anafilaxia generalizată, reacțiile de anafilaxie locală, denumite și stări atopice) : astmul bronșic alergic, febra de fân, urticaria, reacția Arthus, maladia serului).
- reacții de tip II: reacții de citotoxicitate mediate de anticorpi
- reacții de tip III: reacțiile de hipersensibilitate induse de complexe imune
- reacții de tip IV: reacțiile de hipersensibilitate întârziată, mediate de limfocitele T (reacția la tuberculină, brucelină, lepromină etc; dermatitele de contact, reacția de respingere a grefei).

Reacțiile de tip I, II și III sunt mediate de anticorpi, iar cele de tip IV sunt mediate de celule.

Dovezi pentru natura imunitară a reacțiilor de hipersensibilitate:

- reacțiile de hipersensibilitate necesită stimularea prealabilă (sensibilizarea) organismului uman sau animal cu antigenul inductor (alergenul);

- între momentul contactului cu doza sensibilizantă și momentul administrării dozei declanșatoare este necesară o perioadă de timp (5-10 zile), pentru sinteza efectorilor reacției (anticorpi) sau pentru expansiunea clonelor de limfocite. După acest interval, organismul devine sensibil la declanșarea stării de hipersensibilitate, numai la contactul cu același alergen care a creat starea de sensibilizare sau cu un antigen înrudit, care dă reacție serologică încrucișată cu alergenul inductor. Intre antigenul sensibilizant, cel declanșator și starea de hipersensibilitate este o relație specifică;

- organismele sensibilizate prezintă un răspuns imun de tip humoral sau celular. Starea de hipersensibilitate este mediată de efectorii răspunsului imun;

- reacțiile de hipersensibilitate imediată se transferă prin ser de la un organism hipersensibil la unul sănătos. Pentru ca reacția de hipersensibilitate să se manifeste, serul trebuie să se injecteze într-un țesut vascularizat. Reacțiile de hipersensibilitate întârziată se transferă prin intermediul limfocitelor viabile.

Reacțiile de hipersensibilitate imediată de tip I

Reacțiile de hipersensibilitate de tip I, denumite și reacții anafilactice au cea mai mare frecvență și se manifestă foarte diferit, atât în ceea ce privește intensitatea, cât și a organului țintă al reactivității. Fig. 115. Reprezentare schematică a particularităților de evoluție a celor patru tipuri de reacții de hipersensibilitate.

Declanșatorii

Antigenele care induc manifestările reacțiilor anafilactice se numesc alergene. Ele se găsesc în polenul unor plante, în praful de casă, în veninul insectelor sau în produse alimentare. Alergenele sunt un set de antigene, stimulatoare ale sintezei de IgE. Natura lor chimică este foarte heterogenă. Un studiu german recent, relevă că organismul uman vine în contact cu circa 14000 de substanțe chimice: unele sunt substanțe alimentare, altele sunt ingerate odată cu alimentele, fiind adăugate în procesul industrial al prelucrării. O categorie largă o formează substanțele poluante. Din punct de vedere chimic, alergenele sunt glicoproteine și polizaharide de origine vegetală sau animală sau molecule mici, cu rol de haptene.

Haptenele sunt molecule organice sau anorganice, cu greutate mică, insuficientă pentru a fi antigene, dar devin alergene după cuplarea lor cu macromoleculele tisulare. De cele mai multe ori, haptenele alergice sunt substanțe de uz farmaceutic, de 500-1000 D. După legarea covalentă ireversibilă cu proteinele serice, rezultă un conjugat haptena-proteină, cu specificitate antigenică modificată și adeseori alergic. Toate medicamentele în stare nativă, dar și derivații lor de degradare parțială pot să se comporte ca haptene și să devină alergene.

Intensitatea reacțiilor de hipersensibilitate este dependentă de calea de pătrundere în organism, de doză, de frecvența expunerii și de caracteristicile moleculare ale alergenului. Cel mai adesea, alergenele se clasifică în funcție de calea de pătrundere în organism. În raport cu calea de pătrundere a alergenilor, se disting:

- alergene inhalate

- alergene ingerate

- alergene inoculate

Alergenele inhalate sunt glicoproteine din polen, din fungi, din praful animalelor de casă. Greutatea moleculară nu depășește 50 kD, deoarece moleculele mai mari nu străbat membranele mucoase ale tractului respirator. Un alergen inhalat poate determina simptome respiratorii: rinită, astm. Crizele se produc numai în prezența alergenului. Unele alergene sunt sezoniere (polen), altele sunt perene (praful de casă).

Polenul este, din punct de vedere cantitativ, cea mai importantă sursă de alergene. Plantele din familiile Gramineae, Compozitae, Betulaceae, Fagaceae produc polen alergic. Toate polenurile alergice provin de la plante polenizate de vânt (anemofile). Ele produc cantități mult mai mari de polen decât plantele entomofile și în perioada înfloririi îl eliberează în atmosferă. Alergenele din polen sunt glicoproteine înrudite chimic și dau reacții încrucișate. Serul imun de iepure, față de un alergen din polen precipită o diversitate de alergene polenice.

Sporii fungilor se găsesc în aer, în cantitate de circa 5 ori mai mare decât granulele de polen, dar produc mai puține stări alergice. În regiunile temperate, numărul sporilor fungici este maxim în timpul verii și scade în sezonul rece. Alergiile sunt produse de sporii a peste 80 de genuri de fungi: *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*. Singura substanță alergică de origine fungică, izolată în stare pură, este penicilina.

Cantitățile de alergene care pătrund pe cale respiratorie, sunt foarte mici: sub 1 μg/an.

Reacțiile alergice la alergenele fungice apar la 30 de minute de la expunere, iar cele toxice, la 6-8 ore după ingestie. Reacțiile toxice nu au substrat imunologic. Micotoxinele au greutate moleculară mică (sub 1 kD) și pot fi eliminate din extractele de alergene fungice, prin dializă.

Cele mai multe particule inhalate (mai mari de 10 μm), ca de exemplu, polenul și sporii mari sunt depozitate în nazofaringe și sunt asociate cu manifestări locale, nazale și/sau oculare, denumite generic "febră de fân". Particulele mai mici de 10 μm (dar în special cele mai mici de 5 μm) sunt antrenate cu curentul de aer inspirat, în căile inferioare, unde reacțiile alergice tind să se manifeste sub formă de astm. Sporii fungici diferă ca dimensiuni și determină reacții alergice ale tractului respirator superior și inferior.

Alergenele ingerate se găsesc în compoziția unor alimente: în ou, ciocolată, căpșuni, cireșe, uleiul de ficat de pește, în semințele de *Glycine max* (soia), în făina unor cereale (grâu, orz), în semințele de *Arachys hypogea* (alun de pământ) etc. La copii, laptele de vacă și soia sunt cauzele majore ale reacțiilor alergice, urmate de cereale, ouă și pește. Vârsta manifestărilor este variabilă: după primele zile de viață (față de laptele de vacă), până la doi ani. La 90% din cazuri, intoleranța dispare după trei ani. Cele mai comune manifestări sunt vomă, diareea, colicile abdominale, ce apar într-un interval variabil, de la câteva minute, până la 1-2 ore după ingestie. Alergia la laptele de vacă și la pește este mai frecventă la populațiile care consumă cantități mari ale acestor produse.

Alergenele alimentare traversează lumenul intestinal, la nivelul mucoaselor digestive. Bariera mucoasei gastrointestinale este expusă la un grup heterogen de antigene. Experiențele cu

molecule marcate cu peroxidază de hrean sau cu feritină, au evidențiat că unele antigene intacte și fragmente de antigene particulare din tubul digestiv, dobândesc accesul la țesuturile limfoide ale gazdei, în special la persoanele cu deficit al sintezei de IgA. Antigenele ce ajung în contact cu structurile limfoide ale mucoaselor, stimulează răspunsul imun al gazdei.

Penetrarea antigenelor la nivelul tractului digestiv se face pe două căi:

- prin endocitoză de către celulele intestinale absorbante, la polul luminal. Se formează fagosomi, în interiorul cărora se produce digestia materialului endocitat, dar cantități mici rămân nedigerate și sunt exocitate în spațiul extracelular, la polul bazal. Stările de hipo- sau aclorhidrie favorizează tranzitul proteinelor prin mucoasa intestinală.

- pătrunderea antigenelor alimentare la nivelul celulelor epiteliale M, ce acoperă plăcile Peyer, foarte numeroase în regiunea distală a intestinului subțire. Aceste celule funcționează ca adevărate "sonde de antigen", adică au capacitatea de a îngloba antigenele derivate în special din microorganisme și într-o măsură mai mică, antigene de origine alimentară.

Celulele M reprezintă un sistem de avertizare timpurie pentru sistemul imunitar al organismului. Ele sunt acoperite de un strat subțire de mucus, au microvili scurți, dar au capacitatea de a endocita antigene luminale, prin mecanismul pinocitozei. Celulele M sunt diferențiate, conțin lizosomi și nu degradează antigenele pe care le pinocitează, dar le transferă macrofagelor din foliculii subiacenți.

Deși au evoluat ca o modalitate strategică protectoare față de antigenele luminale, totuși celulele M reprezintă poarta de intrare pentru microorganismele patogene, care la acest nivel își dobândesc accesul la țesuturile subiacente mucoasei.

Studiile electrono-optice cu molecule marcate cu peroxidază de hrean, au arătat că acestea sunt transportate din lumenul intestinal și ajung în spațiul subiacent celulelor M, unde se găsesc limfocite și macrofage. Se stimulează astfel răspunsul imun local. Structurile limfoide asociate mucoaselor constituie prima barieră de protecție față de antigenele tractului digestiv. Uneori, cantitățile relativ mari de antigene de origine bacteriană și alimentară, nu sunt anihilate local, de structurile limfoide ale mucoaselor și trec în mediul intern, ajungând la cea de a II-a barieră majoră de protecție față de antigene, care este ficatul. Circa 30% din numărul total de celule ale ficatului au capacitatea de a fagocita și epurează sângele adus de vena portă din teritoriul digestiv.

Antigenele inoculate sunt proteine din veninul de insecte, în special Hymenoptere (albină, viespe), care conține 7-10 antigene. Alergenele din venin sunt diferite forme ale fosfolipazei A. Veninul de albină conține fosfatază acidă, hialuronidază, dopamină și norepinefrină și un peptid care produce degranularea mastocitelor.

Serurile imune obținute pe diferite specii de animale (heteroantiseruri), după injectare la om, adeseori activează răspunsul imun al organismului receptor. Mulți diabetici tratați cu insulină de origine animală sau cu insulină sintetizată în celule reprogramate prin metodele ingineriei genice, sintetizează anticorpi anti-insulină.

Agenții farmacologici, administrați în scop terapeutic sau diagnostic, pot cauza o varietate de dezordini imunitare, deoarece acționează ca haptene care se cuplează cu diferite proteine tisulare, conferindu-le imunogenitate. Legarea covalentă a unui medicament ori a unui metabolit reactiv derivat prin metabolizarea lui, de o macromoleculă, creează un conjugat haptene-macromoleculă, inductoare a răspunsului imun specific. Legarea covalentă a celor două molecule se numește haptene.

Se descriu două tipuri de haptene:

- haptenele directe a celulelor (a moleculelor membranare) și a moleculelor extracelulare, sub acțiunea compușilor chimici cu reactivitate nativă (intrinsecă). De exemplu, penicilinele de semisinteză (benzil-penicilina, cefalosporinele), dar și alte medicamente se cuplează cu diferite proteine serice, formând conjugate cu funcție de alergene. Circa 10% din moleculele de penicilină injectată, se leagă covalent prin gruparea -NH_2 , de proteine plasmatică sau membranare. Celula poate lega mii de haptene β -lactamice, în câteva minute după tratament.

- haptenele indirecte a moleculelor membranare sau libere, cu derivații rezultați din catabolizarea parțială a unor molecule, care în stare nativă sunt puțin reactive sau areactive.

Metabolizarea are loc în hepatocite, cheratinocite (și în alte celule) și poate crea intermediari reactivi ce formează legături covalente cu moleculele carrier.

Uneori, catabolismul medicamentelor este concomitent cu sinteza proteică. Se produce haptenele moleculelor în cursul sintezei (haptene internă) și pot fi expuse ca antigene pe suprafața celulei.

a = inel β -lactamic

b = inel tiazolidinic

După fisiunea inelului β -lactamic rezultă gruparea peniciloil, principalul inductor al reacțiilor anafilactice la om.

Metaboliții reactivi pot fi secretați în spațiul extracelular și se leagă cu proteine extracelulare.

Unii indivizi sunt predispuși la reacțiile alergice față de diverse medicamente, în special antiinfecțioase. Dacă un individ manifestă fenomene alergice față de un compus antimicrobian, riscul alergiei față de o altă clasă de compuși farmacologici crește de 9 ori. Circa 10% dintre adulți sunt alergici față de o clasă de compuși și intră în categoria celor cu risc crescut față de alți compuși farmacologici.

Reacțiile de hipersensibilitate imediată de tip 1, induse de medicamente, se manifestă variat: anafilaxie, urticarie, angioedem.

Unele substanțe pot produce mai mult de un tip de reacție, la un organism sensibil. De exemplu, penicilina poate cauza o reacție anafilactică de tip I, o anemie hemolitică datorată reacției citotoxice de tip II, dezordini funcționale de tip III cu complexe imune sau o reacție de hipersensibilitate întârziată.

Reacțiile de hipersensibilitate apar, de cele mai multe ori, în țesuturile bogate în mastocite: tegument, mucoase, mucoasa linguală, plămân, tractul gastrointestinal.

Dacă reacția de hipersensibilitate imediată este localizată în mucoasa nazală și în conjunctiva oculară, simptomele includ rinoree, lăcrimare, strănut, congestie nazală, creșterea numărului eozinofilelor în sânge. Titrul IgE seric poate să crească sau să rămână scăzut.

Dacă reacția de hipersensibilitate imediată este localizată în bronhii, manifestarea clinică este astmul alergic, caracterizat prin scurtarea și îngreunarea respirației.

Mediatorii reacției de hipersensibilitate imediată de tip I

Reacțiile de hipersensibilitate imediată de tip 1 se datorează sintezei unor izotipuri de anticorpi cu proprietăți particulare.

Din punct de vedere funcțional, anticorpilor sunt convenționali și citofili.

Anticorpilor convenționali (Ig A, IgG, IgM) din ser se detectează in vitro, prin reacția de aglutinare, precipitare sau de fixare a complementului. In vivo, anticorpilor convenționali se combină cu antigenul și îl neutralizează. Reacțiile de hipersensibilitate de tip 1 se datorează sintezei anticorpilor citofili, cu proprietăți funcționale particulare.

Anticorpilor citofili au proprietatea de a se fixa pe suprafața unor celule care au receptori pentru regiunea Fc și în primul rând pe mastocite, dar și pe bazofile, eozinofile, macrofage. Nu produc reacții secundare de aglutinare, precipitare sau de fixare a complementului.

Anticorpilor citofili declanșatori ai reacțiilor de hipersensibilitate imediată se numesc reagine, deoarece produc modificări ale reactivității tisulare: măresc permeabilitatea vasculară prin intermediul histaminei, eliberată din mastocite. La om, reaginele majore sunt IgE și IgG4. IgE este termolabil (se inactivează la 56°C, timp de 30 de minute), iar IgG4 este termostabil. Ambele izotipuri se sintetizează după imunizări naturale. IgE nu traversează bariera placentară. Timpul de înjumătățire este de două zile.

Sinteza lor se face după mecanismul clasic: după ce alergenul vine în contact cu mucoasele (respiratorie sau digestivă), penetrează pelicula de mucus și celulele epiteliale, este fagocitat de macrofage, prelucrat și prezentat în asociație cu moleculele CMH II, limfocitelor Th. Limfocitele

Th sintetizează IL-2 care produce expansiunea clonală a limfocitelor B. Sub acțiunea stimulatorie a IL-2, limfocitele B se transformă în plasmocite ce sintetizează IgE.

La persoanele normale, sinteza IgE este supresată de limfocitele Ts, iar concentrația de IgE seric variază între 17-450 ng/ml, adică 0,002% din totalul cantității de imunoglobuline serice. La indivizii atopici (cu predispoziție genetică pentru manifestarea reacțiilor alergice), după contactul cu o doză mică de alergen, aproape totdeauna se sintetizează IgE, iar titrul seric crește de 1000 de ori. Nivelul seric crescut al IgE este o modalitate de diagnostic al stărilor alergice, dar nivelul normal al IgE nu exclude starea alergică.

IgE se sintetizează local, în structurile limfoide, la poarta de intrare a antigenului, în plasmocitele din corionul mucoasei. Excesul de IgE trece în circulație și se leagă pe receptorii pentru Fc de mare afinitate ai bazofilelor, neutrofilelor, ai celulelor endoteliului vascular, ai celulelor epiteliale alveolare pulmonare. Sângele transportă IgE la masocitele tisulare din tot organismul. IgE fixat pe celule reprezintă o proporție importantă din IgE total.

Deși IgE liber (din ser) are timpul de înjumătățire de două zile, IgE fixat pe suprafața celulelor este foarte stabil. Mastocitele rămân sensibilizate luni de zile, datorită afinității foarte înalte a receptorilor lor pentru Fc al IgE. În stare legată, IgE este protejat de atacul proteazelor.

Celulele mediatore ale reacțiilor de hipersensibilitate imediată sunt în primul rând mastocitele și bazofilele.

Bazofilele sunt celule circulante, dar pot pătrunde în focarul inflamator. Mastocitele sunt celule mononucleate și au două localizări principale:

- în țesutul conjunctiv, în special în jurul vaselor sanguine din ficat, rinichi, splină;

- în mucoasele digestive și cea respiratorie.

În creierul uman sunt două surse de histamină: mastocitele și neuronii histamiergici. Mastocitele se găsesc în zonele cele mai vascularizate (eminența mediană, glanda pineală, meninge) și controlează circulația sângelui și permeabilitatea vaselor SNC. Neuronii histaminergici sunt limitați exclusiv la nivelul nucleului tuberomamilar din hipotalamusul posterior. Colateralele

axonale se proiectează în toate zonele cortexului. Astfel, sistemul histaminergic central controlează activitatea întregului creier.

Localizarea strategică a mastocitelor se corelează cu alterările patologice care se produc la nivel vascular gastrointestinal, bronșic, cutanat, cerebral, ocular.

În citoplasma bazofilelor și mastocitelor, la microscopul electronic se observă granule electronodense, ce reprezintă până la 40% din volumul celular. Ele conțin mediatori preformați, cei mai importanți fiind aminele biogene (histamina și serotonina).

Mastocitele conțin histamină (amina tisulară), detectată inițial în tegument. In vivo, histamina se sintetizează prin decarboxilarea histidinei, reacție catalizată de histidin-decarboxilază (o enzimă citoplasmatică) și este depozitată în granule. O celulă umană conține 2-3 pg de histamină.

Histamina este larg distribuită în țesuturile organismului uman. La om, neuronii histaminergici ai SNC reprezintă o sursă nemastocitară de histamină. Histamina acționează asupra unei varietăți largi de tipuri celulare: celule musculare netede, neuroni, celule endocrine, exocrine, celule sanguine, celulele sistemului imunitar. Efectele variate se produc prin receptori distincți: H1, H2, H3.

Serotonina (5-hidroxi-triptamina) se formează prin decarboxilarea moleculei de triptofan hidroxilat. Mastocitele umane nu conțin serotonină. Serotonina s-a izolat inițial din ser (tonina din ser), deoarece are efect vasoconstrictor. Produce edem și are rol important în reacțiile anafilactice.

Histidina Histamina Serotonina (5-hidroxi-triptamina)

Mecanismul celular și molecular al reacțiilor de hipersensibilitate imediată de tip I

Reacțiile de hipersensibilitate imediată de tip 1 se desfășoară în mai multe stadii.

Faza I a este legarea anticorpilor citofili (IgE, care s-a sintetizat după contactul primar cu antigenul), de receptorii pentru Fc ϵ ai mastocitelor locale. Alți factori activatori ai mastocitelor sunt:

- alergenul specific sau unul înrudit cu cel inductor al sintezei IgE;
- diferite lectine
- anticorpi anti-IgE, anticorpi anti-idiotipici, anticorpi anti-receptor Fc ϵ ;

Fig. 116. Activarea mastocitelor este mediată de legarea încrucișată a receptorului Fc ϵ . Aceasta poate fi realizată de legarea antigenului de IgE fixat pe receptorii pentru Fc ϵ , de anticorpii bivalenți care recunosc determinanții izo-tipici ai regiunii Fc a IgE, de anticorpii anti-idiotipici ai regiunii Fab ai IgE, de anticorpii anti-receptor care se fixează direct pe receptorul pentru Fc ϵ , de dimerii bivalenți de IgE obținuți cu agenți chimici de polimerizare sau de lectinele care se leagă de resturile glu-cidice ale IgE. Antigenele și anticorpii monovalenți nu activează mastocitele, deoa-rece nu realizează legarea încrucișată a receptorilor (după Roitt, 1993).

- neuropeptide endogene, fapt care explică alergia determinată de stimularea sistemului nervos
- anafilatoxinele C3a și C5a
- peptidele bacteriene ce conțin formil-metionină
- agenți fizici (de exemplu, temperatura scăzută)
- diferite medicamente.

În faza a II-a se produce activarea mastocitelor și degranularea lor.

Alergenul declanșator trebuie să fie multivalent pentru a lega încrucișat două molecule de IgE fixate pe celula efectoră. După legarea încrucișată a receptorilor pentru Fc ε, membrana granulelor fuzionează cu membrana citoplasmatică și eliberează conținutul. Fig. 117. Alți stimuli activatori ai mastocitelor. Anafilatoxinele C3a, C5a sau substanțele medica-mentoase (ionoforii de Ca²⁺, codeina, morfina, ACTH sintetic) activează mastocitele pe o cale directă. Toate aceste substanțe induc pătrun-derea Ca²⁺ în mastocit, declanșatoare a fenome-nelor biochimice care duc la degranularea și eliberarea mediatorilor.

Eliberarea mediatorilor preformați

- histamina

- triptaza - activează C3

- heparina

Moleculele de IgE pot fi legate încrucișat de lectine (PHA, Con A), prin asocierea lor cu resturile glucidice ale regiunii Fc. Astfel se explică urticaria produsă de căpșuni și cireșe, care conțin cantități mari de lectine.

Stimulul activator al mastocitelor este transmis prin receptorii pentru IgE. Activarea se datorează legării încrucișate a două situsuri Fab, printr-o moleculă de alergen. Mastocitele au și receptori pentru Fc , care leagă IgG cu afinitate mult mai mică. Degranularea mastocitelor

este precedată de influxul masiv de Ca^{2+} . Granulele pline cu mediatori preformați, migrează la periferia celulei, fuzionează cu membrana externă și eliberează conținutul: histamina, proteaze neutre (triptază, chimază, carboxipeptidază), proteoglicani (heparina, condroitin-sulfatul). Fig. 118. Inducerea și mecanismele efectoare ale hipersensibilității de tip I. Prelucrarea antigenului se face la nivelul mucoaselor. Reexpunerea la alergen declanșează degranularea mastocitelor și producerea mediatorilor ce determină simptome alergice (după Mirakian, 1998).

Triptaza (prezentă în mastocite, dar absentă în bazofile) produce constricția mușchilor netezi ai bronhiilor, iar chimaza stimulează secreția mucoasei bronșice.

Proteoglicanii din granulele mastocitelor au rol în împachetarea mediatorilor preformați în granule.

Heparina este proteoglicanul predominant în mastocitele pulmonare umane. Mastocitul este singura sursă endogenă de heparină la om și la rozătoare. Heparina are efect anticoagulant.

Mastocitele conțin SOD și peroxidază.

Degranularea activează o lipază care mobilizează acidul arachidonic din membrana mastocitului. Prin metabolizarea acestuia se sintetizează mediatori noi ai reacției de hipersensibilitate imediată. Astfel, din acidul arachidonic, pe calea lipooxigenazei se sintetizează leucotriene, iar pe calea ciclooxigenazei se formează prostaglandine și tromboxan.

Efectele mediatorilor mastocitari

Manifestările reacțiilor alergice, inclusiv alergia respiratorie, pot să se producă în două faze:

în faza timpurie, care se desfășoară în câteva minute, datorită eliberării mediatorilor preformați;

în faza tardivă se produce la 3-4 ore după expunerea la alergen, datorită infiltratului celular, ca răspuns la mediatorii fazei timpurii.

În prima etapă, acțiunea histaminei constă în contracția mușchilor netezi ai tractului respirator și digestiv. Histamina produce constricția celulelor endoteliale și crește permeabilitatea vaselor mici. Același efect îl are serotonina. Prin constricția celulelor endoteliale și creșterea permeabilității capilare, se produce edemul tisular.

În etapa a II-a, histamina produce dilatarea vaselor periferice și rezultatul este scăderea brutală a tensiunii arteriale. Șocul hipotensiv este una din manifestările dramatice ale anafilaxiei generalizate.

Alți mediatori ai fazei a II-a sunt chininele. Ele se formează din chininogenul plasmatic și sunt polipeptide mici:

• metionilchinina (Met-Lys-Arg-(Pro)₂-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg)

• bradichinina (Arg-(Pro)₂-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg)

• calidina (lisil-bradichinina): Lys-Arg-(Pro)₂-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg.

Chininogenul este alcătuit din 11 aminoacizi și (acid sialic)_n, la una sau la ambele extremități. Este o α -globulină (2 mg/ml ser).

Chininele au efect vasodilatator și măresc permeabilitatea capilară, producând edem.

În faza a III-a se sintetizează alți mediatori, care întrețin în timp diferitele efecte inițiate de mediatorii eliberați din mastocite, prin efectul chimiotactic față de celulele sanguine:

ECF (eozinofil-chemotactic factor) determină afluxul de eozinofile

NCF (neutrofil-chemotactic factor)

PAF (factorul activator al plachetelor).

Leucotrienele (LC4, LD4, LB4, LE4) determină contracția de durată a mușchilor netezi, edem al mucoaselor și stimularea secreției lor.

Exemple de reacții de hipersensibilitate de tip I

Prima reacție de hipersensibilitate imediată a fost descrisă de Prausnitz și Kustner.

Reacțiile de hipersensibilitate imediată pot să se producă la orice organism al unei specii și se numesc reacții anafilactice sau se manifestă numai la anumiți indivizi predispuși genetic și se numesc atopii (stări atopice).

Reacțiile anafilactice (ana = opus; phylaxis = protecție) se caracterizează printr-o dinamică explozivă a manifestărilor, în decurs de 3-4 minute. Clinic, termenul de anafilaxie semnifică sindromul care rezultă din eliberarea unor mediatori preformați și generați de novo în mastocite, care determină o stare opusă celei de protecție. Manifestările clinice ale reacțiilor de hipersensibilitate sunt dependente de calea de pătrundere a alergenului și de cantitatea de histamină eliberată. Reacțiile cutanate medii, cu eritem, urticarie, prurit, dureri de cap, sunt asociate cu un nivel scăzut al histaminei plasmatice (sub 1 ng/ml).

Dacă alergenul este injectat intravenos, răspunsul este sistemic, adică are loc o anafilaxie generalizată, care poate duce la șoc vascular hipotensiv și asfixie secundară prin constricție bronșică și laringiană. Dacă sfârșitul nu este letal, recuperarea funcțională se poate face într-o oră. Șocul vascular se datorează ieșirii plasmei în spațiul extravascular, rezultând scăderea volumului sanguin. Scăderea debitului cardiac duce la hipoxie și acidifierea mediului intern, antrenând și insuficiența respiratorie.

Dacă alergenul este injectat în piele, reacția este limitată la locul injecției și se numește anafilaxie cutanată, însoțită de eritem (urticarie), angioedem, edem laringian, bronhoconstricție, hipotensiune, aritmie cardiacă.

Anafilaxia generalizată (sistemică) este forma cea mai gravă a hipersensibilității imediate. Mult timp s-a considerat că anafilaxia generalizată este o manifestare patologică, indusă numai în

condiții experimentale la animalele de laborator. În realitate, atât la om cât și la animale se produc ambele tipuri de reacții anafilactice, atât generalizate, cât și locale.

Prima reacție de anafilaxie generalizată a fost descrisă la câine. În 1902, Richét și Portier studiau biologia meduzelor și toxicitatea extractelor apoase și glicerinate din celenterate, asupra mamiferelor. Administrate în doze mari, extractele produc moartea imediată a câinelui, datorită șocului toxic, dar dozele mici sunt suportate. O injecție secundară la câteva săptămâni mai târziu, produce o reacție anafilactică generalizată, cu paralizia mușchilor respiratori și șocul fatal. Instalarea stării de șoc este accelerată de injectarea intravenoasă a dozei secundare. La autopsie se observă edemul mucoasei intestinale, a țesutului pulmonar, congestia ficatului.

La cobai, anafilaxia se induce prin injectarea intravenoasă a unei doze mici (1mg) de albumină serică bovină. La 8 zile după injectarea dozei sensibilizante, animalul devine sensibil la șocul anafilactic și are sensibilitate maximă la 21 de zile. Doza declanșatoare a șocului este mai mare. Răspunsul anafilactic este prompt și manifestările încep în primele zeci de secunde: piloerecție dorsală, agitație motorie, strănut, tuse zgomotoasă, cianozarea mucoaselor, pierderea reflexelor de micțiune și defecație, blocaj respirator, convulsie, moarte. Tabloul acestor modificări patologice se succede în câteva minute. Mușchii netezi bronșici ai cobaiului sunt foarte sensibili la histamină și bronhoconstricția fatală este caracteristica anafilaxiei la această specie.

Reacțiile anafilactice generalizate la om se manifestă în primul rând față de alimente și se exteriorizează prin urticarie generalizată. Urticaria afectează 15-23% din populație. Suportul manifestărilor patologice care însoțesc aceste reacții, este tegumentul.

Anafilaxia generalizată la om, este declanșată și de alți factori: penicilină, aloseruri, heteroseruri, veninul insectelor (albină, viespe) și se manifestă prin urticarie generalizată, spasmul mușchilor bronșici, edem laringian, dispnee severă, cianoză, șoc hipotensiv. Intensitatea manifestărilor este dependentă de gradul de sensibilitate. Sensibilitatea alergică a pacienților variază în limita a circa 1/1000.

Răspunsul sistemic cu reacții tegumentare generalizate, tulburări gastrointestinale, tahicardie, aritmie cardiacă, hipotensiune medie, este asociat cu creșterea concentrației plasmatice a histaminei peste nivelul de bază. Reacția amplă care periclitează viața, cu hipotensiune severă, fibrilație ventriculară, spasmul mușchilor bronșici, stop cardiac și respirator, este asociată cu nivelul crescut al histaminei, de 12 ng/ml. La om, histamina are efect vasodilatator asupra vaselor periferice, cu scăderea presiunii vasculare.

Hipersensibilitatea imediată la penicilină produce circa 500 decese/an/glob. Reacția este declanșată de penicilina nativă sau de derivații rezultați din degradarea ei (acidul peniciloic, acidul penicilenic).

Anticorpul anti-penicilină aparține izotipurilor IgE și IgG4 și se găsește chiar în serul persoanelor netratate cu penicilină. Probabil că sinteza lor a

fost indusă de penicilina din carne. Originea penicilinei este în masa miceliană de la fabricile de antibiotice, care se adaugă în hrana animalelor, ca stimulator al creșterii.

Alergenele inhalate produc manifestări locale, la poarta de intrare.

Reacții atopice. Termenul de atopie definește stările de hipersensibilitate imediată cu substrat ereditar, limitate la om. Stările atopice se manifestă la 10-20% din populație, sub forme variate.

Reacțiile atopice au un tablou clinic mai simplu și se produc atunci când reacția alergenului cu anticorpul specific are loc pe suprafața unei mucoase sau în epiteliul tegumentar.

Rinita alergică sau febra de fân este forma cea mai simplă a atopiei și se manifestă prin secreție abundentă a glandelor epiteliului nazal, iar astmul bronșic, prin contractia mușchilor căilor respiratorii. Cele două forme extreme de manifestări alergice sunt determinate de alergenele inhalate, care se găsesc în polen, în praful de casă (ce conține alergene de acarieni), în părul animalelor. Foarte răspândite sunt alergiile la polenul de Ambrozia, o plantă care răspândește o cantitate mare de polen (100 kg/plantă/an). Grăuncioarele de polen vin în contact cu mucoasa nazală și respiratorie, cu conjunctiva oculară și determină o stare de sensibilizare a aparatului respirator. Reexpunerea la polen în sezonul următor, declanșează reacția alergică, cu următoarele manifestări: eritemul conjunctivei oculare, edemul mucoasei nazale și secreția apoasă abundentă, strănut.

Intensitatea simptomelor depinde de nivelul cantitativ al expunerii la polen, dar și de reactivitatea organismului. Există situații grave, inexplicabile, cu crize ample, după o expunere minimală.

Dacă rinita are caracter sezonier sau este dependentă de condițiile de mediu, aproape sigur are caracter alergic. Rinita alergică perenă se datorează contactului cu praful de casă și de animale.

Mecanismul rinitei alergice este diferit de al altor manifestări alergice. În primul rând, există diferențe funcționale între mastocitele mucoaselor și ale țesutului conjunctiv. Mastocitele mucoasei nazale (denumite MCT) conțin histamină și triptază, iar după stimularea alergenă, se degrează, dar concentrația plasmatică a histaminei nu se modifică. Mediatorii mastocitari produc o hiperemie a mucoasei nazale, edem și transudarea lichidă. Inflamația nazală se datorează transudării, în care albumina este un marker mult mai stabil decât mediatorii din categoria citochinelor. Fig. 119. Mecanismul rinitei alergice (după Frankland, 1998).

În al II-lea rând, manifestările rinitei sunt dependente de particularitățile unice ale vascularizației nazale, conferite de țesutul venos erectil. Variațiile volumului sanguin din țesutul venos erectil reglează rezistența tractului nazal la coloana de aer. Umplerea cu sânge a acestui țesut produce congestia mucoasei. Curgerea sângelui este controlată de fibrele nervoase vegetative. Inervația simpatică este vasoconstrictoare și diminuează fluxul sanguin, iar tonusul simpatic are activitate ciclică. De aceea, mucoasa nazală are o perioadă de repaus la fiecare 2-4 ore, iar căile nazale se pot obtura alternativ.

Faza primară a rinitei (strănut, rinoree, obstrucție nazală) este dependentă de histamina din mastocite, de leucotriene și prostaglandine, iar faza tardivă (obstrucție nazală amplă prin hiperreactivitate și anosmie) este dependentă de bazofile.

Astmul alergic, o variantă complexă a reacțiilor atopice, este o maladie cronică inflamatorie a plămânului, cu o prevalență crescândă a morbidității și mortalității în ultimele două decenii. Deși s-a considerat că este o boală a mușchilor netezi ai căilor respiratorii, în ultima decadă s-a acceptat că astmul este, în primul rând, o boală inflamatorie. Structural, căile aeriene ale astmaticilor se caracterizează prin inflamație cronică, cu infiltrarea intensă a mucoasei bronșice, cu limfocite, eozinofile și mastocite, cu descuamarea epitelului, hiperplazia celulelor mucoase, îngroșarea submucoasei. Aceste modificări se asociază cu manifestările clinice, care includ obstrucția căilor aeriene și hiperreactivitatea căilor aeriene.

Astmul bronșic alergic are determinism multifactorial, atopia (predispoziția genetică de a sintetiza IgE ca răspuns la aeroalergenele comune) fiind cel mai comun factor predispozant. După expuneri repetate la doze mici de alergene, indivizii atopici sintetizează IgE. Expunerea secundară la alergene inițiază răspunsul imun humoral. Evenimentele reacției alergice, consecutive expunerii la alergen, se desfășoară în două faze: faza timpurie, de ordinul minutelor, constă în răspunsul bronhospastic și faza tardivă, de ordinul orelor, ce constă în răspunsul inflamator.

Răspunsul rapid se caracterizează prin edemul mucoasei, creșterea tonusului mușchilor netezi și îngustarea căilor respiratorii, asociată cu degranularea mastocitelor. Manifestările astmatice imediate sunt dependente de eliberarea histaminei din mastocite. Pacienții cu astm alergic au o concentrație de IgE de 6 ori mai mare decât astmaticii nealergici, ceea ce confirmă relația dintre concentrația IgE și starea patologică.

Unii astmatici alergici dezvoltă răspunsul de fază tardivă, la 3-6 ore după stimularea cu alergenul, care, în absența terapiei, poate să persiste câteva zile. Răspunsul tardiv, este asociat cu migrarea eozinofilelor, dar și a neutrofilelor și limfocitelor din sânge, în parenchimul pulmonar. Limfocitele TCD4 au rol esențial în patogeneza astmului. În plămânul astmatic, alergenul este înglobat, prelucrat și prezentat de macrofagul alveolar, de celulele epiteliale ale mucoasei și de celulele dendritice. Limfocitele Th-2 secretă IL-4, 5, 6, 9, 10, 13, stimulatoare ale sintezei de IgE.

Alergiile la alimente formează o categorie de stări atopice foarte comune la copii și se manifestă față de alergene din lapte, ouă, ulei de pește, ciocolată, căpșuni, cireșe, portocale. Manifestările reacțiilor alergice la alimente pot fi locale sau generalizate.

Reacțiile alergice locale se caracterizează prin erupții urticariene (pustule eritematoase) la nivelul mucoasei bucale, însoțite uneori de tulburări digestive (colici abdominale, diaree). La vârsta adultă, subiecții vor manifesta reacții alergice respiratorii.

Nu toate urticariile tegumentare sunt determinate de reacții alergice. Urticaria neimună de contact poate fi declanșată de agenți chimici (salicilați, sulfiți, acidul benzoic, acidul sorbic, acidul nicotinic și esterii săi din alimente, din guma de mestecat, din șampoane, din parfum, din unguente) sau de agenți fizici (traumatisme, frigul). Aceștia stimulează eliberarea factorilor chimici inductori ai urticariei. Mecanismele ei nu se cunosc, dar efectele se manifestă asupra endoteliului vascular. Simptomele sunt arsura, usturimea, pruritul, edemul și eritemul.

Urticaria este acută sau cronică. Cea cronică se manifestă prin apariția zilnică sau aproape zilnică a leziunilor tegumentare, pentru un interval de cel puțin 6 săptămâni, cauzată de stimuli fizici.

În toate cazurile de urticarie, imună sau neimună, pe tegument apar leziuni eritematoase (macule) și edematoase, însoțite de prurit. Urticaria implică dermul superficial.

Leziunea cutanată eruptivă este datorată creșterii permeabilității capilarelor și dilatării venulelor. Plasma părăsește patul vascular și determină formarea pustulei tegumentare pruriginoase,

înconjurată de o zonă de culoare roșie intensă. Lichidul veziculelor eruptive este infiltrat cu limfocite și PMNN. Eruptia tegumentară dispare la 24-48 ore, fără urme în cazul reacțiilor acute sau persistă mai multe zile la cele cronice.

În manifestările cu angioedem, edemul se extinde subcutan sau submucos și leziunile pustulare sunt mai mari și pot să dureze 72 de ore. Se manifestă la nivelul buzelor, limbii, pleoapelor, dar poate fi afectată orice zonă corporală.

Pseudoalergii. Simptomele clinice ale alergiilor (urticarie, rinită, astm, șocul anafilactic) apar adeseori din cauze nealergice. Numărul lor depășește pe acela al alergiilor. Iată principalele cauze:

- histamina se găsește în cantități mari în unele alimente și activează mediatorii specifici ai reacțiilor alergice;
- histidina din alimente este precursorul histaminei;
- tiramina de origine alimentară determină dureri de cap pulsatile și hipertensiune;
- feniletilamina produce migrenă;
- benzoatul de origine alimentară și din acidul benzoic produce astm și rinită;
- bisulfitul de sodiu, bioxidul de sulf și metabisulfii (conservanți) produc simptome ale tractului gastrointestinal, distrug vitaminele B, produc dureri de cap, astm;
- glutamatul monosodic (agent de aromatizare) produce astm;
- coloranții alimentari (în special culoarea galbenă) produc astm și alte reacții alergice;
- aspirina induce astm, urticarie, angioedem (Girard, 1998).

Testarea stărilor atopice

Pentru prevenirea accidentelor provocate de reacțiile de hipersensibilitate imediată, în clinică, înainte de administrarea unor medicamente, se testează eventualele manifestări de hipersensibilitate.

O problemă esențială pentru diagnosticul și tratamentul alergiilor, este gradul înalt de variabilitate biochimică a alergenelor, de la un lot la altul. Preparatele de alergene sunt foarte heterogene, iar cantitatea de alergen specific, din cele mai multe extracte comerciale, variază de la câteva procente până la 50% din proteina totală. Extractele sunt amestecuri complexe, cu cantități variabile de alergene majore, alergene minore și proteine irelevante. Extractele fungice conțin proteine, glucide, enzime proteolitice, enzime glicolitice, în cantități variabile. De aceea, efortul major s-a orientat în direcția clonării alergenelor de importanță clinică majoră. Majoritatea alergenelor s-a clonat și unele sunt disponibile la un nivel moderat sau chiar înalt de puritate. Disponibilitatea preparatelor antigenice omogene, cu puritate și activitate biologică definite, va avea un impact major asupra diagnosticului și probabil, asupra terapiei dezordinilor alergice.

Multe alergene, în special cele de natură proteică, se prezintă într-o multitudine de izoforme naturale. Ele sunt rezultatul variației alelice a numeroaselor proteine vegetale și fungice, foarte asemănătoare ca secvență a aminoacizilor, dar au proprietăți distincte de combinare cu anticorpii sau de activare a clonelor de limfocite T specifice.

Existența numeroaselor izoforme ale aceleiași molecule de alergen, este probabil, asociată cu grade diferite de recunoaștere a epitopilor săi, de către limfocitelor T și B și, ca o consecință, cu grade diferite de sensibilitate. Ca dovadă, anticorpii de la diferiți pacienți alergici, leagă numai unele izoforme ale alergenului.

Preparatele de alergene pentru diagnostic sunt heterogene și derivă din surse naturale care conțin majoritatea sau toate izoformele de alergen. Inlocuirea acestor alergene cu cele clonate, pentru diagnostic, va rezolva unele probleme, dar va crea altele. Unii cercetători apreciază că majoritatea indivizilor răspund la un număr limitat de epitopi ai oricărui alergen. De aceea se consideră că un număr mic de alergene (circa 40) ar putea să fie suficiente pentru a identifica majoritatea indivizilor alergici.

Testele cutanate constau în injectarea subcutană a alergenelor la diferite diluții. La organismul alergic, reacția de hipersensibilitate se manifestă în câteva minute, prin apariția la locul injectării, a unei reacții inflamatorii pruriginoase, înconjurată de o zonă mai extinsă de eritem. Reacția de hipersensibilitate la proteinele salive de țânțar are același aspect. Alergenul injectat (sau inoculat) se leagă specific de IgE fixat pe mastocitele din piele. Mastocitele eliberează histamina în câteva minute, cauzând edemul localizat, eritem (vasodilatație) și prurit. Leziunile locale ale reacției de hipersensibilitate imediată se reproduc prin injectarea unei cantități mici de histamină.

Determinarea cantitativă a IgE seric al pacientului, rămâne cel mai bun criteriu de diagnostic. IgE se dozează prin metoda RIA:

- alergenul (de exemplu, penicilina) se fixează pe suportul inert (dextran);
- proba de ser de cercetat se pune în contact cu alergenul fixat pe suport. IgE din ser se fixează pe alergenul imobilizat;
- se adaugă ser imun de iepure, care conține IgG marcat radioactiv, anti-IgE uman;
- se măsoară indirect cantitatea de IgE fixată pe suport, prin măsurarea cantității de IgG radioactiv legat specific.

Combaterea stărilor de hipersensibilitate imediată de tip I se face prin evitarea alergenelor, prin terapie medicamentoasă și prin imunoterapie.

Măsurile de evitare a alergenelor sunt ideale pentru prevenirea reacțiilor: evitarea alimentelor, medicamentelor, controlul prafului de casă, evitarea contactului cu animalele al căror praf este alergic, combaterea mucegaiului din încăperile locuite.

Medicamentele antihistaminice au efect antagonic față de histamină, deoarece intră în competiție cu receptorii pentru histamină ai celulelor țintă. Astfel, se poate bloca creșterea permeabilității vasculare, vasodilatația, contracția mușchilor bronhiilor și ai mucoasei gastrointestinale. Rinita alergică necesită terapie antihistaminică locală. Cromoglicatul de sodiu protejează pacienții astmatici. Teofilina(o metilxantină) relaxează mușchii netezi bronșici.

Imunoterapia sau hiposensibilizarea constă în administrarea planificată a alergenului la un pacient pentru a diminua sinteza IgE. Rinita alergică, astmul bronșic și anafilaxia la veninul de insecte pot răspunde la această terapie. Alergenul este injectat săptămânal, în doze gradat crescânde. După o creștere inițială a IgE circulant, se produce declinul. Locul IgE este luat de IgG care fixează alergenul și-l împiedică să stimuleze mastocitele, blocând reacția alergică.

1 Atopia definește o stare de hipersensibilitate imediată locală, ce se manifestă la persoane cu predispoziție ereditară.

Reacțiile de hipersensibilitate de tip II

Reacțiile de hipersensibilitate de tip II sunt de tip citotoxic, dependente de anticorpi și sunt consecința acțiunii fagocitelor asupra celulelor nucleate, după opsonizarea lor prealabilă cu anticorpi sau cu componente ale complementului.

Diferitele izotipuri de anticorpi variază în ceea ce privește posibilitatea lor de a iniția aceste reacții, în funcție de capacitatea de a lega C1q sau de a interacționa cu receptorii pentru regiunea Fc, ai celulelor efectoare. Mediatorii reacțiilor de hipersensibilitate de tip II sunt IgG, IgM, și componentele complementului (C3), care se leagă specific de antigenele celulare sau tisulare.

Consecința legării anticorpilor, este apariția leziunilor, limitate la celulele sau țesuturile care expun antigenele. În general, anticorpii specifici față de antigenele suprafeței celulelor proprii, produc efecte defavorabile iar cei specifici față de antigenele intracelulare sunt inofensivi.

În reacțiile de hipersensibilitate imediată de tip citotoxic, anticorpii specifici față de antigenele suprafeței celulare cooperează cu componentele complementului și cu celulele efectoare.

Celulele efectoare sunt macrofagele, neutrofilele, eozinofilele, celulele NK. Toate au receptori pentru regiunea Fc a Ig și receptori pentru C3. Legarea anticorpilor prin intermediul receptorului pentru Fc, stimulează fagocitele să producă leucotriene și prostaglandine, implicate în răspunsul inflamator.

Mecanismul prin care celulele efectoare atacă celulele țintă este același prin care ele sunt active față de agenții infecțioși. Agenții patogeni sunt înglobați în fagolizosom, unde, de cele mai multe

ori, virusurile sunt inactivate iar celulele sunt omorâte sub acțiunea intermediarilor reducerii O₂, a enzimelor lizosomale, a pH acid.

În reacția de hipersensibilitate imediată de tip citotoxic, ținta celulară este prea mare pentru a fi fagocitată și de aceea, conținutul granulațiilor și al lizosomilor citoplasmatici este eliberat la contactul cu celula sensibilizată, prin exocitoză. Fig. 120. Fagocitoza "frustă" are rol în producerea leziunilor tisulare, în reacția de hiper-sensibilitate imediată de tip II (jos) și este prezentată comparativ cu funcția fagocitară normală a neutrofilelor (sus).

Exocitoza conținutului enzimatic al fagocitelor are efect benefic, dacă ținta este un parazit, dar este defavorabilă dacă ținta este țesutul propriu, care a fost sensibilizat în prealabil de anticorpi.

Alți efectori ai hipersensibilității citotoxice mediate de anticorpi, sunt celulele K. Ele au receptori de mare afinitate pentru regiunea Fc și produc efecte citotoxice.

Declanșatorii reacțiilor de hipersensibilitate imediată de tip citotoxic sunt aloantigenele.

Reacțiile citotoxice dependente de anticorpi sunt consecutive aloimunizării, adică au loc după contactul cu antigenele unui organism al aceleiași specii, dar cu o altă variantă alelică a moleculelor CMH.

Aloimunizarea survine în următoarele situații:

- transfuzii de sânge izogrup

- aloimunizarea feto-maternă în cazurile de incompatibilitate Rh

- în transplantul de țesuturi și organe.

Aloimunizarea post-transfuzională

Într-o transfuzie heterogrup, incompatibilă în sistemul ABO, reacția de aglutinare este imediată, deoarece receptorul posedă aglutinine preformate față de hematiile transfuzate. Aglutininele α și β aparțin clasei IgM. Ele produc aglutinarea rapidă, activarea cascadei complementului și hemoliza intravasculară.

Transfuzia izogrup produce aloimunizarea, deoarece în interiorul aceluiași grup eritrocitar din sistemul ABO, există diferențe antigenice mai fine ale glicoproteinelor suprafeței eritrocitare, care induc sinteza IgG în organismul receptor. Circa 8% dintre receptorii politransfuzati se imunizează față de antigenele eritrocitare de izogrup sanguin și circa 25% se imunizează față de antigenul HLA al leucocitelor. Se sintetizează anticorpi ai izotipului IgG. IgG declanșează mecanismele hipersensibilității de tip citotoxic și eritrocitele transfuzate sunt lizate.

Reacțiile post-transfuzionale izogrup se manifestă, uneori, chiar imediat după prima transfuzie, deoarece sunt mediate de anticorpi preexistenți, care s-au sintetizat față de antigenele bacteriene ce dau reacție încrucișată cu antigenele eritrocitare. Alteori, reacțiile de hipersensibilitate se manifestă la câteva zile sau chiar săptămâni după transfuzie, interval necesar sintezei anticorpilor. Reacțiile de hemoliză produc icter și anemie. Icterul se datorează hemolizei masive, care poate produce necroza acută a tubilor renali, sub acțiunea hemoglobinei.

Reacțiile post-transfuzionale orientate față de antigenele plachetare și leucocitare, au consecințe mai puțin grave.

Aloimunizarea fetomaternă în incompatibilitatea Rh[3]

În timpul sarcinii, dar în special în timpul expulziei fătului, hematiile fetale pot traversa placenta și intra în circulația maternă. În cazul incompatibilității Rh (mama Rh- și fătul Rh+, de origine paternă), organismul matern se imunizează cu antigenul Rh al hematiilor fătului și se sintetizează anticorpi. S-au detectat două clase de anticorpi: IgM, care determină aglutinarea eritrocitelor Rh+; IgG, fără efect aglutinant. Din punct de vedere clinic, IgG anti D are o importanță mai mare, deoarece traversează placenta.

Antigenul Rh este o glicoproteină, ancorată în stratul lipidic membranal. Imunizarea maternă cu antigenul Rh se produce atât în timpul sarcinii, dar mai ales la naștere, când eritrocitele fetale, prin ruperea vaselor trec în circulația maternă. IgG traversează placenta și se fixează pe eritrocitele fetale, cauzând distrugerea lor prin mecanismul hipersensibilității de tip citotoxic, adică anticorpii față de componentele celulare stimulează fagocitoza hematiilor prin aderența

opsonică sau distrugerea are loc prin activarea complementului și hemoliză. Consecința este anemia, icterul, edemul. Situația patologică se poate preveni prin administrarea organismului matern, imediat după naștere, a gama-globulinei anti-Rh (anti-D), care elimină celulele fetale Rh+ intrate în circulația maternă și protejează următoarea sarcină Rh+.

Imunizarea Rh este mult mai puțin frecventă decât incompatibilitatea materno-fetală Rh, din următoarele cauze: transferul placentar al hematiilor fetale poate să nu aibă loc; 30% dintre femeile Rh⁻ nu răspund la stimularea cu o cantitate mică de hematii Rh⁺, iar un procent mic nu răspunde nici după stimulare cu 50 ml de hematii Rh⁺; fătul poate fi incompatibil cu organismul matern în sistemul ABO. De exemplu, pentru mama cu grup O și fătul cu grup A sau B, hemaglutininele materne α și β (IgM) elimină celulele fetale înainte ca ele să stimuleze sinteza anticorpilor anti Rh.

Anticorpii anti D se pot detecta folosind Ig de iepure anti-Ig umană, care leagă încrucișat IgG anti-D, în prezența unui amestec de ser, cu albumină serică bovină, care reduce sarcina suprafeței eritrocitelor, ușurând aglutinarea.

Un primitor de sânge Rh- poate sintetiza anticorpi anti-D, dacă este transfuzat cu sânge RhDu. O gravidă RhDu se poate imuniza anti-D, dacă eritrocitele fetale sunt Rh+ cu antigen complet. De aceea, orice gravidă, Rh+Du este considerată Rh- și este testată pentru prezența anticorpilor anti-Rh.

În transfuzie, persoanele Rh+Du se consideră ca fiind Rh-, în cazul în care sunt receptoare și Rh+, dacă sunt donoare de sânge.

Anemia hemolitică indusă de medicamente (imunoalergică)

Unele reacții imunitare față de celulele sanguine (eritrocite, plachete) se pot manifesta ca o consecință a uzului de medicamente. Reacția este orientată față de molecula nativă sau față de un derivat rezultat din degradarea sa. Astfel de reacții imunoalergice sunt produse de penicilină, chinină, sulfamide etc.

Anemiile hemolitice imunoalergice se datorează modificării specificității antigenice a unor molecule ale suprafeței eritrocitare, sub acțiunea unor medicamente care acționează ca haptene. Pentru ca un medicament să fie imunogenic, este necesar ca molecula nativă sau un metabolit al său, să se cupleze cu o moleculă proteică in vivo. Antibioticele β -lactamice sunt un exemplu de molecule cu proprietăți de haptene. Ele formează legături covalente cu proteinele, datorită ruperii spontane a inelului β -lactamic și datorită producerii spontane a grupării peniciloil cu reactivitate chimică crescută. La doze mari de antibiotic, moleculele proteice ale organismului sunt modificate, după legarea moleculelor β -lactamice. Conjugatul antibiotic-proteină este inductor al sintezei IgM și IgG și rezultatul este hemoliza.

Alte medicamente care generează reacții imunitare, în absența sintezei anticorpilor sunt sulfonamidele. Ele produc metaboliți care se leagă preferențial cu anumite proteine. Grupul enzimelor cu citocrom P450 este ținta legării metaboliților sulfonamidei. Proteina alterată generează un peptid care se asociază cu complexul CMH al celulei, devenind ținta atacului limfocitelor T.

Mecanismele moleculare ale inducerii reacțiilor hemolitice imunoalergice sunt ipotetice. Reacția autoimună se datorează modificării specificității antigenice a unor molecule ale suprafeței eritrocitare, sub acțiunea unor medicamente care după ce se adsorb pe suprafața hematiei, acționează ca haptene, fie în stare nativă, fie după generarea unui intermediar reactiv. Se formează conjugate haptena-proteine eritrocitare, în care haptena are rol de epitop stimulator al răspunsului imun. Alteori, molecula legată necovalent, acționează prin modificarea conformației native a proteinei. Noul epitop stimulează limfocitele TCD4, care activează limfocitele B. Se sintetizează anticorpi cu specificitate foarte largă: anticorpi anti-haptena care se leagă cu conjugatul, anticorpi care reacționează cu proteinele membranare în absența haptenei. După fixarea complementului se produce hemoliza. Fig. 121. Reacția de hipersensibilitate de tip II, indusă de medicamente. Molecula nativă sau un produs al metabolismului său, se poate lega de membrana eritocitară sau de o proteină plasmatică pentru a forma un complex care se leagă de membrana eritocitară sau alterează proteina membranară. Se sintetizează auto-anticorpi în IgG sau IgM în care se fixează pe complex și activează complementul, producând liza eritrocitului.

Medicamentele se pot complexa cu proteine plasmatică și formează conjugate haptena-proteine, inductoare ale sintezei anticorpilor specifici. Se formează complexe imune, care se adsorb pe hematii și ulterior se produce liza.

Un anumit medicament poate produce o varietate de fenomene patologice, la diferiți pacienți: hemoliza, trombocitopenia, neutropenia sau combinații ale acestor fenomene.

Anemia hemolitică indusă de medicamente este divizată în 4 grupe patofiziologice majore:

- hemoliza de tip haptenic apare la pacienții expuși la doze mari de penicilină (10-20 milioane de unități/zi). Moleculele de penicilină sau derivații săi activi se cuplează cu glicoproteinele suprafeței eritrocitului și au rolul de haptene. Conjugatele stimulează răspunsul imun cu sinteză de IgG. Diagnosticul se poate stabili prin incubarea serului pacientului cu eritrocitele de la un donor normal, preincubate cu penicilină. IgG se fixează pe suprafața eritrocitelor tapetate cu penicilină și se detectează prin testul antiglobulinic (testul Coombs direct). Același tip de hemoliză este indus de cefalosporine;

- hemoliza de tip quinidinic. Quinidina sau derivații săi se fixează pe proteine plasmatice sau de membrana eritocitară și au rolul de haptene. Se sintetizează IgM antiquinidină, se activează calea clasică a complementului și C3 se depune pe suprafața eritrocitului;

- hemoliza indusă de α -metildopa. O proporție mare (25%) dintre pacienții tratați cu α -metildopa devin pozitivi pentru testul Coombs. Se sintetizează IgG specific față de antigenul Rh. Hemoliza survine la mai puțin de 1% dintre pacienții tratați cu α -metildopa;

- hemoliza indusă de cefalotină este rară. Antibioticul se fixează pe membrana eritrocitului și astfel celula se tapetează cu diferite proteine plasmatice. Se sintetizează IgG și testul antiglobulinic este pozitiv.

Majoritatea pacienților cu anemie imunolergică au un titru scăzut al IgG și hemoliza are un nivel scăzut. Tratamentul cu glucocorticoizi are efecte benefice, deoarece diminuează sinteza de IgG, determină eluția IgG de pe suprafața eritrocitelor și interferează cu receptorii macrofagelor pentru Fc γ , ceea ce prelungește perioada de supraviețuire a eritrocitelor.

Respingerea acută a grefelor de țesuturi și organe, ca o consecință a citotoxicității, va fi discutată ulterior.

Reacțiile citotoxice mediate de anticorpi specifici față de antigenele tisulare sunt consecutive maladiilor autoimune.

Unele maladii autoimune sunt însoțite de sinteza anticorpilor anti-membrană bazală. Regiunea Fc a anticorpilor fixați, este recunoscută de PMNN, care își revarsă conținutul enzimatic și

produc leziuni tisulare. Acțiunea PMNN este frustră, deoarece ele nu pot fagocita o țintă tisulară de dimensiuni mari.

Reacțiile de hipersensibilitate imediată de tip III

Hipersensibilitatea imediată de tip III este dependentă de complexe imune și este consecința formării și persistenței complexelor imune în organism.

In vivo, complexe imune se formează de fiecare dată când anticorpii întâlnesc antigenul specific. De obicei, complexe imune sunt epurate (eliminate din circulație) de celulele SFM, iar persistența lor produce manifestări patologice (reacții de hipersensibilitate).

Complexe imune in vivo se formează în următoarele trei situații:

- în infecțiile cronice cu streptococ α -hemolitic, cu stafilococ, cu Plasmodium, cu virusurile hepatitice B și C, cu HIV. În toate aceste cazuri, antigenele persistă timp îndelungat. Se sintetizează anticorpi specifici și se formează complexe imune, care eventual se depun în țesuturi;

- complexe imune pot fi rezultatul proceselor patologice autoimune. Sinteza continuă a anticorpilor față de componentele self modificate, determină formarea complexelor imune, care nu pot fi eliminate în ritmul formării și se depun;

- complexe imune se pot forma cu antigenele exogene, care nu se multiplică în organism, dar pătrund în mod repetat, în cantitate mare. Astfel, antigenele vegetale, bacteriene (din actinomicete), fungice sau antigene de origine animală, după inhalarea repetată în plămân, induc sinteza locală a anticorpilor și formarea complexelor imune.

Complexe imune interacționează cu celulele sistemului imunitar (macrofage, limfocite), producând activarea sau inactivarea lor. Un alt efect major este stimularea rețelei citochinelor.

Proteinele plasmatice C1q, C4b, C3b, factorul H sau anticorpii anti-IgG (factorul reumatoid), anticorpii anti-idiotipici și anti-fibronectină măresc dimensiunile complexelor imune.

Complexele imune sunt structuri tridimensionale ce formează o rețea moleculară alcătuită din antigen și anticorpii specifici, ale cărei dimensiuni variază în funcție de dimensiunile antigenului, de densitatea epitopilor imunogenici, de izotipul anticorpilor, de multi- sau monospecificitatea anticorpilor, de afinitatea lor.

Pentru demonstrarea complexelor imune in vivo, în ser sau în alte lichide ale organismului, în care antigenul nu este cunoscut, pot fi urmate două căi: 1) estimarea cantitativă a complexelor imune, cu caracterizarea izotipului de imunoglobulină din complex și componentul complementului, utilizând teste screening convenționale; 2) analiza specificității anticorpilor și a antigenului complexat.

Testele screening rapide pentru detectarea complexelor imune se bazează pe capacitatea complexelor imune de a interacționa cu receptorii naturali, humoral și celulari. O tehnică clasică este testul legării C1q, bazat pe capacitatea complexelor imune de a interacționa cu domeniul globular al lui C1q. C1q purificat, radiomarcant, se leagă cu complexe imune și ansamblul rezultat se detectează prin metoda excluderii dimensionale cu PEG. O variantă tehnică mai simplă constă în amestecul unei concentrații mici de PEG, cu efect precipitant asupra complexelor macromoleculare și analiza ulterioară a precipitatului. AMC specifici față de C1q imobilizați pe suport, pot fi utilizați pentru a capta C1q, fixat pe complexe imune in vivo, cu evidențierea ulterioară a imunoglobulinei din complex.

Altă metodă pentru detectarea complexelor imune pe o fază solidă, constă în utilizarea conglutininei sau a factorilor reumatoizi, pentru captarea complementului legat cu complexe imune. Conglutinina este o proteină din serul normal de bovine, cu proprietatea de a lega componentele complementului.

Complexele imune se pot detecta pe calea utilizării interacțiunii lor cu receptorul Fc de pe suprafața macrofagelor sau plachetelor. Testul cel mai folosit se bazează pe folosirea receptorilor pentru C3bi de pe suprafața celulelor limfoblastoide transformate in vitro. Testul inhibiției rozetelor EAC (eritrocite-anticorpi-complement) măsoară gradul inhibiției formării rozetelor, de către complexe imune, dintre o subpopulație de limfocite B circulante și eritrocitele tapetate cu C3.

Epurarea complexelor imune și cauzele persistenței lor în organism

Complexele imune persistă în organism, datorită incapacității organismului de a le elimina. Rata eliminării este dependentă de mai

mulți factori:

- dimensiunile complexelor imune
- disponibilitatea proteinelor complementului
- izotipul anticorpilor.

Complexele Ag-Ac de dimensiuni mari sunt eliminate în câteva minute după ce s-au format, iar cele de dimensiuni mici circulă timp îndelungat. Orice factor care influențează dimensiunile complexelor imune, influențează rata clearance-ului. Anticorpilor față de antigenele self au adeseori, afinitate mică, ceea ce înseamnă formarea complexelor imune mici, cu persistență îndelungată. În excesul antigenic, caracteristic infecțiilor cronice sau maladiilor autoimune, situsurile de legare ale anticorpilor se saturează și se formează, de asemenea, complexe imune de dimensiuni mici.

Fig. 122. Formarea complexelor imune. Dimensiunile complexelor imune sunt dependente de valența anti-genului și anticorpilor. a. În excesul de anticorpi, epitopii sunt saturați și se formează complexe mici. b. La concentrații echivalente se formează o rețea care aglutinează sau precipită antigenul. c. În excesul de antigen, paratopii anticorpilor se saturează și complexe imune sunt mici. d. Cu un antigen monovalent nu se produc legături încrucișate și reacția secundară nu este vizibilă.

Complexele imune ce se formează în mediul intern sau pătrund în circulație, trebuie să ajungă în organele care conțin celulele fixe ale sistemului fagocitar mononuclear. Cea mai mare parte a complexelor imune se leagă pe receptorii de suprafață ai celulelor circulante, prin intermediul cărora sunt transportate în compartimentul în care vor fi reținute de macrofagele fixe.

Complexele imune sunt legate pe receptorii celulelor din compartimentul de transport. Celulele transportoare ale complexelor imune sunt eritrocitele. Complexele imune opsonizate cu C3b sunt rapid epurate din circulație, după ce se fixează pe receptorul pentru C3b de pe suprafața eritrocitelor (receptorul CR 1). Complexele imune mari sunt mai eficiente în legarea C3b și astfel sunt mai ușor recunoscute de receptorul eritrocitar. Receptorul eritrocitar pentru C3b se găsește numai la primate. Neprimatale au receptor pentru C3b, numai pe plachete. Pe suprafața unui eritrocit sunt 50-1000 de receptori. Sunt mobili și gruparea lor în zone membranare distincte (patch), permite legarea complexelor imune, cu mare aviditate. Rolul complementului în medierea legării complexelor imune a fost sugerat de observația că serul inactivat la 55°C nu mediază legarea, iar tratamentul prealabil al serului cu factorul veninului de cobră a avut același efect, ceea ce denotă rolul lui C3.

Receptorii pentru C3 ai neutrofilului sunt mult mai numeroși (până la 50000), dar rolul esențial în transportul complexelor imune revine eritrocitelor, datorită preponderenței lor numerice.

În capilare, eritrocitele circulă în curentul axial al coloanei de sânge și nu vin în contact cu celulele endoteliale. Contactul eritrocitelor cu endoteliul se produce în sinusoidale ficatului și splinei, dar și la situsurile la care curgerea sângelui devine turbionară (punctele de ramificație arterială). În sinusoidale ficatului și splinei, eritrocitele se descarcă de complexe imune. Tot aici sunt reținute eritrocitele îmbătrânite. Complementul este foarte important, deoarece mediază legarea complexelor imune, de macrofagele din sinusoidale splenice și hepatice. Insuficiența cantitativă a complementului diminuează clearance-ul splenic, iar consecința este inițierea reacțiilor mediate de complexe imune.

Complexele imune neopsonizate cu C3b pot fi rapid captate de ficat prin receptorii pentru Fc, dar ulterior se eliberează și se depun în tegument, rinichi, articulații, unde produc reacții inflamatorii.

Persistența complexelor imune este influențată de izotipul anticorpilor. Complexele cu IgG sunt eliminate mai eficient, iar cele cu IgA persistă și se depun.

Deficiențele funcției fagocitelor sistemului mononuclear, datorate supraîncărcării, sunt asociate cu creșterea nivelului complexelor imune circulante.

Depozitarea. Incapacitatea sistemului de transport eritrocitar sau disfuncția diferitelor etape de prelucrare a complexelor imune în sistemul fagocitar mononuclear, poate duce la persistența complexelor imune în circulație și depunerea lor în țesuturi: tegument, articulații, rinichi,

plămân, retină. Depunerea este favorizată de creșterea permeabilității vasculare. Rinichiul este organul de elecție al depunerii complexelor imune, factorul favorizant fiind presiunea sanguină de 4 ori mai mare în glomerulii vasculari, comparativ cu celelalte capilare. Dar cele mai severe leziuni se produc la situsurile unde circulația sângelui produce curgere turbionară: la bifurcația arterelor și în filtrele vasculare (plexurile coroide, corpul ciliar).

Depunerea preferențială a complexelor imune (în rinichi, articulații, tegument) este determinată de natura antigenului din complexele imune. Complexele imune cu ADN se asociază cu membrana bazală a capilarelor (renale, tegumentare)

Persistența îndelungată a complexelor imune la locul depunerii favorizează denaturarea IgG.

IgG denaturat induce sinteza auto-anticorpilor \bar{n} IgM anti-IgG, care poartă denumirea de factor reumatoid (FR). Factorul reumatoid se sintetizează in situ (în articulații), în plasmocitele din membrana sinovială.

Maladii determinate de complexe imune

Maladia pulmonară a fermierilor este indusă de complexe imune cu anticorpi specifici față de antigenele actinomicetelor. Actinomicetele se dezvoltă abundent pe suprafața materialelor vegetale. Sporii actinomicetelor termofile, inhalați odată cu praful, sunt principalii agenți inductori ai maladiei. Serul pacienților, in vitro, precipită antigenele de actinomicete.

Maladia pulmonară a crescătorilor de păsări este datorată complexelor imune formate in vivo cu antigene aviare. Prin expunerea repetată la antigenele aviare, se sintetizează IgG și se formează complexe imune. Pneumopatiile sunt produse de antigenele de la porumbei, papagali etc. Antigenele de la puii de găină induc sinteza anticorpilor precipitanți, dar nu produc pneumopatii, deoarece complexe imune nu persistă în organism.

Modelul experimental al maladiei cu complexe imune

Fenomenul Arthus este procesul de necroză tisulară, ca o consecință a formării complexelor imune in vivo, într-un teritoriu delimitat. Este o reacție de inflamație acută, indusă în tegumentul de iepure, prin injectarea repetată, în același loc, a serului de cal, consecutivă modificărilor vasculare și de aceea, reacția se produce numai în teritorii vascularizate. Este o reacție anafilactică locală, în interiorul vaselor și în jurul pereților vasculari. Fenomenul Arthus se evidențiază ușor, la nivelul tegumentului.

Fenomenul se induce prin injectarea repetată la iepure, subcutan sau intradermic, a serului de cal, la interval de o săptămână, până când în sânge se realizează un titru ridicat al IgG anti-proteine heterologe de cal.

După primele 2-3 injecții săptămânale de antigen, nu se observă modificări tisulare. După a 3-a sau a 4-a injecție, la circa 30 de minute, local, apare un edem eritematos moderat care persistă câteva ore. După injecțiile următoare de antigen, edemul este tot mai extins și mai persistent. După 6-7 injecții, se produce necroza locală a țesutului.

Fenomenul Arthus este o reacție de hipersensibilitate locală, caracterizată prin necroză dermică, la locul unde se injectează repetat, același antigen. Se sintetizează un titru crescut de anticorpi circulanți, iar antigenul este în exces în spațiul extravascular. Se formează complexe imune solubile, datorită excesului de antigen.

Din punct de vedere histopatologic, fenomenul Arthus este o reacție inflamatorie clasică. La locul injectării, inițial se produce un edem eritematos, curgerea sângelui fiind îngreunată. În lumenul vascular se formează trombi plachetari și leucocitari, datorită aderenței plachetelor și leucocitelor de celulele endoteliale: circulația sângelui se întrerupe și zona se necrozează.

Mecanismul celular și molecular al fenomenului Arthus. La locul injectării repetate a antigenului se formează complexe Ag-Ac, cu IgG și IgM. Complexele imune se formează extravascular, cu anticorpii aduși pe cale circulatorie, care trec în spațiul extravascular, datorită creșterii permeabilității vasculare. Complexele imune se depun pe membrana bazală a capilarului. Se activează cascada complementară și se eliberează C3a și C5a. Anafilatoxinele măresc permeabilitatea vasculară, dar sunt și factori atractanți pentru leucocite (PMNN).

C3a și C5a activează mastocitele, din care se eliberează histamina. Se sintetizează leucotriene și, alături de histamină, măresc permeabilitatea vasculară și determină aflux de PMNN în spațiul extravascular. Fig. 123. Fenomenul Arthus. Antigenul injectat pe cale intradermică se leagă cu anticorpii circulanți specifici și formează complexe imune. Complexele activează complementul și activează plachetele, care eliberează aminele vasoactive. Fragmentele C3a și C5a ale complementului provoacă o retracție a celulelor endoteliale, degranularea mastocitelor și atragerea polinuclearelor spre situsul de reacție. Produsele eliberate de mastocite, în special histamina și leucotrienele, induc creșterea debitului sanguin și a permeabilității capilare. Reacția inflamatorie este amplificată de enzimele lizosomale eliberate de polinucleare. C3b opsonizează complexe imune și ușurează fagocitarea lor (după Roitt, 1984).

Din mastocite se eliberează factorul de agregare plachetară (PAF), iar din plachete se eliberează amine vasoactive. PMNN extravasculare descarcă conținutul enzimatic și lezează peretele capilar.

Injectarea intradermică a antigenelor fungice sau de actinomicete, la indivizii cu aspergiloză pulmonară și respectiv la cei cu plămân de fermier, produce reacții de hipersensibilitate de tip Arthus.

Ca mecanism intim, fenomenul Arthus este o reacție de hipersensibilitate imediată, deoarece complexe Ag-Ac se formează foarte repede, dar manifestarea fenomenului (eritem și edem) este tardivă.

Fenomenul Arthus poate fi transferat pasiv la animale neimunizate, astfel:

- prin injectarea intravenoasă a serului de la un organism la care s-a indus fenomenul Arthus, urmată imediat de injectarea intradermică a antigenului declanșator;

- prin injectarea intradermică a antigenului, urmată de injectarea intravenoasă a serului, obținut de la un organism imunizat față de antigenul specific.

Modelul clinic al maladiei cu complexe imune

Maladia serului este un fenomen Arthus generalizat, provocat artificial, ca o consecință a utilizării terapeutice a unui ser imun heterolog.

Serurile imune sunt preparate pe diferite animale (cal, berbec, capră, iepure), în institutele de profil. În perioada 1920-1940, înaintea introducerii antibioticelor în terapia anti-infecțioasă, serurile imune s-au folosit pe scară largă, pentru a conferi imunitate pasivă față de un agent patogen sau o toxină a acestuia.

După un interval variabil, primitorii de ser prezintă un sindrom caracteristic, denumit boala serului: febră, adenopatie (creșterea volumului ganglionar), splenomegalie, eritem și urticarie tegumentară, proteinurie, uremie.

În primele 6 zile după administrarea serului heterolog, nivelul proteinelor serice heterologe din ser scade foarte lent. Începând din ziua a 8-a, nivelul lor scade mai rapid, deoarece proteinele străine încep să fie eliminate prin formarea complexelor imune. După 10 zile de la administrarea serului heterolog (de cal), antigenul liber dispare din circulație. Proteinele serice heterologe sunt imunogene și induc sinteza anticorpilor, cu care formează complexe imune, în excesul de antigen. Odată cu formarea complexelor imune, apar și semnele maladiei serice.

La om, maladia serului se prezintă modificat, ori de câte ori se repetă injecțiile de ser. Manifestările clinice iau aspectul unei reacții anamnestice generalizate (reacție de hipersensibilitate imediată).

Se descriu trei tipuri de reacții:

- reacția de tip imediat se desfășoară în 24 de ore, chiar cu necroză tisulară la locul injectării serului. Se manifestă la persoanele la care reinjecția de ser se face la 12-18 zile de la prima injecție de ser heterolog;

- reacția de tip accelerat, cu incubare de 2-6 zile, la persoanele la care reinjecția de ser heterolog survine la 2-6 luni de la prima injecție. Reacția locală (la locul injectării serului) este foarte puternică. Moartea poate să survină prin colaps vasomotor;

- o reacție după dinamica răspunsului imun primar, la 20-25 de zile, se manifestă după administrarea unei singure injecții de ser heterolog și se produce la 50% dintre indivizi.

Mecanismul manifestărilor patologice ale maladiei serului, rezidă în acțiunea complexelor imune asupra vaselor sanguine. În sânge se formează complexe Ag-Ac, care se depozitează lent în vasele mici (capilare), între endoteliul vascular și membrana bazală, mai ales în ansele glomerulare renale.

Tipul de leziuni renale este dependent de dimensiunile complexelor imune. În condițiile excesului de antigen, complexele imune sunt mici și se depozitează în spațiul subepitelial, complexele mari se depun subendotelial.

Complexele depozitate activează complementul și determină eliberarea anafilatoxinelor C3a și C5a, care produc degranularea mastocitelor și bazofilelor. Crește permeabilitatea vasculară și sunt atrase neutrofilele. Ele ingeră complexele imune și eliberează enzimele lizosomale, care lizează celulele endoteliului vascular și intensifică reacția inflamatorie. Proteinuria însoțește leziunea glomerulară.

Pentru depistarea predispoziției la accidente serice de hipersensibilitate față de serul de cal se utilizează diferite teste:

- proba oftalmică constă în depunerea unei picături de ser heterolog diluat 1/10, pe conjunctiva primitorului de ser. La persoanele hipersensibile, în 30 de minute apare un eritem intens și edem;

- proba cutanată constă în injectarea intradermică a cantității de 0,1 ml ser heterolog diluat 1/10. La hipersensibili, la locul injectării, apare o reacție imediată, în 20-30 de minute, cu erupție urticariană, înconjurată de o zonă de eritem. Reacția dispăre în 30-60 de minute. Dacă este intensă, reacția durează 6-12 ore.

Din cauza reacțiilor de hipersensibilitate de tipul maladiei serului, seroterapia trebuie să utilizeze seruri omologe.

Maladia serului se induce experimental, la iepure, prin injectarea intravenoasă a albuminei serice bovine. Se sintetizează anticorpi specifici, care leagă antigenul în exces. Complexele imune, neputând fi eliminate cu o rată egală cu cea a formării, se depozitează pe membrana bazală a glomerulilor renali și în peretele vaselor mici. Complexele imune fixează complementul și se eliberează lent histamina din bazofile.

Reacțiile de hipersensibilitate de tip IV (Hipersensibilitatea întârziată)

Hipersensibilitatea întârziată cuprinde toate reacțiile care, după clasificarea lui Coombs și Gell (1963), necesită mai mult de 12 ore pentru a deveni evidente.

Reacțiile de hipersensibilitate întârziată au următoarele particularități:

- apariția lor este lentă și atinge amplitudinea maximă la 24-72 de ore de la contactul secundar cu antigenul;
- reacția de hipersensibilitate întârziată nu afectează un anumit organ țintă, ci este o stare cu răsunet sistemic, cu simptome generalizate, ceea ce o deosebește de reacțiile de hipersensibilitate imediată;
- în reacțiile de hipersensibilitate întârziată nu se produce liză celulară, cu excepția cazurilor grave;
- reacțiile de hipersensibilitate întârziată nu sunt dependente de factorii humoralii (anticorpi) și de aceea nu se transferă prin intermediul serului. Sunt dependente de limfocitele T sensibilizate și se transferă prin suspensia celulară din exudatul inflamator (exudat peritoneal), bogat în limfocite și macrofage;

- nefiind dependentă de molecule proteice circulante, reacțiile de hiper-sensibilitate întârziată se manifestă în țesuturile vascularizate și nevascularizate.

Declanșatorii reacțiilor de hipersensibilitate întârziată

Declanșatorii acestor reacții sunt foarte diferiți, dar au o caracteristică funcțională comună, ce constă în aceea că devin stimuli cronici:

- substanțe anorganice: HgCl₂, sulfat de nichel, compuși ai cromului, coloranții de anilină;
- glucidele, cu rol de haptene, după ce in vivo se complexează cu o proteină purtător;
- substanțe proteice produse de *M. tuberculosis* (tuberculina), de *Brucella* (brucelina), dar și celulele întregi, al căror perete este rezistent la acțiunea anticorpilor și a complementului: celule de *M. tuberculosis*, vaccinul BCG, *M. leprae*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Treponema*, *Bordetella*, *Brucella*, *Listeria*, *Salmonella*.
- fungii *Candida*, *Histoplasma*;
- paraziții *Schistosoma*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Leishmania*;
- virusuri: rujeolic, herpetice, adenovirusuri etc;
- antigenele celulare din grefele de țesuturi și organe.

Modul de administrare a antigenului influențează reactivitatea imunitară. Asocierea antigenului cu adjuvantul Freund complet, favorizează reacția de hipersensibilitate întârziată, iar injectarea intravenoasă este defavorabilă

acestui proces.

Reacțiile de hipersensibilitate imediată și întârziată coexistă pentru orice antigen, cu predominanța uneia sau alteia, fără să se excludă complet.

Se cunosc trei tipuri de reacție de hipersensibilitate de tip întârziat:

- reacția întârziată de tip tuberculinic

- hipersensibilitatea întârziată de contact. Ambele tipuri de reacție apar la 48-72 de la reexpunerea la antigen;

- hipersensibilitatea întârziată granulomatoasă se manifestă în 21-28 de zile. Granuloamele se formează prin agregarea și proliferarea macrofagelor și pot să persiste un interval de mai multe săptămâni.

1. Reacțiile de hipersensibilitate întârziată de tip tuberculinic

Hipersensibilitatea întârziată este o reacție caracterizată printr-un proces inflamator, care devine vizibil macroscopic la 6-12 ore după contactul secundar cu antigenul și atinge intensitatea maximă la 24-72 de ore. Histologic se caracterizează prin infiltrare limfocitară și mononucleară.

Cea mai cunoscută reacție de hipersensibilitate întârziată este cea indusă de tuberculină, dar antigene ca lepromina, brucelina, histoplasmina, diferite componente ale celulelor de Candida etc., produc reacții asemănătoare

Tuberculina este o substanță proteică, netoxică, pe care celulele de *M. tuberculosis* o elimină extracelular. Este inofensivă pentru organismele umane care nu au experiența antigenică a contactului cu *M. tuberculosis* sau cu componente antigenice ale celulelor sale.

R. Koch a descoperit tuberculina, dar și reacțiile de hipersensibilitate întârziată la tuberculină, în experiențe de genul următor:

- a inoculat subcutan în regiunea coapsei cobailor normali, o suspensie de celule vii de *M. tuberculosis*. Celulele bacteriene se multiplică local și determină o reacție inflamatorie în ganglionii regionali. Se produce adenopatia tuberculoasă (creșterea volumului ganglionar). Infecția progresează lent, se generalizează și după câteva luni, animalul moare;

- la 2-3 săptămâni de la prima inoculare, R. Koch a reinoculat cobaii cu o nouă doză de celule de *M. tuberculosis*, vii sau omorâte.

La locul celui de al II-lea inocul se produce o reacție amplă, caracterizată prin inflamație masivă în câteva ore, ce progresează rapid și în 2-3 zile determină necroza zonei învecinate, urmată de eliminarea brutală a țesutului.

Reacția de necroză și eliminare tisulară, cu o delimitare foarte netă față de țesutul înconjurător, a fost denumită fenomenul Koch.

Fenomenul Koch este o reacție de hipersensibilitate întârziată și poate fi reprodus prin injectarea corpiilor celulari de *M. tuberculosis*, fie numai a tuberculinei.

La organismele infectate sau care au experiența anterioară a contactului cu antigene de *M. tuberculosis* (dobândită prin vaccinare), reinjectarea celulelor de *M. tuberculosis*, vii sau moarte ori a tuberculinei, determină o reacție de hipersensibilitate întârziată severă, cu producerea leziunilor tisulare ce se succed astfel: indurație locală, eritem cu reacție inflamatorie intensă, puroi și necroză, în cazul în care reacția este intens pozitivă. Fenomenul Koch este detrimental pentru gazdă, pentru că *M. tuberculosis* se multiplică repede în țesutul necrotic.

Reacția este locală, dar injectarea unei cantități mari de tuberculină la un organism sensibilizat, poate produce o reacție sistemică (generalizată), urmată de șoc grav și moarte.

După contactul secundar cu antigenele de *M. tuberculosis* se produc două tipuri de răspuns:

- o reacție locală, cu apariția unei congestii și a unui edem la locul injecției, însoțită de o adenopatie locală;

- o reacție focală, ce constă în activarea focarelor de tuberculoză latentă, eventual existente în organism. Focarele latente se activează, printr-o reacție inflamatorie locală.

Reacția de hipersensibilitate la tuberculină nu a fost interpretată corect de descoperitorul ei. Koch a injectat tuberculina, ca vaccin, în scop imunoterapeutic, la bolnavii de tuberculoză. Consecința a fost reactivarea focarelor de latente de infecție tuberculoasă la cei vindecați clinic (asimptomatici) și agravarea tuberculozei la pacienții cu proces infecțios evolutiv.

Bacilul *M. tuberculosis* nu are efecte toxice directe asupra celulelor infectate, dar reacțiile de hipersensibilitate celulară pot să determine leziuni tisulare și chiar necroză. De aceea, după contactul primar, efectele antigenelor de *M. tuberculosis* sunt minime sau absente.

Efectorii celulari ai reacțiilor de hipersensibilitate întârziată

Celulele efectoare ale reacției de hipersensibilitate întârziată sunt de două categorii:

- celule de origine sanguină: limfocite T sensibilizate, care recunosc specific antigenul, monocite, bazofile, neutrofile;

- celule rezidente tisulare: celule endoteliale vasculare, macrofage tisulare (care înglobează antigenul, îl prelucrează și îl prezintă limfocitelor T), mastocite (își eliberează conținutul și modifică permeabilitatea capilarelor).

Recrutarea bazofilelor și neutrofilelor este mediată de chemoatracții produși în focar, iar limfocitele T activate produc factori de inhibare a migrării. Infiltratul celular format din monocite și limfocite pătrunde în derm și dezorganizează fasciculele de colagen, sub acțiunea

enzimelor eliberate de macrofage. Monocitele și limfocitele infiltratului se găsesc în proporții egale. În teritoriul focarului inflamator, monocitele se diferențiază în macrofage. Fig. 124. Bazele celulare ale hipersensibilității de tip IV.

Macrofagele, celulele dendritice și posibil chiar limfocitele B preiau moleculele de tuberculină, le prelucrează și le expun în asociație cu moleculele CMH II. Antigenul este recunoscut de limfocitele TCD4 și eliberează limfocine (IL-2, ifn γ), cu efect activator asupra macrofagelor, pe care le rețin în focarul inflamator.

Reacția inflamatorie, caracterizată anatomic prin edem și eritem, atinge intensitatea maximă la 48-72 de ore. Dacă antigenul este degradat, ulterior, intensitatea reacției de hipersensibilitate întârziată diminuează treptat. Dacă antigenul nu poate fi eliminat, persistența lui determină reacția granulomatoasă, cea mai importantă formă de manifestare a hipersensibilității întârziate.

2. Reacția de hipersensibilitate întârziată de tip granulomatos

Reacția granulomatoasă este produsă de antigene persistente, fiind cea care determină efectele patologice ale infecției cu *M. tuberculosis* sau cu *M. leprae*. Granuloamele tuberculoase și leproase sunt cele mai cunoscute.

Persistența celulelor de *M. tuberculosis* și *M. leprae* este atribuită unor factori care împiedică fuziunea lizosomilor cu vacuola de fagocitoză. Uneori este posibilă chiar multiplicarea celulelor de *Mycobacterium*.

Granulomul este indus nu numai de persistența celulelor de *Mycobacterium*, ci și de încărcarea macrofagelor din focar, cu pulberi nedegradabile (talc, siliciu, azbest, cărbune).

Granulomul pulmonar este tipic pentru natura sa imunitară și este consecința reacției inflamatorii cronice a țesutului care înconjură celulele infectate cu *M. tuberculosis*. Granulomul este o

structură care izolează celulele infectate cu *M. tuberculosis* și previne diseminarea lor, fiind alcătuit din două categorii de celule: macrofage și limfocite T.

Macrofagele infectate cu *M. tuberculosis* se hipertrofiază și dobândesc caractere morfologice epitelioidale sau fuzionează și formează celule gigante. Ele ocupă o poziție centrală în granulom, iar limfocitele sunt situate la periferie. În jurul celulelor din focar, fibroblastele proliferază și sintetizează colagen, formând un țesut fibros de acoperire.

Granuloamele care conțin bacili de *M. tuberculosis* rămân latente pentru zeci de ani, la circa 90% dintre cei aproximativ 2 miliarde de indivizi umani infectați, cu focare de tuberculoză latentă, dar fără manifestări clinice. La restul de 10%, celulele centrale ale granulomului se lizează din mai multe cauze: lipsa O₂, proliferarea bacililor tuberculoși, acțiunea TNF și a limfocitelor T_c. Consecutiv lizei celulelor din centrul granulomului, se formează granuloame cazeoase (de consistența cheagului de cazeină), în interiorul cărora celulele de *M. tuberculosis* se dezvoltă foarte bine. După ruperea peretelui fibros, bacilii se diseminează prin contiguitate în țesutul adiacent, pe cale sanguină, în alte organe sau pe cale aeriană, la alți indivizi.

Raporturile numerice și funcționale dintre limfocite și macrofage, determină intensitatea reacțiilor de hipersensibilitate întârziată și condiționează chiar formarea granulomului. Argumentul este infecția cu *M. leprae*, care determină două tipuri extreme de manifestări:

- lepra leproidă, asociată cu leziuni multiple și un număr enorm de bacili în leziuni. Testul la lepromină este pozitiv. Proliferarea bacililor produce leziuni tegumentare distribuite difuz sau localizate în noduli. Un număr enorm de bacili de *M. leprae* se găsește în granuloamele lepromatoase (peste 10¹⁰/gram de țesut). Granuloamele sunt formate din macrofage inactivate, gigante, provenite prin fuziune, încărcate cu bacili. Lipsesc infiltratul limfocitar, ceea ce dovedește absența imunității mediate celular. S-a demonstrat anergia celulelor T, cu specificitate față de antigenele bacilului leprozei. Anergia IMC este explicată prin predispoziția genetică, prin deleția clonală a celulelor T specifice față de antigenele de *M. leprae* și prin funcția inhibitorie a celulelor T_s specifice. Macrofagele sunt pline cu bacili și chiar după chimioterapie prelungită, bacilii sunt eliminați lent.

- lepra tuberculoidă este o boală localizată, cu granuloame bine organizate, în care macrofagele sunt diferențiate în celule epitelioidale, celule gigante Langhans active, care omoară și digeră bacilii de *M. leprae*. Infiltratul limfocitar al granulomului este intens, cu predominanța limfocitelor TCD4, care secretă interferon gama. Interferonul activează macrofagele din focar, devenind capabile să inhibe creșterea și diviziunea celulelor de *M. leprae*. La periferia granulomului se găsesc limfocite TCD8. Leziunile nervilor se datorează proliferării bacililor și răspunsului IMC, în situsuri adiacente filetelor nervoase.

Deși intensitatea reacției de hipersensibilitate întârziată este reflectarea directă a gradului de activare a limfocitelor TCD4, ea nu conferă totdeauna imunitate. Stările de hipersensibilitate întârziată și de imunitate nu se induc reciproc.

Macrofagele activate de limfocite pot nu numai să inhibe creșterea și diviziunea celulelor de Mycobacterium, dar pot să producă leziuni tisulare, consecutiv eliberării conținutului lor enzimatic și prin producerea intermediarilor reactivi ai reducerii O₂.

Teste in vivo pentru detectarea hipersensibilității întârziate

Pentru testarea reacției de hipersensibilitate întârziată la tuberculină, se folosesc două tipuri de preparate:

- tuberculina Koch (alt = old tuberculin) este filtratul brut al culturii de M. tuberculosis în mediul lichid, vechi de câteva săptămâni, concentrat în baie de vapori la 1/10 din volumul inițial;

- substanța activă denumită PPD (purified protein derivative), de natură proteică. Produsul este parțial purificat din culturile de M. tuberculosis autoclavate, prin precipitare cu sulfat de amoniu, fiind un amestec al mai multor fragmente proteice cu greutatea moleculară de 5000 D. Nu se cunosc epitopii declanșatori ai activării limfocitelor TCD4. Se păstrează în stare liofilizată.

Cel mai folosit este testul intradermic (intradermoreacția = IDR), denumit și testul Mantoux, ce constă în injectarea unui volum de 0,1 ml din preparatul de PPD. Reacția se citește la 24-48 de ore. Se apreciază aria eritemului, gradul infiltrației dermice (edemul) sau chiar necroza tisulară indusă de antigenul test.

La persoanele pozitive pentru reacția de hipersensibilitate întârziată, apare o indurație locală (întărire a țesutului) eritematoasă. Zonele de indurație de 0,5 cm sau mai mari sunt înregistrate ca pozitive. Reacția de intensitate medie dispare în 2-3 zile și denotă că organismul a fost vaccinat. La cei cu reacție intens pozitivă, manifestările sunt mai severe, cu febră ușoară, alterarea stării

generale, dureri ale membrelor, ce se instalează după 24 de ore. La locul injectării tuberculinei, țesutul se necrozează. Reacția amplă se datorează focarelor multiple latente de tuberculoză, existente în organism.

În absența reacției tisulare (absența edemului și a eritemului), reacția de hipersensibilitate întârziată este negativă. Semnificația este că persoana nu are experiența contactului anterior cu antigenele de *M. tuberculosis*, nici prin vaccinare și nici prin infecție naturală.

Testul alergiei de contact se folosește pentru evaluarea alergiei tegumentare și constă în impregnarea unei fibre textile cu tuberculină (sau cu oricare substanță test), fixată pe leucoplast și aplicare tegumentară pentru o perioadă mai lungă de timp. Alergenul pătrunde în tegument. La 48-72 de ore apar reacții eritematoase.

Aceleași teste se folosesc pentru evaluarea gradului de sensibilizare a organismului față de *Brucella*, *L. monocytogenes*, *T. pallidum*, față de boli parazitare (toxoplasmoză, malarie etc.), față de infecțiile virale, fungice.

In vitro, cel mai folosit este testul proliferării limfocitelor. Suspensia de limfocite se obține din sânge și se cultivă în mediu cu ser de vițel și antibiotice. Celulele sunt stimulate cu PHA, Con A, PWM sau cu preparate antigenice din *Candida*, anatoxină tetanică, PPD sau orice antigen relevant pentru maladia pacientului. În studiile cu lectine mitogene, celulele se marchează cu timidină H3 și culturile se sacrifică la 2-3 zile. Culturile stimulate cu antigene se sacrifică la 6-7 zile.

Sinteza ADN în culturile stimulate cu mitogen sau cu antigene, se compară cu sinteza ADN în cultura martor.

PHA și Con A sunt mitogeni ai limfocitelor T. PWM induce proliferarea și maturarea limfocitelor B, dar răspunsul lor necesită funcția accesorie a limfocitelor T.

În culturile stimulate cu antigene, proliferază limfocitele TCD4. Răspunsul limfocitelor reflectă gradul de sensibilizare printr-o expunere anterioară a subiectului, la antigenul test.

Răspunsul limfocitelor T la aloantigene se măsoară în reacția limfocitară mixtă (RLM), în care celulele de la doi indivizi se cultivă împreună. În reacția unidirecțională, una din cele două

populații de limfocite se inactivează prin iradiere sau tratament cu mitomicină C. Ele nu sintetizează ADN propriu, dar stimulează limfocitele celeilalte populații. Sinteza ADN se determină prin măsurarea H3, după cel mult 7 zile. În RLM proliferază limfocitele TCD4 și TCD8.

3. Hipersensibilitatea de contact (dermatita de contact)

Hipersensibilitatea de contact, la om, se prezintă ca o inflamație a tegumentului, adică o leziune tegumentară cu eritem, edem moderat și distrugerea epitelului la locul de contact cu alergenul. Reacția este maximă la 48-72 de ore după contactul secundar.

Dermatita alergică de contact este o formă de hipersensibilitate întârziată și este rezultatul sensibilizării limfocitelor. Unele haptene (de exemplu, dinitroclorbenzenul), sensibilizează aproape toți indivizii umani.

Moleculele inductoare ale hipersensibilității de contact sunt mici (sub 1 kD), dar se comportă ca haptene: compuși ai Ni, Co, Cr (bicromatul de K), ai Hg, cauciucul, compuși acrilici, esențele de lemn care conțin substanțe toxice (oțetar veninos, stejar veninos), formolul, unele substanțe cosmetice, diferite rășini, unii coloranți (de anilină), pesticide, antiseptice, antibiotice, anestezice.

Reacția de hipersensibilitate de contact se desfășoară în două faze:

1) Faza de sensibilizare (faza contactului primar). Moleculele mici (mai mici de 500 D) de orice proveniență, traversează tegumentul și se leagă covalent sau necovalent cu proteine tisulare constitutive, în special cu colagenul, prin gruparea NH₂ a lizinei. Astfel se formează, in vivo, un conjugat haptentă-proteină, recunoscut de sistemul imunitar al tegumentului. Celulele Langerhans, localizate în straturile suprabazale ale epidermei sunt principalele celule prezentatoare ale antigenului. Ele exprimă la nivel membranar, molecule CMH II, precum și receptori pentru regiunea Fc și pentru componentele complementului. În faza de sensibilizare, celulele Langerhans transportă conjugatul antigenic, fie internalizat, fie asociat membranei, de la nivelul tegumentului, în ganglionii limfatici regionali. Fig. 125. Migrarea celulelor Langerhans din epiderm, în ganglionul limfatic. Antigenele sunt prelucrate în epiderm de către celulele Langerhans și stimulii produși de cheratinocite, stimulează migrarea celulelor în ganglionii limfatici, unde se diferențiază în celule dendritice prezentatoare de antigen. Celulele Langerhans sunt înlocuite de precursori derivați din monocitul circulant (după Sminia, 1998).

Antigenul sensibilizant este recunoscut de limfocite T neangajate (naive). Ele se activează la distanță de locul pătrunderii antigenului, în ganglionii limfatici regionali. În ganglioni, antigenul este prezentat limfocitelor TCD4. Celulele T sunt prezente în tegument (și în alte țesuturi), în număr nesemnificativ, dar în ganglioni, contactul celulelor T cu celulele prezentatoare de antigen este foarte mult ușurat de densitatea mare a ambelor tipuri celulare. În răspunsul imun primar, stimularea celulelor T poate să nu fie evidentă, deoarece se produce în ganglioni și nu la locul contactului cu antigenul. Celulele T neangajate, de dimensiuni mici, se activează, se produce expansiunea clonală și diferențierea în celule efectoare și celule de memorie cu specificitate față de haptentă. Numărul lor crește cu câteva ordine de mărime. Din ganglion, celulele T sunt diseminate în sângele periferic, iar de aici, probabil prin homing specific, în tegument la situsul de contact cu antigenul, unde eliberează citochine.

Între contactul sensibilizant și cel de al II-lea contact este necesar un interval de 10-14 zile.

2) Reacția propriu-zisă se produce după cel de al II-lea contact cu alergenul și se exprimă ca o dermatită. După stimularea secundară cu antigenul, se produce inflamația deschisă a pielii (leziunea tegumentară). Fig. 126. Reprezentare schematică a etapelor succesive ce duc la manifestarea dermatitei alergice de contact.

Celulele Langerhans care au legat conjugatul haptentă-proteină, se deplasează din epiderm spre derm și secretă mediatori atracțanți pentru limfocitele TCD4 de memorie. Acestea secretă IFN γ , care determină exprimarea moleculelor CMH II pe suprafața cheratinocitelor și a celulelor endoteliale ale capilarelor dermice. În condiții patologice, cheratinocitele exprimă molecule CMH II și pot să prezinte antigenul. Ele se activează și secretă IL-1 și alte interleuchine. IL-1 stimulează celulele Langerhans și limfocitele infiltrate în aria de contact cu antigenul. Interleuchinele sunt factori atracțanți pentru macrofage și limfocite, fără specificitate de antigen. Aceste celule infiltrază dermul și epidermul în 48 de ore. Majoritatea celulelor infiltrate sunt limfocite TCD4, iar circa 99% dintre ele nu au specificitate față de antigen. În infiltrat lipsesc PMNN. Mecanismul principal pentru recrutarea celulelor T, este activarea independentă de specificitatea antigenică.

Celulele infiltrate în limfocite și macrofage în secretă factori cu acțiune litică asupra celulelor epidermice.

Un mecanism alternativ al producerii leziunii, constă în acțiunea limfocitelor T de memorie. Reacția inflamatorie locală este inițiată de un număr minim de limfocite T de memorie, teoretic una singură. După contactul primar cu alergenul, în aria tegumentară migrează un număr mic de limfocite T de memorie. Celulele T de memorie sunt stimulate secundar pe calea receptorului specific. După stimulare, secretă citochine atrăgătoare pentru celulele efectoare nespecifice (limfocite și macrofage).

La om, dermatitele de contact sunt profesionale: dermatita la ciment, la uleiuri minerale, la medicamente, la coloranți etc.

Testarea hipersensibilității de contact se face prin aplicarea substanței direct pe tegument. Reacția se citește după 48 de ore. Reacția pozitivă este însoțită de eritem și de erupție veziculară.

2 Icterul semnifică apariția în sânge a pigmentilor rezultați din degradarea hemoglobinei (bilirubina, biliverdina) și colorarea tegumentului și conjunctivei.

3 Factorul antigenic Rh nu este unic, ci constituie un sistem complex, format din mai multe subunități antigenice. Dintre toate componentele antigenice ale sistemului Rh, antigenul Rho (sau D) este cel mai puternic și cel mai important pentru clinică. Subunitățile antigenice ale factorului Rh se notează cu A, B, C, D, F. Persoanele Rh-, transfuzate cu sânge Rh+, prezintă riscul de a sintetiza anticorpi anti-Rh, în proporție de 50-80%. Din acest motiv, persoanele Rh-, trebuie transfuzate numai cu sânge Rh-. Uneori, complexul antigenic Rh este incomplet, adică lipsesc anumite subunități din structura sa. Absența lor fenotipică se notează cu a, b, c, f. De exemplu, absența primelor două subunități, generează un factor care se notează RhabCDF. Persoanele care posedă antigenul Rh incomplet, după transfuzia cu sânge RhABCDF se imunizează și produc anticorpi față de subunitățile antigenice care le lipsesc. Factorul Rh incomplet are o imunogenitate mai slabă și se notează cu Du.

2. CONFLICTUL IMUNITAR IN VIVO.

MALADIILE AUTOIMUNE

În 1900, Ehrlich și Morgenroth au formulat conceptul “horror autotoxicus”, care semnifică faptul că, în mod normal, organismul își tolerează propriile componente, pe care le protejează față de autodistrugerea pe calea efectorilor răspunsului imun. Sistemul imunitar este tolerant față de componentele proprii. Starea de toleranță față de self se instalează în cursul dezvoltării embrionare. Una din axiomele Imunologiei este că, la organismele cu reactivitate imunitară normală, nu se produc anticorpi față de constituenții proprii organismului. Totuși, autoanticorpii apar mai ales la persoanele în vârstă: sunt autoanticorpi anti-hematii sau anti-membrană bazală glomerulară.

Starea de toleranță perfectă a sistemului imunitar față de componentele self, este perturbată în unele situații în care se sintetizează autoanticorpi sau se diferențiază limfocite autoreactive, care nu mai recunosc selful. Prin extinderea efectelor sale, starea de autoreactivitate imunitară generează maladiile autoimune. Maladiile autoimune, în esență, se caracterizează prin expansiunea proliferativă a limfocitelor reactive față de componentele self.

Reactivitatea imunitară față de self nu s-a evidențiat niciodată ca fiind factorul inițiator primar al maladiilor autoimune, chiar dacă self-reaktivitatea a amplificat manifestările patologice cu componente autoimune. Există

maladii cu fenomene autoimune bine exprimate, dar etiologia lor primară

nu se cunoaște.

Mecanisme ipotetice ale inițierii conflictului autoimun

Mecanismele celulare și moleculare prin care este perturbată starea de toleranță a sistemului imunitar față de self, nu se cunosc, dar faptele de observație au condus la următoarele ipoteze:

a) Eliberarea antigenului sechestrat. Starea de toleranță față de self se induce în timpul dezvoltării embrionare. Antigenele sechestrate sunt acelea care, prin localizarea sau prin

particularitățile de vascularizație ale unui țesut, sunt inaccesibile recunoașterii de către celulele limfoide, în perioada dezvoltării embrionare. Ele au localizare intracelulară sau sunt delimitate prin bariere anatomice. În situații normale, antigenele sechestrate nu stimulează nici starea de toleranță și nici nu induc răspunsul imun, datorită absenței contactului lor cu limfocitele. Din diferite cauze (traumatisme, intervenții chirurgicale, procese infecțioase), antigenele sechestrate se eliberează și devin accesibile limfocitelor, declanșând răspunsul imun. Un astfel de mecanism patogen s-a presupus că este activ în generarea oftalmiei imune și în aspermia autoimună a tubilor seminiferi. Proteinele cristalinelor, în cursul intervențiilor chirurgicale, după traumatismele ce sparg capsula sau după afecțiunile care permeabilizează cristaloida, se comportă ca antigene care declanșează un răspuns imun anti-cristalin. Astfel, pot fi afectate irisul, procesele ciliare, coroida. Proteinele spermatice, în cazurile de spermatoză, induc sinteza locală a anticorpilor în structurile epididimului. Anticorpii reacționează cu antigene acrosomale sau flagelare ale spermatozoizilor și produc imobilizarea sau chiar aglutinarea lor, consecința fiind sterilitatea autoimună. Prin același mecanism, al eliberării antigenului sechestrat, se pot declanșa alte maladii autoimune: afecțiuni demielinizante ale SNC, tiroidita Hashimoto. Sistemul nervos central și tiroida sunt delimitate de bariere anatomice etanșe, care nu permit accesul efectorilor sistemului imunitar. După traumatisme, intervenții chirurgicale sau consecutiv unor infecții distructive, antigenele specifice acestor țesuturi, se pot elibera și pătrund în circulație. Față de ele se poate declanșa răspunsul imun, generator al maladiilor demielinizante cu componentă autoimună și al tiroiditei autoimune.

b) Pierderea stării de toleranță, ca mecanism posibil al generării stărilor de autoimunitate, este tot mai mult acceptată. Datorită unor mutații, ar fi posibilă apariția clonelor de celule limfoide imunocompetente, care pierd proprietatea de toleranță față de self. Limfocitele T și B autoreactive, generează efectorii răspunsului imun care interacționează specific cu componentele self. Apariția clonelor autoreactive ar fi asociată cu un deficit al celulelor Ts, precum și cu activarea celulelor Th.

c) Modificarea structurii chimice a antigenelor proprii (teoria selfului alterat). Sub acțiunea unor factori fizici (arsuri, radiații), biologici de natură infecțioasă (bacterii, virusuri, fungi) sau a unor substanțe chimice (medicamente), proteinele proprii se modifică și expun determinanți antigenici interni sau se alterează configurația lor moleculară. Moleculile modificate devin autoantigene.

Virusurile învelite au un rol important în generarea autoanticorpilor, deoarece, pe suprafața celulelor infectate sunt expuse antigene virale, care pot să modifice specificitatea antigenică a moleculelor proprii membranei celulare. Virusurile învelite înmuguresc prin membranele celulei gazdă și pot încorpora proteine ale membranei celulare. Virusul este neutralizat de anticorpi, iar complexul imun este ingerat de macrofag prin intermediul receptorilor pentru Fc. Odată cu glicoproteinele virale, pe suprafața macrofagului vor fi expuse și glicoproteine originare în celula gazdă. Astfel sunt stimulate limfocitele T față de proteinele self.

d) Asemănarea antigenică între antigenele exogene și componentele self. Uneori, microorganismele infecțioase conțin molecule asemănătoare, înrudite antigenic cu componentele self. Se sintetizează anticorpi care recunosc nu numai antigenul invadant, ci și propriile componente. De exemplu, peretele de *Str. haemolyticus* conține proteina M. Anticorpii anti-proteină M reacționează încrucișat cu proteine membranare ale celulelor mușchiului cardiac. Unele antigene exogene, de origine bacteriană, stimulează sinteza anticorpilor ce dau reacții încrucișate cu molecule ale suprafeței hematiei. De aceea, infecția cu *Str. haemolyticus* produce, uneori, leziuni ale miocardului.

Maladiile infecțioase (sifilis, lepră) stimulează sinteza autoanticorpilor (factorul reumatoid, anticorpi anti-tiroidieni) și aceștia ar putea fi cauza dezechilibrului mecanismelor imunologice centrale. Răspunsul autoimun este declanșat de novo sau cel preexistent este amplificat după infecția cu o largă varietate de virusuri ADN și ARN,

La animalele de experiență, infecțiile virale acute și persistente pot induce sau pot accelera evoluția maladiei autoimune.

e) Activarea răspunsului imun poate fi rezultatul întreruperii stării de echilibru a rețelei idiotipice. Limfocitele sunt legate într-o rețea funcțională complexă, prin interacțiuni ce implică regiunile variabile ale receptorilor de antigen. Limfocitele T au receptor de antigen cu regiuni variabile și stimulează răspunsul anti-idiotipic. În mod normal, în absența stimulului antigenic, interacțiunile celulare mențin sistemul imunitar în echilibru, dar la contactul cu antigenul, rețeaua se orientează în sensul elaborării răspunsului imun specific. Ulterior, datorită semnalelor supresoare, rețeaua se întoarce la starea de echilibru. Interacțiunile idiotipice pot avea rol stimulator sau inhibitor al răspunsului imun. Anticorpii anti-idiotipici, care în mod obișnuit au rol reglator, pot fi autoanticorpi.

f) Supraviețuirea limfocitelor autoreactive. În timus, clonele de limfocite self-reactive sunt eliminate. În organism, rămân totuși clone cu o autoreactivitate medie. Ele nu sunt agresive față de propriile antigene, dar pot deveni foarte reactive, după ce s-au activat sub acțiunea unui antigen exogen. După activare, proliferază și atacă țesutul self. Dacă limfocitele supraviețuiesc mai mult decât este necesar, efectul acțiunii lor se extinde. Mecanismul supraviețuirii limfocitelor activate pare a fi implicat în generarea lupusului sistemic eritematos și a artritei reumatoide. Supraviețuirea limfocitelor se datorează producerii unor molecule ce blochează ligandul Fas. Astfel, ligandul Fas nu se mai leagă specific cu receptorul Fas și transmiterea mesajului morții în limfocit este blocată.

g) Stimularea policlonală a limfocitelor B. Unii agenți infecțioși, ca de exemplu virusul Epstein-Barr, infectează limfocitele B și produc activarea policlonală. Ele străbat câteva cicluri de

diviziune și sintetizează anticorpi cu specificități multiple de combinare, unii fiind autoanticorpi. Micoplasmele sunt activatoare policlonale ale limfocitelor și pot contamina preparatele virale. Frecvent, virusurile infectează limfocitele și macrofagele, stimulând astfel eliberarea citochinelor. Aceste molecule influențează nivelul de exprimare a moleculelor CMH I și II, modulând răspunsul imun.

h) Influențele hormonale. Numeroase observații clinice sugerează o corelare directă între dezechilibrele hormonale și momentul declanșării maladiilor autoimune. Maladiile autoimune sunt mai frecvente la femei, iar bărbații cu fenomene autoimune au un nivel mai crescut de hormoni estrogeni. Sarcina se asociază cu ameliorarea severității maladiilor autoimune, în special a artritei reumatoide.

j) Factorii genetici. Maladiile autoimune tind să aibă o incidență familială, ceea ce sugerează substratul genetic predispozant la maladiile autoimune.

Inducerea experimentală a maladiilor autoimune

Prima manifestare autoimună s-a indus experimental la iepurii injectați cu mojarat corneean bovin. S-au sintetizat anticorpi care au reacționat cu antigenele corneei bovine, dar și cu antigenele țesutului corneean de iepure, atât in vivo, cât și in vitro. În anii 1930, Rivers și colab. au indus encefalomielita la maimuță, prin injectarea mojaratului de creier. Fig. 127. Natura multifactorială a fenomenelor autoimune. Bid = celulă B care secretă autoanticorpi; Balfald = celulă B care secretă anticorpi anti-idiotipici; Te = celulă T efectoare.

Ulterior, s-a demonstrat că cea mai sigură modalitate experimentală de a induce o manifestare autoimună, este injectarea mojaratului tisular singenic, alogenic sau xenogenic, în asociație cu adjuvantul Freund. Se sintetizează anticorpi care reacționează cu antigenul inductor, dar și cu componentele tisulare self asemănătoare. Anticorpii față de constituenții tiroidieni și tiroidita pot fi induse prin imunizarea iepurilor cu mojarat tiroidian, asociat cu adjuvantul Freund complet. S-a dedus astfel că unul din mecanismele producerii maladiilor autoimune este similar mecanismului sintezei autoanticorpilor, adică prin stimularea cu antigene înrudite. În sprijinul afirmației, există cazuri de analogie directă.

Encefalomielite autoimună, consecutivă administrării vaccinului rabic, este declanșată de antigenele țesutului nervos de iepure (mielină). Preparatul vaccinal atenuat, utilizat chiar de Pasteur, era măduva spinării de la iepurele infectat cu virus rabic, uscată și macerată.

Capacitatea antigenelor înrudite chimic, de a induce sinteza anticorpilor care reacționează încrucișat cu componente proprii, are ca rezultat întreruperea stării de toleranță. De exemplu, utilizarea preparatelor de insulină din pancreasul de bovine sau de porc, a creat dificultăți majore în tratamentul pacienților cu diabet insulino-dependent, deoarece insulina bovină diferă de cea umană prin 3 aminoacizi, iar insulina de porc, printr-un singur aminoacid. Aceste diferențe sunt suficiente pentru stimularea reactivității imunitare a receptorului de insulină. O complicație suplimentară a fost generată de faptul că preparatele de insulină sunt contaminate cu proinsulină. Insulina se sintetizează în celulele B insulare, ca preproinsulină, care, față de proinsulină are o catenă de 20 de aminoacizi la capătul N-terminal. După clivarea acestei catene, rămâne proinsulina, în care aminoacidul 1 din catena A este reunit cu aminoacidul 30 din catena B, prin catena C. Proinsulina este convertită la insulină și este depozitată în granule, de unde este eliberată în circulație. Proinsulina nu se găsește în mod normal în circulație și nu induce starea de toleranță. De aceea, administrarea proinsulinei induce sinteza autoanticorpilor anti-insulină. Fig. 128. Structura primară a proinsulinei, molecula precursoră a insulinei după clivarea enzimatică a peptidului C. Proinsulina este în mod obișnuit, sechestrată de contactul cu sistemul imunitar, dar dacă se eliberează în circulație, activează sinteza anticorpilor care se combină cu molecula de insulină. Catenele A și B ale insulinei sunt legate prin punți S-S.

Înțelegerea naturii chimice a multor autoantigene este insuficientă, iar auto-anticorpilor se detectează observând legarea lor de secțiunile tisulare, prin tehnica imunofluorescenței. Secțiunea tisulară este foarte complexă din punct de vedere antigenic și interpretarea rezultatelor necesită experiență și prudență.

MECANISME CELULARE ȘI MOLECULARE

ALE PROGRESIEI MALADIILOR AUTOIMUNE

Indiferent de mecanismul declanșator, maladiile autoimune se caracterizează prin sinteza autoanticorpilor sau prin generarea limfocitelor T autoreactive. Leziunile tisulare consecutive acțiunii efectorilor imunitari, se produc pe una din următoarele căi:

- autoanticorpilor au, uneori, o acțiune directă față de antigenele tisulare cu care formează complexe imune. Se activează complementul și rezultatul este liza celulelor;

- alteleori, autoanticorpilor au acțiune indirectă. Complexele imune (Ag - Ac - C) se depun la nivelul vaselor mici (arteriole, capilare) din diferite organe și produc reacții inflamatorii, consecința fiind distrugerea țesutului;

- în alte cazuri, țesutul țintă este lezat sub acțiunea limfocitelor Tc infiltrate.

La pacienții la care se sintetizează autoanticorpi, maladiile autoimune au o particularitate comună: inflamația cronică fără o cauză infecțioasă cunoscută. Autoanticorpilor pot iniția procesul patologic, pot contribui la patogeneză și sunt utili pentru diagnostic. În evaluarea semnificației autoanticorpilor trebuie avute în vedere următoarele situații: 1) autoanticorpilor pot fi agenții efectori ai maladiei, ca de exemplu, în anemia hemolitică autoimună; 2) alteleori, după lezarea unor țesuturi (nervos, cardiac) se sintetizează autoanticorpi care reacționează cu țesuturile respective; 3) autoanticorpilor semnifică prezența unui agent etiologic, fără să aibă rol în patogenitate și indică originea infecțioasă a maladiei; 4) autoanticorpilor se găsesc uneori, mai ales la vârstnici, în absența manifestărilor patologice.

Unele maladii autoimune se caracterizează prin procese patologice strict localizate, adică efectorii (în special anticorpilor) au acțiune specifică față de antigenele proprii organului sau țesutului țintă. Astfel, în maladia autoimună diabetus melitus insulino-dependent, auto-anticorpilor au specificitate numai față de celulele B din insulele Langerhans, iar în tiroidita Hashimoto, autoanticorpilor sunt specifici față de celula epitelială tiroidiană.

La centrul spectrului se situează leziunile care tind să fie localizate într-un singur organ, dar autoanticorpilor nu au specificitate de organ. Exemplul tipic este ciroza biliară primară, în care, canaliculele biliare sunt ținta infiltrării cu celule inflamatorii, dar anticorpilor serici, în special anti-mitocondriali nu au specificitate de organ (nu sunt specifici față de mitocondriile hepatice). De asemenea, în sindromul Goodpasture, autoanticorpilor se fixează pe membrana bazală a glomerulului renal și a epiteliului alveolar, producând glomerulonefrita cronică și hemoragii pulmonare.

La cealaltă extremitate a spectrului sunt maladiile autoimune diseminate, caracterizate prin sinteza autoanticorpilor față de antigene cu distribuție tisulară largă (de exemplu, anticorpi anti-nucleari în lupusul eritematos diseminat).

Autoanticorpul se sintetizează preponderent, față de antigenele țesuturilor endocrine: tiroidă, corticosuprarenale, celulele insulare pancreatice, paratiroide, hipofiză, ovar. Titrul cel mai crescut se înregistrează în cazul maladiei tiroidiene.

Autoanticorpul pot fi specifici față de diferite componente antigenice:

- față de molecule ale suprafeței celulare și au rol patologic (ca de exemplu, anticorpul anti-receptor de hormoni);

- față de ținte extracelulare (molecule circulante sau ale matricei extracelulare) și pot fi agravanți ai maladiei autoimune;

față de componente intracelulare. Spectrul maladiilor autoimune Organ sau țesut afectat
Antigenul

Tiroidita Hashimoto

Mixedemul primar

Maladia Basedow (tireotoxicoza)

Anemia pernicioasă Biermer

(deficitul vitaminei B12)

Diabetul juvenil

Unele alergii atopice

Myasthenia gravis

Sterilitatea masculină

Maladia lui Addison

Menopauza precoce

Anemia hemolitică autoimună

Purpura trombocitopenică idiopatică

Hepatita cronică activă fără HBs

Ciroza biliară primară

Poliartrita reumatoidă

Sindromul Goodpasture

LED

Colita ulcerativă

Sindromul Sjogren

Pemphigus vulgaris

Cardiomiopatia autoimună

Miozita

Tiroida

Tiroida

Tiroida

Mucoasa gastrică

Celulele B insulare

Sistemul nervos periferic

Mușchi striat și cardiac

Spermatozoid

Celulele corticosuprarenalei

Ovar

Hematii

Plachete

Ficatul și mușchiul neted

Mitocondrii

Membrana sinovială

Rinichi și plămâni

Distribuție difuză

Mucoasa colonului

Glande lacrimale și salivare

Tegumentul

Mușchiul cardiac

Mușchiul striat

Tiroglobulina

Citoplasma, suprafața celulei

Receptorul pentru TSH al suprafeței celulare

Factorul intrinsec (FI)

Citoplasma celulelor insulare

Receptorul beta-adrenergic

Receptor de acetilcolină

Citoplasma

Citoplasma celulelor pro-ducătoare de steroizi Suprafața hematiei

Suprafața plachetelor

Celula hepatică, actina

Piruvat dehidrogenaza mitocondrială

Regiunea Fc a moleculei de IgG

Membrana bazală

ADN, ADN-proteine, IgG

Lipopolizaharidul celulelor epiteliale

Mitocondrii, nucleii

Membrana bazală a epidermei

Miofibrilele și sarcolema celulei musculare cardiace

ARN, miozina

Autoanticorpii au specificitate față de molecule self. Prezența autoanticorpilor este, uneori, un indiciu al riscului pentru viitoare maladii autoimune, iar alteleori, titrul lor seric este o reflectare directă a amplitudinii dezordinii autoimune. Evidențierea autoanticorpilor nu este niciodată revelatoare pentru diagnosticul unei maladii, deoarece se pot găsi și în serul organismului normal. Prezența lor în serul normal are o frecvență variabilă în funcție de vârstă și sex: cea mai mică frecvență, autoanticorpii o au în serul bărbaților tineri, iar în serul femeilor vârstnice, frecvența este cea mai mare.

Autoanticorpii se identifică prin tehnicile de aglutinare pasivă și precipitare. Tehnicile de aglutinare utilizează particule de latex sau eritrocite, tapetate cu antigenul molecular.

Autoanticorpii antitiroidieni se detectează prin hemaglutinarea pasivă (HAI), adică antigenul tiroidian este legat pe suprafața eritrocitelor, iar aglutinarea particulelor de latex tapetate cu imunoglobulină este cea mai folosită pentru detectarea factorului reumatoid. Imunofluorescența indirectă este folosită pentru evidențierea anticorpilor antinucleari.

Nu toți pacienții cu o anumită dezordine endocrină sintetizează autoanticorpi. Testul negativ al detectării autoanticorpilor nu exclude maladia autoimună, iar testul pozitiv nu are semnificația obligatorie a unui diagnostic pozitiv. Autoanticorpii față de celulele insulare pancreatice au o particularitate ce constă în faptul că procentajul serurilor pozitive scade după declanșarea bolii.

Maladii autoimune ale țesutului conjunctiv (colagenoze)

Cele mai frecvente colagenoze sunt lupusul eritematos diseminat (LED), artrita reumatoidă (AR) și febra reumatismală. Din punct de vedere imunologic, toate se caracterizează prin prezența autoanticorpilor în ser, care formează complexe imune cu diferite antigene tisulare. În febra reumatismală, autoanticorpii lezează țesutul miocardic și articulațiile. În artrita reumatoidă sunt lezate articulațiile, iar în LED sunt afectate mai multe organe.

Lupusul eritematos diseminat

Denumirea de lupus semnifică efectul distructiv asupra țesuturilor, iar calificativul sistemic reflectă implicarea unui număr mare de țesuturi, ceea ce conferă caracterul generalizat al maladiei; termenul eritematos desemnează eritemul tegumentar care însoțește fazele acute ale maladiei. Lupusul eritematos diseminat este prototipul maladiilor autoimune sistemice. Maladia poate să apară la orice vârstă, dar femeile în perioada sarcinii sunt cele mai afectate.

Lupusul este asociat cu multiple fenomene autoimune și se exteriorizează prin manifestări clinice plurifocale extrem de diverse, care implică sisteme de organe: tegument, articulații, rinichi.

Din punct de vedere citologic, LED se caracterizează prin prezența celulelor LE (lupice), evidențiate de Hargreaves în măduva osoasă a pacienților. Celula LE este un PMN care a ingerat nucleul altei celule și poate să apară în sângele periferic.

Semnul distinctiv al maladiei este nivelul seric ridicat al IgG cu specificitate anti-nucleară. Manifestările clinice heterogene par a fi asociate cu producerea autoanticorpilor. În serul pacienților s-au identificat peste 28 de specificități diferite de autoanticorpi. Cei mai semnificativi sunt anticorpii antinucleari (FAN), anti-leucocitari, anti-mușchi neted de stomac, anti-eritrocitari, anti-plachetari, anti-ribosomal. Titrul crescut de anticorpi anti-ADN dublu catenar, asociat cu nivelul scăzut al complementului poate fi considerat ca un test de diagnosticare a LED.

În sângele pacienților cu LED, există ADN liber, anticorpi anti-ADN, dar și complexe imune anticorpi-ADN. ADN pur nu este imunogen, dar proteinele cu care este asociat îi conferă imunogenitate. În complexul ADN-proteine, ADN are rol de haptenă, iar anticorpii au specificitate față de ADN. Anticorpii anti-ADN aparțin clasei IgG și dau reacții încrucișate multiple: cu polizaharidele bacteriene, cu proteinele fibrilare ale citoscheletului, cu cardioplipina. Anticorpii anti-ADN formează complexe imune cu ADN circulant și se depozitează în țesuturi, având astfel efecte patologice directe. Anticorpii lupici se leagă de componente renale (membrana bazală a glomerulilor), fixează complementul și inițiază un răspuns inflamator, care modifică funcția renală, producând glomerulonefrita cu complexe imune, a cărei consecință este

proteinuria. Complexele imune pot produce și alte manifestări patologice: artrită, vasculită, erupție rash. O fracție a autoanticorpilor este orientată față de determinanții suprafeței eritrocitare și pot produce anemia hemolitică, trombocitopenia (liza plachetelor) sau chiar leziuni ale SNC.

Complexele imune se depun, în special la nivelul pereților vasculari sau sunt filtrate la nivelul glomerulilor renali, unde produc leziuni inflamatorii caracteristice. ADN liber, precum și complexe ADN-anticorpi au afinitate pentru colagenul din membrana bazală a glomerulilor, ceea ce explică depozitarea preferențială a complexelor imune în rinichiul pacienților cu LED. Depunerea preferențială a complexelor ADN-anti-ADN are o explicație moleculară: histonele din complexe nucleoproteice au afinitate față de heparan-sulfat, component al membranei bazale a glomerulului.

Complexele imune activează cascada complementară și cantitatea serică de C3 și C4 diminuează la majoritatea pacienților cu LED activ. Din cauza creșterii ratei sintezei, nivelul seric al acestor proteine poate fi normal, în ciuda consumului accelerat. Anafilatoxinele eliberate din activarea complementului, inițiază reacția inflamatorie locală.

Datorită sintezei autoanticorpilor cu specificități multiple, maladia este însoțită de hipergamaglobulinemie.

Dintre toate specificitățile de autoanticorpi care se sintetizează în LED, FAN este cel mai caracteristic și este dominant cantitativ. Anticorpii antinucleari sunt specifici pentru această maladie și detectarea lor este utilă pentru diagnostic. Anticorpii anti-nucleari reacționează cu toate tipurile de nucleu, indiferent de origine, dar reacționează și cu antigenele nucleare ale gazdei și de aceea sunt considerați autoanticorpi. În LED, titrul anticorpilor antinucleari este crescut, dar anticorpi anti-ADN se sintetizează și în artrita reumatoidă, în sindromul Sjogren, myasthenia gravis, hepatita cronică activă. Anticorpii antinucleari sunt antinucleosomali (structuri ce constau din ADN și histone). ADN poate fi de origine eucariotă sau procariotă, dublu catenar sau monocatenar, polidispers sau omogen. Anticorpii se fixează pe nucleul unei largi varietăți de țesuturi animale, ceea ce permite evidențierea lor în serul pacienților prin metoda imunofluorescenței indirecte. Metoda utilizează timus de vițel, dar în special secțiuni de ficat de șobolan, obținute prin criotomie. Secțiunile se acoperă cu serul de cercetat. Lama cu secțiuni se spală pentru îndepărtarea anticorpilor care nu au reacționat specific cu nucleul hepatocitului. Lamele se incubă cu ser de iepure anti-IgG umană, conjugat cu fluoresceină. Secțiunile se examinează la microscop, cu lumină ultravioletă. Dacă în serul de cercetat se găsește FAN, se observă fluorescența celulelor hepatice de șobolan.

Mulți pacienți cu LED au anticorpi serici, nu numai față de antigenele nucleare, ci și față de antigenele citoplasmice.

Cel mai comun fenomen patologic la pacienții cu LED este vasculita inflamatorie, datorată depunerii locale a complexelor imune, îndeosebi a acelor care conțin ADN, în pereții vasculari.

Maladia se reproduce experimental la șoarece prin injectarea unei endotoxine care determină liza celulară, cu eliberare de ADN. ADN liber sau complexe ADN-anticorpi se fixează pe membrana bazală.

Agentul declanșator al LED nu se cunoaște. Retravirusurile sunt posibili agenți etiologici, deoarece la pacienții cu LED este indusă sinteza unui interferon atipic (IFN-lentivirus), iar în culturile de limfocite de la pacienții cu LED s-a evidențiat revers-transcriptaza.

Predominanța netă a pacientelor (9:1) față de bărbați sugerează rolul hormonilor sexuali în această maladie. Numeroase date sugerează un dezechilibru al raportului cantitativ al hormonilor androgeni și estrogeni în plasmă. Bărbații cu LED manifestă o prevalență superioară a hipoandrogenismului. Boala pare să implice emergența și activarea limfocitelor TCD4 și B cu potențial autoreactiv.

Declanșarea și progresia LED are o bază genetică complexă, cu contribuția genelor CMH și a multor gene din afara complexului. Complexitatea genetică în bolile poligenice se datorează penetranței scăzute a fiecărei gene în parte, adică este o mică probabilitate ca o anumită alelă să determine expresia maladii. Datorită penetranței incomplete, chiar în prezența unui set complet de alele susceptibile, maladia nu se manifestă totdeauna.

Artrita reumatoidă

Artrita reumatoidă este o maladie inflamatorie cronică ce afectează predominant membrele superioare și inferioare, dar poate să implice orice articulație. Este o maladie autoimună cronică, sistemică, cu etiopatogeneză necunoscută. Debutul ei este, de regulă, după 40 de ani, dar poate să apară la orice vârstă. Maladia este mult mai frecventă decât LED și este consecutivă persistenței complexelor imune în circulație, pentru perioade lungi de timp. Este una din cele mai comune maladii autoimune, de 2-3 ori mai frecventă la femei decât la bărbați. Artrita reumatoidă este caracterizată prin inflamația și distrugerea cartilajului articular, producând deformarea degetelor.

Waller și Rose au evidențiat că serul pacienților de AR aglutinează eritrocitele de berbec, tapetate cu o doză subaglutinantă de anticorpi specifici. Concluzia lor a fost că serul conține un

factor specific, care recunoaște regiunea Fc a moleculelor de anticorpi ce tapetează hematiile și l-au denumit factor reumatoid (FR).

Factorul reumatoid aglutinează hematiile oricărei specii, dacă sunt tapetate cu anticorpi specifici. Factorul reumatoid este autoanticorp, un IgM anti-regiunea Fc a IgG denaturat. In vitro, FR precipită cu IgG denaturată chimic sau termic.

In vivo, modificarea structurii IgG se produce după ce IgG reacționează cu antigenul corespunzător, sau in vitro, după ce se fixează nespecific pe un suport inert sau după denaturare termică.

Factorul reumatoid se sintetizează față de molecula IgG a cărei conformație moleculară a fost modificată in vivo și se găsește la circa 70% dintre pacienții cu artrită reumatoidă. După modificarea conformației moleculare, IgG expune determinanți antigenici inaccesibili pe molecula intactă. Sinteza FR se face în plasmocitele din ganglionii limfatici, dar și în cele din țesutul de granulație al membranei sinoviale. Țesutul de granulație este un țesut conjunctiv reparator care se formează în focarul reacției inflamatorii.

Determinanții antigenici ai IgG umană, care reacționează cu FR, nu se găsesc la toți indivizii. Factorul reumatoid care reacționează cu IgG de iepure, este diferit de cel care reacționează cu IgG umană. Factorul reumatoid este considerat ca autoanticorp, dar nici un FR din această categorie nu se poate numi autoanticorp, din următoarele motive:

- nu precipită cu IgG nativă a propriului organism. O variantă a FR se combină cu IgG numai de origine umană și numai dacă este legat în complexe imune, dar nu reacționează cu IgG liberă;
- factorul reumatoid care se combină cu IgG umană, frecvent recunoaște numai IgG denaturat și agregat prin tratament termic;
- factorul reumatoid precipită IgG cu specificitate alotipică, diferită de aceea a pacientului
- factorul reumatoid precipită cu IgG de alte specii.

Pe baza reacției cu FR, indivizii umani se împart în două grupe:

- cei al căror IgG precipită cu FR

- cei al căror IgG nu reacționează cu FR.

Determinanții antigenici ai moleculelor de IgG sunt omologi antigenelor de grup sanguin și se numesc Gm(gama marker). Ei reprezintă variante antigenice alotipice ale IgG umane. Indivizii al căror IgG reacționează cu FR aparțin grupului Gm(a+), iar ceilalți sunt Gm(a-).

Biologia moleculară a artritei reumatoide

Mecanismul declanșator al maladiei este incert. Nu se cunoaște natura stimulului antigenic. Reacția autoimună ar fi declanșată de o infecție cu micoplasme sau cu un virus (EBV, CMV sau un retravirus) care ar avea epitopi asemănători cu autoantigenele. Antigenele de Salmonella, Shigella sau Yersinia pot să activeze diferite artrite. Răspunsul față de aceste antigene este detectat la situsul sinovial al inflamației, fără ca microorganismul să fie prezent. Antigenele bacteriene cu potențial autoimun pot fi transportate în articulații și inițiază sau amplifică un răspuns imun anormal. Printre posibili factori etiologici ai AR, o atenție specială s-a acordat proteinelor de răspuns la șocul termic. Alți autori consideră că un autoantigen (gp 39, componentă a țesutului articular) este recunoscut ca nonself de sistemul imunitar. S-a sugerat posibilitatea ca AR să se datoreze unei insuficiențe corticosteroiene, odată cu descoperirea efectelor antiinflamatorii ample ale cortizonului, în această maladie. Ipoteza n-a fost confirmată, dar nici infirmată.

După alții, maladia este declanșată de complexe imune circulante care se fixează în articulații. Complexele imune sunt recunoscute specific de limfocitele B, care leagă antigenul din complex, prin receptorul imunglobulinic.

Artrita reumatoidă este o colecție de maladii autoimune, pentru care antigenul declanșator diferă, la diferite forme ale maladiei. Deși AR este considerată o maladie autoimună, tabloul patologic distinctiv este dominat net de o reacție inflamatorie intensă, severă și cronică, stimulată de antigene infecțioase sau de superantigene.

Etiologic, AR pare a fi rezultatul unei combinații de factori care include predispoziția genetică și stimularea antigenică, posibil ca rezultat al infecției cu microorganisme. Procesul imunologic are un rol central în patogeneza AR, argumentat de următoarele observații:

- prezența autoanticorpilor serici (FR)
- în situsul inflamator se găsesc factorii rezultați din activarea C
- în situsul articular inflammat se găsesc neutrofile, limfocite T, B, macrofage și citochinele lor
- sensibilitatea la AR este asociată cu expresia unor alele specifice CMH II.

Limfocitele T sunt implicate direct în mecanismul patogeniei AR. În țesutul sinovial reumatoid, celulele care delimitează cavitatea sinovială sunt hiperplazice și sunt infiltrate cu limfocite B, T și macrofage. Utilizarea AMC marcați cu fluoresceină, arată că în țesuturile sinoviale sunt celule T care exprimă molecule CMH II.

Oricare ar fi stimulul, la nivelul articulației se declanșează reacția inflamatorie, proces patologic care determină progresia AR. Se presupune că celulele Th1 recunosc un antigen self în țesutul sinovial, se activează și produc limfocine (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN γ) și activează limfocitele B, care se diferențiază în plasmocite și secretă IgG, ce formează complexe imune (CI). CI activează cascada C și se eliberează C3a și C5a, cu acțiuni chimiotactice pozitive și activatoare față de leucocite, inclusiv pentru limfocite, care amplifică reacția inflamatorie. Celulele Th1 secretă citochine care activează celulele fagocitare ce eliberează produse de oxidare a acidului arachidonic, radicalii oxigenului și metaloproteaze lizosomale, care degradează matricea extracelulară a țesutului articular.

Macrofagele eliberează IL-1, cu efecte multiple: stimulează proliferarea și eliberarea moleculelor proteolitice și chimiotactice din macrofage, stimulează osteoclastele și condroclastele. Osteoclastele și condroclastele atacă și lizează cartilajul, amplificând inflamația articulară. Factorii de creștere și citochinele stimulează hiperplazia fibroblastelor și angiogeneza în jurul articulației, iar în membrana sinovială a articulației se organizează foliculi limfoizi, cu centri germinativi în care se găsesc numeroase plasmocite. Răspunsul imun și răspunsul inflamator inițiază și întrețin o sinovită, care poate progresa la forma erozivă a artritei, la pacienții pozitivi pentru epitopul antigenic declanșator sau datorită contactului repetat cu un epitop de origine infecțioasă, stimulator al reactivității imunitare și al reacției inflamatorii.

Trăsătura esențială a patologiei AR este degradarea cartilajului articular, sub acțiunea metaloproteazelor derivate din celulele inflamatorii infiltrate și din condrocitele rezidente:

colagenaze, gelatinaze, stromelizine etc. Sinteza lor este stimulată de citochinele inflamatorii. Cartilajul articular este un țesut unic pentru că celulele sale componente se găsesc în lacune izolate, fără contact direct cu alte celule. Cartilajul este nevascularizat și este foarte rezistent la invazia cu vasele sanguine și de către celulele tumorale.

Molecule din categoria FR se sintetizează și la persoane cu dezordini limfoproliferative. Factorii reumatoizi de la persoanele normale sunt componente ale familiei anticorpilor naturali, cu afinitate mică față de self. Adeseori, anticorpii naturali sunt polispecifici, reacționând cu antigene self și cu antigene exogene. În contrast, factorii reumatoizi de la pacienții cu artrită reumatoidă au adeseori afinitate înaltă.

Artrita reumatoidă se reproduce experimental prin injectarea fibrinei heterologe. Se produce o hiperplazie a celulelor membranei sinoviale, eroziunea cartilajului articular și a osului subiacent și inflamația cronică a membranei sinoviale.

Alt model experimental al artritei este artrita de adjuvant. Prin injectarea intradermică a antigenului, asociat cu adjuvantul Freund complet, la șobolan se dezvoltă o afecțiune similară artritei reumatoide.

Febra reumatismală sau reumatismul articular acut (RAA)

Febra reumatică este o complicație relativ rară a faringitei streptococice, ce apare la 2-4 săptămâni după infecția bacteriană. Febra reumatismală este o afecțiune provocată de complexe imune circulante, care se localizează în regiunile articulare. Se manifestă ca o poliartrită febrilă, cu evoluție favorabilă, singurul risc fiind complicațiile valvulare cardiace, miocardice sau pericardice. Febra reumatismală este consecutivă infecției tractului respirator cu *Str. haemolyticus*. După 2-3 săptămâni, se dezvoltă o maladie asemănătoare maladiei serului, cu febră, artrită, uneori chorea și cardită. Anticorpii cu reacție încrucișată atacă valvele cardiace, pentru că antigenele self ale țesutului cardiac se aseamănă cu proteina M din *Str. haemolyticus*. Riscul complicațiilor cardiace este mai mare pentru indivizii cu grup sanguin A. Toate grupele sanguine au un precursor antigenic comun în antigenul H (codificat de gena H) în pe suprafața eritrocitelor, bine exprimat cantitativ la persoanele de grup 0. Specificitatea antigenică a hematiilor de grup 0 este conferită de L-fucoză. Grupul A are o altă genă ce codifică sinteza glicozil-transferazei, enzimă ce adaugă N-acetil-D-galactozamina, la galactoza preterminală a substanței H. De aceea, specificitatea antigenică a eritrocitelor grupului A este dată de N-acetil-D-galactozamină și L-fucoză.

Indivizii grupului B au o genă ce adaugă D-galactoza la galactoza preterminală a moleculei H și specificitatea antigenică a eritrocitelor este dată de D-galactoză și L-fucoză.

Glucidul terminal al polizaharidului streptococic este N-acetil-D glucozamina, legată de un polimer de ramnoză. Diferența dintre N-acetil-D glucozamină și N-acetil-D galactozamină este grupul OH. De aceea, antigenele de grup sanguin A se aseamănă cu antigenul streptococic, mai mult decât ale grupului 0. La fel pentru antigenele de grup B, la care D-glucoza este mai asemănătoare structural cu N-acetil-D glucozamina de *Str. pyogenes*, decât cu L-fucoza grupului 0. Ca urmare, anticorpul produs de indivizii de grup A, după infecția cu *Str. pyogenes*, se cuplează cu antigenele tisulare care conțin antigene ale grupului A și produc reacții inflamatorii. Țesutul cardiac conține grupe moleculare, similare cu substanța de grup A.

Anticorpul anti-streptococic se leagă cu antigenele înrudite (o reacție încrucișată), ceea ce explică frecvența superioară a febrei reumatice la indivizii cu grup sanguin A și B, față de indivizii cu grup sanguin 0.

Chorea care însoțește febra reumatică, se poate explica prin asemănarea unor molecule ale ganglionilor bazali, cu antigene streptococice.

Febra reumatismală debutează în momentul în care încep să se sintetizeze anticorpi antistreptococici. Absorbția antigenelor streptococice în circulația sanguină, determină, în special, sinteza anticorpilor anti-streptolizină O (ASLO). Se formează complexe imune circulante. Rămâne neexplicat faptul că numai 2-3% dintre indivizii atinși de infecția cu *S. pyogenes* fac reumatism articular acut.

Țesutul cardiac este adeseori implicat, deoarece anticorpul dau reacție încrucișată cu antigenele streptococice și cu antigenele de organ ale fibrei musculare striate din mușchiul cardiac și chiar cu mușchiul neted din pereții vasculari. Anticorpul anti-streptolizină O reacționează cu sarcolema fibrelor musculare cardiace. O fracție a anticorpilor anti-streptococici, reacționează încrucișat atât cu antigenele glucidice bacteriene, cât și cu o proteină structurală de pe valvele cardiace. Complicațiile pericardice, uneori consecutive infecției cu *S. pyogenes*, nu sunt explicate, pentru că în pericard nu se găsesc antigene care să reacționeze încrucișat cu cele bacteriene.

Biologia moleculară a maladiilor autoimune organo-specifice

O serie de maladii cu substrat imunitar se caracterizează prin spectrul foarte limitat al specificității autoanticorpilor serici și implicit prin limitarea leziunilor tisulare la țesutul țintă:

tiroidita autoimună Hashimoto, boala Basedow-Graves, diabetul zaharat insulino-dependent, myasthenia gravis, anemia pernicioasă, boala Addison, insuficiența ovariană primară, pemphigus.

Cel mai adesea, autoanticorpul sunt specifici față de componente ale sistemului endocrin. Adeseori, în cazuri patologice, în organism se sintetizează anticorpi cu specificitate față de un anumit receptor hormonal. Mecanismul inducției sintezei acestor anticorpi nu se cunoaște, dar se consideră că receptorii de hormoni sunt "secretați de celule în mediul intern. Moleculele sunt preluate și prelucrate de celulele specializate și sunt prezentate limfocitelor. Anticorpul anti-receptor hormonal pot să blocheze funcția hormonului respectiv.

Autoanticorpul față de receptorii pentru hormonii hipofizari și față de receptorii organului țintă au rol determinant în progresia unor maladii. Cei mai studiați sunt anticorpul anti-receptor pentru TSH și anti-receptor de insulină. Efectele fizio-patologice ale anticorpilor anti-receptorii hormonali sunt variate. Anticorpul pot stimula activitatea receptorului și efectul este intensificarea activității secretorii a glandei (efect mimetic hormonal) sau invers, blochează receptorul și efectul se reflectă în inhibiția activității secretorii. La același pacient pot coexista ambele variante de anticorpi. De exemplu, anticorpul față de receptorul periferic de insulină, se găsesc la un număr mic de pacienți cu diabetus melitus insulino-rezistent, dar și la cei hipoglicemici. Pacienții cu aceste manifestări au o maladie autoimună de fond, cel mai adesea lupus eritematos diseminat.

Uneori, pacienții hiperglicemici insulino-rezistenți, evoluează spre hipoglicemie. S-a presupus că autoanticorpul cu titru crescut, distrug receptorul de insulină și de aici ar rezulta rezistența maladiei la hormonul circulant, iar autoanticorpul anti-receptor de insulină, cu titru scăzut, produc o stimulare a receptorului (mimează acțiunea hormonului) și efectul este hipoglicemia. Se pare însă că autoanticorpul au specificitate față de epitopi diferiți ai receptorului, ceea ce explică diferențele acțiunii lor.

Diabetus mellitus insulino-dependent

Diabetul zaharat este cea mai frecventă maladie endocrină. Diabetus mellitus insulino-dependent (IDDM) rezultă din distrugerea celulelor pancreatice B, producătoare de insulină. Rezultatul este hipoinsulinemia și hiperglicemia. IDDM pare a fi o maladie autoimună. Predispoziția genetică este o condiție necesară pentru declanșarea maladiei, dar factorii de mediu în infecțiile virale, regimul alimentar, diferite toxine, au un rol important în expresia clinică a acestei maladii. Maladia s-a reprodus experimental la șoarece. Insulele sunt infiltrate cu limfocite. Sunt lizate celulele B ale insulelor, procesul distructiv excluzând alte tipuri celulare, care rămân intacte.

După instalarea hiperglicemiei, gradul infiltrării mononucleare scade. Infiltratul constă din macrofage, celule dendritice, TCD4, TCD8, NK și mai puțin limfocite B.

În ser se detectează anticorpi anti-celule insulare pancreatice, cu specificitate citoplasmatică și anticorpi anti-componente membranare (decarboxilaza acidului glutamic). Această enzimă se găsește în citoplasma celulelor B pancreatice, dar funcția ei este necunoscută. Aceiași enzimă se găsește în neuronii care produc inhibitorul transmiterii impulsului nervos γ -aminobutiric. La epileptici, ca și la pacienții IDDM, titrul anticorpilor anti-glutamic acid-decarboxilază este crescut. Enzima citoplasmatică se găsește și la nivelul membranei plasmatică, unde devine ținta sistemului imunitar și induce sinteza autoanticorpilor. Agentul etiologic al IDDM nu este cunoscut, dar poate fi un picornavirus (Coxsackie B4) litic pentru celulele B insulare, ale cărui antigene dau reacție încrucișată cu antigene self. Diferite substanțe toxice cu efect litic ar elibera antigenele celulare. Celulele B insulare pot fi lizate direct, sub acțiunea infecției virale sau de către macrofage, care detectează antigenele virale. Agenții chimici diabetogeni (aloxan, streptozocină etc.) distrug celulele B prin diferite mecanisme și reproduc maladia, cu sinteza auto-anticorpilor anti-celule insulare.

Maladii autoimune tiroidiene

Tiroida secretă tiroxina (T4) și triiodotironina (T3), hormoni reglatori ai ratei metabolismului bazal și ai funcțiilor cardiace și neurologice. Afecțiunile tiroidei pot determina modificări ale secreției hormonale, hipertrofia glandei sau ambele consecințe. Fig. 129. Reprezentare schematică a dezvoltării diabetului zaharat insulino-dependent (IDDM). Autoantigenele eliberate din celulele β în timpul turnover-ului natural sau lizei celulelor datorită infecției virale, sunt prelucrate de macrofage și prezentate celulelor Th în asociație cu moleculele CMH II. Macrofagele eliberează IL-12, activatoare a limfocitelor Th1. În același timp, IL-2 și alte citochine eliberate de celulele CD4+, activează limfocitele T cu potențial toxic față de celulele insulare β . IFN γ eliberat de celulele Th stimulează funcția citotoxică a macrofagelor. Ele eliberează citochine cu efect toxic pentru celulele β (IL-1 β , TNF α , IFN γ) și radicali liberi. Celulele Th secretă interleuchine care activează alte celule Th, limfocite B și celule Tc. Celulele Tc (CD8+) pot să recunoască autoantigenele exprimate pe celulele β normale. Ele eliberează granzima și citolizina (perforina), cu efect toxic asupra celulelor β insulare. Distrugerea celulelor β ar putea fi datorată apoptozei mediată de interacțiunea receptorului Fas cu ligandul Fas. Astfel, macrofagele, celulele T și citochinele cooperează sinergic pentru distrugerea celulelor β , rezultatul fiind diabetul zaharat insulino-dependent (după Ji-Woon Yoon, 1998).

În ariile geografice în care ingestia iodului alimentar este adecvată necesităților, maladiile tiroidiene au, în primul rând, mecanisme imunitare. Ele apar cu o frecvență de circa 4% în

populația umană și se manifestă prin hipertiroidism cu sau fără oftalmopatie sau prin hipotiroidism. În ambele cazuri, tiroida poate să crească în volum (gușă).

S-au descris trei specificități de autoanticorpi anti-tiroidieni: anti-tiroid peroxidază (antigenul microsomal); anti-tiroglobulină; anti-receptor pentru TSH al celulelor acinare tiroidiene.

Hipertiroidismul cu creșterea volumului glandei este cunoscut sub denumirea de boala Graves sau von Basedow sau boala Parry, iar insuficiența tiroidiană poartă numele de tiroidita autoimună, caracterizată prin infiltrare limfocitară. În funcție de aspectul clinic, se disting două stări patologice: tiroidita Hashimoto (gușogenă) și tiroidita atrofică (mixedem primar). În ambele cazuri, țesutul tiroidian se distruge.

Boala tiroidiană autoimună apare în special la organisme feminine și din punct de vedere imunologic se caracterizează prin autoanticorpi circulanți, celule T activate față de antigenele tiroidiene și prin infiltrarea limfocitară a organului.

Maladia Basedow-Graves (tirotoxicoza) este de natură autoimună și se caracterizează prin sinteza anticorpilor (IgG) anti-tiroidieni, detectabili la 85% dintre pacienți, iar histologic se observă leziuni structurale. Anticorpul anti-tiroidieni sunt autoanticorpi specifici față de receptorul pentru TSH. Anticorpul se fixează pe receptorul celular pentru TSH și efectul este o stimulare de durată a funcției tiroidei. Autoanticorpul s-a denumit LATS (Long-Acting-Thyroid-Stimulating). Mecanismul lor de acțiune este același ca și al TSH, prin intermediul adenil-ciclazei.

Interacțiunea autoanticorpilor cu antigenul celular (receptorul pentru TSH) nu produce distrugerea celulei, ci efectul este proliferarea și stimularea activității ei. Un efect stimulator asemănător îl are IgG anti-imunoglobulina de suprafață a limfocitului B. Rezultatul este transformarea blastică a limfocitului.

Acțiunea anticorpilor anti-TSH nu se supune controlului feed-back prin hormonul tiroidian, a cărui sinteză este stimulată. Tiroida se activează, secretă hormon tiroidian și crește mult în volum. Celulele foliculare se divid și hiperplazia tiroidei este asociată cu hiperfuncția.

Autoanticorpul anti-receptor pentru TSH traversează placentă și determină hiperplazia tiroidiană a fătului, cu manifestările clinice ale hipertiroidismului, ce persistă până când anticorpul de origine maternă sunt catabolizați.

Maladia este influențată de diferiți factori: vârstă, sex, rasă, starea hormonală. Maladia se remite în timpul sarcinii, dar se activează la modificări hormonale: pubertate, perioada post-partum, menopauză. Boala este mai gravă la bărbați (deși ei sunt numai 25% dintre pacienți), cu titru mare de anticorpi.

Oftalmopatia se datorează hipertrofiei musculare extraoculare, creșterii volumului țesutului adipos și a țesutului conjunctiv înconjurător, cu infiltrat celular inflamator și al celulelor imunitare. Se pare că anticorpii și limfocitele T recunosc determinanți antigenici pe mușchii extraoculari sau pe fibroblastele orbitale, cu fenomene de citotoxicitate mediată celular, dependentă sau independentă de anticorpi.

Tiroidita Hashimoto. La pacienții cu maladia autoimună a tiroiditei Hashimoto, se găsesc autoanticorpi cu diferite specificități, dar definitorie pentru această maladie este înlocuirea țesutului tiroidian, cu țesut limfoid. Volumul glandei crește foarte mult, dar nu, sintetizează hormoni (gușă uscată). În serul pacienților se găsesc autoanticorpi care reacționează cu tiroglobulina, anticorpi anti-celule tiroidiene, anticorpi anti-TSH și anticorpi față de antigenele microsomale asociate cu lipoproteinele. Microsomii sunt constituenți intracelulari ai veziculei de exocitoză a celulei tiroidiene, în care se maturează hormonul tiroidian. Veziculele de exocitoză transportă tiroglobulina spre suprafața apicală a celulei și o eliberează prin fuziunea cu membrana polului apical. Microsomii tiroidieni se exprimă și pe membrana laterobazală a celulei, când vezicula de exocitoză fuzionează greșit cu această zonă. Astfel, hormonul devine accesibil sistemului imunitar. Microsomii constituie autoantigenul, potențial stimulator al răspunsului imun.

Anticorpii anti-microsomi tiroidieni au făcut posibilă detectarea unei proteine de 993 aminoacizi în tiroid-peroxidaza (TPO), enzima tiroidiană asociată microsomilor, cu rol esențial în generarea hormonilor tiroidieni din tiroglobulină.

Anticorpii anti-tiroglobulină au titru de până la 1/2500 și se detectează în reacția de precipitare dintre serul pacienților și mojaratul de țesut tiroidian.

În vivo, autoanticorpii se fixează pe țesutul tiroidian. Se produce inflamația cronică a tiroidei și creșterea volumului ei (gușa). Se disting două situații patologice: tiroidita gușogenă și tiroidita atrofică (mixedem primar).

În ambele cazuri, celulele foliculare tiroidiene se lizează. Consecința este deficitul tiroidian (hipotiroidia), proporțional cu volumul tisular pierdut. Hipotiroidismul este asociat cu mixedemul primar. În serul pacienților se găsesc anticorpi anti-receptor pentru TSH, care blochează legarea TSH, fiind astfel inhibată regenerarea foliculilor, o trăsătură a gușii Hashimoto, dar și anticorpi anti-mușchi neted de stomac, anticorpi anti-factor intrinsec. Rolul autoanticorpilor în distrugerea celulelor tiroidiene nu este determinat, iar maladia este, în primul rând, rezultatul acțiunii limfocitelor T care infiltrează țesutul glandular.

Maladia se induce experimental prin injectarea mojaratului de țesut tiroidian omolog sau heterolog, la iepure, asociat cu adjuvantul Freund. Tiroida se infiltrează cu limfocite mici. Liza țesutului tiroidian este rezultatul imunității mediate celular, față de antigenele tiroidiene.

Autoanticorpii față de antigene ale membranei se sintetizează în diferite neuropatii. Sunt cunoscuți anticorpii specifici față de gangliozele celulei nervoase. Aceste molecule alcătuite dintr-un lipid, ceramidă (sfingozina legată de un acid gras), combinate cu o varietate de oligozaharide, se găsesc în membrana neuronilor periferici. În serul pacienților cu diferite neuropatii se găsește IgM specific față de o anumită ganglioază. Anticorpii nu inițiază procesul patologic și nu au specificitate de maladie, ci se sintetizează după leziuni ale țesutului nervos (după atacul cerebral, după traumatisme ale cutiei craniene sau chiar la pacienții cu spondiloză cervicală).

Anemia pernicioasă

Anemia pernicioasă apare în stadiile terminale ale gastritei autoimune distructive și este consecința distrugerii celulelor parietale ale glandelor gastrice, datorită conflictului imunitar. În absența celulelor parietale, vitamina B12 nu se absoarbe.

Denumirea “pernicioasă”, dată de Biermer (1972), subliniază progresia inevitabilă spre fatalitate și s-a păstrat, deși ea este caracteristică numai pentru faza terminală a bolii.

De fapt, maladia debutează și se manifestă ca o gastrită autoimună, pentru care există dovezi histologice din 1970, dar condiționarea dintre anemie și gastrită a fost precizată de Biermer.

Procesul patologic autoimun este inițiat la nivelul mucoasei gastrice și este de lungă durată (circa 20 de ani), cu mult înainte epuizării funcționale a celulelor parietale. În serul pacienților se găsesc autoanticorpi cu mai multe specificități, dar cei anti-stomac au titrul cel mai înalt. Sediul

sintezei lor este în plasmocitele din mucoasa gastrică și se leagă specific față de două categorii de auto-antigene:

- ATP-aza H+K+ (o enzimă) din celula parietală, cu specificitate celulară, dar nu de specie, ceea ce denotă importanța rolului fiziologic al moleculei în celula parietală gastrică;

- un produs de secreție a celulelor gastrice parietale, denumit factor gastric intrinsec sau transcobalamina, o glicoproteină a cărei funcție este de a lega vitamina B12 și de a permite absorbția ei intestinală.

Enzima ATP-ază H+K+ funcționează ca pompă protonică și realizează acidifierea sucului gastric. Ea aparține familiei ATP-azelor de tip P, cu rol în fluxul ionic (Na+K+-ATP-aza, Ca2+-ATP-aza). Anticorpul anti-factor intrinsec are o frecvență de 80-90%, în cazurile clinice de anemie pernicioasă și se evidențiază prin inhibiția fixării vitaminei B12 radiomarcate, în sucul gastric. Enzima gastrică ATP-aza H+K+ este localizată pe membranele intracelulare și pe membrana apicală a celulei gastrice parietale.

Factorul gastric intrinsec este o glicoproteină de 44 kD. Vitamina B12, în mediul acid al sucului gastric, se eliberează din legăturile sale cu proteinele și se leagă cu transcobalamina. Dacă secreția acidă este inhibată de inactivitatea H+K+-ATP-azei, cantitatea de vitamină B12 disponibilă pentru a se lega cu factorul intrinsec diminuează mult, iar situsul de legare cu transcobalamina este blocat de autoanticorpi. Rezultatul este malabsorbția vitaminei B12. Gastrita autoimună progresează până când vitamina B12 scade la nivele ce nu mai pot să susțină metabolismul neuronal. Pacientul devine anemic, cu complicații neurologice.

Anticorpul sunt IgG și alături de limfocitele T, participă la distrugerea celulelor gastrice. Pe măsură ce inflamația progresează, se reduce numărul celulelor principale și al celor parietale. Reacția autoimună este limitată la corpul stomacului. Rezultatul este atrofia gastrică, dar rata progresiei este variabilă. La unii indivizi, capacitatea de a absorbi vitamina B12 se menține timp de circa 20 de ani, iar la alții atrofia este rapidă și se instalează anemia pernicioasă.

Myasthenia gravis

Myasthenia gravis se caracterizează clinic prin diminuarea progresivă a forței mușchilor scheletici, cu atingerea musculaturii oculare, a membrelor, a trunchiului și, în cazuri severe, a mușchilor respiratori.

Maladia este asociată cu sinteza anticorpilor anti-receptor de acetilcolină (Ach), prezent pe membrana celulei musculare la nivelul plăcii motorii, prin intermediul căreia neuronul intră în contact cu fibra musculară. Receptorii sunt localizați la vârful pliurilor membranei postsinaptice ale fibrelor mușchilor striați și sunt proteine alcătuite din trei catene (α , β , γ). Ei leagă acetilcolina eliberată din terminația nervoasă, în fanta sinaptică. Acetilcolina este eliberată de potențialul presinaptic și ca răspuns, se deschid canalele cationice specifice pentru Na, producându-se depolarizarea locală a membranei postsinaptice și declanșarea potențialului de acțiune al mușchiului. Imunizarea iepurelui cu receptori purificați de Ach din organul electric de pește *Electrophorus*, produce autoanticorpi anti-receptor de Ach și simptome asemănătoare cu myasthenia gravis. Legarea anticorpilor de receptorul de Ach, blochează legarea Ach și funcția canalelor ionice.

Maladia afectează indivizi de la vârsta copilăriei, până la cei vârstnici.

Leziunile plăcii motorii pot fi amplificate prin mecanisme dependente de complement. La nivelul plăcii motorii, numărul receptorilor de acetilcolină diminuează semnificativ. Odată cu pierderea receptorilor se instalează oboseala musculară, trăsătura clinică esențială a maladiei, pentru că impulsul nervos, chiar dacă eliberează o cantitate normală de acetilcolină, nu este urmat de contracția musculară. Mușchiul nu este afectat, iar receptorii de acetilcolină se reînnoiesc cu o rată optimă. Oboseala musculară se datorează scăderii numărului și funcției receptorilor de acetilcolină. Pierderea receptorilor de acetilcolină, diminuează sensibilitatea membranei postsinaptice la acetilcolină. Astfel, potențialele electrice produse de eliberarea acetilcolinei din terminația nervoasă motoare au o frecvență redusă, scade amplitudinea lor și diminuează amplitudinea contracției.

Autoanticorpii față de receptorii de acetilcolină se detectează la 85-90% din pacienții cu myasthenia gravis generalizată și la 50-60% dintre cei cu maladia limitată la musculatura oculară. Practic, sunt absenți la persoanele sănătoase.

Eliminarea anticorpilor din sânge este condiția recuperării. Sinteza anticorpilor poate fi inhibată prin supresia limfocitelor B producătoare de anticorpi. Anticorpii plasmatici pot fi eliminați prin procedeul plasmaferezei.

Fig. 130. Myasthenia gravis presupune pierderea receptorilor de acetilcolină (Ach) de la joncțiunea neuromusculară. a. O sinapsă neuro-musculară normală are un număr mare de receptori ce leagă Ach.

b. Pacienții miastenici au un număr semnificativ mai mic de receptori de Ach.

Serul de la miastenicii negativi pentru anticorpii anti- receptor de acetilcolină poate să transfere maladia la animale de experiență, sugerând că maladia poate fi produsă de anticorpi față de o altă proteină.

Titrul anticorpilor nu se corelează cu severitatea bolii, ceea ce sugerează rolul preponderent al altor factori (neimunitari) în evoluția maladiei.

La joncțiunea neuro-musculară, în stadiile de acutizare a simptomatologiei, se găsesc macrofage.

În special la persoanele tinere afectate de myasthenia gravis, timusul se mărește, rezultând un timom de natură epitelială, limfoidă sau mixtă, iar alteori timusul rămâne nemodificat. În 70-80% din cazurile de timom, în timus se formează centrul germinativ, ceea ce denotă o sinteză locală a anticorpilor. Rareori, timomul este un epiteliom. Efectul favorabil se obține prin timectomie, ceea ce a stimulat identificarea unui factor timic circulant, susceptibil de a deprimă conducerea neuromusculară. Goldstein a izolat, din timusul de vițel, un factor polipeptidic, cu greutatea molară de 6000 D, pe care l-a denumit timopoetină, cu un posibil rol în diferențierea limfocitelor T.

La persoanele vârstnice, timusul este atrofic. La joncțiunea cortico-medulară se găsesc celule mioide, cu receptori de acetilcolină de tip extrasinaptic (embrionar). Maladia poate fi inițiată în timus, față de receptorii de acetilcolină ai acestor celule, iar ulterior se extinde față de receptorul sinaptic de acetilcolină.

Maladia se reproduce experimental la iepure, prin imunizarea organismului cu receptori de acetilcolină, purificați din organul electric de Electrophorus. Forța musculară se reduce, ca și în situația clinică umană. În serul pacienților se găsesc autoanticorpi cu alte specificități: anti-mușchi striat, anti-nucleari, anti-mușchi neted, anti-celulă parietală de stomac.

Ciroza biliară primară

Ciroza biliară primitivă (CBP) fără antigenul HBs este o maladie cronică enigmatică a ficatului, caracterizată prin obliterarea inflamatorie progresivă a ductelor biliare intrahepatice. Limfocitele T se infiltrează și distrug cele mai mici ducturi biliare intrahepatice, rezultatul fiind obstrucția biliară progresivă lentă, icter și în final, ciroza. Maladia se detectează cu precădere la femei, cu o varietate de autoanticorpi, cu complexe imune circulante și activarea complementului, cu

disfuncția celulelor T reglatoare, cu defecte de comutare izotipică a sintezei imunoglobulinelor, cu predominanța celulelor T în infiltratele hepatice periductale.

Autoanticorpul este specific față de autoantigenele tiroidiene, anti-mușchi neted, anticorpi față de antigenele nucleare. Autoanticorpul anti-tiroidian este citotoxic, dar semnul distinctiv al bolii este conferit de anticorpii anti-mitocondriali, cu titru înalt, la 90% dintre pacienții cu ciroză. Anticorpii anti-mitocondriali nu au specificitate de organ și nici de specie.

Titulul seric al imunoglobulinelor crește, iar proteinele complementului diminuează cantitativ, datorită activării cascadei. Scade numărul limfocitelor TCD4 și TCD8.

La examenul histologic, ductele biliare sunt înconjurate și penetrate de limfocitele T infiltrate, în special CD8, care formează adevărate granuloame, ceea ce este neobișnuit pentru patologia autoimună. În mod normal, epiteliul ductelor biliare exprimă numai moleculele CMH I, dar la pacienții CBP, celulele epiteliale biliare exprimă și moleculele CMH II. Apariția acestor molecule poate fi relevantă și definitivă pentru ciroza biliară primitivă autoimună, pentru că celulele epiteliale ale ductelor biliare pot avea rolul de celule prezentatoare de antigen pentru limfocitele TCD4.

Autoanticorpii specifici antimitocondriali constituie semnul distinctiv al CBP. Anticorpii recunosc proteine majore ale membranei mitocondriale interne. Proteinele mitocondriale sunt enzime intracelulare, componente ale unor complexe enzimatice mari. Autoanticorpii par a fi orientați față de situsurile funcționale ale enzimelor, deoarece interferă cu funcțiile lor metabolice. Diagnosticul se bazează pe capacitatea serului de la pacientul cu CBP de a inhiba activitatea catalitică a complexului enzimatic al piruvat-dehidrogenazei.

Mecanismul molecular al etiologiei acestei maladii autoimune nu este înțeles. Este posibil ca antigenele unui agent infecțios să dea reacție încrucișată cu autoantigenele mitocondriale. Pe de altă parte, autoantigenele sunt sintetizate în citoplasmă și transportate în mitocondrii. Mutațiile în secvența leader sau defecte ale degradării lor, pot duce la generarea unor molecule noi și la exprimarea lor pe membrana celulei, unde devin ținta reactivității imunitare. Autoanticorpii anti-mitocondriali nu au efect patologic. Transplantul ficatului normal la un pacient cu CBP nu este urmat de manifestările patologice, deși anticorpii antimitocondriali persistă.

Sindromul Wiskott-Aldrich este x-lincat și se caracterizează prin trombo-citopenie și sângerări. Nivelul IgG este scăzut, iar IgA și IgE sunt crescute.

Sterilitatea imună a bărbaților este caracterizată prin sinteza anticorpilor în lichidul seminal, specifici față de antigenele spermatozoizilor, care imobilizează spermatozoizii, iar la titru înalt, produc chiar aglutinarea lor. Anticorpii se sintetizează local, în structurile epididimului, deoarece concentrația lor este mult mai înaltă decât în sânge.

Maladia Addison

Maladia Addison survine ca o consecință a distrugerii țesutului suprarenalian, în proporție de 90%. Țesutul poate fi distrus pe cale chirurgicală, datorită tuberculozei renale, histoplasmozei, criptococozei, prin mecanism autoimun sau datorită altor cauze necunoscute (maladia Addison idiopatică).

În maladia Addison autoimună, țesutul glandular este infiltrat cu limfocite, iar în ser se găsesc autoanticorpi specifici față de antigene din citoplasma celulelor corticosuprarenalelor, cu specificitate de organ. Autoanticorpii sunt detectabili la circa 80% dintre pacienții cu boala Addison de natură autoimună.

Tehnica imunofluorescenței evidențiază că autoanticorpii reacționează cu toate cele trei straturi celulare ale corticosuprarenalei. Serul unor pacienți reacționează cu antigene ale celor trei zone corticale, alte seruri reacționează cu zona fasciculată și cu zona reticulată și o mică proporție reacționează numai cu zona glomerulară, ceea ce sugerează heterogenitatea bolii Addison, cu implicarea preferențială a diferitelor antigene ale corticosuprarenalei.

Anticorpii serici dau reacție încrucișată și cu antigenele altor celule care secretă hormoni steroidici: cu celulele trofoblastice ale placentei ce secretă HCG; cu celulele interstițiale testiculare Leydig; cu celulele corpului galben ovarian.

Celulele zonei corticale se distrug, iar acolo unde mai rămân, nu mai păstrează arhitectura normală a distribuției în cele trei zone corticale. Celulele sunt hipertrofiate și au aspect vacuolar. Țesutul corticosuprarenalian este infiltrat cu macrofage și plasmocite. Zona medulară este intactă sau infiltrată cu un număr mic de celule limfoide.

Boala Crohn și colita ulcerativă

Boala Crohn și colita ulcerativă sunt maladii ulcerative ale intestinului gros. Ambele constau dintr-un infiltrat intens al macrofagelor și limfocitelor, cu un număr mare de celule plasmatiche. În colita ulcerativă, modificarea patologică constă în inflamația difuză, cu ulcere ale mucoasei. Este implicată numai mucoasa, fără straturile profunde.

În boala Crohn, infiltratul inflamator formează adeseori granuloame și se poate extinde în stratul muscular. Se sintetizează predominant IgG. Mărimea zonei mucoase infiltrate este diferită. Simptomele principale sunt diareea și hemoragia colică.

Leziunile colice sunt induse de anticorpii sintetizați față de antigenele bacteriene, care dau reacție încrucișată cu antigenele tisulare. În celulele epiteliale ale colonului uman se găsește un antigen lipoproteic, care reacționează încrucișat cu anticorpii specifici față de LPS de *E. coli*.

Sindromul Sjogren este o maladie autoimună, caracterizată prin infiltrarea cu celule imunitare a glandelor salivare și lacrimale, cu inflamația cronică și disfuncția acestor țesuturi.

Anemiile hemolitice autoimune

Anemiile hemolitice autoimune (AHA) reprezintă un grup de dezordini cu substrat imunitar, în care se sintetizează anticorpi specifici față de una sau mai multe componente ale membranei eritrocitare, rezultatul fiind liza eritrocitelor. AHA sunt mediate de IgG și IgM.

Anemia hemolitică autoimună se distinge de anemia de aloimunizare fetomaternală, la care IgG matern trece prin bariera placentară. Maladia se deosebește și de anemiile hemolitice imunoalergice, produse de medicamente care se cuplează cu o proteină membranară și formează conjugate inductoare ale sintezei anticorpilor specifici.

Anemia hemolitică autoimună este mediată de anticorpii anti-hematie, care se sintetizează față de antigenele suprafeței eritrocitare și au specificitate, în primul rând față de antigenele sistemului Rh. Anticorpii sunt IgG, de reacție la cald (adică se fixează pe eritrocite la 37°C) sau IgM, de reacție la rece sau crioglobuline 4 (se fixează pe hematii la temperaturi mai mici de 30°C, în capilarele periferice, în sezonul rece). Cea mai comună este maladia cu hemaglutinine la rece, primară sau idiopatică, asociată cu infecția produsă de *M. pneumoniae*, cu virusul Epstein-Barr

sau cu virusul citomegalic. Hemoliza este dependentă de activarea cascadei complementului. Eritrocitele tapetate cu IgM se opsonizează cu C3b și acestea sunt captate de macrofagele din ficat, cu receptori pentru C3b.

In vivo, liza hematiilor survine la 37°C, condiții în care se fixează și complementul și de aceea s-a denumit hemoliză la cald. Simptomele apar la câteva ore după reexpunerea la rece: febră intensă, hemoglobinurie (datorată hemolizei), splenomegalie, deoarece se produce o sechestrare splenică masivă a hematiilor tapetate cu anticorpi. Intensitatea hemolizei este dependentă de titrul autoanticorpilor.

Macrofagele detectează eritrocitele tapetate cu IgG și le fagocitează în absența C3b, dar în prezența C3b, captarea lor este mai rapidă. Hemoliza este aproape totdeauna extravasculară și celulele tapetate cu IgG sunt epurate în special în splină. De aceea, splenectomia este o măsură strategică, cu remisiune parțială a maladiei.

Anticorpii adsorbiți pe suprafața hematiilor pot fi IgG sau IgM, dar pentru că nu produc aglutinarea, s-au numit în mod eronat, anticorpi incompleți. Evidențierea anticorpilor adsorbiți pe hematii se face prin testul Coombs direct, denumit și testul antiglobulinic⁵.

Testul detectează orice anticorp fixat pe suprafața hematiilor (anticorpi anti-Rh sau specifici față de alte antigene eritrocitare) și utilizează antiseruri monospecifice marcate cu fluorocromi, obținute pe iepure, față de antigenele purificate: seruri anti-IgG, anti-IgM, anti-C3, anti-C4. Serurile imune monospecifice se pun în contact cu eritrocitele bolnavului. Dacă pe suprafața lor sunt adsorbiți anticorpii, se evidențiază fluorescența sau, dacă titrul autoanticorpilor este prea mare, se produce chiar aglutinarea hematiilor.

Purpura trombocitopenică este o maladie autoimună, caracterizată prin diminuarea numărului plachetelor sanguine, până la 1/10 din valoarea normală. În serul pacienților se detectează anticorpi antiplachetari. Serul pacienților determină aglutinarea plachetelor indivizilor normali și liza în prezența complementului.

Pemphigus este o maladie a pielii și a membranelor mucoase, caracterizată prin acantoliză, adică pierderea aderenței intercelulare și prin sinteza autoanticorpilor ce se fixează pe suprafața celulelor epidermice. Anticorpii au specificitate față de dezmosom, o componentă structurală cu rol în coeziunea celulelor epidermice. Autoanticorpii nu sunt declanșatori ai maladiei, dar au rol important în progresia ei. Imunofluorescența directă a epidermei lezate, evidențiază imunoglobulinele legate pe suprafața celulelor epidermice. Nivelul anticorpilor anti-celule epidermice se corelează cu gravitatea leziunilor, iar îndepărtarea anticorpilor prin plasmafereză

este urmată de ameliorarea clinică. Maladia poate fi transferată pasiv, prin ser sau imunoglobuline de la pacienți. Anticorpilor anti-epidermici aparțin subclasei IgG4.

Miozita este o maladie idiopatică(cauză necunoscută) inflamatorie a mușchilor, cu o componentă autoimună. Adeseori, pacienții prezintă autoanticorpi specifici pentru una sau alta dintre maladiile autoimune. Cel mai adesea, autoanticorpilor sunt specifici față de proteinele sau ribonucleoproteinele cu rol în sinteza proteică și se cuplează cu ARN.

Cei mai studiați sunt autoanticorpilor față de histidil-ARNt sintetază și respectiv glicil-, alanil-, treonil-, izoleucil-ARN sintetază. Anticorpilor se cuplează cu ARN și inhibă acțiunea enzimei. Titrul lor este variabil, în raport cu stadiul maladii. Enzimele nu se găsesc pe suprafața celulelor musculare, dar se eliberează prin liza celulelor musculare consecutivă infecției cu un picornavirus miotropic, ca de exemplu virusul encefalomiocarditei. Aceste virusuri pot produce miozita și ARN viral poate fi substratul aminoacil-ARNt-sintetazei. Rolul autoanticorpilor în progresia acestei maladii este îndoielnic.

Altă componentă citoplasmatică, inductoare a sintezei anticorpilor este miozina. Miocardita, infarctul miocardic, chirurgia valvulară, grefarea arterelor coronare bypass induc sinteza anticorpilor antimiozină, dar nu se cunoaște rolul lor patologic.

În concluzie, reacțiile autoimune, caracterizate prin sinteza autoanticorpilor și generarea limfocitelor Tc autoreactive, însoțesc multe maladii. Uneori, ele progresează spre maladii autoimune. Autoanticorpilor specifici față de componente ale suprafeței celulare (de exemplu, receptori de hormoni) sunt inductori ai proceselor patologice, iar cei specifici față de ținte extracelulare (moleculă circulante, matricea extracelulară) pot sau nu să producă leziuni. Anticorpilor specifici față de ținte intracelulare produc efecte patogene, dacă antigenul este eliberat din celulă și devine accesibil sistemului imunitar, dacă antigenul este orientat greșit și expus pe suprafața celulei

sau dacă o moleculă ce dă reacție încrucișată are o localizare accesibilă

fixării anticorpilor.

Anticorpilor își exercită efectele prin agregare, blocaj, stimulare, opsonizare, fixarea C, sensibilizare la acțiunea altor celule efectoare.

4 în serul uman normal apar cantități mici de crioglobuline (30 mg/l), dar simptomele pot fi asociate cu concentrații de peste 100 mg/l. Uneori, chiar concentrații mari, de câteva grame/l pot să nu producă manifestări clinice.

Pe baza analizei imunochimice, crioglobulinele sunt distribuite în trei grupe:

- crioglobulinele de tip I (5-10% din crioglobulinemii) sunt imunoglobuline monoclonale și se găsesc, în proporție de 90% din cazuri, la pacienții cu malignități ale limfocitelor B. Cel mai adesea sunt IgM, mai rar IgG, ocazional IgA și foarte rar sunt proteine Bence-Jones;

- crioglobulinele de tip II (50-65% din crioglobulinemii) sunt mixte, cu o componentă monoclonală, care are activitate de anticorp față de IgG policlonal. Componenta monoclonală este IgM (factorul reumatoid), dar poate fi IgG sau IgA;

- crioglobulinele de tip III (30-40% din crioglobulinemii) sunt compuse din una sau mai multe clase de imunoglobuline policlonale, în special IgM, sub forma complexelor Ig-anti Ig. Complexele conțin, uneori, molecule neimunoglobulinice: complement, lipoproteine, fibronectina.

Simptomele clasice ale crioglobulinemiilor apar în formele de tip II și III (ulcerații cronice ale membrelor inferioare, artralgie, insuficiență renală cu proteinurie). Complementul este activat și consumat în proporție de 90%.

Crioglobulinele sunt imunoglobuline care, in vitro la temperaturi mai mici de 37°C precipită sau formează un gel, reversibil la reîncălzire. La titruri mici, ele precipită numai în jurul a 4°C, dar în general, cu cât concentrația serică este mai mare, cu atât crește temperatura de precipitare.

5 Testul antiglobulinic a fost utilizat inițial (1941), pentru detectarea IgG anti-antigene eritrocitare ale sistemului Rh. Se sintetizează două categorii funcționale de anticorpi: cei care determină aglutinarea hematiilor într-o suspensie salină (IgM) și anticorpi neaglutinanți (incompleți sau blocanți) ai izotipului IgG, care nu au acțiune aglutinantă directă. Eritrocitele au sarcină negativă care le menține la o distanță de 20 nm. De aceea, IgG nu leagă încrucișat hematiile, chiar dacă brațele sale au extensia maximă. În schimb, regiunea Fc a moleculei oferă situsul de legare pentru anticorpii anti-IgG. Moleculele de IgG de pe două eritrocite diferite sunt legate încrucișat, producând aglutinarea. Testul este utilizat în imunohematologia clinică:

În diagnosticul anemiei hemolitice prin evidențierea anticorpilor fixați pe suprafața eritrocitelor (testul Coombs direct). Reactivii antiglobulinici specifici anti-IgM, anti-IgA și anti-IgG (toate subclasele) se obțin pe iepure sau pe capră.

În transfuzia sanguină pentru determinarea compatibilității dintre donor și receptor. Celulele donorului se pun în contact cu serul receptorului (testul Coombs indirect). Eventualii anticorpi neaglutinanți se pot evidenția prin adăugarea anticorpilor antiglobulinici marcați cu fluorocromi.

Imunodeficiențele

Organismele imunodeficientă reprezintă, din punct de vedere clinic, adevărate “experiențe ale naturii”, care, alături de studiile experimentale, au contribuit decisiv la fundamentarea concepției actuale cu privire la organizarea și funcționarea sistemului imunitar. Analiza cazurilor clinice ale indivizilor imunodeficienți, a evidențiat faptul că cele două compartimente celulare ale sistemului limfoid sunt semiautonomie, deoarece între ele există multiple interdependențe funcționale.

Maladiile cu substrat imunitar (imunodeficiențele) sunt heterogene, atât în expresia lor imunologică-clinică, cât și în privința mecanismelor celulare și moleculare implicate.

Imunodeficiențele pot fi înăscute (primare) sau dobândite (secundare) și se datorează mai multor cauze:

- pot fi rezultatul unor defecte genetice intrinsece ale celulelor limfoide, care se manifestă prin erori ale diferitelor trepte de maturare, care se succed de la celula stem pluripotentă, până la celula T matură și respectiv, până la plasmocit. Deficiența poate fi datorată lipsei unor enzime esențiale pentru metabolismul celulei (de exemplu, metabolismul purinelor). Consecința este absența limfocitelor din organele limfoide și din circulație;

- altele se produc deleții ale genelor care codifică unele izotipuri de lanț greu (H). Astfel, apar deficiențele selective ale claselor de imunoglobuline;

- imunodeficiențele se pot datora slabei dezvoltării a mediului necesar diferențierii și maturării celulelor limfoide (timus, GALT);

- imunodeficiențele pot fi rezultatul perturbării mecanismelor reglatoare ale celulelor Th și Ts, care controlează răspunsul imun mediat celular și humoral;

- imunodeficiențele pot surveni ca rezultat al catabolizării imunoglobulinelor cu o rată excesivă, sau chiar datorită pierderii imunoglobulinelor din sânge și din secreții, deși celulele limfoide și imunoglobulinele sunt normale sub aspect numeric și respectiv, cantitativ;

Circa 50% din imunodeficiențe se datorează sintezei deficitare a anticorpilor, 10% sunt imunodeficiențe celulare, 20% sunt imunodeficiențe combinate, 18% sunt deficiențe ale fagocitelor și 2% sunt deficiențe ale proteinelor complementului.

Imunodeficiențele înnăscute

Imunodeficiențele înnăscute (primare) au fost descoperite de O. Bruton (1952), odată cu descrierea agamaglobulinemiei și hipogamaglobulinemiei infantile sex-linkată. Maladia afectează băieții și se transmite prin cromosomul X. Pacienții rămân asimptomatici în primele luni de viață, deoarece în această perioadă imunoglobulinele materne asigură protecția antiinfecțioasă. După vârsta de 5-6 luni, pacienții devin foarte sensibili la infecțiile tegumentare cu bacterii piogene și la infecții ale tractului respirator cu streptococi, meningococi, H. influenzae. Pacienții sunt lipsiți de reactivitatea imunitară mediată humoral. În țesuturile limfoide lipsesc plasmocitele, iar foliculii limfoizi nu se formează nici după stimularea antigenică repetată. La electroforeză, serul pacienților nu relevă fracția gamaglobulinică. IgG are concentrația de 1/10 (1 mg/ml față de 10 mg/ml), iar IgM are concentrația de 1/100 din valorile normale. Lipsesc IgA, dar lipsesc și hemaglutininele α și β . În mod normal limfocitele B reprezintă 5-18% din totalul limfocitelor circulante, dar la acești pacienți, proporția lor este foarte mică (mai puțin de 0,1%). Absența limfocitelor B mature se datorează defectelor de maturare, determinate de tirozin-kinaza nefuncțională, codificată de gena mutantă.

Pacienții au reactivitate normală a imunității mediate celular: testul hipersensibilității întârziate la tuberculină este pozitiv, resping alogregele, limitează infecțiile virale, cu excepția hepatitei B (care evoluează rapid spre ciroză) și a celor cu enterovirusuri. Limfocitele T au valori numerice normale. Vaccinurile virale atenuate sunt bine suportate și nu produc infecții clinice.

Disgamaglobulinemiile selective se caracterizează prin incapacitatea sintezei unui anumit izotip imunoglobulinic. Se cunosc deficiențe selective ale IgM, IgA sau ale IgM și IgA, IgA și IgG, IgM și IgG.

Deficiențele IgA se asociază cu o frecvență crescută a infecțiilor tractului digestiv și respirator, iar deficiențele sintezei IgG și IgM se însoțesc cu creșterea sensibilității față de infecțiile tegumentare cu bacterii piogene: Streptococcus, Staphylococcus.

Agama-, hipogama- și disgamaglobulinemiile selective se ameliorează net, prin administrarea intravenoasă a gamaglobulinelor.

Sindromul Di George este consecința hipoplaziei sau ageneziei timice. În cursul vieții embrionare se produce o perturbare a dezvoltării structurilor derivate din perechile a 3-a și a 4-a de punji faringiene. Agenezia timică este însoțită de absența paratiroidelor și de aceea, pacienții, inițial, prezintă alte simptome: hipocalcemie, malformații cardiace. Timusul este foarte redus ca dimensiuni sau chiar lipsește la 1/3 dintre pacienți. Adeseori, timusul există sub forma glandelor ectopice. Imunitatea mediată humoral este normală, reflectată în valorile normale ale concentrației imunoglobulinelor.

Dacă supraviețuiesc, la câțiva ani, pacienții manifestă sensibilitate înaltă față de infecțiile virale, față de bacteriile intracelulare sau față de infecția fungică cu *Pneumocystis carinii*.

Imunodeficiența severă combinată (scid) se caracterizează prin deficitul ambelor compartimente ale imunității, atât celular, cât și cel humoral. Deficiența se datorează absenței celulelor stem de origine a limfocitelor. Lipsesc limfocitele T, B și granulocitele, datorită hipoplaziei generalizate a țesutului reticular hematopoetic. Organele limfoide secundare sunt hipoplazice, iar timusul este absent. Lipsesc imunoglobulinele serice.

Pentru restabilirea funcției imunitare se impune transplantul măduvei osoase.

Imunodeficiențele dobândite

Imunodeficiențele dobândite (secundare) cuprind diverse maladii, datorate unor cauze patologice care interferă direct sau indirect cu funcția imunitară.

Imunodeficiențele dobândite pot fi cauzate de hiperatabolismul imunoglobulinelor. Concentrațiile serice ale imunoglobulinelor reflectă raportul dintre rata sintezei și rata catabolismului acestor molecule. Creșterea ratei catabolismului poate să conducă la o deficiență selectivă a unei clase de imunoglobuline, ce se manifestă prin hipoproteinemie.

Imunodeficiențele dobândite se pot datora pierderii excesive a imunoglobulinelor, la nivelul tractului urinar sau gastrointestinal. Pierderea urinară este consecința defectelor renale glomerulare, a unor disfuncții tubulare sau unor defecte combinate.

Deficiențele glomerulare sunt asociate cu pierderea proprietăților de sită ale endoteliului capilarelor glomerulare. Moleculele imunoglobulinice mici (IgG) trec în urină cu o rată superioară față de moleculele mari (IgM). Totuși, IgG3 și IgG4 rămân normale, ceea ce sugerează că, în afara greutateii moleculare, sunt importanți și alți factori care condiționează funcția filtrului renal. Nivelul seric al IgG scade, proporțional cu gradul perturbării funcției de sită a endoteliului glomerular, iar IgM rămâne normal.

A II-a cale majoră a pierderii majore a imunoglobulinelor este tractul gastrointestinal, la nivelul vaselor limfatice. Cele mai multe situații patologice la acest nivel nu induc hipogamaglobulinemie, cu excepția limfangiectaziei intestinale. Aceasta se caracterizează prin dilatarea excesivă a canalelor limfatice și este însoțită de pierderea masivă de proteine și chiar a limfocitelor. Dilatarea vaselor limfatice este cauzată de obstrucția limfatică, datorită unei infecții (de exemplu, tuberculoza), unei malignități (limfom) sau datorită creșterii presiunii hidrostatice în insuficiența cardiacă severă congestivă. Rata sintezei imunoglobulinelor este normală sau crescută, dar turnover-ul este rapid, datorită pierderii excesive a proteinelor la nivel intestinal.

Imunodeficiențe datorate micronutrienților. Deficiența fierului creează condiții predispozante pentru candidoza mucocutanată cronică. Deficiența zincului supresează funcția celulelor T și predispune la infecții oportuniste. Seleniul este important pentru funcția celulelor T. Deficiența parțială la copii, predispune la infecții.

Imunodeficiențe induse de medicamente. Cele mai multe medicamente citotoxice și imunosupresoare, utilizate în tratamentul malignităților, al inflamațiilor și în imunosupresia pacienților cu transplant de organe, deprimă funcția imunitară celulară și humorală, iar neutropenia predispozează la infecții cu bacterii Gram negative și la infecții fungice. Compușii steroidici utilizați în tratamentul bolii reumatismale, ciclofosfamida și azatioprina, folosite în tratamentul neoplaziilor, după administrare prelungită, deprimă imunitatea mediată celular, dar și nivelul seric al imunoglobulinelor.

Unele imunodeficiențe sunt consecutive altor procese patologice, care interferă cu efectorii sistemului imunitar: deficiența renală sau hepatică are ca efect acumularea substanțelor toxice în organism, cu efect supresor asupra reactivității imunitare.

Dezechilibrul endocrin, cu producerea în exces a cortizonului suprarenalian (în boala Cushing) este asociat cu imunodeficiența. Cortizonul lizează limfocitele T și B circulante și diminuează monocitele periferice.

Stările neoplazice, în special cele care afectează sistemul imunocitar, monocitar sau granulocitar induc un deficit al funcției imunitare. În boala Hodgkin în neoplazia liniei monocitare a ganglionilor limfatici nu se instalează deficiența imunității mediate celular, dar imunitatea humorală este normală. În alte malignități, efectele neoplaziei asupra sistemului imunitar, nu s-au putut disocia de efectele provocate de cașexie.

Mielomul multiplu (tumoră plasmocitară localizată în măduva osoasă) este însoțit de scăderea cantitativă severă a tuturor claselor de imunoglobuline normale și de aici, deficiențe ample ale imunității humorale, dar imunitatea celulară rămâne normală.

Imunodeficiența consecutivă infecției cu HIV

Imunodeficiența consecutivă infecției cu virusul HIV este, în esență, expresia incapacității organismului uman de a neutraliza virionii, în timpul fazei acute a infecției. După contactul primar cu antigenele HIV, organismul se apără prin mecanisme imunitare specifice. Se

sintetizează anticorpi specifici, la un titru crescut. Testul ELISA pentru diagnosticul infecției cu HIV se bazează pe detectarea anticorpilor anti-HIV. Titrul maxim al anticorpilor se corelează în timp, cu nivelul viremiei.

Imunitatea mediată celular anti-HIV se detectează foarte timpuriu după infecție și este dominată de numărul mare de limfocite TCD8, al căror număr crește de 10-20 de ori față de valorile normale (200-600/ γ l). Ele manifestă activitate citotoxică specifică anti-HIV și lizează limfocitele infectate, care expun pe suprafața lor, proteinele env (SU și TM).

Limfocitele TCD8 diminuează viremia primară, atât prin efect citotoxic direct asupra celulelor în care virusul se replică, cât și prin efect represor asupra replicării virale, mediat de citochine. Celulele NK lizează celulele infectate prin mecanismul ADCC.

Răspunsul imun primar, humoral și celular represează replicarea virală după infecție. Deși foarte energetic, răspunsul imun primar nu elimină complet virusul și nici celulele infectate. Organismul nu se sterilizează deoarece anticorpii specifici anti-HIV, produși în timpul infecției primare, nu au activitate neutralizantă optimă. Anticorpii răspunsului imun primar, în esență, nu au efect protector, deoarece răspunsul imun este neadecvat, fie cantitativ, fie calitativ. O proporție importantă a virionilor nu este neutralizată, păstrându-și infecțiozitatea. Rămân de asemenea, multe celule infectate cu virus, în special în ganglionii limfatici, atât limfocite cât și celule foliculare dendritice.

Anticorpii neutralizanți se detectează mai târziu, după trecerea de la faza acută a infecției, la faza cronică. Probabil că anticorpii neutralizanți sunt specifici față de epitopii care nu sunt expuși pe virionii asamblați în cursul infecției primare sau anticorpii răspunsului imun secundar suferă fenomenul maturării de afinitate și se leagă mai eficient de epitopi.

Pe măsură ce infecția progresează, anticorpii neutralizanți sunt înlocuiți cu anticorpi stimulatori (enhancing) ai infecției. Anticorpii stimulatori favorizează infecția celulelor, prin intermediul receptorului pentru C3 sau pentru Fc. Ineficiența anticorpilor este explicată prin aceea că una din glicoproteinele de înveliș al virionilor este foarte glicozilată (circa 24 de situsuri de glicozilare), pe o secvență de 481 aminoacizi. Grupările glucidice maschează epitopii antigenici și împiedică neutralizarea virusului.

Imunodeficiența gravă este consecința directă a scăderii dramatice a numărului de limfocite TCD4 circulante, de la circa 1000 la 100/ γ l. Dacă în stadiul preclinic, proporția limfocitelor producătoare de virus este de 1/40, în stadiile avansate, proporția este 1/10.

Cauza principală a scăderii numărului de limfocite TCD4 este liza consecutivă infecției cu HIV. Proteinele virale sintetizate în celulă au efect toxic. Legarea HIV de membrană și penetrarea în celulă, este asociată cu creșterea volumului celular. Celula pierde controlul influxului ionilor și al apei. Aceste modificări s-au reprodus in vitro cu glicoproteina 120 de HIV. Efectul toxic al glicoproteinelor virale este reversat de antagoniștii canalelor de Ca²⁺, utilizați în clinică pentru a atenua anomaliile neurologice consecutive infecției cu HIV.

La pacienții infectați cu HIV, o proporție semnificativă de limfocite, după stimularea cu antigenele virale, în loc să se activeze și să se dividă, se sinucid prin apoptoză, adică prin activarea programului genetic al morții.

O altă cauză a imunodeficienței o constituie anergia limfocitelor. Cele două glicoproteine (120 și 41) rezultă prin clivajul enzimatic al proteinei precursoră 160. Clivajul proteinei 160 este esențial pentru infecțiozitatea virală. Glicoproteina 120 asociată necovalent cu gp 41 pe suprafața învelișului viral, este ușor eliberată de pe suprafața celulei și a învelișului. Glicoproteina 120 sintetizată în exces, se găsește liberă ("solubilă") în sânge și se leagă de receptorul CD4, producând perturbări ale reactivității imunitare, prin blocarea reactivității limfocitelor. Afinitatea interacțiunii gp 120 cu CD4 este conferită de resturile sale glucidice. Starea de anergie poate fi reversată sub acțiunea stimuloare a IL-2. Complexele imune gp 120-anti gp 120 s-au identificat pe suprafața limfocitelor, la pacienții infectați cu HIV.

HIV-1 infectează limfocitele TCD4, dar și monocitele, macrofagele, celulele dendritice, celulele Langerhans, celulele trofoblastice placentare, neuronii.

Scăderea amplă a numărului de limfocite TCD4, detectabilă în testul transformării blastice cu mitogene, anulează funcția lor reglatoare asupra funcției imunitare. Limfocitele viabile asigură persistența infecției. Diminuarea sintezei IL-2 încetinește proliferarea și diferențierea limfocitelor Tc. În absența celulelor Tc activate, multiplicarea virală este necontrolată. Consecutiv scăderii sintezei IL-2, diminuează activitatea macrofagelor și a celulelor NK.

La organisme infectate cu HIV, numărul limfocitelor B este normal, iar concentrația imunoglobulinelor este de circa 10 ori mai mare decât la persoanele sănătoase. Explicația creșterii titrului anticorpilor este că, în absența limfocitelor TCD4, celulele Ts nu-și îndeplinesc rolul fiziologic de a supresa activarea limfocitelor B, diferențierea lor și sinteza Ig. Limfocitele B se activează nespecific, policlonal. Se sintetizează anticorpi la un titru crescut, dar nu au specificitate anti-HIV și nu sunt protectori nici față de alți agenți patogeni sau potențial patogeni.

Data fiind specificitatea interacțiunii gp 120 cu receptorul limfocitar CD4, s-a încercat utilizarea CD4 solubil ca agent imunoterapeutic. Tulpinile virale de laborator au fost neutralizate eficient de preparatele CD4, dar izolatele primare de HIV-1 sunt relativ rezistente. Absența neutralizării infecțiozității s-a atribuit mecanismelor complexe de intrare a virusului în celulă. CD4 solubil stimulează eliberarea gp 120 din învelișul viral, ceea ce determină creșterea infecțiozității.

Grupurile cu risc major de îmbolnăvire sunt cele ale homosexualilor și ale consumatorilor de droguri. Virusul se transmite și pe cale heterosexuale, mai ales la femei, care transmit infecția fătului.

IMUNOLOGIE TUMORALĂ

După malignizare, membrana citoplasmatică este cea mai modificată structură celulară. Semnalele reglatoare de control al creșterii și multiplicării, care acționează în primul rând prin intermediul receptorilor membranari, nu-și mai găsesc ținta structurală. Incapacitatea celulelor de a recepționa semnalele reglatoare ale creșterii și diviziunii sau de a răspunde adecvat acestor semnale, este cauza principală a comportamentului invaziv al celulelor maligne. Pierderea inhibiției de contact este reflectarea modificărilor suprafeței celulare.

Adeseori, malignizarea este însoțită de sinteza unor molecule noi, localizate în oricare din compartimentele celulei și care se comportă ca antigene tumorale.

Orice structură chimică a celulei maligne, absentă în sau pe celulele normale ale țesutului de origine a tumorii, susceptibilă de a induce o reacție imunitară la gazda primară sau după injectare la o nouă gazdă, poate fi considerată ca antigen tumoral.

ANTIGENE TUMORALE

Se disting următoarele categorii de antigene tumorale:

1. Antigenele tumorale de diferențiere, denumite și antigene oncofetale, deoarece se găsesc atât pe suprafața celulelor unor tumori, dar sunt prezente și în timpul unei faze de diferențiere embrionară. Ele lipsesc pe suprafața celulelor organismului adult sau se găsesc în cantități foarte mici, nedectabile.

a) Antigenul carcinoembrionar (CEA) s-a izolat din sângele unui pacient cu cancer de colon (1965). Este o glicoproteină de 180-200 kD, localizată pe membrana celulelor normale ale tractului digestiv la făt, dar se găsește în cantități foarte mici la subiecții normali adulți.

La făt, CEA este sintetizat în celulele mucoasei gastro-intestinale și este concentrat în glicocalix, pe suprafața luminală a acestor celule. În celulele embrionare normale, CEA pare a avea rol în aderența celulară, dar probabil favorizează metastazarea celor maligne.

CEA este un grup foarte heterogen de molecule, cu o cantitate foarte variabilă de glucide. Raportul proteine/glucide variază între 1/1 și 1/5. Componenta glucidică este reprezentată, în primul rând, de acidul sialic. Imunogenitatea moleculei este conferită de componenta proteică.

La adult, CEA se găsește în cantități mici pe mucoasa colonului, în plămân, în țesutul mamar, dar re apare în cantități mari pe celulele maligne ale tractului digestiv uman (intestin subțire, pancreas, ficat, stomac, colon, rect). CEA se găsește nu numai asociat suprafeței celulelor maligne, dar trece și în sângele a 60-80% dintre pacienții cu cancer de colon. Nu se cunoaște mecanismul prin care CEA ajunge în sânge.

Din sângele pacienților neoplazici, CEA sintetizat de celulele maligne, este epurat la nivelul ficatului. De aceea, cele mai mari concentrații de CEA apar la neoplazicii cu insuficiență hepatică (metastaze hepatice, ciroze).

CEA este un antigen nespecific, deoarece poate să apară, în concentrații mici (10 ng/ml), în sângele unor pacienți cu maladii nemaligne: la cei cu ciroză alcoolică a ficatului sau cu insuficiență renală, astfel că speranța detectării cancerului prin depistarea CEA în sânge, s-a năruit.

Leziunile de orice natură ale mucoasei tractului gastrointestinal sunt însoțite de creșterea sintezei și secreției CEA, care trece și în sânge: în maladia inflamatorie a intestinului, în colita ulcerativă, polipi ai tractului digestiv, tumori ale tractului gastrointestinal.

Unele tumori secretă CEA, mai ales după o metastazare hepatică (adenocarcinomul colonului, tumorile de pancreas, ficat, plămân).

Nivelul CEA foarte crescut, reflectă o evoluție rapidă a tumorii.

b) Alfafetoproteina (AFP) este o glicoproteină majoră a fătului timpuriu, o globulină normală (69 kD) a sângelui fetal uman și a celorlalte mamifere, descoperită în 1956. Conținutul glucidic este de 3,5%. Din punct de vedere structural, AFP este asemănătoare albuminei. Genele codificatoare ale celor două proteine au organizare similară. AFP se detectează în plasmă la embrionul de 4 săptămâni și crește rapid în primul trimestru de sarcină. Nivelul maxim

(2-3 mg/ml) se găsește la fătul de 14 săptămâni și scade la valorile caracteristice adultului, la vârsta de 6-10 luni. AFP se găsește nu numai în plasmă, ci și în fluidele fetale: lichidul amniotic, lichidul cerebrospinal, urină. Cantități mici de AFP (500 ng/ml) străbat placenta și se găsesc în serul femeilor gravide.

În timpul vieții fetale, AFP se sintetizează în ficat, în celulele gastrointestinale. La adultul normal, concentrația sa este nedetectabilă prin metodele imunochimice obișnuite, dar crește în neoplaziile de carcinom hepatic. Circa 70% din cancerurile hepatice primare sunt însoțite de creșterea nivelului seric al AFP. AFP crește și în alte neoplazii: testiculare, ovariene. Nu toate hepatoamele și tumorile testiculare produc AFP, dar cele care sintetizează această glicoproteină, o produc în cantități foarte mari.

Creșterea concentrației AFP în sânge nu este totdeauna asociată cu malignitatea: AFP crește în stările patologice de hepatită virală, hepatită cronică, ciroză, fapt ce reflectă regenerarea celulară.

AFP crește în maladiile inflamatorii ale intestinului: boala Crohn, colita ulcerativă.

AFP este un marker util pentru depistarea cancerului hepatic la populațiile cu risc înalt (chinezi, japonezi, eschimoși din Alaska), dar este inutilă pentru celelalte populații, datorită creșterii nivelului său în afecțiuni nemaligne.

În lichidul amniotic, nivelul crescut al AFP este asociat cu defecte ale tubului neural (spina bifida).

2. Antigenele de transplantare a tumorilor (TATA = tumor associated transplantation antigen).

a) Antigenele specifice de organ se exprimă la un nivel înalt pe celulele tumorale, în timp ce exprimarea lor pe celulele normale este foarte scăzută sau este limitată la un anumit stadiu al dezvoltării țesutului.

Antigenul specific prostatei (PSA) este fosfataza acidă prostatică, o glicoproteină cu activitate proteolitică asupra gelului seminal, pe care-l hidrolizează. PSA se găsește în țesutul prostatic normal, în adenomul benign și în carcinomul malign. Este produs de celulele acinare ale prostatei. În ser, PSA este legat cu α 1-antichimiotripsina, ceea ce influențează valorile furnizate de determinarea sa cantitativă.

PSA crește mult în cancerul prostatic, cel mai comun cancer la vârsta de peste 75 se ani, dar crește și în hipertrofia prostatică benignă. Concentrația sa se corelează cu volumul prostatei, cu stadiul cancerului prostatic, cu răspunsul la terapie.

Glicoproteinele mucinoase sunt antigene de suprafață celulară, cu greutate moleculară mare.

Sunt formate dintr-o axă polipeptidică, de care se atașează numeroase catene oligozaharidice. Glucidele reprezintă 60-80% din greutatea lor moleculară. Sinteza glicoproteinelor mucinoase este consecința pierderii controlului metabolismului celulei neoplazice. Uneori, celula malignă pierde capacitatea de sinteză a unor glicoproteine de suprafață, ca de exemplu antigenul de grup sanguin A și sintetizează molecule absente în celulele normale.

Glicoproteinele mucinoase se exprimă pe suprafața celulelor epiteliale și se detectează în ser, salivă, ori sunt adsorbite pe eritrocite. Ele s-au identificat odată cu disponibilitatea anticorpilor monoclonali: CA 15-3, CA 125, asociate cu cancerul ovarian, CA 19-9, identificat într-o tumoră colorectală (CA = cancer associated). Modificarea cantitativă a glucidelor membranare poate modifica dramatic malignitatea, influențând potențialul de metastazare.

Markerii tumorali imunoglobulinici se identifică prin electroforeza serului sau a urinei. Aparțin izotipurilor IgG, A, M, E sau sunt catene κ sau λ libere. Aproximativ, 1% din adulți au proteine

serice M (monoclonale), iar din acestea 25% au semnificație nedeterminată. 50% din totalul proteinelor serice M sunt datorate mielomului multiplu. Determinarea proteinelor M în sânge sau urină este utilă pentru monitorizarea răspunsului la terapie.

b) Antigenele specifice fiecărei tumori sunt antigene individuale (TSTA = tumor specific transplantation antigen), proprii fiecărei tumori. Sunt exprimate numai în celulele tumorale și nu sunt niciodată detectabile în țesuturile normale. Sunt caracteristice tumorilor induse chimic (L. Gross, 1953). Chiar tumorile multiple induse de același agent chimic (metilcolantren), în același țesut (tegument) al unui organism, sunt diferite în ceea ce privește specificitatea antigenelor de transplantare. Aceasta semnifică faptul că informația genetică declanșatoare a malignizării, rezidă în gene diferite, care suferă mutație sub acțiunea agentului chimic. Fig. 131. Tumorile tegumentare induse de un agent chimic (de exemplu, metilcolantrenul) posedă antigene tumorale strict individuale.

Toate celulele unei tumori induse de metilcolantren sunt identice din punct de vedere antigenic, fapt demonstrat experimental: șoarecele imunizat cu mojarat de celule tumorale, respinge ulterior o greafă de celule vii ale aceleiași tumori.

Datorită unicității lor antigenice, fiecare tumoră indusă chimic, stimulează imunitatea față de antigenele proprii, iar reacțiile încrucișate sunt absente totdeauna.

Antigenele tumorale specifice de transplantare sunt complexe glicoproteice sintetizate în celulă și inserate în membrana citoplasmatică.

Celulele maligne pot să prezinte simultan, atât antigene tumorale comune, cât și antigene specifice.

Tumorile care apar în mod natural sunt slab sau deloc antigenice.

Nu se știe dacă antigenele tumorale sunt prezente de la început pe toate celulele tumorale sau dacă celula devine malignă, fără să dobândească markerii distinctivi de malignitate. Antigenele tumorilor induse de agenți chimici pot fi stabile și se transmit de la o generație celulară la alta, dar majoritatea tumorilor induse de agenți chimici, trebuie considerate heterogene din punct de vedere antigenic, datorită instabilității genetice.

Antigenele suprafeței celulelor maligne sunt supuse modificărilor cantitative și calitative.

La om, 90% din tumori sunt induse de agenți chimici.

3. Antigenele de origine virală sunt comune și se găsesc la toate tumorile induse de același virus, chiar la specii diferite.

Antigenele tumorilor induse de oncovirusuri sunt codificate de programul timpuriu al informației genetice virale. De exemplu, virusurile polioma și SV40 induc tumori la animalele de experiență, iar virusul papiloma este implicat în geneza tumorilor de cervix uterin uman.

Virusurile oncogene ADN induc sinteza antigenelor tumorale cu localizare nucleară și membranară. Sunt proteine nestructurale, care se disting de antigenele capsidale virale. În celulele transformate cu oncovirusuri, nu se detectează antigene capsidale, deoarece programul tardiv al genomului viral nu este transcris și virusul progen nu este asamblat.

SV40 codifică sinteza a două proteine virale (antigene tumorale), de 94 și respectiv 17 kD, iar virusul polioma codifică sinteza a trei antigene, de 100, 55 și respectiv de 22 kD. Antigenul T de 100 kD are o localizare aproape exclusiv nucleară și se sintetizează atât în celulele infectate productiv, cât și în cele transformate. Antigenul de 55 kD este o proteină fosforilată ce se asociază cu oncoproteina Src, o chinază tirozin-specifică, codificată de protooncogenul c-src. Interacțiunea cu antigenul viral produce o stimulare de circa 50 de ori a activității chinazice a oncoproteinei celulare Src.

Antigenele T sunt comune și pentru alte virusuri ale grupului. Toate tumorile induse de un virus, au antigene comune, chiar la specii diferite. Imunizarea organismului receptor de greșă de țesut tumoral cu celule tumorale iradiate sau cu mojarat de celule tumorale de același tip este protectoare față de dezvoltarea tumorii transplantate.

Antigenele T, codificate de oncovirusuri nu se găsesc în structura virionului (proteine nestructurale). De aceea, virionii inactivați nu imunizează și nu protejează organismul față de suspensia de celule tumorale omologe (transformate de același virus).

Antigenele tumorale codificate de oncornavirusuri sunt comune pentru toate tumorile induse de un virus, indiferent de specificitatea antigenică a celulei. Majoritatea sunt antigene proteice virale structurale, adică se regăsesc în structura virionului, ceea ce le deosebește net de antigenele codificate de oncodnavirusuri.

Antigenele tumorilor induse de oncornavirusuri sunt codificate de gena env și au specificitate de grup. Multiplicarea oncornavirusurilor nu interferează cu capacitatea celulelor de a crește și de a se divide. Deoarece antigenele tumorale sunt proteine structurale ale virionilor, imunizarea organismului cu o suspensie virală inactivată, conferă protecție față de celulele transformate de virusul omolog.

Spre deosebire de antigenele induse chimic, care pot fi tari sau slabe, antigenele codificate de virusurile oncogene sunt foarte imunogene.

La om, circa 10% din totalul tumorilor sunt cauzate de virusuri:

- carcinomul hepatocelular (indus de virusul hepatitei B)

- cancerul de col uterin (indus de papilomavirusuri în HPV16, HPV18)

- limfomul Burkitt și carcinomul nazofaringian (induse de virusul Epstein-Barr)

- leucemia celulelor T mature (indusă de HTLV-1).

4. Antigenele tumorale codificate de protooncogene. Mutațiile punctiforme ale oncogenelor în genele ce reglează creșterea normală și diferențierea - și mutațiile genelor supresoare ale oncogenelor, ca de exemplu, p53 și Rb, produc substituții ale unui singur aminoacid în catena polipeptidică codificată, care le transformă în antigene tumorale, codificate de genom. Ele au localizare nucleară, citoplasmatică sau membranară. S-au descris peste 10 antioncogene (supresoare ale oncogenelor) și circa 100 de oncogene (de exemplu, genele ras), ale căror mutații punctiforme determină sinteza unor molecule cu substituții punctiforme de aminoacizi, unice sau multiple și care se deosebesc de moleculele normale. Antioncogenă p53 codifică o proteină nucleară, reglatoare a diviziunii celulare. În celulele maligne, p53 se sintetizează în exces.

După localizare, antigenele tumorale sunt:

- antigene expuse la suprafața celulei. Sunt cele mai importante, deoarece sunt accesibile efectorilor răspunsului imun (TSTA, TATA);
- antigene intracelulare, localizate în nucleu sau în citoplasmă.

Ambele categorii de antigene, se pot elibera fie din celulele vii, fie după necroză și se găsesc în circulație, la distanță de tumoră. Eliberarea lor poate stimula răspunsul imun sau are un efect de blocare a reactivității imunitare, prin fenomenul de inundare antigenică.

Anticorpii antitumorali se obțin prin injectarea celulelor tumorale viabile, ori a mojaratului tumoral, la organismele altei linii genetice sau altei specii, care poartă alte molecule CMH. Celulele vor fi respinse ca o grefă alogenică. Antiserul conține anticorpi anti-antigene tumorale, dar și anticorpi anti-antigene CMH. De aceea, serul imun trebuie absorbit cu antigene tisulare normale. Astfel s-a evidențiat CEA la pacienții cu tumori de colon și AFP la cei cu hepatoame. Antigenul evidențiat de anticorpi în serul absorbit poate fi un antigen tumoral sau un antigen normal, exprimat abundent pe celulele tumorale. Fig. 132. Modificări ale suprafeței celulei, asociate cu transformarea malignă (după Roitt, 1997).

Procesul dezvoltării tumorii are loc în câteva trepte:

- transformarea celulei normale în celulă malignă
- creșterea exponențială a celulei maligne și constituirea tumorii primare
- angiogeneza
- invazia țesutului înconjurător

- intravazarea și eliberarea celulelor tumorale individuale, în vasele sanguine și limfatice, unde trebuie să supraviețuiască
- oprirea celulelor tumorale în diferite localizări (ficat, plămân etc.)
- extravazarea celulelor tumorale și invazia acestor țesuturi
- creșterea tumorii la noile situsuri de metastazare și angiogeneza.

Fiecare etapă a dezvoltării tumorii este influențată de factori imunologici și neimunologici. De exemplu, integritatea condiționează interacțiunile dintre celule. Cu cât aderența celulelor maligne este mai bine exprimată, cu atât tendința ei de metastazare este mai limitată. Celulele maligne eliberează unele componente membranare, ca de exemplu, fibronectina. Pierderea fibronectinei pare să determine scăderea aderenței majorității tipurilor de celule maligne și precede metastazarea. Componentele glicocalixului sunt eliberate sub acțiunea proteazelor, pe care le secretă celulele tumorale. Proteazele (din categoria metaloproteazelor) modifică consistența substanței fundamentale a țesutului conjunctiv, degradează colagenul și proteoglicanii, ușurând metastazarea și invazia.

RĂSPUNSUL IMUN ANTITUMORAL

Creșterea anormală este prevenită prin diferite mecanisme de control: mecanisme de reparare a ADN, acțiunea genelor supresoare ale oncogenelor (antioncogene) sau prin apoptoza celulelor care au suferit leziuni ireversibile. Dacă aceste mecanisme nu mai sunt operative, celula continuă să prolifereze. Celula malignă se află într-o interacțiune dinamică cu micromediul, ce determină supraviețuirea sau moartea ei.

Imunogenitatea tumorilor pentru gazdă și stimularea timpurie a răspunsului imun antitumoral a condus la formularea conceptului imunoprotecției, în acord cu care, organismele elimină celulele potențial canceroase care apar în cursul vieții individuale. Conform acestui concept, cancerul clinic este consecința scăpării celulelor maligne, de acțiunea mecanismelor protectoare. De aceea, factorii care interferă cu reactivitatea imunitară, predispun la malignitate. În concepția

actuală, malignizarea este rezultatul activării oncogenelor sau pierderii funcției genelor supresoare ale oncogenelor (antioncogene).

Teoria supravegherii imune afirmă că sistemul imunitar, monitorizează constant organismul, pentru apariția celulelor tumorale și că majoritatea acestor celule aberante sunt detectate și lizate de sistemul imunitar, înainte de a produce tumori clinice. Așa se întâmplă cu celulele tumorale intens imunogene. Majoritatea (sau toate) celulele tumorale care apar spontan, sunt imunogene și răspunsul imun inhibă creșterea tumorii.

Argumentele în favoarea sau contra acestei teorii sunt greu de obținut. Ele sunt extrapolate din observații asupra tumorilor clinice.

Dispariția spontană a tumorilor și recuperarea completă a pacienților cu cancer diseminat, este rară, dar există și este explicată prin insuficiența vascularizației, prin procese de diferențiere a celulelor tumorale, prin mecanisme psihosomatice. O explicație imunologică, este că raportul dintre creșterea tumorii și răspunsul imun antitumoral este în favoarea răspunsului imun. Există dovezi care sugerează că organismul uman răspunde la prezența tumorilor, prin mecanisme imunitare:

- regresia spontană, în special a melanoamelor maligne, a carcinoamelor renale, a neuroblastomului și retinoblastomului, semnalată în peste 100 de cazuri publicate;

- unele tumori evoluează latent, o lungă perioadă, adică cresc foarte încet sau sunt complet inactice și apoi brusc metastazează. Latența se poate explica prin echilibrul dintre tumoră și sistemul imunitar;

- frecvent tumorile sunt infiltrate cu celule mononucleare: limfocite, monocite, puține plasmocite. Celulele T și macrofagele sunt prezente abundent în tumorile umane, sugerând un răspuns imun antitumoral. Celulele T activate față de tumora autologă, s-au izolat din câteva tipuri de tumori (melanom malign, carcinom renal, cervical). Ele recunosc peptide asociate cu moleculele CMH I, care sunt represate în celulele normale sau peptide derivate din proteinele mutante;

- carcinoamele asociate cu reacție inflamatorie evoluează mai lent decât cele care nu manifestă un răspuns inflamator;

- tumorile sunt mai frecvente la organismele foarte tinere (datorită imaturității sistemului imunitar) și la cele vârstnice (datorită senescenței sistemului imunitar);

- anumite categorii de tumori (cancerle de piele cu papiloma virus, limfoamele pozitive pentru antigenul EBV) au o incidență crescută la pacienții cu transplant, supuși imunosupresiei. Imunosupresia prelungită (20 de ani), este asociată cu creșterea incidenței tumorilor de origine virală, în timp ce incidența celorlalte categorii de tumori, crește foarte puțin. Dovezile clinice sugerează că răspunsul imun este orientat predominant față de infecția cu virusuri oncogene și neoncogene, iar rata apariției altor tumori este relativ nemodificată. Aceasta arată, indirect, că supravegherea antitumorală este relativ inefficientă. Datele experimentale sprijină ideea că supravegherea imună este orientată, în primul rând, față de virusuri oncogene ADN și nu față de oncorna- sau față de tumorile induse de agenții chimici carcinogeni.;

- celulele metastatice sunt comune la pacienții cu cancer, dar frecvența implantării lor și creșterea tumorilor secundare este mică.

Efectorii răspunsului imun antitumoral

Dacă sunt prezente, multe antigene tumorale stimulează răspunsul imun la animalele de experiență și pot induce o stare de rezistență antitumorală față de celulele transplantate. Răspunsul imun antitumoral are o eficiență foarte variabilă, în funcție de natura antigenelor. Astfel, antigenul indus de virusurile oncogene sau ale tumorilor induse de radiațiile UV, sunt foarte imunogene și stimulează răspunsul imun protector, iar antigenul de transplantare al tumorilor induse chimic sunt slabe. Tumorile care apar spontan la animale și la om sunt puțin antigenice și induc un răspuns imun de mică intensitate.

Antigenul asociat celulelor tumorale sunt recunoscute ca nonspecific, de sistemul imunitar al gazdei, dar tumorile secretă antigene solubile, care tind să producă fenomenul de inundare antigenică și paralizie imunitară.

Răspunsul imun antitumoral este humoral și celular. Anticorpul specific, de cele mai multe ori, nu are eficiență antitumorală. Cel mai adesea, celulele tumorale supraviețuiesc acțiunii factorilor humoral și se multiplică. Ineficiența acțiunii lor s-a demonstrat în experiențe cu celule maligne închise în camere poroase, permeabile numai pentru molecule, amplasate în cavitatea abdominală a unor organisme imunizate cu mojarat de țesut tumoral. Anticorpul sunt efectori eficienți față de celulele maligne de origine limfoidă (leucemii, limfoame). După activarea complementului, se produce liza celulei țintă.

Efactorii imunității antitumorale sunt celulele. Rolul lor s-a demonstrat cu același gen de experimente, cu celule maligne plasate în camere poroase, care permit trecerea celulelor efectoare ale răspunsului imun. Rezultatul acțiunii celulelor imunitare este liza celulei țintă. Fig. 133. Antigenul tumoral poate fi prezentat celulelor T, pe diferite căi: direct, în absența co-stimulilor necesari, rezultatul fiind anergia; direct de celula tumorală care exprimă molecule co-stimulatoare, rezultând activarea celulelor Tc; direct de celulele tumorale și indirect via CPA, producând activarea limfocitelor Tc și Th (după Roitt, 1997).

Imunitatea celulară antitumorală este mediată de celule capabile să lizeze celulele țintă, prin interacțiuni specifice sau de celule care nu necesită procese de recunoaștere specifică.

Rolul celulelor NK

Celulele NK sunt cei mai importanți efectori ai imunității antitumorale. Acțiunea lor nu este limitată de identitatea moleculelor CMH și își exercită efectul prin contact direct. Celulele NK nu necesită prezentarea antigenului de către celulele accesorii. Mecanismul molecular al interacțiunii lor cu celula țintă nu este cunoscut.

Activitatea celulelor NK se modifică cu vârsta: are nivel scăzut la naștere, atinge maximum la pubertate și scade gradat cu vârsta. Activitatea lor față de celulele maligne, in vitro, este invers proporțională cu nivelul moleculelor CMH I, exprimate pe suprafața celulelor maligne. Expimarea moleculelor CMH I poate duce chiar la scăparea celulelor tumorale de a fi recunoscute de celulele NK, in vivo. Se presupune că celulele NK controlează celulele pentru nivelul expresiei CMH I. Celulele care au pierdut total sau parțial moleculele CMH I, par a fi recunoscute ca ținte și lizate. Deoarece acțiunea celulelor NK nu este restrictivă în raport cu moleculele CMH, ele sunt active față de celulele tumorale singenice, alogenice și chiar xenogenice.

Importanța funcțională a celulelor NK pentru protecția antitumorală este argumentată de faptul că liniile de șoareci congenital atimici sau cei timentomizați neonatal au un număr mare de celule NK

Celulele K interacționează cu celula țintă prin intermediul receptorilor pentru Fc γ . Celula tumorală tapetată cu IgG este astfel ușor recunoscută de celulele K. Ele se activează și lizează celula țintă prin fenomenul ADCC.

Activitatea celulelor NK și K din sânge, testată in vitro, scade odată cu progresia tumorii. La contactul cu celula malignă, direct sau mediat de anticorpi, celula efectoare eliberează factori citotoxici solubili: perforina, proteaze, TNF- α , limfotoxina (TNF- β). Mecanismul eliberării factorilor litici este același, descris pentru limfocitul Tc.

Celulele NK, activate in vitro de IFN- γ și de IL-2, se numesc LAK (celule killer activate de limfochine).

Activarea celulelor NK și K nu produce memorie imună. Nu există diferențe între răspunsul imun primar și secundar.

Citotoxicitatea mediată de macrofage

Macrofagul neactivat (de la indivizi normali) exprimă un nivel minim de citotoxicitate antitumorală.

Macrofagul activat distinge celulele tumorale de celulele normale și poate să omoare selectiv, celulele tumorale. Activitatea sa citotoxică este independentă de moleculele CMH, dar este dependentă de factori genetici. Macrofagul se activează în următoarele situații:

- după ce leagă prin receptorul pentru Fc, moleculele de imunoglobulină fixate pe determinanții antigenici ai celulei maligne sau complexe Ig α Ag tumoral solubil;
- sub acțiunea factorilor eliberați de celulele T sensibilizate (IFN γ)
- sub acțiunea endotoxinelor bacteriene
- sub acțiunea antigenelor de Mycobacterium, Listeria, Toxoplasma sau după infecția cu aceste microorganisme intracelulare.

Activarea constă în amplificarea ratei metabolice și macrofagul devine killer potențial al celulelor tumorale. Macrofagul activat nu interacționează cu antigenele tumorale specifice, dar

ca și celulele NK, pare să distingă între celulele maligne și cele normale, prin mecanisme moleculare necunoscute.

Macrofagele activate secretă diferite molecule antitumorale:

- enzime hidrolitice care degradează țesutul conjunctiv
- IFN- α , activator al celulelor NK
- TNF- α (cașectina) cu efect stimulator asupra altor celule care eliberează IL
- H₂O₂ și produși de oxidare a glucozei, cu efect toxic direct asupra celulei țintă, prin perturbări membranare
- oxidul nitric (NO), toxic pentru celulele maligne. NO se formează prin combinarea oxigenului cu azotul derivat din dezaminarea enzimatică oxidativă a L-argininei. Reacția este catalizată de nitric-oxid-sintază. NO mediază citotoxicitatea macrofagului, dependentă de L-arginină.

Una din cauzele primare ale patologiei maligne este metastazarea, adică eliberarea celulelor din situsul tumorii primare, pentru a iniția la distanță, creșterea unei noi tumori. Celulele metastazate au aceleași antigene de suprafață, ca și tumora primară. Principalele situsuri de metastazare sunt ganglionii limfatici, plămânul, ficatul.

În studiile experimentale, macrofagele activate s-au dovedit a fi foarte eficiente în reducerea incidenței metastazelor unor tumori.

Imunitatea mediată de celulele T

Imunitatea antitumorală mediată de celulele T, ca mecanism, este analogă răspunsului imun față de alte antigene T-dependente (de exemplu, antigenele CMH). Experiențele in vitro au evidențiat că antigenele tumorale stimulează proliferarea tuturor subpopulațiilor de limfocite T (Th, Ts, Tc). Funcțiile efectoare ale limfocitelor T sunt stimulate de limfochine și monochine (IL-1 și TNF- α), sintetizate și secretate de macrofagele care prezintă antigenele tumorale solubile.

IL-1 stimulează proliferarea celulelor B, T și NK. IL-1 produce și răspunsul febril în reacția inflamatorie, iar TNF- α determină necroza celulelor tumorale.

Limfocitele TCD4 (și NK) secretă IL-2, cu efect stimulator asupra celulelor care o secretă.

IFN γ este secretat de celulele TCD4 (și NK) și activează macrofagele și celulele NK. Interferonul are efect antitumoral direct, dar este și imunomodulator.

Limfocitele Tc au rol important în liza celulelor tumorale, dacă acestea exprimă molecule CMH I. Interacțiunea limfocitului Tc cu celula malignă este specifică. Limfotoxina produsă de limfocitul Tc are efect litic direct asupra celulelor tumorale.

Celula tumorală expune pe suprafața ei, antigene asociate cu moleculele CMH I, dar elimină și molecule solubile, care sunt preluate de CPA și prezentate limfocitelor Th. Acestea secretă IL-2, activatoare pentru toate tipurile de celule cu funcție imunitară, specifică sau nespecifică.

În concluzie, reacția imună față de celulele tumorale are două trepte. În prima etapă sunt activate celulele efectoare nespecifice (macrofage, eozinofile, neutrofile, celule NK) și se produce o reacție inflamatorie locală. Reacția nespecifică ușurează reacția imună specifică, prin diminuarea ratei de creștere a tumorii și creșterea nivelului de prezentare a antigenelor tumorale de către celulele maligne, prin modularea exprimării moleculelor CMH. În faza a II-a, celulele Tc asigură protecția imună față de creșterea tumorii.

Celulele efectoare ale imunității mediate celular, specifică și nespecifică, sunt eficiente în detectarea și liza celulelor tumorale izolate și transplantate. Deoarece detectează celulele tumorale izolate, ele sunt eficiente în prevenirea metastazelor, dar sunt ineficiente față de celulele care constituie o microtumoră.

Mecanisme de scăpare a celulelor tumorale

Antigenele tumorale se găsesc pe suprafața celulelor tumorale. Ele sunt antigene TSTA, mai concentrate sau mai diluate. Antigenele CMH normale nu dispar, dar diminuează cantitativ.

Creșterea tumorilor, în condițiile activării răspunsului imun, nu este explicată satisfăcător. S-au propus mai multe mecanisme prin care celulele tumorale evită recunoașterea de către efectorii răspunsului imun. Când sistemul imunitar este alertat, țesutul tumoral este prea dezvoltat și nu mai poate fi înlăturat.

De cele mai multe ori, tumora nu este imunogenă. Lipsa imunogenității nu se datorează absenței antigenelor tumorale, ci faptului că celulele tumorale nu sunt eficiente în prezentarea antigenului.

Cel mai surprinzător și cel mai studiat mecanism de evitare a răspunsului imun este modularea antigenică. Fenomenul modulării antigenice definește capacitatea tumorii de a masca sau de pierde antigenele, în prezența efectorilor imunitari. De exemplu, celulele leucemice transplantate la șoarecele imunizat cu mojaratul celulelor leucemice care conțin antigenul TL, au pierdut antigenul TL, dar antigenul reapare după transplantul celulelor leucemice la șoarecii care nu au anticorpi serici anti-TL.

Imunoselecția. Antigenele exprimate pe suprafața celulelor tumorale activează răspunsul imun mediat celular, iar antigenele solubile stimulează sinteza anticorpilor. Unele celule tumorale, ca rezultat al instabilității genetice, pierd antigenele inițiale și astfel evită efectorii răspunsului imun specific. Ele devin dominante în masa tumorii. Noile variante antigenice induc răspunsul imun specific, dar fenomenul schimbării specificității antigenice se repetă. Răspunsul imun nu induce schimbarea specificității antigenice a suprafeței celulei maligne, ci selectează celulele care au suferit modificarea antigenică și astfel au devenit rezistente la acțiunea efectorilor imunitari.

Diminuarea reactivității imunitare pe cale naturală sau artificială este însoțită de creșterea incidenței neoplaziilor. Imunosupresia naturală este mediată de limfocitele Ts. Antigenele tumorale par să activeze mai ușor celulele Ts decât limfocitele Th. Limfocitele Ts sunt mai numeroase la pacienții neoplazici și pot să reprezeze răspunsul imun până la ineficiență totală.

Celulele tumorale secretă citochine cu acțiune imunosupresoare, prin efectul lor inhibitor asupra interleuchinelor. Celulele maligne produc IL-10, detectată în lichidul peritoneal și în serul pacienților cu cancer ovarian sau cu alte neoplasme intraperitoneale. IL-10 inhibă exprimarea moleculelor CMH II pe suprafața monocitelor și macrofagelor și diminuează reactivitatea imunitară prin efectele sale multiple asupra limfocitelor, monocitelor, celulelor NK și celulelor dendritice.

Reactivitatea imunitară poate să diminueze datorită mascării antigenelor tumorale. De exemplu, sialomucina, abundentă pe suprafața celulelor unor tumori, maschează antigenele tumorale și le face inaccesibile recunoașterii imunitare și efectorilor imunitari. Sialomucina poate fi

îndepărtată, in vitro, prin tratamentul celulelor cu neuraminidază de *Vibrio cholerae* și celulele își dobândesc sensibilitatea la acțiunea litică a efectorilor imunitari.

Diminuarea reactivității imunitare se poate datora inundării organismului cu antigenele tumorii. Fiind o celulă foarte activă din punct de vedere metabolic, componentele membranei sale au un turn-over ridicat. Antigenele eliberate se complexează cu anticorpilor specifici sau cu receptorii specifici ai limfocitelor, făcându-i ineficienți în recunoașterea celulelor maligne. Efectul imunosupresor al antigenelor tumorale este proporțional cu dimensiunile tumorii și dependent de existența metastazelor.

Efectul de inundare cu antigenele tumorii este argumentat de experiențele de transplant tumoral. Numărul celulelor transplantate este determinant pentru dezvoltarea tumorii. Grefarea unui număr mic de celule (prin injectarea suspensiei) este urmată de respingere, iar grefarea unui număr mare de celule este urmată totdeauna de creșterea tumorii. După ce organismul a respins un număr mic de celule maligne transplantate, se va apăra față de un număr progresiv crescând de celule de același tip. Imunitatea de transplantare față de antigenele tumorale poate fi depășită de un număr de 100-10 000 mai mare de celule tumorale, decât numărul de celule necesar grefei tumorii la animalele neimunizate.

Efectul imunosupresor al tumorii. Pacienții purtători de tumori mari nu răspund la antigenele tumorale, iar limfocitele lor in vitro, au o slabă activitate citotoxică față de celulele tumorale autologe.

Antigenele tumorale exercită un efect imunosupresor în gradient. La un situs îndepărtat de tumoră, efectul imunosupresor diminuează și inoculul mic de celule tumorale este respins. După ce tumora a dobândit dimensiuni importante, efectul imunosupresor este sistemic. Antigenele tumorale circulante se asociază cu celulele efectoare ale sistemului imunitar, chiar în sângele circulant, producând paralizia răspunsului imun.

Creșterea tumorii poate fi stimulată prin fenomenul de enhancement imunitar. Fenomenul de enhancement, descoperit experimental, se definește ca un proces de intensificare a creșterii tumorii, în prezența anticorpilor specifici. Tumorile au fost transplantate la organisme imunizate cu mojarat celular al aceleiași tumori, pentru sinteza anticorpilor specifici. Anticorpilor nu numai că nu resping celulele grefate, ci determină un efect invers, de stimulare a creșterii tumorii, comparativ cu creșterea sa la animalele neimunizate. Anticorpilor cu efect de enhancement sunt IgG, la titru mic.

Fenomenul de enhancement se explică astfel:

- anticorpii ar putea induce un efect imunosupresor, deoarece prin feed-back inhibă sinteza anticorpilor potențial citolitici;

- anticorpii de enhancement sunt citofili, adică se leagă specific pe suprafața celulelor tumorale, formându-se complexe Ag-Ac, care blochează fizic atașarea efectorilor humoralii sau celulari.

Evoluția tumorii este condiționată, într-o oarecare măsură, de tipul anticorpilor care se sintetizează.

Toleranța imunitară este un mecanism eficient de scăpare a celulelor tumorale de acțiunea efectorilor sistemului imunitar. Toleranța se datorează lipsei de reactivitate a limfocitelor Tc și B, care la contactul cu antigenele tumorale nu se sensibilizează și nu generează răspunsul imun, deși față de alte antigene, reactivitatea imunitară este normală. Toleranța survine datorită stimulării repetate cu cantități mici de antigene, dar un rol esențial în inducerea toleranței imunitare pare să revină raportului dintre limfocitele Th și Ts.

Diferite produse tumorale, altele decât antigenele, pot să interfereze cu funcția imunitară și să favorizeze instalarea toleranței imunitare. De exemplu, prostaglandinele diminuează nivelul exprimării moleculelor CMH II pe suprafața celulelor prezentatoare de antigen și pot de asemenea să suprimă activitatea celulelor NK.

Factorii genetici, neidentificați, influențează evoluția tumorii. Unele neoplazii sunt asociate cu incapacitatea limfocitelor T de a activa răspunsul imun, probabil datorită incapacității lor de a recunoaște antigenul.

În concluzie, micile acumulări de celule tumorale, stimulează răspunsul imun. Dar, chiar tumorile imunogene continuă să crească la gazdele imunocompetente, datorită eficienței scăzute a răspunsului imun antitumoral in vivo. Tumorile evită acțiunea distructivă a efectorilor imunitari sau blochează chiar răspunsul imun.

Abordări terapeutice ale neoplaziilor

Terapia neoplaziilor este abordată pe următoarele căi: chirurgicală, radioterapia, chimioterapia și imunoterapia. Oricare ar fi modalitatea de tratament, este necesară reducerea prealabilă a masei tumorale prin rejecție chirurgicală.

Terapia chirurgicală are ca scop reducerea dimensiunilor tumorilor solide, în stadiile timpurii ale neoplasmelor de sân, colon, plămân, prostată - cele 4 malignități majore la om, ce reprezintă peste 50% din totalul tumorilor solide.

Radioterapia poate fi primară sau secundară. Cea primară se practică în cancerele capului, gâtului și în maladia Hodgkin (neoplazie a ganglionilor limfatici, din diferite regiuni ale corpului). Radioterapia este mai eficientă pentru țesuturile moi, în arii adiacente maxilarelor și căilor nazale. Iradierea totală se practică înainte de transplantul măduvei osoase și este foarte eficientă pentru anumite leucemii acute, refractare la chimioterapie și pentru tratamentul unor tumori solide (cancer de sân), care au revenit după câțiva ani de remisiune.

Chimioterapia constă în tratamentul cu medicamente citotoxice, majoritatea fiind produse de sinteză chimică. Scopul chimioterapiei este de a omorî selectiv celulele maligne, deoarece au o rată superioară de creștere și diviziune. Cele mai sensibile la chimioterapie sunt leucemiile. Efectul medicamentelor citotoxice este dependent de doză. Dozele prea mici nu produc efect, iar cele mari au efecte toxice asupra organismului, în special asupra măduvei osoase și asupra celulelor cu o rată mare de diviziune. Doza se calculează la aria de suprafață corporală, preferabilă raportării la greutate. Majoritatea agenților citotoxici se administrează intravenos, calea orală fiind adecvată pentru ciclofosfamidă (și pentru tamoxifen).

Agenții chimioterapeutici, în funcție de mecanismul acțiunii lor, aparțin mai multor clase.

Agenții alchilanți induc formarea legăturilor transversale stabile între cele două catene ale ADN (prin legarea de N7 a guaninei) și inhibă replicarea moleculei de ADN. Interacțiunea poate să se producă cu una sau cu ambele catene ADN. Alchilarea guaninei induce împerecherea anormală cu timina sau depurinarea prin excizia resturilor de guanină. Consecința este ruperea catenei de ADN. Dacă legătura transversală se face între resturile de guanină ale celor două catene, excizia reparatorie poate să rupă molecula de ADN și să rezulte o mutație letală pentru celulă. Agenții alchilanți reacționează chimic cu grupările sulfhidril, amino, hidroxil și fosfat. Acțiunea lor nu are specificitate de fază a ciclului celular, dar celulele sunt mai sensibile în faza G1 și S. Efectul se manifestă prin blocarea ciclului celular după faza G2.

Mecanismul rezistenței dobândite la agenții alchilanți poate să conste într-o retenție scăzută a agentului în celulă, în creșterea sintezei compușilor sulfhidril cu greutate mică și în creșterea

capacității de reparare a leziunilor ADN. Deși au mecanisme asemănătoare de acțiune, diferențele structurii moleculare reduc gradul rezistenței încrucișate între compușii subclaselor majore. Efectele secundare sunt gastrointestinale (greață, vomă) și hematologice (mielosupresie).

Ciclofosfamida este cel mai folosit agent alchilant, în tratamentul malignităților hematologice și a tumorilor solide. Este convertită la forma activă în ficat

Compușii platinei (cisplatin, carboplatin) nu sunt agenți alchilanți, dar acționează printr-un mecanism similar, adică se leagă de N7 al guaninei și realizează legarea încrucișată a catenelor de ADN. Se leagă și cu alte molecule: adenina, citozina, ARN, proteine.

Antimetaboliții (citarabina, fluorouracil, metotrexat, mercaptopurina, hidroxiureea) sunt analogi ai bazelor azotate și inhibă sinteza ADN, ARN sau sinteza proteinelor. Sunt agenți cu specificitate de fază a ciclului celular.

Antagoniștii pirimidinelor. Citarabina (Ara-C) este un compus cu specificitate de fază S. Este metabolizată în celulă la forma activă, ara-CTP, inhibitor al ADN-polimerazei și al sintezei ADN. Ara-C este încorporată în ADN și blochează alungirea catenei, ca și legarea fragmentelor în molecula de ADN nou sintetizată.

Antagoniștii purinelor. 6-mercaptopurina și 6-tioguanina sunt convertite la forma nucleotidică de hipoxantin-guanin fosforibozil transferază (HGPRT). Metaboliții lor inhibă unele enzime ale căii purinice. Unii metaboliți ai

6-tioguaninei sunt încorporați în ADN și în ARN.

Fludarabina este analog al adeninei. Derivatul său, fludarabin-trifosfat, acționează prin inhibiția ADN-polimerazei și ribonucleotid-reductazei și prin încorporarea în ADN

Antagoniștii acidului folic (metotrexat, aminopterina) sunt analogi structurali ai acidului folic.

Alcaloizii din plante (vincristina și vinblastina, izolați din *Vinca rosea*), produc agregarea tubulinei și dezorganizarea microtubulilor celulari. Vinblastina este toxică pentru măduva hematopoetică, iar vincristina are efecte toxice majore asupra terminațiilor nervoase periferice, producând neuropatii senzoriale (parestezie, adică lipsa senzației de durere) și motorii, în degete.

Pentru un număr mare de categorii de tumori, chimioterapia determină o citoreducere importantă. Dar, la câteva luni sau la câțiva ani, creșterea tumorală este reluată și continuă chiar în condițiile reinstaurării tratamentului. Creșterea reflectă dobândirea rezistenței specifice la medicamentele administrate.

În general, dezvoltarea rezistenței la un medicament este considerată ca rezultat al unei rate înalte a mutațiilor celulelor maligne, consecința fiind apariția unor subpopulații heterogene, din care unele sunt rezistente la diferite medicamente. Cea mai importantă mutantă este cea cu rezistență medicamentoasă multiplă, mediată de glicoproteina P, o glicoproteină membranară, care funcționează ca o pompă de eflux, dependentă de energie. Pompa elimină activ din celulă, o varietate de agenți citotoxici: alcaloizii din plante, antibioticele (dactinomicina, doxorubicina, daunorubicina) și unii agenți sintetici (melphalan). Celulele maligne mutante, care exprimă gena codificatoare a glicoproteinei P, sunt rezistente la o largă varietate de medicamente anticancerose.

Imunoterapia încearcă să distrugă celulele maligne, prin manipulări de stimulare a reactivității a sistemului imunitar.

Injectarea citochinelor sau stimularea in vitro, cu IL-2, a limfocitelor autologe, obținute din sângele pacientului, are efecte stimulative asupra răspunsului imun. Rareori s-a produs remisiunea completă a neuroblastomului, a carcinomului renal sau a melanomului malign, ceea ce evidențiază că răspunsul imun față de aceste neoplazii poate fi stimulat. Fig. 134. Modelul unei celule maligne care exprimă glico-proteina P, o proteină transmembranară care funcționează ca o pompă de efluaturale sau artificiale), după care sunt pompate la exteriorul celulei. Funcția glico-proteinei P poate fi inhibată ex. Ea are situsuri acceptoare la care se leagă diferite medicamente anti-cancerose (nometitiv de agenți chimio-sensibilizatori ca verapamil.

Cea mai obișnuită formă de terapie imună a neoplaziilor este utilizarea anticorpilor monoclonali (AMC) cu specificitate tumorală, cuplați cu toxine (toxina difterică, toxina de ricin) sau cuplați cu agenți chimici (I131, medicamente citotoxice), ce suprimă proliferarea celulară. În ansamblu, terapia cu AMC nu a reușit. Cele mai frecvente tumori (de colon, de sân, de plămân, de prostată) poartă antigene proteice intracelulare, inaccesibile AMC. Strategiile chimioterapeutice au progresat mult și oferă mai multe șanse de reușită, la un preț de cost inferior.

În tratamentul limfoamelor celulelor B se folosesc AMC anti-idiotipici față de imunoglobulina membranară a limfomului.

Stimularea nespecifică a țesutului limfoid este o metodă terapeutică introdusă de G. Mathé. El a administrat BCG pentru terapia leucemiilor limfoblastice la copii. Remisiunile se prelungesc ca durată. Celulele de *Corynebacterium parvum* au efecte antitumorale, în asociere cu chimioterapia, iar celule de *C. parvum* și BCG injectate direct în masa tumorii, inhibă creșterea tumorii. Antigenele bacteriene stimulează imunitatea mediată celular. Celulele limfoide sunt atrase în număr mare la locul injectării și acțiunea lor este orientată asupra celulelor tumorale. Macrofagele se activează la contactul cu antigenele bacteriene și dobândesc proprietăți citotoxice față de celulele tumorale, evidențiate in vitro.

Interferonul α (produs de leucocite) se utilizează în tratamentul unor leucemii și în tratamentul limfoamelor, dar este toxic, ceea ce impune limitarea dozei. Majoritatea pacienților, după administrarea interferonului, fac un “sindrom al stării gripale”: febră, senzație de frig, dureri de cap, dureri musculare. Aceste simptome diminuează pe parcursul terapiei și sunt controlate, parțial, cu diferiți agenți farmacologici.

Imunoprofilaxia cu vaccinuri, pentru anumite virusuri, a avut succes la animale. Boala lui Marek, produsă de un herpesvirus, este o maladie limfoproliferativă la puii de găină. Incidența leucemiei felinelor a scăzut, ca rezultat al unui program de vaccinare. Nu există vaccinuri protectoare față de neoplaziile umane.

IMUNITATEA ÎN TRANSPLANTUL

DE ȚESUTURI ȘI ORGANE

Chirurgia transplantului a depășit dificultățile de ordin tehnic. Reușita transplantului depinde exclusiv de reactivitatea imunitară, care declanșează un răspuns de respingere.

Ideia înlocuirii unui organ lezat, cu unul sănătos, a preocupat medicina din timpuri foarte îndepărtate. În mitologia greacă se vorbea de organisme himere, păstrate și astăzi în reprezentările sculpturale sub forma monștrilor fabuloși, a căror origine sugerează o triplă heterogrefă: leu-capră-coadă de dragon sau leu-capră-șarpe. Combinația este interpretată ca o materializare pe plan abstract, a ideii de a asocia organisme foarte diferite. Sirenele (jumătate femeie-jumătate pește) și minotaurii (jumătate om, jumătate taur) exprimau ideia de asociere a acestor organisme foarte diferite.

Perioada științifică a transplantului începe cu Alexis Carrel (medic american, care a lucrat în Franța, autorul lucrării “Omul în ființă necunoscută”), cel care a pus bazele cultivării celulelor și țesuturilor. În 1902, Carrel a făcut grefe de rinichi la animale. În 1906, a grefat plămâni la pisică și a făcut primul transplant de inimă la câine, legând inima de vasele regiunii cervicale. Animalul a trăit 21 de ore.

K. Landsteiner, unul din promotorii perioadei științifice, a descris grupele sanguine și condițiile de compatibilitate majoră între donor și receptor. În 1944, Medawar a conchis că respingerea grefelor de țesuturi și organe are cauze imunitare, iar curând după aceea, Billingham, Brent și Medawar au descris fenomenul de toleranță imunitară.

G. Mathé (hematolog francez) a creat himerele biologice. El a pornit de la ideea că fenomenele de respingere a grefelor de țesuturi și organe sunt datorate stimulării activității sistemului imunitar. În lucrările sale experimentale, a recurs la metoda paralizării reactivității imunitare. În acest scop, puii nou-născuți de șobolan au fost supuși iradierii totale, cu doza de 800 de razi. Rezultatul iradierii este desființarea barierelor imunitare, adică anihilarea reactivității imunitare față de greșă. La animalele iradiate a inoculat câteva milioane de celule din măduva osoasă de șoarece. Autorul a creat astfel, himera biologică șoarece-șobolan (șobolan cu elemente figurate sanguine de șoarece). Himera este sensibilă la infecția cu virusul leucemiei șoarecelui și face leucemia, în timp ce șobolanii convenționali sunt rezistenți la infecția cu acest virus.

Himera biologică este orice organism dotat în mod artificial cu componente celulare, cu țesuturi sau organe, care provin de la alte organisme. Ulterior, tehnicile de inginerie genetică au creat molecule de ADN himere și chiar microorganisme himere, ce poartă informație genetică provenită de la două specii diferite.

În 1967, Christian Barnard a realizat primul transplant de cord la om.

Denumirea de greșă, folosită curent pentru țesutul implantat în organismul străin, vine de cuvântul grecesc grafion, care desemnează un instrument de scriere prin gravură. Denumirea a fost ulterior folosită cu înțelesul de altoi la plante. Denumirea de transplant a fost folosită de Paracelsus și înseamnă a transfera, a muta.

Noțiunea de transplant are un sens mai larg. Ea include fecundarea ovulului de către spermatozoid, ca transplant natural. Fătul este o alogreșă naturală, ce poartă informația genetică

de origine paternă, dar este protejat prin mecanisme cu acțiune placentară, de fenomenele de respingere.

Terminologie. Terminologia modernă referitoare la grefă are trei origini: chirurgicală, imunologică și genetică. Uniformizarea ei a fost cerută de OMS. Relația genetică

și antigenică

între organismul

donor și receptor (Denumire nouă)	Tipul de grefă Denumire veche	Tipul de țesut	Observații
Identitate (autohtonă, autogenă)	Autogrefă Grefă autologă		
		Țesut autogenic	

Individul este atât donor cât și receptor

Identitate Singrefă

(Homogrefă singenică)

Izogrefă

(Grefă izogenă

Grefă izologă)

Țesut singenic (congenic) Organisme identice ale unei linii inbred.

Pentru om, gemeni univitelini.

Diferite Alogrefă

(Homogrefă alogenică) Grefă homologă Țesut alogenic Allos = altul

Organisme ale aceleiași specii dar cu variante alelice diferite.

Foarte diferite Xenogrefă Heterogrefă

(Grefă heterologă) Țesut xenogenic Xenos = străin

Indivzii aparțin unor specii diferite (câine - iepure).

Autogrefele se practică cu o frecvență mare: în cazuri de arsuri, intervenții chirurgicale estetice. Pielea dintr-o regiune a corpului este implantată într-o zonă compromisă.

Alte denumiri se referă la particularitățile țesutului transplantat:

-> grefele homovitale se fac pentru asigurarea viabilității țesutului transplantat

-> grefele homostatice sunt acelea în care țesutul grefat are rolul numai de suport structural, pe care se poate dezvolta țesutul gazdei, pentru restabilirea arhitecturii inițiale. Astfel de grefe sunt lipsite de orice urmă de țesut antigenic, se practică pentru a înlocui un fragment de vas sau de os.

În raport cu locul de unde țesutul a fost luat și locul unde se reimplantează, se disting grefe ortotopice (țesutul grefat este așezat la receptor în aceeași poziție) și grefe heterotopice (țesutul grefat este implantat în alt situs anatomic al organismului receptor).

După 1956, primul succes al grefei de rinichi între gemeni univitelini, transplantul de organe a devenit o practică curentă. Interesul pentru transplant s-a deplasat de la actul chirurgical, la aspectele imunologice.

Argumente ale rolului reactivității imunitare în respingerea grefei

Respingerea grefei este rezultatul activării mecanismelor imunitare, datorită diferențelor antigenice între moleculele CMH I și II ale donorului și receptorului. În favoarea acestei afirmații argumentează mai multe fapte de observație:

-> autogrefele și singrefele sunt acceptate totdeauna, dacă sunt respectate condițiile de asepsie;

-> grefa între indivizi diferiți este respinsă cu atât mai brutal, cu cât diferențele antigenice(biochimice) dintre moleculele CMH ale donorului și receptorului sunt mai mari;

D R

A ----- A ---- O Grefa prinde.

B ----- A ---- O Grefa este respinsă, pentru că organismele diferă prin moleculele CMH.

B ----- AxB ---- O Grefa este acceptată. Capacitatea de a accepta o grefă depinde de existența la organismul receptor, a tuturor genelor de histocompatibilitate ale donorului. Dacă receptorul are un antigen suplimentar, grefa este acceptată.

AxB ----- B ----- O Dacă donorul posedă un antigen suplimentar față de receptor, grefa este respinsă.

-> din punct de vedere histologic, țesutul grefat respins este infiltrat cu celule efectoare ale răspunsului imun: limfocite, macrofage, plasmocite;

-> animalele timetomizate au o capacitate scăzută de respingere a grefelor de țesuturi și organe, care se restabilește după grefarea timusului;

-> debutul fenomenelor de respingere este foarte mult întârziat, dacă organismului receptor de grefă i se administrează ser antilimfocitar (SAL);

-> fenomenele de respingere sunt mai intense la copii, datorită abundenței țesutului limfoid, dar sunt mult atenuate la bătrâni.

Argumente indirecte în favoarea respingerii imunitare:

-> organele grefate rapid după recoltare sunt suportate mult mai bine decât cele care au fost păstrate o perioadă mai lungă de timp în afara organismului. Țesutul transplantat după o perioadă de păstrare, conține mai multe celule lezate și lizate, din care se eliberează molecule nonself, care amplifică răspunsul imun;

-> conservarea în condiții optime mărește gradul de toleranță față de țesutul grefat, iar păstrarea neadecvată are efecte defavorabile;

-> organele și țesuturile sănătoase sunt tolerate mai bine decât cele care prezintă o stare de uzură biologică.

EVOLUȚIA RESPINGERII GREFEI DE PIELE

În raport cu dinamica desfășurării, se disting trei modalități de respingere a grefei de piele.

Respingerea acută sau hiperacută este foarte rar întâlnită și se datorează incompatibilității totale între donor și receptor, care nu aparțin aceluiași grup sanguin în sistemul ABO. În organismul receptor de grefă, există anticorpi circulanți preformați (aglutininele α și β) față de antigenele țesutului transplantat. Lor li se adaugă efectele imediate produse de macrofagele și neutrofilele activate, de anafilatoxinele eliberate din fixarea complementului. Vasele din organul grefat se obturează prin formarea trombilor de coagulare. Grefa nu se vascularizează, rămâne albă și în câteva ore este respinsă.

Respingerea după dinamica răspunsului imun primar survine în cazul în care, între donor și receptor este o incompatibilitate relativă. Grefa se vascularizează, dobândește o culoare normală (roză), dar după 10-12 zile, culoarea se închide, devine purpurie, apar fenomene de respingere și grefa este eliminată.

Respingerea după dinamica răspunsului imun secundar este de tip accelerat și are loc la organisme la care grefa s-a repetat după o altă grefă cu țesut de la același organism donor sau

de la un organism al aceleiași linii înbred. Răspunsul este accelerat, în sensul că fenomenele de infiltrație cu macrofage, neutrofile și limfocite T sensibilizate, se produc foarte repede și în 3-4 zile, grefa este respinsă.

Respingerea grefei de rinichi

Respingerea hiperacută se produce foarte repede după ce s-au stabilit conexiunile vasculare cu organul grefat și se datorează incompatibilității totale între donor și receptor, care nu aparțin aceleiași grup sanguin în sistemul ABO. În primele ore după stabilirea conexiunilor vasculare se produce încetinirea fluxului sanguin, urmată de o stază circulatorie în organul grefat. Rinichiul se încarcă cu o cantitate mare de sânge și dobândește culoarea roșie, fenomen denumit hepatizare. Oprirea circulației sanguine inițiază procesul de coagulare la nivelul capilarelor sanguine.

Cauzele respingerii hiperacute. În sângele organismului receptor se găsesc anticorpi preformați (aglutinine), specifici față de antigenele din organul grefat. Antigenele de grup sanguin în sistemul ABO se găsesc nu numai pe eritrocite, ci și pe celulele endoteliale ale capilarelor sanguine. Aglutininele α și β ale receptorului de greafă ajung în rinichiul grefat imediat după realizarea anastomozelor vasculare. Se formează complexe antigen-anticorp care inițiază fixarea complementului. Endoteliul capilar suferă mici leziuni, suficiente pentru a determina apariția suprafețelor rugoase, de care aderă PMNN. La acest nivel, celulele endoteliale exprimă selectinele, prin intermediul cărora leucocitele aderă de endoteliu și părăsesc circulația. La nivelul suprafeței rugoase se acumulează trombocitele, care se agregă treptat și împreună cu factorii plasmatici, formează trombi care obturează lumenul capilar. În 48 de ore, arteriolele și capilarele se trombozează.

Respingerea hiperacută este o reacție de activare endotelială și grefa este respinsă ca o xenogrefă. Pentru a elimina anticorpii naturali, se practică plasmafereza sângelui receptorului și absorbția anticorpilor pe coloană. Complementul este eliminat prin administrarea veninului de cobră.

Respingerea acută se produce în două variante dinamice:

-> respingerea acută precoce, în 10-14 zile de la transplantare

-> respingerea acută tardivă, în circa 4 luni.

După grefarea țesutului, o parte a antigenelor tisulare se eliberează din rinichi și trec în circulație, ajungând în ganglionii limfatici regionali.

Antigenele declanșatoare ale respingerii grefei

Moleculele CMH ale țesutului grefat stimulează un răspuns imun intens al organismului receptor, a cărui finalitate este respingerea grefei. Moleculele CMH I se găsesc pe toate celulele nucleate, dar au un nivel variabil de exprimare. Moleculele CMH II au o distribuție limitată: pe macrofage, pe limfocitele B, pe unele celule epiteliale și endoteliale, pe celulele dendritice. Nivelul de exprimare a moleculelor CMH I și II este modulată de citochine (IFN și TNF α). Polimorfismul extensiv al moleculelor CMH limitează posibilitatea transplantului numai între parteneri compatibili CMH. Chiar în aceste condiții, grefa poate fi respinsă, datorită diferențelor între antigenele minore ale donorului și receptorului.

Antigenele din greafă au următoarele origini:

-> antigenele libere (antigene "solubile") provin din liza eritrocitelor și din membrana bazală;

-> antigenele CMH exprimate pe celulele dendritice existente în țesutul grefat;

-> antigenes CMH asociate membranelor rezultate din liza celulelor organului, în perioada de conservare.

Antigenele CMH ale donorului pot fi recunoscute pe suprafața celulelor prezentatoare (prezentare directă) sau ca fragmente prelucrate și asociate cu moleculele CMH ale receptorului (prezentare indirectă).

Antigenele eliberate din greafă, ajung în ganglionii regionali ai gazdei și activează limfocitele T și B. Cele mai importante antigene aduse de organul grefat, cu rol esențial în declanșarea conflictului imun, sunt moleculele CMH I și II. Un rol deosebit se atribuie celulelor dendritice din țesutul grefat. Ele exprimă molecule CMH II la densitate foarte înaltă, care determină stimularea inițială a limfocitelor gazdei.

Moleculile CMH I și II libere se comportă ca antigene tari, intens imunogene și nu necesită prezentarea în asociație cu moleculele CMH proprii organismului, pentru a stimula limfocitele T, dar sunt mult mai imunogene dacă sunt prezentate de alte celule, în special de celulele dendritice și de celulele endoteliale.

Răspunsul imun față de țesutul grefat este mediat în primul rând de limfocitele T. Ca dovadă, șoarecii atimici (nuzi) nu resping grefele alogenice de piele și tolerează chiar grefe xenogenice.

La examenul histologic al unei grefe de piele, în cursul respingerii, se observă infiltratul cu mononucleare, multe fiind limfocite. Acumularea lor în țesutul grefat precede respingerea, care survine în câteva zile. În organul grefat, raportul dintre limfocitele TCD4 și TCD8 este 1/3, adică predomină net limfocitele Tc, iar în mod normal, acest raport este 2/1.

Limfocitele T stimulate de antigenele CMH sintetizează interferon γ , activator al macrofagelor din focarul conflictului. Macrofagele devin citotoxice față de țesutul grefat, ca și limfocitele Tc.

Macrofagele secretă IL-1, care produce febra ce însoțește reacția de respingere a grefei. Limfocitele pătrunse în țesutul grefat sunt pasagere. Ele părăsesc grefa, trec în limfă și ajung în ganglioni, unde începe proliferarea, eliberează citochine, care activează limfocitele ganglionare. Acestea devin limfocite efectoare.

Celulele NK nu necesită activarea prealabilă pentru a liza diferite celule tumorale. Ele sunt implicate în respingerea alogrefelor de organe.

Capacitatea de a respinge grefa poate fi ușor transferată prin intermediul limfocitelor de la organismul imunizat prin contactul anterior cu antigenele grefei. Surprinzător, în țesutul grefat nu migrează limfocitele transferate, ci migrează limfocitele organismului gazdă, activate de IL secretate de limfocitele transferate.

Rolul anticorpilor. Ca răspuns față de antigenele țesutului grefat, se sintetizează anticorpi specifici față de antigenele de transplantare. Anticorpii au rol secundar în reacția de respingere a grefelor de țesuturi și organe. Anticorpii au rol foarte important în respingerea grefei, în situațiile în care, anticorpii anti-CMH preexistă la un titru crescut în momentul transplantării. Sinteza lor este indusă de sarcinile multiple, de transfuzii repetate sau de o grefă anterioară. Grefa este respinsă imediat.

Anticorpicii au rol important în respingerea grefelor cu incompatibilitate gravă între donor și receptor, deoarece fixează complementul și produc fenomenul de citoliză. Dacă nu fixează complementul, anticorpicii au rol de opsonine, adică sensibilizează celulele grefate față de acțiunea macrofagelor și neutrofilelor. Anticorpicii sintetizați în țesutul grefat, determină eliberarea mediatorilor reacției de hipersensibilitate imediată (de exemplu, histamina), care produc modificări circulatorii în vasele grefei.

Anticorpicii față de antigenele eritrocitare sunt singurii efectori imunitari eficienți în transfuzia incompatibilă. Efectul lor constă în aglutinarea și liza eritrocitelor.

După grefarea unui organ sănătos într-un organism uzat, din punct de vedere funcțional, organul grefat se aliniază repede la starea generală de uzură a gazdei.

Transplantarea măduvei osoase se realizează pentru tratamentul pacienților cu maladii imunodeficitare, anemie aplazică severă, leucemie, limfom, iar mai recent, pentru dezordinile hematopoetice cu substrat genetic.

La pacienții imunodeficitari, transplantul măduvei osoase este destinat să furnizeze celule stem pentru a restabili sistemul imunitar al receptorului, fără să înlocuiască în mod necesar compartimentul mieloid. Datorită stării nefuncționale a sistemului imunitar, transplantul măduvei osoase poate fi făcut fără tratamentul imunosupresor al gazdei.

Măduva este recoltată prin aspirație din crestele iliace anterioare și posterioare, de la donatorul anesteziat. Amestecul de măduvă osoasă și sânge este plasat în mediu de cultivare cu heparină, într-o pungă hematologică și se administrează fără întârziere organismului receptor, prin infuzie intravenoasă, în cantitatea de 2×10^8 - 6×10^8 celule medulare/kg. Infuzia se face la 1-24 ore după ultima iradiere totală a corpului sau la 36 de ore după ultima doză de ciclofosamidă. Celulele stem circulă în sânge, însămânțează cavitatea medulară și încep să se dividă. În 2-4 săptămâni, crește populația celulară a măduvei și în același timp crește numărul celulelor sanguine periferice. La donator, măduva se reface repede.

Prevenirea respingerii grefelor de organe este posibilă printr-o împerechere cât mai adecvată a donatorului și receptorului din punctul de vedere al asemănării moleculelor CMH și, ulterior, prin instituirea tratamentului imunosupresor. Dar, spre deosebire de alte celule, cele din măduva osoasă sunt foarte antigenice (au o mare densitate a moleculelor CMH I) și din această cauză, receptorul trebuie să fie supus unui tratament radio-chimioterapeutic intens, până la limita suportabilității, pentru ca transplantul de măduvă să aibă succes. Chiar astfel, la pacienții

leucemici, respingerea măduvei osoase poate să aibă loc, în cazul unei împerecheri antigenice neadecvate.

Transplantul de măduvă osoasă ridică o problemă specială: celulele transplantate fiind imunocompetente, pot să inițieze reacția “grefă contra gazdă”, față de antigenele receptorului. Reacția este inițiată față de antigenele tegumentare, ale ficatului și intestinului și este letală la 10-15% dintre receptorii de măduvă osoasă cu molecule HLA identice și la 40% dintre receptorii cu molecule HLA neidentice.

Teste de histocompatibilitate

În transplantul de țesuturi și organe, esențială este asemănarea cât mai accentuată a moleculelor CMH ale donorului și receptorului. Pentru testul gradului de asemănare, se analizează comportamentul limfocitelor celor doi parteneri, în amestec (reacția de amestec limfocitar, RAL). Testul evidențiază diferențele antigenice dintre donor și receptor, în ceea ce privește moleculele CMH II. Pentru reușita grefei, este obligatorie identitatea acestor molecule. Perechea donor-receptor care produce cel mai ușor răspuns în RAL, oferă cea mai bună șansă de acceptare a grefei.

Cel mai adesea se folosesc limfocitele din sânge. Celulele trebuie să fie viabile și în mediu se adaugă ser de vițel (1-10%) și 2-mercaptoetanol. Limfocitele donorului se cultivă în amestec cu limfocitele receptorului, în prezența timidinei H3. Se măsoară nivelul radioactivității limfocitelor, consecutiv încorporării timidinei H3 pentru sinteza ADN. RAL reflectă răspunsul proliferativ al celulelor T, cu puține sau fără celule B. Transformarea blastică nu se produce în RAL a gemenilor monoziși. Într-un amestec celular $a \times b + a \times c$, răspunsul este bidirecțional. Cea mai amplă reacție are loc între limfocitele care se deosebesc prin moleculele CMH. Cel mai puternic stimul în RAL îl reprezintă aloantigenele CMH II, cu un polimorfism foarte înalt, iar aloantigenele clasa I au un rol stimulator limitat. Moleculele CMH II se găsesc pe limfocitele B, pe macrofage, pe celulele dendritice, iar pe limfocitele T, numai după activare. Se pare că răspunsul în RAL nu este orientat față de epitopii CMH propriu-ziși, ci față de o largă varietate de peptide self legate de moleculele CMH, rezultate probabil prin degradarea diferitelor proteine celulare. Dat fiind polimorfismul deosebit al moleculelor CMH, probabil că marea majoritate a limfocitelor T din amestec manifestă aloreactivitate față de cel puțin unul din aloantigenele CMH ale speciei.

Pentru răspunsul unidirecțional, una din cele două populații celulare (de obicei a donorului) se inactivează prin tratament cu mitomicină C (pentru inhibiția sintezei ADN) sau se supun iradierii.

Tratamentul inactivează celulele T, dar nu interferează cu imunogenitatea lor. În RAL se activează numai limfocitele receptorului de greafă, ca răspuns la aloantigenele donorului.

În cazul grefei unui organ imunocompetent la o gazdă imunodeficientă, în RAL se inactivează limfocitele receptorului, pentru a evalua reactivitatea limfocitelor donorului, care ar putea iniția o reacție greafă contra gazdă.

Compatibilitatea donor-receptor pentru antigenele CMH I se testează cu seruri imune anti-CMH I. Se analizează reacția limfocitelor celor doi parteneri, față de un număr cât mai mare de seruri anti CMH I. În laboratorul de profil există seturi de seruri anti-CMH I, recoltate de la persoane care au o bogată experiență antigenică HLA:

-> persoane care suferit transfuzii sanguine multiple și astfel s-au imunizat față de antigenele HLA;

-> femei multipare, care au avut sarcini multiple cu parteneri diferiți.

Serurile anti-CMH se pun în contact cu limfocitele donorului și cu ale receptorului de greafă. Anticorpii anti-CMH se fixează pe suprafața limfocitelor și astfel este inițiată transformarea blastică. Se determină un coeficient de reactivitate (coeficient de transformare blastică), pe baza numărului de limfocite transformate.

Dacă limfocitele donorului și receptorului se comportă asemănător față de un număr mare de seruri, concluzia este că cele două populații de limfocite sunt asemănătoare.

Dacă titrul anticorpilor anti-CMH în ser este crescut, se poate produce nu numai activarea limfocitelor, ci chiar aglutinarea imună sau, după fixarea complementului, citoliza.

Xenotransplantarea

Termenul semnifică transplantul de țesuturi și organe între organisme de specii diferite. Interesul clinic pentru xenotransplantare a fost determinat de lipsa organelor umane. Succesul alotransplantului a creat un necesar care depășește disponibilul. În 1963, transplantul de rinichi de cimpanzeu la om, a prelungit supraviețuirea cu 9 luni și moartea a survenit după complicațiile

provocate de imunosupresie. În 1984, inima de babuin a fost transplantată la om. A urmat transplantul de ficat de maimuță, transplantul de celule neurale de embrion de porc, la un pacient cu boală Parkinson, transplantul de măduvă osoasă de la babuin, la un pacient cu SIDA.

Barierile xenotransplantării sunt multiple: unele organe de la alte specii nu funcționează adecvat în noul mediu. Rinichiul de cimpanzeu este funcțional în organismul uman. Persoanele transplantate cu rinichi de porc devin anemice, probabil pentru că eritropoetina nu este activă, iar cele cu ficat de babuin au nivele mai mici de colesterol (echivalente cu cele de babuin) și nivele foarte scăzute de acid uric (pentru că ficatul de babuin nu produce acid uric). Grefarea celulelor sanguine stem xenogenice este limitată de absența factorului de creștere specific celulelor stem transplantate.

Xenogrefele pot fi neconcordante (de la porc) sau concordante (de la cimpanzeu, babuin). La perechile neconcordante, titrul anticorpilor preformați este detectabil și xenogrefele sunt respinse hiperacut (în câteva minute), prin reacția de activare a endoteliului. Pentru respingerea hiperacută a grefelor neconcordante, un alt factor critic (alături de anticorpii preformați) al producerii leziunilor endoteliale este complementul și proteinele sale reglatoare. În combinația porc-om, anticorpii preformați se leagă la nivelul determinantilor antigenici de galactoză α (1,3)-galactoză ai endoteliului grefei, deoarece omul a pierdut gena pentru enzima alfa-galactozil-transferază și nu posedă acest epitop. Activarea complementului se face pe calea clasică, iar în absența anticorpilor preformați, pe calea alternativă. În esență, respingerea hiperacută se datorează reacției endoteliale la activarea complementului, mediată de anticorpii preformați (IgG anti- α -gal).

Incompatibilitatea combinației porc-om se datorează faptului că porcul exprimă un nou antigen de grup sanguin, α -gal(gal- α 1,3-gal) (la om, specificitatea antigenică a grupului 0 este conferită de L-fucoză, a grupului A, de N-acetil-galactozamină, galactoză și L-fucoză, iar a grupului B, de D-galactoză și L-fucoză). α -gal nu este singurul determinant recunoscut de anticorpii naturali umani. Alte heteroantigene pot deveni importante, după transplantul organului. Anticorpii xenoreactivi, specifici față de epitopii α 1,3-gal și complementul sunt factorii majori ai respingerii hiperacute.

Ținta respingerii hiperacute este endoteliul vascular. Activarea endoteliului produce cele mai evidente manifestări ale respingerii hiperacute: tromboza intravasculară, hemoragia extravasculară și edemul.

În asocierile concordante, titrul anticorpilor preformați nu este detectabil și respingerea este acută, datorită aceluiași fenomen de activare a endoteliului vascular.

Respingerea întârziată (acută) a xenogrefelor concordante se face în 2-3 zile (mult mai repede decât a alogrefelor). Din punct de vedere histologic, respingerea acută relevă mai puțină hemoragie, dar cu tromboză intravasculară semnificativă, ca și în reacția hiperacută, deoarece ținta este endoteliul vascular. Respingerea acută a xenogrefei se datorează anticorpilor a căror sinteză este indusă de antigenele xenogrefei. Se sintetizează preponderent IgG anti- α -gal, al căror titru crește rapid.

Progresul în xenotransplantare s-a făcut în sensul prevenirii respingerii hiperacute: imunosupresia receptorului de greafă și ingineria genică a donorului pentru a elimina marile diferențe antigenice dintre xenogrefe și alogrefe. La șoarece s-a reușit eliminarea genei galactozil-transferazei prin recombinare homologă, dar tehnologia nu este adecvată pentru alte specii. Eliminarea antigenului α -gal, expune un nou determinant glucidic, față de care omul are un nivel scăzut de anticorpi preformați.

Imunosupresia

Variantele alelice multiple codificatoare ale moleculelor CMH fac cu totul improbabilă posibilitatea ca două organisme să fie identice pentru moleculele CMH, cu excepția gemenilor monozi-goți. Natura determinismului genetic al moleculelor CMH nu este favorabilă transplantului de țesuturi și organe. Amplitudinea procesului de respingere a grefei este parțial dependentă de gradul de incompatibilitate al antigenelor CMH, dintre donor și receptor.

Scopul imunosupresiei selective este de a menține funcționalitatea mecanismelor de apărare a organismului, față de infecțiile virale, bacteriene, fungice și față de paraziți, de a păstra capacitatea SFM de a fagocita celulele îmbătrânite și de a proteja mecanismele de imunosupraveghere care elimină celulele maligne. Pe de altă parte, se urmărește inducerea stării de toleranță față de antigenele organului grefat (rinichi, ficat, inimă). În cazul maladiilor autoimune, dezideratul imunosupresiei este inhibiția selectivă a reactivității imunitare autoagresive față de antigenele retinei (în uveită) sau față de antigenele colonului (în boala Crohn).

Un medicament imunosupresor trebuie să întrunească următoarele criterii:

-> să inhibe activarea răspunsului imun și să fie eficient față de procesele imunitare în curs de desfășurare;

-> să aibă acțiune selectivă, adică să producă deleția clonală sau să inactiveze numai anumite subpopulații de celule imunocompetente;

-> să aibă un index terapeutic bun, adică un raport favorabil între doza terapeutică și cea toxică.

Pentru supraviețuirea grefei, transfuziile de sânge cu specificitatea antigenică a donorului sau transfuziile nespecifice, ca și testele de histocompatibilitate sunt importante numai dacă se asociază cu imunosupresia, cu scopul diminuării reactivității imunitare. Terapia imunosupresoare este foarte complexă, pentru că nici un agent chimic nu are acțiune strict selectivă asupra țesutului limfoid. Imunosupresia se realizează prin:

-> iradierea x

-> terapia imunosupresoare

-> metode imunologice.

Terapia imunosupresoare. Medicamentele imunosupresoare inhibă nespecific reactivitatea imunitară și se administrează atât după grefa tisulară, cât și pacienților cu maladii reumatice, caracterizate prin reactivitate imunitară excesivă.

Imunosupresia s-a realizat cu o varietate de agenți terapeutici: hormoni corticosteroizi, medicamente citotoxice. Cele mai multe metode convenționale de imunosupresie își realizează efectul în mod neselectiv.

Medicamentele citotoxice au fost inițial folosite în tratamentul neoplaziilor, dar reprezintă o modalitate importantă de imunosupresie pentru tratamentul maladiilor autoimune.

Chimioterapia administrată pacienților neoplazici produce, uneori, o imunosupresie profundă. Medicamentele citotoxice sunt imunosupresoare deoarece distrug celulele imunocompetente sau blochează proliferarea lor.

Agenții citotoxici folosiți pentru imunosupresie (dar și în tratamentul neoplaziilor) sunt:

-> agenți alchilanți

-> antimetaboliți: analogi ai purinelor (6-mercaptopurina și azatioprina); analogi pirimidinici (citozin-arabinozida);

-> antagoniștii acidului folic (methotrexatul).

Ciclofosfamida este compusul prototip al agenților alchilanți. Acțiunea sa este nespecifică, asupra tuturor subpopulațiilor de limfocite și a celulelor nelimfoide care intră în faza S.

Agenții din categoriile menționate, au acțiune nespecifică, adică acțiunea lor nu este limitată la celulele imunocompetente. Ei produc leziuni asupra tuturor celulelor aflate în mitoză, inclusiv asupra celulelor hematopoetice. Respingerea grefei poate fi blocată, dar acțiunea neselectivă a acestor agenți produce efecte secundare toxice prea severe și rezultatele au fost considerate ca nesatisfăcătoare.

Ciclosporina este un peptid ciclic lipofil, izolat din culturi de microorganisme și acționează specific asupra limfocitelor, inhibând transcrierea genică pe o cale dependentă de Ca, adică blochează progresia ciclului celular de la G0 la G1. Este un agent imunosupresor mai selectiv, deoarece acționează asupra celulelor Th, fără efecte notabile asupra altor subpopulații de limfocite T, asupra limfocitelor B, granulocitelor sau macrofagelor. Efectul major pare a fi inhibiția sintezei IL-2. Imunosupresia cu ciclosporină este o modalitate imunofarmacologică, datorită acțiunii sale selective față de celulele imunocompetente.

În ultimii ani s-au identificat câțiva compuși chimici naturali, izolați ca și ciclosporina, din culturi de microorganisme: tacrolimus, sirolimus (rapamycin), mizoribine și spergualin.

Tacrolimus este o lactonă macrociclică lipofilă, cu mecanism de acțiune asemănător cu al ciclosporinei. Sirolimus este un macrolid care inhibă proliferarea celulelor T, prin blocarea trecerii de la faza G1 la faza S.

Imunosupresorul ideal va media inducerea toleranței, în special în transplant, adică va permite sistemului imunitar să adopte ca self, moleculele CMH specifice țesutului grefat.

Radiația ionizantă x și gama produce ionizarea atomilor și generează radicali liberi, în special radicalul OH., foarte reactiv, principalul agent ce mediază moartea celulelor iradiate. Efectele radiațiilor ionizante sunt dependente de doză. Celulele stem și celulele imature sunt foarte sensibile. Limfocitele T sunt mai rezistente decât limfocitele B, iar monocitele și macrofagele sunt relativ rezistente.

Corticosteroidii sunt cele mai folosite medicamente, cu efect inhibitor asupra răspunsului imun, dar și al proceselor inflamatorii. S-a propus mecanismul limfolizei, dar la om acest efect nu se produce. Timp de 4-6 ore după administrare, corticosteroidii reduc numărul de leucocite circulante (limfocite, monocite, eozinofile), dar crește semnificativ numărul neutrofilelor. Valorile leucocitelor revin la normal în 24 de ore. Limfocitele T, precum și monocitele părăsesc circulația și migrează în măduva osoasă, iar limfocitele B sunt relativ rezistente la corticosteroizi. Eozinopenia, după injectarea corticosteroizilor, explică efectele benefice ale acestor hormoni la persoanele alergice.

Serul antilimfocitar (SAL) și globulina antitimocitară se obțin prin injectarea limfocitelor, respectiv a timocitelor, la o specie xenogenă. Se folosesc celulele ductului toracic sau timocitele pentru imunizarea iepurelui sau calului. Din serul heterolog se separă fracția imunoglobulinică, ce se administrează intravenos pentru depășirea unei stări critice după grefare.

Anticorpii policlonali din SAL au fost înlocuiți cu AMC specifici față de antigene celulare de suprafață: AMC anti-receptor de IL-2 și anti CD4.

Deoarece citochinele sunt molecule foarte importante în reacția imunitară, s-a încercat neutralizarea lor cu receptori solubili.

Deleția specifică a populațiilor de limfocite este posibilă cu preparatele denumite imunotoxine. Acestea sunt complexe ce constau din două componente: un anticorp monoclonal care asigură recunoașterea specifică a țintei celulare și o componentă toxică (ricina, toxina difterică).

Interacțiunile sistemului imunitar

cu sistemul neuroendocrin

Sistemele imunitar, nervos și endocrin sunt interconectate structural (anatomic) și funcțional, ceea ce a condus la conturarea unor noi domenii interdisciplinare, ca neuroimunoendocrinologia, neuroimuno-modularea și psihoneuroimunologia. Sistemele enumerate au în comun capacitatea de răspuns la un număr de stimuli comuni (hormoni steroizi, citochine, neuropeptide), care furnizează baza moleculară a integrării bidirecționale. Starea psihică influențează reactivitatea imunitară și intensitatea răspunsului inflamator a organismului. Există dovezi certe că anomaliile neuroendocrine au rol important în inducerea disfuncțiilor imunitare, materializate, în primul rând, în manifestările autoimune. Pe de altă parte, vârsta, genul și alți factori genetici reglează interacțiunile imuno-neuroendocrine.

Cele mai pregnante interacțiuni neuroendocrinoimunitare se produc în starea de stress. Stressul este definit ca o condiție dinamică în cursul căreia homeostazia normală (starea de echilibru a mediului intern) este perturbată sau periclitată. Starea de dezechilibru este indusă de factori de stress, fizici sau psihologici. Factorii de stress, fizici sau mentali, declanșează un răspuns complex adaptativ, denumit răspunsul de stress sau de alarmă, menit să contracareze efectele factorului de stress. Intensitatea răspunsului adaptativ este dependentă de vârstă, gen, starea hormonală și de alți factori genetici. Fig. 135. Interacțiuni neuro-endocrino-imunitare.

Stressul presupune în primul rând, modificarea unor componente mentale și comportamentale. Crește brusc activitatea sistemului nervos central ce controlează starea de veghe, alerta, starea psihică, atenția, concentrarea atenției și este inhibată activitatea vegetativă care controlează hrănirea și reproducerea. În răspunsul la stress se produc modificări fizice ale sistemului circulator, care redirecționează nutrienții spre organele activate. O reactivitate prea mare sau prea mică la stress poate produce sau poate contribui indirect la manifestări patologice.

Răspunsul la factorii de stress este mediat de factorul (hormonul) de eliberare a corticotropinei (CRH), de axa hipotalamo-hipofizo-corticosu-prarenală și de sistemul nervos simpatic. CRH este produs în primul rând în hipotalamus, dar și în alte arii ale creierului și în sistemul nervos periferic și are următoarele funcții:

- controlează starea de veghe, starea psihică și integrează sistemele de răspuns la stress;

- activează axa hipofizo-corticosuprarenală, stimulând secreția ACTH și a corticosteroidilor;

- activează sistemul nervos simpatic, cu stimularea epinefrinei și norepinefrinei.

CRH este activatorul stării de alarmă, manifestată prin creșterea glicemiei, a ritmului cardiac, a tensiunii arteriale, dar inhibă funcția imunitară și răspunsul inflamator. Efectul activator al CRH asupra sistemului nervos simpatic este mediat de locus ceruleus, care își proiectează axonii în trunchiul cerebral și în hipotalamus, ceea ce contribuie direct la eliberarea mediatorilor simpatici (epinefrina și norepinefrina) în arii foarte largi ale SNC. Activarea sistemului nervos simpatic stimulează eliberarea CRH din neuronii nucleilor paraventriculari sub acțiunea impulsurilor cu originea în locus ceruleus.

Sistemul de răspuns la stress funcționează ca o buclă feedback pozitivă, bidirecțională. Activarea unui component al sistemului, activează pe celălalt. Serotonina și acetilcolina activează răspunsul la factorii de stress, iar MSH (hormonul stimulator al melanocitelor) și acidul gama aminobutiric sunt inhibitori.

Corticosteroidii sunt componentele majore ale sistemului de răspuns la stress și inhibă cele două componente majore ale răspunsului (secreția CRH și sistemul nervos vegetativ), dar și reactivitatea imunitară și răspunsul inflamator.

Răspunsul activator la stress influențează axa hipotalamo-hipofizară cu componentele ei: hipotalamus-hipofiză-tiroidă (HHT) și respectiv, hipotalamo-hipofizo-gonadală (HHG).

Chiar dacă stressul acut stimulează secreția hipofizară a hormonului de creștere, stressul cronic, prin intermediul CRH, stimulează secreția hipofizară a somatostatinei (inhibitor al creșterii). Somatostatina, a cărei secreție este stimulată de CRH, inhibă secreția de TSH, iar glucocorticoizii inhibă conversia tiroxinei, relativ inactivă, la triiodotiroxină. Aceste răspunsuri sunt adaptative și se corelează cu necesitatea limitării pierderii energiei.

Activarea răspunsului la stress inhibă axa HHG, la mai multe nivele. CRH inhibă sinteza factorului eliberator al hormonului luteinizant din nucleul arcuat hipotalamic, fie direct, fie prin intermediul corticosteroidilor. Corticosteroidii inhibă secreția hormonului luteinizant (LH) hipofizar și concomitent, producția hormonilor gonadali: estrogeni, progesterona, testosteronul.

Hormonii tiroidieni și sexosteroizi influențează activitatea axei hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenale (HHC). Hipotiroidismul inhibă axa HHC. La organismele de sex feminin (șoarece, șobolan, om), axa HHC este mai activă decât la masculi, adică stressul induce un

răspuns mai amplu, măsurabil prin nivelul mai înalt al corticosteroidelor. Ovarectomia diminuează eliberarea corticosteroidelor, iar orhiectomia mărește rata sintezei corticosteroidelor la stress.

Răspunsul integrat neuro-imuno-endocrin este mediat nu numai de hormoni, ci și de interleuchine, cele mai cunoscute fiind IL-1 și IL-6.

IL-1 activează axa hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenală, stimulând eliberarea ACTH hipofizar, iar sinteza ei este inhibată de glucocorticoizi. Endotoxinele stimulează producerea IL-1 în hipofiză și astfel secreția ACTH este reglată local, în hipofiză.

IL-1 este sintetizată local, în arii discrete ale SNC (hipotalamus, hipocamp). Aceste arii reglează răspunsul la stress.

Rolul corticosteroidelor în reglarea funcției imunitare

Asemănarea dintre hormoni și imunoglobuline rezultă din similitudinea structurală și funcțională a celor două categorii de molecule: ambele conțin o regiune de legare la un receptor celular și o secvență cu rolul de a transmite semnale specifice la un sistem efector.

Există dovezi că moleculele CMH I, implicate în prezentarea antigenelor, au rol de receptor pentru insulină.

Corticosteroidii reglează toate componentele răspunsului imunitar și inflamator, chiar și creșterea și diferențierea timocitelor. Nivelul corticosteroidelor crește într-un interval de ordinul minutelor, după expunerea la factorul de stress. Rolul lor este de a limita extensia răspunsului și a procesului inflamator. Amplitudinea lor prea mare poate să producă leziuni, inclusiv maladii autoimune.

Administrarea corticosteroidelor, la rozătoare, produce moartea apoptotică a limfocitelor timice. Limfocitele T mature (periferice) umane sunt rezistente la corticosteroizi, dar cele timice sunt sensibile. Creșterea nivelului plasmatic al corticosteroidelor, produsă de stress, induce apoptoza timocitelor.

Corticosteroidii par a fi implicați în selecția timocitelor cu specificitate față de antigenele nonsel. Concepția dominantă presupune că timocitele sunt selectate pentru apoptoză sau supraviețuire, în funcție de capacitatea lor de a se asocia cu moleculele CMH. Timocitele cu receptori (RCT) de mare afinitate pentru moleculele CMH, sunt potențial generatoare ale maladiilor autoimune și suferă moartea apoptotică. Cele cu receptori de mică afinitate pentru moleculele CMH mor de asemenea prin apoptoză, sub acțiunea corticosteroidilor. Supraviețuiesc numai timocitele cu receptori de aviditate medie pentru moleculele CMH. Selecția limfocitelor în timus este controlată de hormoni sintetizați local. Astfel, timusul exprimă activități neuroendocrine multiple, inclusiv sinteza CRH și ACTH. CRH stimulează secreția ACTH, iar ACTH induce producerea corticosteroidilor în celulele corticosuprarenalelor. Sinteza neuropeptidelor (CRH) în timus este deosebit de interesantă, având în vedere rezultatele care susțin că celulele timice epiteliale conțin enzime steroidogene și sintetizează corticosteroizi, în special în perioada fetală și neonatală. Astfel, timusul poate să sintetizeze toți hormonii produși prin activarea axei HHC.

Corticosteroidii reglează dezvoltarea subpopulațiilor Th1 și Th2 de limfocite, inhibând sinteza citochinelor Th1 (IL-2, IFN γ).

Rolul sexosteroidilor

Hormonii steroizi sexuali influențează maturarea și diferențierea timocitelor. Timusul suferă modificări profunde în timpul sarcinii, după gonadectomie sau după administrarea exogenă a hormonilor sexuali. După gonadectomie, masa timusului crește, iar administrarea hormonilor sexuali (estrogen, testosteron) are efecte inverse.

Factorul hipotalamic de eliberare a hormonului luteinizant (RFLH), reglează atât funcția de reproducere, cât și funcția imunitară. Acest hormon se sintetizează nu numai în creier, ci și în gonade, în glandele mamare, în placentă, splină și timus, având rol integrator al funcției neuroendocrine reproducătoare și al funcției imunitare. În timus, limfocitele T sintetizează RFLH și au receptori specifici pentru acest hormon.

Îmbătrânirea sistemului imunitar, la om, începe după 30 de ani și se caracterizează prin creșterea producției de autoanticorpi și diminuarea capacității de a produce anticorpi față de antigenele nonsel. Diminuă sinteza IL-2, dar crește rata sintezei IL-4, IL-5 și IL-6. Aceste schimbări sugerează o creștere numerică a subpopulației de limfocite Th2, în raport cu subpopulația Th1. Diminuă funcția citotoxică. Crește nivelul plasmatic al IL-6, cu rol reglator al sintezei anticorpilor, dar și cu rol în progresia maladiilor autoimune sau a altor procese patologice, ca osteoporoza.

Un rol important în procesul de îmbătrânire se atribuie dehidroepiandrosteronului (DHEA), secretat de corticosuprarenale, sub controlul ACTH. Este un intermediar al biosintezei altor hormoni (testosteronul și estradiolul). DHEA circulă în formă inactivă, de sulfat. Hormonul se activează numai în țesuturile care au DHEA-sulfatază, cu distribuție diferențială în organele limfoide. Nivelul plasmatic al sulfatazei scade odată cu îmbătrânirea sistemului imunitar și scade brusc în diferite boli cronice, inclusiv maladiile autoimune. Administrarea DHEA la rozătoare și om, restabilește funcția imunitară la organisme vârstnice și are efect antagonic corticosteroizilor, care produc atrofia timică. Fig. 136. Organele și celulele influențate de hormoni steroizi sexuali. Acești hormoni pot acționa în timpul dezvoltării celulelor imunitare, dar și direct asupra celulelor mature efectoare.

Hormonul de creștere, prolactina și hormonul tiroidian stimulează maturarea și diferențierea timocitelor. Hipofizectomia sau hiposecreția acestor hormoni hipofizari duce la imunodeficiență și hipoplazia timusului. Hormonul de creștere stimulează intens proliferarea celulelor precursoare ale timocitelor în măduva osoasă. Prolactina stimulează diferențierea celulelor T cu specificitate de antigen în organele limfoide periferice. Hormonul tiroidian stimulează creșterea timusului și a splinei. Șoarecii hipotiroidieni au timus și splină hipoplazică, număr redus de celule TCD8.

Interacțiunile neuro-imuno-endocrine sunt bidirecționale. Țesuturile și celulele sistemului imunitar sintetizează un spectru larg de hormoni neuro-endocrini. Foarte importantă este sinteza CRH, un reglator esențial al răspunsului la stress, în timus, splină, hipofiza anterioară, corticosuprarenale, ovar, testicul, intestin, inimă, plămân. În timus și splină, CRH este sintetizat de celulele T, unde exercită efecte reglatoare autocrine sau paracrine. CRH este de asemenea sintetizat local în focarele inflamatorii acute sau cronice, inclusiv în lichidul sinovial al pacienților cu artrită reumatoidă.

Factori neuroendocrini favorizanți ai maladiilor autoimune umane

Diferențele funcționale cu privire la intensitatea răspunsului axelor hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenaliene (HHC) și hipotalamo-hipofizo-gonadale (HHG) sunt importante pentru înțelegerea manifestărilor autoimune. Maladiile autoimune sunt mult mai frecvente la femei decât la bărbați. De exemplu, raportul pe sexe al tiroiditei autoimune este de 19/1, al lupusului de 9/1, iar al artritei reumatoide, de 3-4/1. Mai mult, maladiile autoimune tind să se dezvolte, să aibă intensitate maximă ori să diminueze, în perioadele de schimbare a activității axei HHG (pubertate, menstruație, sarcină, perioada postpartum, menopauză sau în timpul unui stress psihologic de amploare). Toate aceste perioade sunt asociate cu modificări ale secreției factorului hipotalamic de eliberare a LH, a LH hipofizar, a hormonilor sexuali și a altor hormoni. Frecvența fenomenelor autoimune crește cu vârsta, corelată cu schimbările neuroendocrine.

Artrita reumatoidă este asociată cu o insuficiență a sintezei corticosteroizilor. Nivelul corticosteroizilor plasmatici tinde să se coreleze cu severitatea inflamației, dar pacienții cu afecțiuni de intensitate medie au nivele inferioare ale corticosteroizilor comparativ cu indivizii normali. Nivelul testosteronului la pacienții cu artrită reumatoidă, în special la bărbați, tinde să aibă valori scăzute, iar nivelul estrogenului este nemodificat. Terapia cu testosteron ameliorează maladia. Estrogenii nu par să producă o exacerbare a artritei reumatoide, iar contraceptivele orale încetinesc evoluția maladiei. Odată cu scăderea bruscă a nivelului estrogenilor (perioada postpartum, intervalul care precede menstruația, menopauza), artrita reumatoidă se intensifică. În același timp diminuează secreția de corticosteroizi, deoarece estrogenii influențează axa HHC. Nivelul prolactinei la pacienții cu artrită reumatoidă este variabil (crescut, normal sau scăzut). Artrita reumatoidă se remite frecvent în timpul sarcinii și se reactivează sau se declanșează în perioada postpartum, îndeosebi la femeile care alăptează. Alăptarea este însoțită cu creșterea marcată a secreției de prolactină și cu supresia funcției axei HHC.

Lupusul sistemic eritematos are o dominanță netă la femei, ceea ce denotă rolul hormonilor sexuali în declanșarea și evoluția acestei maladii. În plasma pacienților s-a relevat un dezechilibru între nivelul androgenilor și estrogenilor. Dezechilibrul poate fi primar sau secundar, datorat unei enzime care convertește androgenii la estrogeni. Bărbații cu lupus sunt prevalent hipoandrogenici. Nivelul scăzut al androgenilor favorizează imunitatea mediată humoral, iar estrogenii favorizează autoimunitatea, prin stimularea producerii de prolactină, care are efect activator asupra funcției imunitare. Pacienții cu lupus se caracterizează prin hiperprolactinemie. În timpul sarcinii, maladia se intensifică.

Tiroidita autoimună se declanșează frecvent în perioada postpartum, caracterizată prin hipocortisolemie.

Perioada sarcinii se caracterizează prin supresia imunității mediate celular și menținerea sau chiar creșterea imunității humorale. Setul de citochine sintetizate de celulele Th1 diminuează (IL-2 și IFN γ), ceea ce elimină riscul avortului imunitar. Diminuarea sintezei IFN γ este esențială pentru păstrarea sarcinii, deoarece cantitățile mari favorizează avortul. Nivelul plasmatic al corticosteroizilor, estrogenilor și progesteronei crește. Starea hormonală complexă în timpul sarcinii pare să condiționeze remisia maladiilor autoimune dependente de imunitatea celulară, ca de exemplu artrita reumatoidă și agravarea maladiilor dependente de procese ale imunității humorale, ca de exemplu, glomerulonefrita în lupusul eritematos.

Postpartum, starea hormonală se modifică brusc. Corticosteroizii, estrogenii și progesterona scad la nivele subnormale, iar imunitatea mediată celular se restabilește, ceea ce permite declanșarea sau activarea unor maladii autoimune, așa cum este artrita reumatoidă, datorită creșterii secreției de prolactină.

Perioadele de sarcină și postpartum se caracterizează prin modificări ample ale stării hormonale și sunt asociate frecvent cu declanșarea sau activarea unor maladii autoimune, ceea ce ilustrează rolul mecanismelor endocrine în reglarea funcției imunitare.

BIBLIOGRAFIE

Conținutul acestei cărți a fost redactat pe baza consultării unui număr mare de articole apărute în diferite periodice și a unor capitole speciale sau volume de Imunologie, publicate în tratate de Microbiologie sau de Virologie. Sintezele apărute în Annual Review of Immunology au constituit o sursă informațională de o valoare deosebită.

Periodice

Annual Reviews Biochemistry

Annual Reviews Immunology

Annual Reviews Microbiology

Bulletin de l'Institut Pasteur

Cancer Immunology

Cell

Clinical Microbiology Reviews

EMBO Journal

Immunology Today

Journal of Immunology

Mediators of inflammation

Microbiology and Molecular Biology Reviews

Nature

Scientific American

Science

Cărți

Delves P.J, Roitt I. M. ñ Encyclopedia of Immunology, vol. 1-4, sec. ed., 1998, Acad. Press.

Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. ñ Fields Virology, 3rd edition, Lippincot Raven Publishers, Philadelphia, 1996

Male D., Champion B., Anne Cook ñ Advanced Immunology, J.B. Lippincot Company, 1987.

Patrick S. and Larkin M. J. - Immunological and molecular aspects of bacterial virulence, J. Wiley & Sons, 1995.

Roitt I. M. ñ Essential Immunology, ninth edition, 1997, Blackwell Science

Samter M, Talmage D. W., Frank M. M., Austen K. F., Claman H. N. ñ Immunological diseases, vol. I, II, fourth ed., Boston, Toronto.

Serhan C. N., Ward P. A. - Molecular and Celular basis of Inflammation, 1999, Humana Press.

Sheehan Catherine ñ Clinical Immunology, Principles and Laboratory Diagnosis, sec. edition, 1997, Lippincot, Philadelphia, New York

Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier, 1990

Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, vol. IV Immunology, Ed. Lesslie Collier, A. Balows, M. Sussman, 1998.

Weir D. M., Stewart J. ñ Immunology , seventh edition, Longman Group, UK, 1993.

Zarnea G. ñ Tratat de Microbiologie, vol. IV Imunobiologie, Ed. Academiei Române, 1990.

Zarnea G., Mihăescu Gr. ñ Immunologie, Ed. Universităţii Bucureşti, 1995.

Zwilling B. S., Eisenstein T. K. ñ Macrophage- Pathogen Interactions, 1994, New York, Basel, Hong Kong.